

DER ABBAU VON FLUORBENZOL UND SEINEN HOMOLOGEN  
DURCH *BURKHOLDERIA FUNGORUM* FLU 100  
-  
BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN UND ANWENDUNG IN DER  
ABLUF TREINIGUNG

Dissertation

Von der Fakultät Bau- und Umweltingenieurwissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)  
genehmigte Abhandlung

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Engesser

Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. M. Reuss

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Februar 2008

vorgelegt von:

Dipl.-Ing. Niko Strunk

aus Stuttgart

Universität Stuttgart

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft

Abteilung Biologische Abluftreinigung

Im November 2007



für Helene Lotte



Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten fanden am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Abteilung biologische Abluftreinigung, der Universität Stuttgart statt.

Sie wurde selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt.

© 2007 Niko Strunk

Diese Dissertation einschließlich aller ihrer Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb des Urhebergesetzes ist ohne Zustimmung des Verfassers unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verbreitung in elektronischen Systemen.



## 1. Verzeichnisse

### 1.1. Inhaltsverzeichnis

(Ein stärker untergliedertes Verzeichnis findet sich im Anhang 7.1.)

1.	Verzeichnisse.....	7
1.1.	Inhaltsverzeichnis.....	7
1.2.	Abkürzungsverzeichnis.....	9
1.3.	Trivialnamenverzeichnis.....	9
1.4.	Geräteverzeichnis.....	10
	Zusammenfassung.....	12
	Abstract.....	13
2.	Einleitung.....	14
3.	Grundlagen.....	18
3.1.	Stand der Forschung.....	18
3.2.	Die chemischen Verhältnisse in Halogenaromaten und ihre Auswirkungen auf bakterielle Abbauaktivitäten.....	18
3.3.	Die Grundprinzipien der aeroben Dehalogenierung von Aromaten.....	21
3.4.	Die Grundprinzipien des Halogenaromatenabbaus.....	24
3.5.	Charakterisierung der wichtigsten in dieser Arbeit eingesetzten Substrate.....	32
3.6.	Der Stamm FLU 100.....	46
3.7.	Der Einfluss von freien Halogenidionen.....	46
3.8.	Biofiltersystem im Technikumsmaßstab zur Abreinigung von fluorbenzolbelasteter Abluft.....	47
3.9.	Methoden der Gentechnik.....	59
3.10.	Ansätze aus der Proteomik.....	74
3.11.	Bestimmung der Verdampfungsenthalpie.....	76
4.	Material und Methoden.....	80
4.1.	Verwendete Organismen.....	80
4.2.	Medien.....	80
4.3.	Identifikation und Beschreibung von Bakterienstämmen.....	85
4.4.	Methoden der klassischen Mikrobiologie.....	89
4.5.	Stoffwechsel- und Enzymtests.....	96
4.6.	Genetik.....	98

4.7.	Methoden der Proteomik.....	109
4.8.	Analytik.....	120
4.9.	Reaktoren.....	132
5.	Experimente und Ergebnisse.....	162
5.1.	Der Stamm FLU 100 – Taxonomische Einordnung .....	162
5.2.	Substratpattern.....	165
5.3.	Wachstumskinetiken und Umsatzversuche .....	176
5.4.	Toxische Effekte.....	194
5.5.	Enzymreaktionen .....	204
5.6.	Genetik.....	208
5.7.	Analytische Methoden zur Identifikation von Metaboliten des Aromatenabbaus durch FLU 100 .....	217
5.8.	Proteomik.....	230
5.9.	Betrieb der Biotricklingfilter im Technikumsmaßstab .....	246
6.	Diskussion.....	278
6.1.	Struktur der Diskussion .....	278
6.2.	Der fluorbenzolverwertende Stamm FLU 100.....	278
6.3.	Die metabolische Leistungsfähigkeit des Stammes FLU 100 .....	279
6.4.	Toxizitäten.....	287
6.5.	Enzymreaktionen .....	288
6.6.	Proteomik.....	290
6.7.	Transposonmutagenese und Metabolite.....	291
6.8.	Die Konstruktion des Abbauweges der Monohalogenbenzole im Stamm FLU 100 .....	294
6.9.	Der Einsatz von FLU 100 in Biotricklingfiltern .....	299
6.10.	Abschlussbemerkungen und Ausblick .....	302
7.	Anhang.....	302
7.1.	Ausführliches Inhaltsverzeichnis .....	304
7.2.	Literaturliste.....	313
7.3.	Ergänzungen zu den Ergebnissen .....	329
7.4.	Bildnachweis .....	329
7.5.	Lebenslauf.....	338
7.6.	Danksagung .....	340

## 1.2. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
A	Absorption (Der Index gibt die Wellenlänge an, bei der gemessen wurde [nm])
BTB	Bromthymolblau
BKP	Bromkresolpurpur
BPB	Bromphenolblau
DDT	Di-(chlorphenyl)-2-trichlorethan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN	Elektronegativität
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FAD	Flavinadenindinucleotid, oxidierte Form
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinucleotid, reduzierte Form
FP	Flusspunkt
Hal	Steht in Reaktionsgleichungen und Strukturformeln für ein stabiles Halogenatom (F, Cl, Br, I)
KP	Kondensationspunkt
MM	Minimal Medium
MMB	Minimal Medium Bouillon
NB	Nutrient Broth
NAD	Nicotinsäureamidadenindinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinsäureamidadenindinucleotid, reduzierte Form
OD	Optische Dichte, eine Zahl im Index gibt eine Wellenlänge wieder [nm]
mOD	"milli OD", entspricht der durch 1000 dividierten optischen Dichte
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PVC	Polyvinylchlorid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
X	Steht in Reaktionsgleichungen für ein oxidiertes Reduktionsäquivalent z.B. NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup> , FAD o.ä.
XH <sub>2</sub>	Steht in Reaktionsgleichungen für ein reduziertes Reduktionsäquivalent z.B. NADH + H <sup>+</sup> , NADPH + H <sup>+</sup> , FADH <sub>2</sub> o.ä.

## 1.3. Trivialnamenverzeichnis

Diendiol	1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadien
Muconolacton	4-Carboxymethyl-but-2-en-1,4-olid)
Dienlacton	4-Carboxymethyl-but-2,4-dien-1,4-olid

## 1.4. Geräteverzeichnis

### *Festinstallierte Einrichtungen und Laborgroßgeräte:*

Abzug	WS Laborbau Syke
Autoklaven	Webeco
Cleanbench	steag Laminarflow - Preozesstechnik GmbH, Gerätetyp: LF-MRF-BT300
French - Presse	SLM Instruments Inc., Sim*Aminco French Pressure Cell Press, 40 000 psi Zelle

### *Standard Laborausrüstung:*

pH – Meter	WTW pH – Meter pH 391
Photometer	Pharmacia LKB Ultrospec III
Photometer	Kontron Uvikon 941 Plus
Vakuumpumpe	MLT Labortechnik AG, Vacu-Box PVK 610
Naßschüttler	Infors AG Modell HT
Wärmebad	Fa. Memmert

### *Gaschromatograph:*

Basisgerät	Carlo Erba HRGC 5300 MegaSeries
Verstärker	Carlo Erba EL500
Integrator	Shimadzu C-R6A CHROMATOPAC
Säule	Supelco SPB-5 Capillary Column

### *Ionenchromatographie:*

Basisgerät	Metrohm 761 Compact IC mit Standard –
Trennsäule	Metrohm Standard – Anionensäule

### *Mikroskopie:*

Labormikroskop	Zeiss KF 2; 45 07 11 mit Zeiss Okular 46 40 26 01
Lupe	
Axioskop	

*Waagen:*

Laborwaage	Satorius BP 2100 S
Laborwaage	Satorius BA 310 P
Analysenwaage	

*Zentrifugen:*

450 mL Gefäße	Sigma 6 K 10
Eppcup, ungekühlt	Eppendorf Centrifuge 5415 C
Eppcup, ungekühlt	Eppendorf Centrifuge 5319 C
Eppcup, gekühlt	Heraeus Sepatech Biofuge 13 R

*Geräte zum Betrieb der Reaktoren:*

Dosimat	Metrohm Dosimat 665 / 765
FID	
Kompressor	
Umwälzpumpe	

## Zusammenfassung

Der Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 besitzt die unter den Bakterien äußerst selten zu findende Eigenschaft, Fluorbenzol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können. Außerdem kann der Stamm auch die anderen Monohalogenbenzole sowie Benzol und Toluol – als Reinstoff oder in beliebigen Mischungen – vollständig produktiv verwerten. In dieser Arbeit wurden ein Teil des Abbauweges sowie die Einsatzmöglichkeiten des Stammes im Rahmen der biologischen Abluftreinigung erforscht.

Der Stamm FLU 100 kann mit Halogenatomen oder Alkylgruppen di- und höher substituierte Benzole nicht abbauen. 3-Fluorphenol ist hingegen abbaubar, jedoch wird hierzu, abweichend vom Fluorbenzolabbauweg, mindestens ein weiteres Enzym, eine Phenoloxigenase exprimiert. Zur Aufklärung der Aromatenabbauwege wurde *Burkholderia fungorum* FLU 100 mittels einer Tn5-Variante (pCro2) mutiert. Die Untersuchung der gewonnenen Transposonmutanten lieferte zahlreiche Metabolite des oberen Abbauweges. Das initiale Dioxygenasesystem greift die angebotenen benzoiden Substrate stets in Orthoposition zum Substituenten an. Dadurch wird die Aromatizität aufgehoben, es werden in 3-Position substituierte Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diole (Diendiole) gebildet, welche beim Abbau von Monohalogenaromaten das Halogenatom in 3-Position tragen. Diese Metabolite werden zu den entsprechenden, an der 3-Position substituierten Catecholen zyklisiert, welche wiederum zu 2-substituierten Muconaten oxidativ gespalten werden. Aus den Muconaten entstehen in einem weiteren Schritt Muconolactone. Die Catechol-1,2-dioxygenase weist dabei klassische Typ – II - Kinetik auf. Der Stamm FLU 100 verfügt über eine bemerkenswert hohe Fluorid – Toleranz. Er stellt das Wachstum erst ab 200 mmol/L im Medium ein.

Zwei Biotricklingfilter im Technikumsmaßstab wurden konstruiert und über anderthalb Jahre hinweg betrieben. Als Packungsmaterial kam Blähton zum Einsatz. Es zeigte sich, dass fluorbenzolbelastete Abluft mit einer geringen Eliminationskapazität von ca. 5 g/m<sup>3</sup>h abgereinigt werden konnte, der Wirkungsgrad lag dabei um die 50 %. Eine äquimolare Mischung aus Fluorbenzol und Chlorbenzol konnte mit einer Eliminationskapazität zwischen 6 und 10 g/m<sup>3</sup>h behandelt werden. Dabei lag der Wirkungsgrad bezüglich des Fluorbenzols bei ca. 50 %, der des Chlorbenzols bei ca. 90 %. In den Reaktorsümpfen sammelten sich Fluorwasserstoff und Chlorwasserstoff als saure Metabolite an. Diese konnten mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert werden. Weiße, kristalline Ablagerungen traten mit der Zeit in den Reaktorsümpfen auf. Diese enthielten entgegen den Erwartungen nur sehr wenig Calciumfluorid (Fluoranteil 5 %), sondern vor allem Calcium, Sauerstoff, Phosphor und Silizium.

## Abstract

The strain *Burkholderia fungorum* FLU 100 offers the very rare potential to utilize fluorobenzene as sole source of carbon and energy. In addition, chlorobenzene, bromobenzene, iodobenzene, toluene and benzene are mineralized, even in random mixing ratios. In this work this potential is explored with respect to application in waste air purification. The work consists of two major parts, first, the investigation of the biochemical degradation pathway of the fluorobenzene degrading bacterium FLU 100, second, construction, operation and application of a biotrickling filter system.

The degradation by FLU 100 is characterized by the fact that it – after a change of the substrate (or mixture type) – proceeds without a lag phase. FLU 100 mineralizes mono-halogen benzenes almost stoichiometrically, the conversion of toluene is more complex, in dependence of the pH, metabolites may appear. FLU 100 attacks higher halogenated or alkylated aromatic compounds, but they are not degraded and dead-end metabolites appear. Transposon mutants of FLU 100 revealed that these substrates are degraded via an initial dioxygenation in direct vicinity of the substituent, yielding a 3-substituted cyclohexa-3,5-diene-1,2-diol ("dienediol"). This metabolite is then dehydrogenated resulting in a 3-substituted catechol, which is then cleaved by a catechol-1,2-dioxygenase to 2-halo- or 2-methylmuconate. A catechol-2,3-cleaving (metypyrocatechase) activity was never observed in FLU 100. The kinetics of this enzyme matches that of the type II ortho cleavage enzymes. Strain FLU 100 is very resistant to free fluoride anions in the growth medium. It also degrades 3-fluorophenol and 3-chlorophenol completely, after induction of a phenol monooxygenase.

Two biotrickling filters were constructed on a laboratory scale and operated over one and a half years. The packing consisted of expanded clay balls with diameters beyond 11 mm. One reactor was used to investigate the degradation efficiency for fluorobenzene. The efficiency was about 50 %. The elimination capacity was 5 g/m<sup>3</sup>h on average which is still low for economically productive biofiltration. The other biotrickling filter was used to clean an air stream, polluted with a mixture of chlorobenzene and fluorobenzene in the same quantity of material. This experiment yielded a degradation efficiency on average of 90 % for chlorobenzene and 50 % for fluorobenzene. The overall elimination capacity was between 6 and 10 g/m<sup>3</sup>h. In both reactors the mineral acids produced in the swamp by the biological were neutralized by sodium hydrogen carbonate. In the swamps of the reactors were some white crystalline residues that, in contrast to the expectations, contained only a small amount (5 %) of calcium fluoride but mainly calcium, oxygen, phosphorus and silicon from the medium and from the packing of the filters.

## 2. Einleitung

Der Mensch hat zu allen Zeiten bewusst oder unbewusst, direkt oder indirekt die stoffliche Qualität seiner Umwelt verändert. Bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts waren die Veränderungen begrenzt und führten nur punktuell zu sichtbaren Destabilisierungen ökologischer Gleichgewichte, beispielsweise dem Smog in London aufgrund von Schwefeldioxidemissionen. Seit der industriellen Revolution nahmen antropogene Emissionen von Schadstoffen stark zu und führten schließlich zu makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Ökosysteme. Weil immer mehr Menschen am technischen Wohlstand teilhaben wollen und auch können, besteht die große Gefahr, dass sich die Emissionen in Zukunft weiter verstärken können und weltweit die Ökosysteme, in ihrer Diversität, ihrer Leistungsfähigkeit und schließlich in ihrer Existenz bedrohen (Alloway 1996). Die Aufgabe besteht also darin, solche Emissionen zu vermindern, wenn nicht sogar zu verhindern, indem Produktionsprozesse entsprechend gestaltet werden, oder dort, wo es nicht möglich ist, entsprechende wirksame Reinigungsverfahren von produktionsbedingten Stoffströmen einzusetzen.

Diese Arbeit widmet sich dem biologischen Abbau von Monohalogenaromaten, insbesondere dem Fluorbenzol, welches xenobiotische Eigenschaften aufweist. Solche Aromaten werden in großen Mengen in der chemischen Industrie hergestellt und weiterverarbeitet. Es ist unvermeidlich, daß diese Halogenorganika während dieser Prozesse auch in die Umwelt gelangen können (Alexander 1975, Hutzinger 1981, Ribbons 1987, Knackmuss 1983 und Douglas 1987).

Vor wenigen Jahren wurde ein Bakterienstamm isoliert, *Burkholderia fungorum* FLU 100 (Strunk 2000), welche die selten zu findende Eigenschaft aufweist, Fluorbenzol und die anderen Monohalogenaromaten sowie Benzol und Toluol als Reinsubstrat und auch in Mischungen vollständig mineralisieren zu können. In Bezug auf Fluorbenzol gibt es in diesem Kontext relativ wenige Vorarbeiten, neben der schon genannten Arbeit (Strunk 2000) wurde von Carvalho 2002, 2005A und 2005B eine Fluorbenzol - verwertende Spezies beschrieben. Es liegt also nahe, den Stamm FLU 100 ausführlich zu untersuchen und darauf hin zu prüfen, in welcher Weise er in der biologischen Abluftreinigung eingesetzt werden kann.

In der Konsequenz stellt sich die vorliegende Arbeit die Aufgabe, die Grundlagen der Abbauphänomene und die Möglichkeiten eines prinzipiellen technischen Einsatzes aufzuklären. Entsprechend dieses typisch ingenieurwissenschaftlichen Ansatzes, in denen Aspekte von Grundlagen und Anwendung kombiniert werden, ist diese Arbeit gegliedert. Das folgende Kapitel 3 ist den Grundlagen gewidmet. Es stellt den Stand der Forschung dar, die Eigenschaften der eingesetzten Substrate, die Prinzipien der Abbauwege, die Grundlagen der angewandten Methoden und die Techniken der biologischen Abluftreinigung. In Kapitel 4 werden die verwendeten Materialien und Methoden sowie die Vorgehensweisen zusammengestellt. In einem naturgemäß etwas umfangreicheren Kapitel 5 werden die

durchgeführten Experimente und gewonnenen Ergebnisse dargestellt und, wo es hilfreich erscheint, einer ersten Bewertung unterzogen. Eine besondere Rolle werden hierbei die Transposonmutagenese (Kapitel 5.6.) und die Reaktorexperimente (Kapitel 5.8.) spielen. Die Diskussion in Kapitel 6 gliedert sich im Wesentlichen in drei Teile, in die Diskussion der Ergebnisse zu den Grundlagen der klassischen mikrobiologischen Eigenschaften von FLU 100, in die Erarbeitung der einzelnen Schritte des Abbauweges, welche in den Vorschlag eines Abbauweges zusammengeführt werden, sowie in die Diskussion der technischen Anwendungsmöglichkeiten

.

# Kapitel 3: Grundlagen

### 3. Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die biochemischen Grundlagen des bakteriellen Halogenaromatenabbaus dargestellt werden. Zudem wird eine Einführung in die Techniken der biologischen Abluftreinigung gegeben sowie ein Überblick über die Grundlagen der verwendeten Methoden.

#### 3.1. Stand der Forschung

Über den bakteriellen Abbau von Fluorbenzol lagen zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten außer den eigenen Vorarbeiten (Strunk 2000) nur noch die Arbeiten von Carvalho, 2002 vor. Daher wird im Folgenden der Stand der Forschung des allgemeinen Halogenaromatenabbaus dargestellt.

#### 3.2. Die chemischen Verhältnisse in Halogenaromaten und ihre Auswirkungen auf bakterielle Abbauaktivitäten

Halogenatome haben aufgrund ihrer Elektronegativität (EN) einen elektronenziehenden induktiven Effekt (Tabelle 1). Andererseits haben sie, wenn sie als Substituenten am Phenylring gebunden sind, wegen ihrer freien Valenzelektronenpaare einen elektronenspendenden, mesomeren Effekt auf das Ringsystem. Beide Effekte haben bei allen vier greifbaren Monohalogenbenzolen konträre Auswirkungen auf das aromatische System, der induktive Effekt deaktiviert den Aromaten, der mesomere Effekt aktiviert ihn (Klessinger 1972, Vollhard 2000).

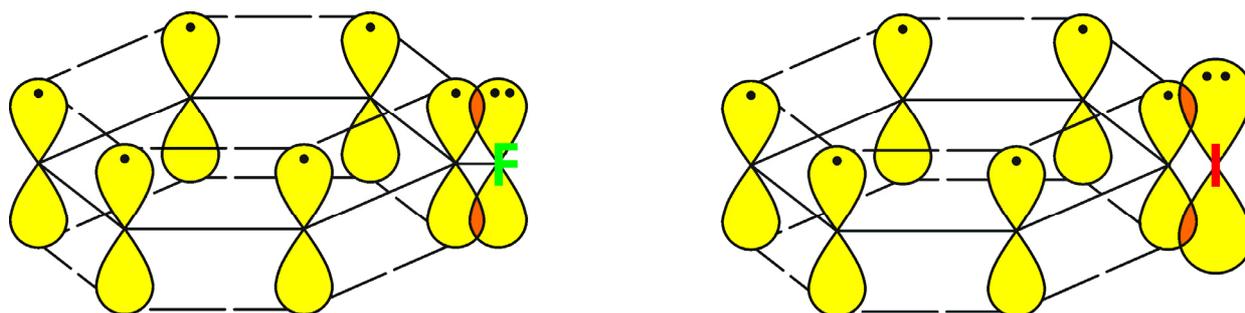
**Tabelle 1: Bindungsverhältnisse in Halogenaromaten**

Geordnet hinsichtlich der Elektronegativitäten, der Energien und der Bindungsradien. Dargestellt sind auch die Unterschiede der jeweiligen Elektronegativität zu der des Kohlenstoffs ( $\Delta EN$ ).

Element	Fluor	Chlor	Brom	Iod	Wasserstoff	Kohlenstoff
Elektronegativität (EN)	4,0	3,2	3,0	2,7	2,2	2,5
$\Delta EN$ bzgl. C	1,5	0,7	0,5	0,2	0,3	0
Bindungsenergie an $C_6H_5$ [KJ/mol]	528	402	339	272	465	k.a.
Kovalenzradius [pm]	64	99	114	133	77	32
Van der Waals - Radius [pm]	147	175	185	200	120	170

*Mesomerer Effekt:*

Für den mesomeren Effekt ist das Verhältnis zwischen  $2p_z$  – Orbital und dem Kovalenzradius bestimmend. Das  $2p_z$  – Orbital des Halogenatoms überlappt mit dem  $\pi$  – Elektronensystem des Aromaten. Mit zunehmender Masse des Halogens wird jedoch dessen Kovalenzradius (siehe Tabelle 1, Bild 2) immer größer und damit die Überlappungszone aus geometrischen Gründen immer kleiner, der mesomere Effekt wird schwächer (siehe hierzu die Veranschaulichung in Bild 1)



**Bild 1: Elektronische Eigenschaften der Monohalogenaromaten**

Die  $2p_z$  – Atomorbitale des Kohlenstoffskeletts und der Halogenatome im Fluorbenzol und Iodbenzol. Die Überlappungszone ist beim Iodbenzol kleiner als beim Fluorbenzol.

*Induktiver Effekt:*

Fluor hat die höchste Elektronegativität aller Halogene, d.h. bei ihm ist die elektronenanziehende Wirkung am stärksten ausgeprägt. Je schwerer die Halogene werden, umso kleiner wird ihre Elektronegativität, so ist die Iod – Kohlenstoff - Bindung sogar unpolarer als die Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindung.

Bei allen vier Monohalogenbenzolen überwiegt der induktive Effekt, der Aromat ist leicht deaktiviert. Die Stärke der Deaktivierung nimmt dabei mit der zunehmenden Masse des Halogenatoms ab. Somit enthält Fluorbenzol den am stärksten deaktivierten Aromaten aller Monohalogenbenzole. Astat, das fünfte und schwerste Halogen dürfte sich in diese homologe Reihe einfügen. Die Existenz von Astatbenzol wurde zwar bestätigt (Holleman 2007), aber aufgrund der Instabilität des Astats stehen keine Daten zu dieser Verbindung zur Verfügung.

Der deaktivierende Effekt der Halogene ist kumulativ, je höher der Aromat mit Halogenatomen substituiert ist, umso stärker ist er deaktiviert und umso mehr Energie müssen die Mikroorganismen aufwenden, um seine Aromatizität aufzuheben und ihn angreifen zu können.

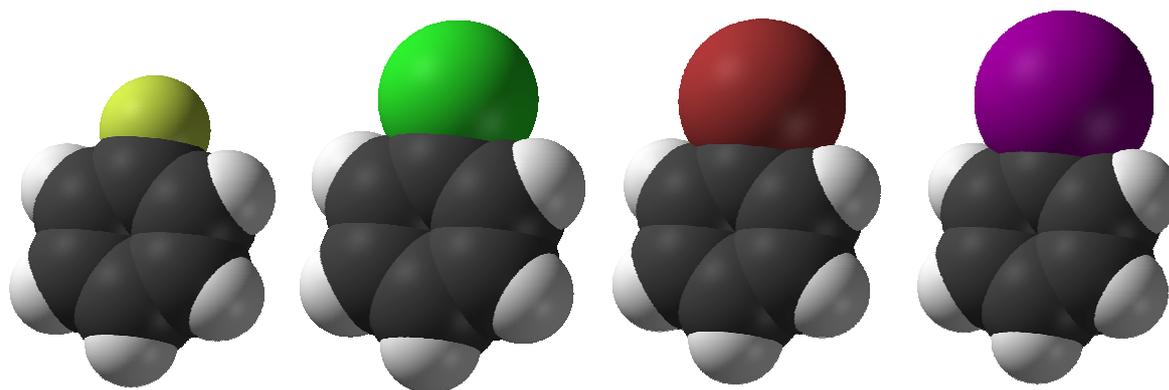
*Zur Sonderstellung des Fluors im Periodensystem der Elemente:*

Der Name "Fluor" leitet sich von flux (lat.) = Fluss ab, da das meistverbreitete Fluormineral, der Flussspat ( $\text{CaF}_2$ ) schon in früher Zeit den Erzen als Flussmittel beigemischt wurde, um sie durch Herabsetzung des Schmelzpunktes leichter flüssig zu machen.

Fluor ist das elektronegativste und das reaktionsfähigste aller Elemente. Es wurde 1886 von Moissan erstmals elementar dargestellt, nachdem es bereits von Sir Humphry Davy als Element erkannt wurde (Pilgrim 1950). Es ist das leichteste der Halogene und bildet mit allen Elementen außer Helium, Neon und Argon binäre Verbindungen. Fluor verfügt über keine d - Orbitale, es ist zu keiner Oktettaufweitung fähig. In seinen Verbindungen trägt es immer die formale Oxidationszahl  $-1$ , da alle anderen Elemente elektropositiver als Fluor sind. Die einzige Ausnahme ist elementares Fluor ( $\text{F}_2$ ), hier ist die Oxidationszahl per Definition 0.

Die Fluor – Kohlenstoff - Bindung ist aufgrund des Elektronegativitätsunterschiedes von 1,5 stark polar, außerdem lässt sich das Fluoratom in seinen Bindungen nur sehr schlecht polarisieren.

Der Radius von Fluoratomen in kovalenten Bindungen und deren Raumerfüllung ähnelt dem von Wasserstoffatomen. Dieses ermöglicht die Substitution von Wasserstoff durch Fluor in Substraten, ohne dass sterische Hemmungen im Substrat oder bei der Bildung eines Substrat-Enzym-Komplexes auftreten. Fluoridionen nehmen ebenso wie Chlorid- und Bromidionen in biologischen Systemen an keinerlei Redoxreaktionen teil, können also als metabolisch inert angesehen werden.



**Bild 2: Kalottenmodelle von Fluor-, Chlor-, Brom- und Iodbenzol**

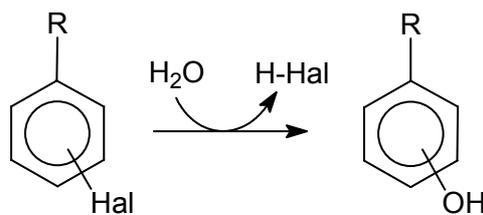
Das Fluoratom weist einen ähnlichen Kovalenzradius wie Wasserstoff auf, die schwereren Halogenatome sind deutlich größer (Die Bilder stammen aus der Wikipedia und sind als gemeinfrei gekennzeichnet).

### 3.3. Die Grundprinzipien der aeroben Dehalogenierung von Aromaten

Mikroorganismen haben vier grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten, um Halogensubstituenten aus einem Aromaten zu eliminieren. Allen ist gemein, dass dabei das Halogenatom formal als Halogenwasserstoff anfällt (Schlömman 1991, Strunk 2003, Natarajan 2005, Pieper 2006, Reineke 2006).

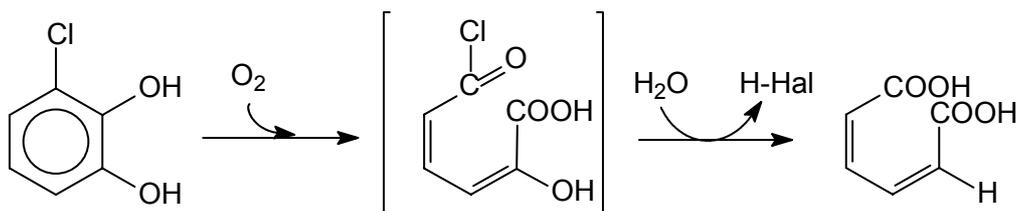
#### *Hydrolytische Dehalogenierung:*

Hier erfolgt ein elektrophiler Angriff von Wasser. Dabei werden eine Hydroxylgruppe in das Substrat eingeführt, und das Halogen wird als Halogenwasserstoff abgespalten. Dies kann mit Enzymhilfe erfolgen (Strunk 2003) (Bild 3) oder auch spontan nach der Spaltung des Substrats durch eine Catecholdioxygenase (Mars 1997) (Bild 4). Höher chlorierte Aromaten werden hydrolytisch dehalogeniert (Marinucci 1979, Husain 1980, Apajalahti 1987, Abraham 2002).



#### **Bild 3: Enzymatisch hydrolytische Halogeneliminierung am Aromaten**

Durch einen Enzymangriff wird der Halogensubstituent gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht. Dabei wird ein Wassermolekül verbraucht.



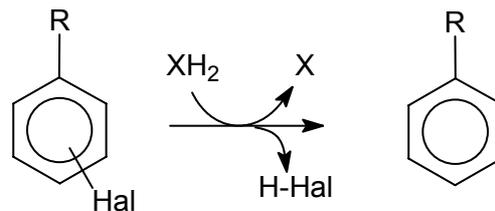
#### **Bild 4: Spontan hydrolytische Halogeneliminierung**

Der Catechol-2,3-Dioxygenaseangriff auf ein halogeniertes Brenzcatechin führt zu einem labilen Carbonsäurehalogenid. Dieses kann spontan, d.h. ohne Enzymhilfe, hydrolysiert werden.

*Reduktive Dehalogenierung:*

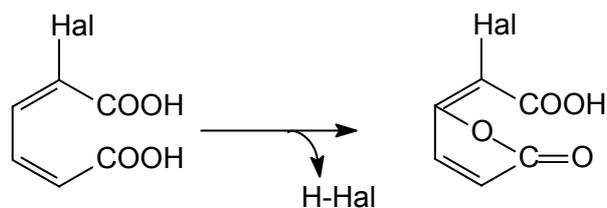
Hier wird ein Wasserstoffatom in den Aromaten mittels eines Enzyms unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalentes eingeführt. Das zweite Wasserstoffatom des Reduktionsäquivalentes bildet zusammen mit dem eliminierten Halogenatom den Halogenwasserstoff (Bild 5).

Dieser initiale Eliminationsweg wird vor allem im anaeroben Milieu eingeschlagen (Strunk 2003).

**Bild 5: Reduktive Halogeneliminierung an aromatischen Systemen**

Der Halogensubstituent am Benzolring wird durch eine Reduktase in den entsprechenden Halogenwasserstoff überführt. Dabei wird ein Reduktionsäquivalent verbraucht und ein Wasserstoffatom in den Ring eingebaut.

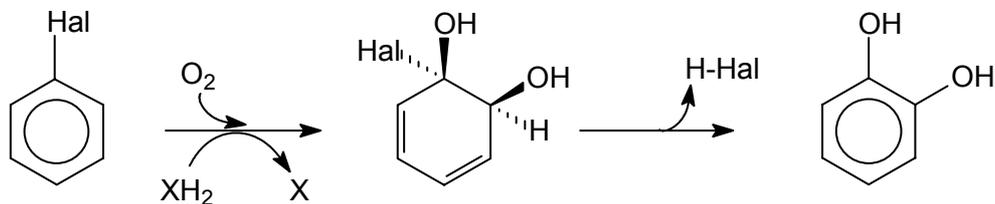
Die reduktive Eliminierung von Halogenen kann auch später in der Reaktionskette, an nichtaromatischen Systemen erfolgen, z.B. durch eine Muconatcycloisomerase (Nishino 1992; Engesser 1990), vergleiche Bild 6.

**Bild 6: Reduktive Halogeneliminierung an einem nichtaromatischen System**

Durch den Abbau eines Halogenaromaten ist ein halogeniertes Muconat entstanden, dessen Halogenatom reaktiv eliminiert werden kann.

*Oxidative Dehalogenierung:*

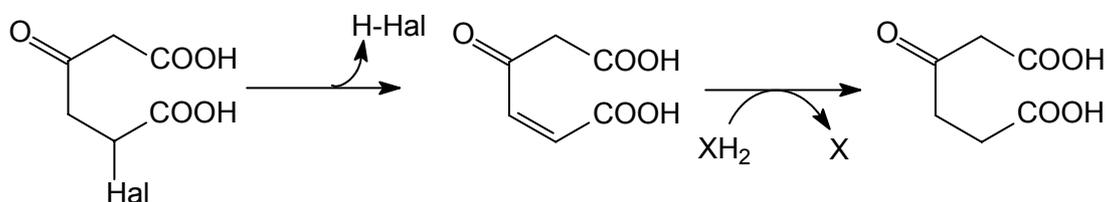
Es erfolgt ein initialer Dioxygenaseangriff. Das dabei gebildete Diendiol eliminiert unter Rearomatisierung ein Molekül Halogenwasserstoff (Vora 1988) (siehe Bild 7).

**Bild 7: Oxidative Halogeneliminierung**

Durch einen Dioxygenaseangriff und anschließender Dehydrogenierung wird ein Halogensubstituent unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalentes und eines Sauerstoffmoleküls eliminiert. In den Ring werden zwei Hydroxylgruppen eingebaut. Solcherlei Reaktionen stehen oftmals am Anfang einer Abbaureaktionskette.

*Spontane Halogeneliminierung:*

Ein Molekül, das ein Halogenatom und eine Carboxylgruppe am selben Kohlenstoffatom trägt (siehe Bild 8), kann bei geeigneter Konstitution das Halogenatom auch spontan eliminieren (Franck-Moßkroß 1998). Beobachtet wurde dies beim Stamm *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. Hier wird beim Abbau von Chloraromaten das Halogenatom im Orthoweg nicht eliminiert, sondern verbleibt im Substrat bis zur Stufe des 3-Oxo-5-chloradipats. Diese Verbindung vermag spontan Chlorwasserstoff zu eliminieren (Pieper 1986, Chapman 1976). Das entstandene Maleylacetat wird danach, unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalentes, in 3-Oxoadipat umgewandelt (siehe Bild 8, Kaschabek 1992, 1993 und 1995, Müller 1996, Kasberg 1997).

**Bild 8: Spontane Halogeneliminierung**

3-Oxo-5-chloradipat eliminiert spontan Chlorwasserstoff, das dabei entstandene Maleylacetat kann mit Enzymhilfe in 3-Oxadipat überführt werden.

### 3.4. Die Grundprinzipien des Halogenaromatenabbaus

Für Bakterien und andere Lebewesen, welche die ökologische Nische der Destruenten besetzen ist es aus energie- und stoffökonomischen Gründen wichtig, die angebotenen Substratmoleküle möglichst rasch in wenige, zentrale Intermediate wie beispielsweise Catechol (Brenzcatechin) oder Protocatechusäure zu überführen. Dieses "Prinzip der Ökonomie" wird auch "Channeling" oder "Funneling" genannt und ist ein wichtiges Kennzeichen kataboler Stoffwechselwege. Allerdings wird dies hier nicht so streng wie beispielsweise beim Hexoseabbau verwirklicht. Catechole können durchaus auch Halogen-, Alkyl- oder Carboxylsubstituenten tragen. Diese werden im Laufe des Abbauweges eliminiert. In Sonderfällen wird dies sogar erst durch angepasste Enzyme des Tricarbonsäurezyclus vollführt (Engesser 1991).

Die Aromatenabbauwege gliedern sich in den oberen Teil, der vom Ausgangssubstrat zum zentralen Metabolit führt. Von diesem aus startet der untere Abbauweg, hier wird Acetyl – CoA oder Pyruvat produziert, welche in die zentralen Stoffwechselwege der Zelle einmünden.

#### 3.4.1. Der obere Aromatenabbauweg, initiale Dioxygenierung und anschließende Dehydrogenierung

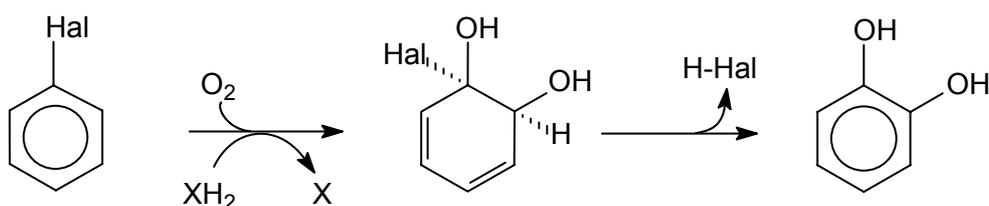
Benzol und abgeleitete Verbindungen werden durch einen initialen Oxygenaseangriff in ein Dihydrodiol überführt. Dabei wird die Aromatizität aufgehoben, es muss also die Resonanzenergie des Aromaten aufgebracht werden. Die Reaktion kann in einem einzigen Schritt erfolgen, in diesem Fall wird molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) durch eine Dioxygenase mittels eines aus einem Reduktionsäquivalent stammenden Elektrons aktiviert. Es wird ein Peroxidradikal ( $O_2^-$ ) gebildet. Dieses wird durch das aktive Zentrum des Enzyms mit dem zu aktivierenden Aromaten in Kontakt gebracht, so dass dieser oxidiert werden kann. Es bildet sich ein Dihydrodiol. Alternativ kann dieser Metabolit auch durch zwei sequenzielle Monooxygenaseangriffe gebildet werden. Als Zwischenmetabolit tritt dabei ein Phenol auf.

Das Dihydrodiol wird durch eine Dehydrogenase (Fong 1996) wieder rearomatisiert, die beiden in das Molekül eingeführten Hydroxylgruppen bleiben dabei erhalten, es entstehen Brenzcatechine. Beide Enzyme, die initiale Oxygenase (oder initiale Oxygenasen) und die Dehydrogenase bilden eine Einheit. Ihre Gene sind oft im selben Operon codiert (Takizawa 1994, Pollmann 2001). Die Hydroxylgruppen der Brenzcatechine aktivieren den Aromaten, so dass diese Verbindungen sehr reaktionsfreudig und nur im sauren Milieu stabil sind. Bei pH - Werten über 7 oligo- und polymerisieren die Catechole durch radikalische Mechanismen (Sánchez-Cortés 2001). Vom Catechol aus können nun zwei unterschiedliche Reaktionswege eingeschlagen werden. Beiden ist gemein, dass sie von einem weiteren Dioxygenaseangriff eingeleitet werden. Dieses Mal wird die Aromatizität endgültig aufgehoben (Kapitel 3.4.2.).

Im Falle der Monohalogenbenzole sind, bedingt durch die Konstitution der Produkte und Edukte, drei Reaktionswege möglich (siehe Bild 9 – 11).

*Dioxygenaseangriff in Ipsoposition mit anschließender Dehydrogenierung:*

Die Dioxygenase greift den Aromaten unmittelbar an der Position eines Halogensubstituenten an. Ein eventuell vorhandenes Halogenatom kann bei der der initialen Dioxygenierung folgenden Dehydrogenierung eliminiert werden (Bild 9, Schreiber 1980, Renganathan 1988).

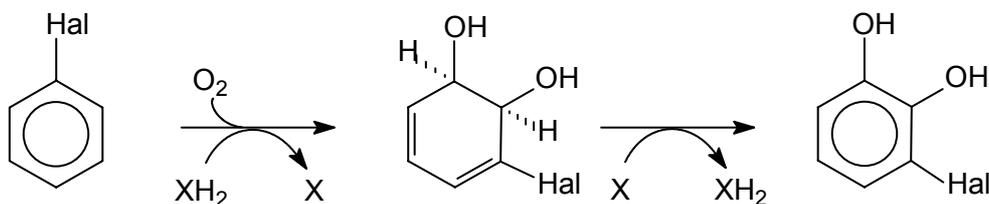


**Bild 9: Initialer Dioxygenaseangriff in Ipsoposition**

Der Angriff erfolgt in Ipsoposition bezüglich des Halogensubstituenten auf ein Monohalogenbenzol. Unter Halogenwasserstoffeliminierung erfolgt eine Rearomatisierung. Es werden zwei Hydroxylgruppen in den Ring eingebaut.

*Dioxygenaseangriff in Orthoposition mit anschließender Dehydrogenierung:*

Bei dieser sterischen Variante des Dioxygenaseangriffs wird der Benzolring unmittelbar neben einem Halogensubstituenten oxidiert. Hierbei verbleibt das Halogenatom auch nach der folgenden Dehydrogenierung im Ring. Es entsteht ein 3-Halogenbrenzcatechin (Bild 10).

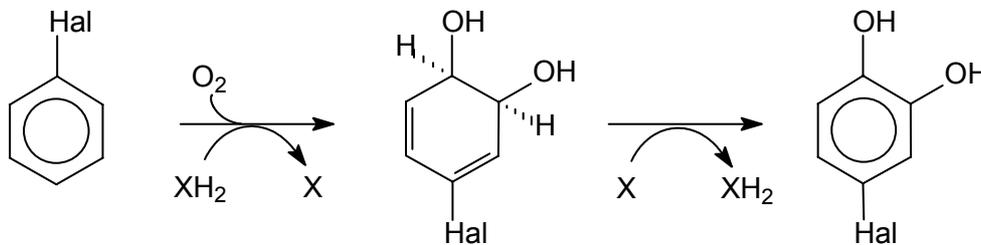


**Bild 10: Initialer Dioxygenaseangriff in Orthoposition**

Der Angriff erfolgt in Orthoposition bezüglich des Halogensubstituenten auf ein Monohalogenbenzol. Es wird kein Halogenwasserstoff gebildet. Das Halogen verbleibt im Ringsystem, es entsteht ein 3-Halogenbrenzcatechin.

*Dioxygenaseangriff in Metaposition mit anschließender Dehydrogenierung:*

Auch bei dieser Variante kann das Halogenatom nicht eliminiert werden. Die Dioxygenase greift das Ringsystem zwei Positionen versetzt bezüglich eines Halogensubstituenten an. Es entsteht ein 4-Halogenbrenzcatechin (Bild 11)



**Bild 11: Initialer Dioxygenaseangriff in Metaposition**

Der Angriff erfolgt in Metaposition bezüglich des Halogensubstituenten auf ein Monohalogenbenzol. Es wird kein Halogenwasserstoff gebildet. Das Halogen verbleibt im Ringsystem, es entsteht ein 4-Halogenbrenzcatechin.

Es entsteht nur im ersten Fall (Dioxygenaseangriff in Ipsoposition) das Channelingsprodukt Brenzcatechin. Die im zweiten (Dioxygenaseangriff in Orthoposition) und dritten Fall (Dioxygenaseangriff in Metaposition) entstehenden halogenierten Brenzcatechine erfordern speziell angepasste Enzyme für den unteren Abbauweg.

### 3.4.2. Der untere Abbauweg, Ringspaltung und weitere Oxidation des Substrates

Der weitere Abbauweg der Brenzcatechine kann über zwei grundsätzlich verschiedene Abbauwege erfolgen, diese sind in Bild 12 dargestellt.

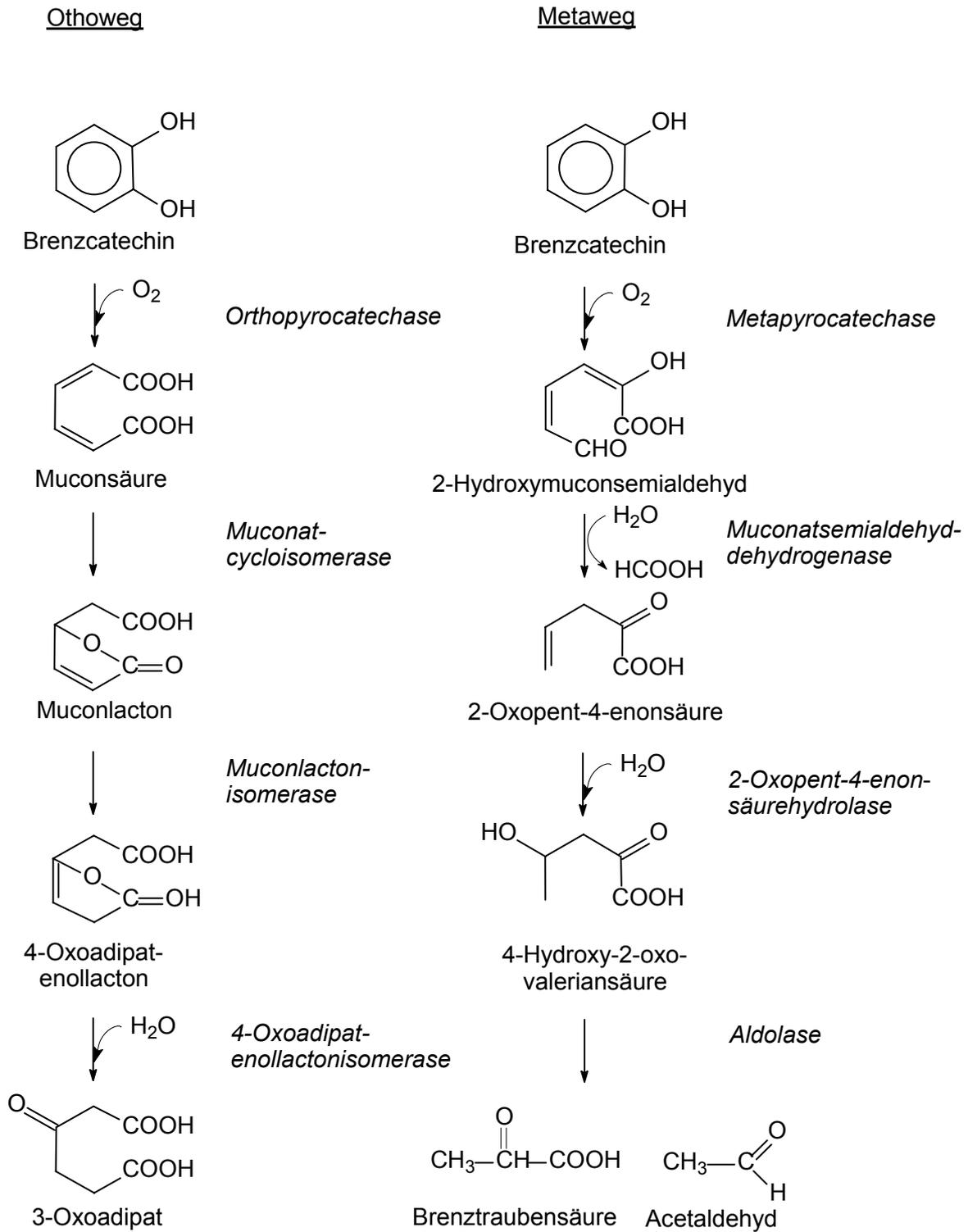
*Orthospaltung (intradiolische Spaltung, 3-Oxo adipatweg, englisch:  $\beta$ -ketoadipate pathway):*

Die eigentliche Orthospaltung findet in der ersten Reaktion statt (siehe Bild 12), es wird orthoständig zur Hydroxylgruppe gespalten, es entsteht eine Muconsäure. Das beteiligte Enzym ist eine Dioxygenase, die Orthopyrokatechase oder auch Catechol-1,2-Dioxygenase. Im zweiten Schritt wird die Muconsäure lactonisiert, das dafür verantwortliche Enzym ist eine Muconatlactonase. Das so gebildete Lacton wird durch eine Muconatlactonisomerase in ein Enlacton überführt, welches dann durch eine Hydrolase zu 3-Oxo adipat umgesetzt wird. Das 3-Oxo adipat wird im "kleinen" Zyklus des Coenzyms A in Succinat und Acetyl-CoA gespalten, die direkt in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden können (Kaschakek 2002, Göbel 2002).

*Metaspaltung (Extradiolische Spaltung):*

Auch hier findet die eigentliche Spaltung schon im ersten Schritt durch eine Dioxygenase statt (Metapyrocatechase, Catechol-2,3-Dioxygenase, Nozaki 1970), dabei entsteht ein "Semialdehyd" (siehe Bild 12). Im zweiten Schritt wird durch eine Hydrolase ein Molekül Formiat abgespalten, zurück bleibt eine Oxopentensäure. Danach addiert eine Hydrolase ein Wassermolekül, es entsteht eine Hydroxyoxopentensäure, welche durch eine Aldolase zu Pyruvat (Brenztraubensäure) und Acetaldehyd gespalten wird. Das im ersten Reaktionsschritt gebildete "Semialdehyd" ist oftmals intensiv gelb gefärbt, was zu dessen Bestimmung ausgenutzt werden kann.

Die nächsten beiden Kapitel (3.4.2.1. und 3.4.2.2.) enthalten eine Zusammenstellung und Bewertung der verschiedenen Realisierungsmöglichkeiten für den produktiven Abbau von Monohalogenaromaten über den Ortho- und Metaweg.



**Bild 12: Schematische Darstellung des Ortho- und Metaabbauweges von unsubstituiertem Brenzcatechin**

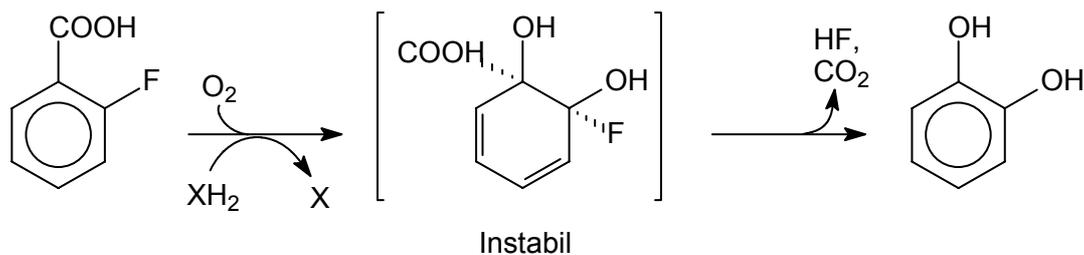
Die Namen der beteiligten Enzyme sind kursiv geschrieben.

### 3.4.2.1. Der Orthoweg

Es gibt zwei Möglichkeiten für Bakterien, Monohalogenbenzole über den Orthoweg abzubauen. Die initiale Dehalogenierung ist die einfachste Variante der Dehalogenierung, denn hier erfolgt schon im ersten Schritt der Abbaukette die Dehalogenierung (Beil 1997, 1998 und 1999, Strunk 2003). Viele Bakterien eliminieren jedoch das Halogen nicht im ersten Abbauschritt aus dem Halogenaromaten, sondern bauen diesen via Halogenbrenzcatechine ab (Schlömman 1988, Reineke 1988 und 1984, Müller 1986).

*Orthospaltung nach initialer Dehalogenierung:*

Das nach der initialen Dehalogenierung gebildete Catechol kann ohne Probleme und Spezialenzyme über den Orthoweg vollständig abgebaut werden. So wird 2-Fluorbenzoat durch *Pseudomonas* sp. B13-2 initial dehalogeniert (Strunk 2003, Gaillard 2006), siehe Bild 13.

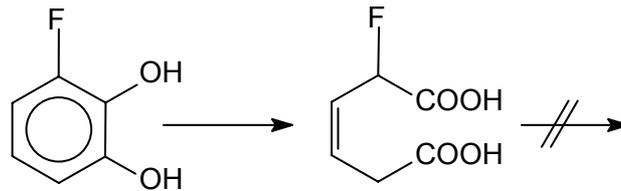


#### Bild 13: Initiale Halogeneliminierung

Mittels eines initialen Dioxygenaseangriffs eliminiert *Pseudomonas* sp. B13-2 nicht nur das Halogenatom aus dem Aromaten sondern auch die Carboxylgruppe. Das so gebildete unsubstituierte Brenzcatechin kann völlig unproblematisch und vollständig mineralisiert werden.

*Orthospaltung von 3-Halogenocatechol:*

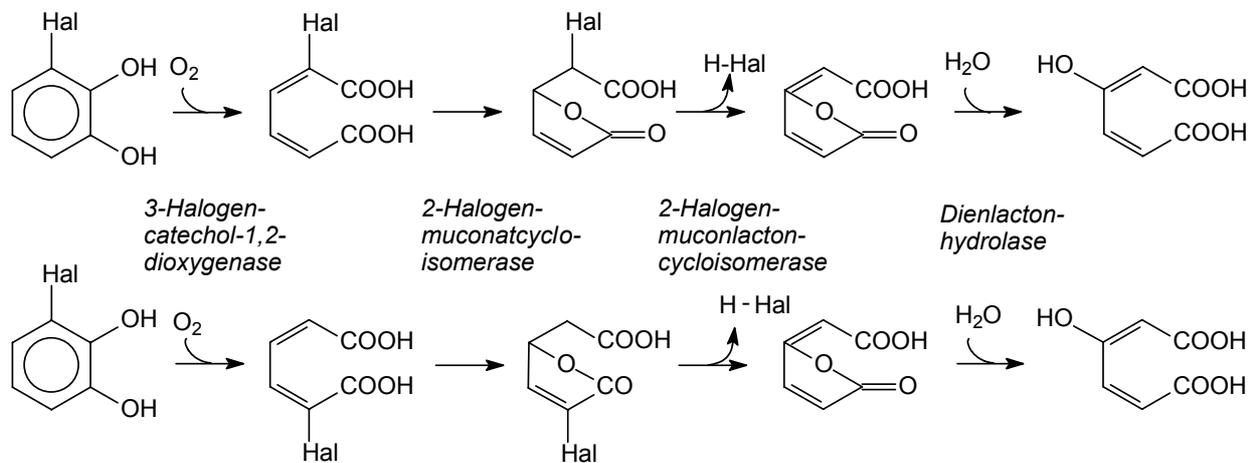
Der Abbau von Fluorbenzol ohne initiale Dehalogenierung könnte zur Bildung von 3-Fluorocatechol führen. Dieses Intermediat entsteht auch beim Abbau von Fluorbenzoaten durch *Pseudomonas* sp. (Vora 1988) und FLB 300 (Engesser 1992), siehe Bild 14. Überdies hat sich gezeigt, dass Bakterien des Stammes *Pseudomonas putida* B13 das 3-Fluorocatechol zum 2-Fluormuconat spalten, dieses Intermediat aber nicht weiter verwerten können, es bleibt als Dead – end - Metaboliten im Medium zurück. Im Jahre 2003 demonstrierten Solyanikova et al., dass der Rohextrakt einer grampositiven Spezies (*Rhodococcus opacus* 1cp) dazu befähigt ist 2-Fluormuconat umzusetzen (Solyanikova 2003).



**Bild 14: Produktion eines Dead – end – Metaboliten beim Abbau von 3-Fluorocatechol**

Der Stamm *Pseudomonas putida* B13 baut Fluorbenzoate zum 3-Fluorocatechol ab, welches als Dead – end – Metabolit liegen bleibt.

Nach Boersma, 1998, existieren folgende Abbauwege des 3-Halogencatechols:



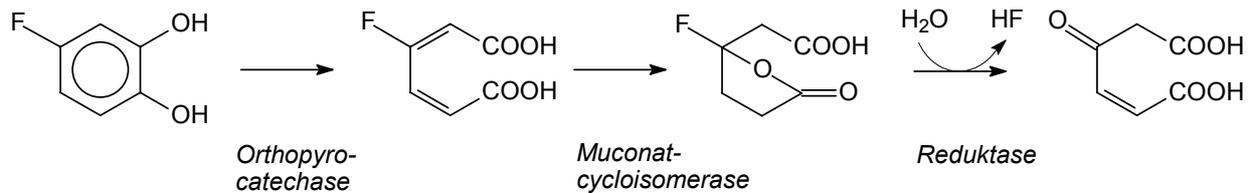
**Bild 15: Zwei produktive Abbauwege von 3-Halogencatechol**

In beiden Fällen wird das Halogen durch die 2-Halogenmuconlactonisomerase reaktiv eliminiert. Beide Abbauwege unterscheiden sich nur durch die Stellung des Halogens im Lacton.

Das Halogenatom wird durch eine 2-Halogenmuconlactonisomerase eliminiert. Beide gezeigten Abbauwege wurden für 3-Chlorocatechol beobachtet (Boersma 1998). Es gibt Anzeichen, dass diese Abbauwege ganz oder teilweise auch mit 3-Fluorocatechol funktionieren.

*Orthospaltung von 4-Halogencatechol:*

Ein hypothetischer Abbau von Fluorbenzol könnte über den Metaboliten 4-Fluorocatechol laufen. 4-Fluorocatechol entsteht als Intermediat z.B. beim Abbau von Fluorbenzoaten durch FLB 300 (Engesser 1992). Bild 16 zeigt die beobachteten Abbauschritte.



**Bild 16: Ein Abbauweg für 4-Fluorcatechol**

Hydrolytische Elimination des Fluoratoms durch eine Hydrolase im Abbauweg des 4-Fluorcatechols durch den Stamm FLB 300.

Zuerst wird das 4-Fluorcatechol zu einem Muconat oxidiert, dann erfolgt der gewohnte Muconatcycloisomeraseangriff, es entsteht ein Lacton, welches durch das Fluoratom aktiviert ist, sodaß ein halogeneliminierender Hydrolaseangriff energetisch erleichtert ist. Das so entstandene Produkt, 3-Oxohex—4-en-1,6-dicarbonsäure, kann durch eine Reduktase, unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalentes, leicht in 3-Oxadipat überführt werden.

### 3.4.2.2. Der Metaweg

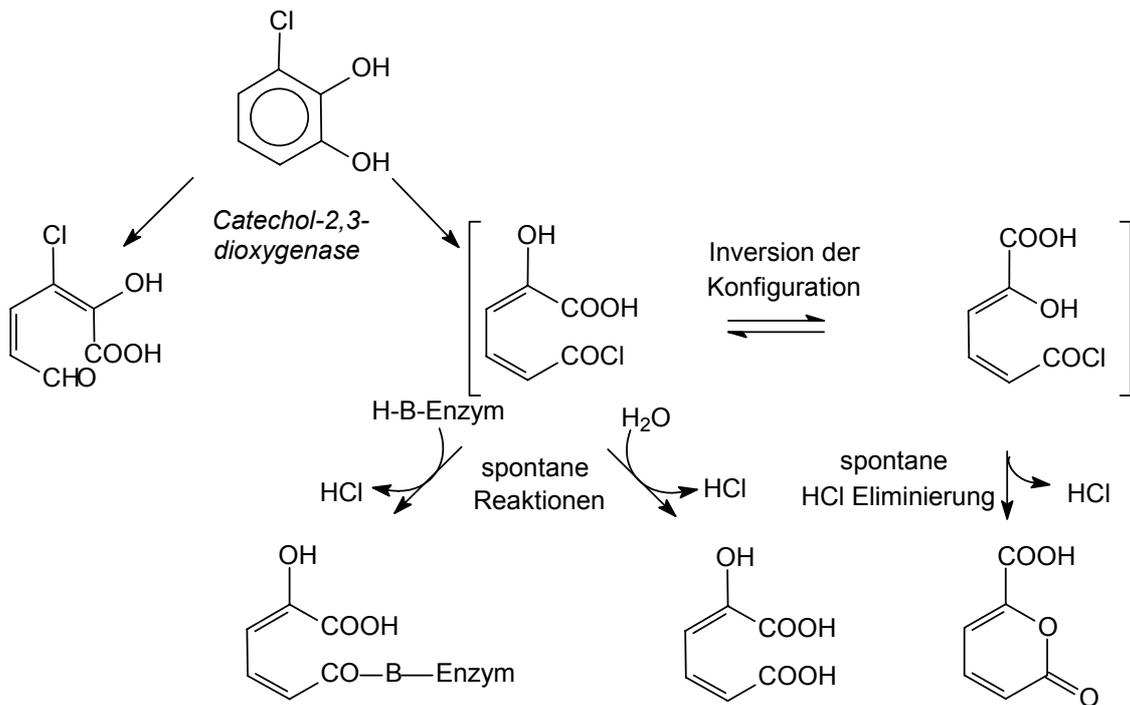
#### *Metaspaltung von 3-Halogencatechol:*

Der Abbau von Chlorbenzol über den Metaweg ohne initiale Dehalogenierung wurde beobachtet (Kaschabek 1998, Mars 1997, 1999, Göbel 2004), siehe Bild 17. Die Dioxygenase des Stamms *Pseudomonas putida* GJ31 greift das Chlorbenzol in Orthostellung zum Halogen an, das resultierende 3-Chlorcatechol wird durch eine Catechol-2,3-Dioxygenase distal zu einem gelben Semialdehyd oder proximal zu einem sehr reaktiven Carbonsäurechlorid umgesetzt. Aus dem Semialdehyd kann das Halogenatom z.B. reaktiv eliminiert werden.

Das Carbonsäurechlorid reagiert teilweise mit nucleophilen Gruppen der Catechol-2,3-Dioxygenase (Klecka 1981, Iwaki 1982, Junca 2003), dabei wird das Enzym deaktiviert ("suicide inactivation", siehe auch Bartels 1984, Strunk 2003). Ein anderer Teil des Carbonsäurechlorids wird spontan zu einem Muconat hydrolysiert. Der letzte Teil des Carbonsäurechlorids isomerisiert aufgrund seiner Keto – Enol Tautomerie und kann dann durch Lactonisierung das Chloratom als HCl eliminieren.

#### *Metaspaltung von 4-Halogencatechol:*

4-Halogencatechol kann in der Regel unproblematisch extradiolisch gespalten werden (Arenschorf 1995).



**Bild 17: Der Abbau von 3-Chlorbrenzcatechin über den Metaweg**

Durch den Angriff einer Catechol-2,3-Dioxygenase können zwei Produkte entstehen, ein chloriertes "Semialdehyd" und ein sehr reaktives Carbonsäurechlorid. Dieses kann sich an die Catechol-2,3-Dioxygenase anlagern und sie somit deaktivieren ("suicide deactivation"). Das Chloratom des Carbonsäurechlorids kann aber auch durch eine spontane Hydrolyse ohne die Mithilfe eines Enzyms eliminiert werden. Das Carbonsäurechlorid liegt im Gleichgewicht mit einem seiner Stereoisomere vor. Aus beiden Molekülen kann spontan ein Molekül Chlorwasserstoff hydrolytisch eliminiert werden.

### 3.5. Charakterisierung der wichtigsten in dieser Arbeit eingesetzten Substrate

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Substrate diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit für den bakteriellen Abbau eingesetzt wurden, wobei auf die Schlüsselchemikalien Fluorbenzol und Chlorbenzol intensiv eingegangen wird. Deren Synthese, Eigenschaften und Verwendungszwecke sollen in diesem Kapitel dargestellt werden. Die wichtigsten Stoffdaten sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Ein Seitenaspekt dieser Diskussion liegt auch darin, dass man sich vor dem Beginn von Arbeiten mit Chemikalien über deren Eigenschaften gründlich informiert (Koch 1989). Die genaue Kenntnis der Stoffe, mit denen unter Umständen jahrelang gearbeitet wird, ist für deren sichere Handhabung unerlässlich. Diesen Aspekt muss man vor dem Hintergrund sehen, dass Halogenaromaten wichtige Produkte der chemischen Industrie sind. Sie werden im 100 Kilotonnenmaßstab produziert und verbraucht. Die wichtigsten physikalischen und toxikologischen Daten sind in tabellarischer Form am Ende dieses Kapitels zusammengefasst.

### 3.5.1. Fluorbenzol

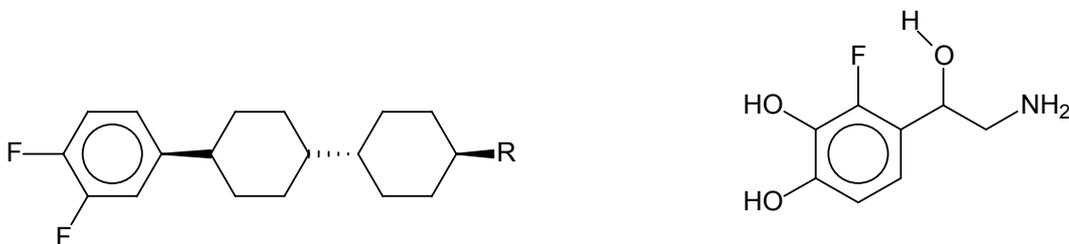
#### *Allgemeines und Verwendung:*

Fluorbenzol ( $C_6H_5F$ ; PhF) (Phenylfluorid, Monofluorbenzol, englisch: fluorobenzene) ist eine farblose, brennbare und aromatisch riechende Flüssigkeit. Es ist in Wasser schwer, in den meisten organischen Lösungsmitteln leicht löslich.

Fluorbenzol wurde erstmals von Otto Wallach (1847 – 1931, Universität Bonn, später Universität Göttingen, Nobelpreis für Chemie 1910) im Jahre 1886 nach dem weiter unten dargestellten Syntheseweg erstmals hergestellt und beschrieben (Wallach 1886).

Fluorbenzol wird großtechnisch hergestellt und wird zu Schädlingsbekämpfungsmitteln, Pharmazeutika (Goldman 1986), vor allem Psychopharmaka sowie zu Polymeren und Kunstharzen weiterverarbeitet. Es wird auch zur Aufkohlung von Spezialstählen verwendet. Fluorbenzol dient auch für die Synthese von Flüssigkristallen für TFT – Displays. Dabei steht TFT für "thin film transistor", diese sind teilweise durchsichtige Feldeffekttransistoren, von denen pro Pixel drei Stück verbaut werden. Dies ist der Grund, warum in den letzten Jahren die weltweite Produktionsmenge von Fluorbenzol drastisch erhöht wurde.

Bild 18 zeigt einige Beispiele für fluororganische Verbindungen, für die Fluorbenzol als Edukt herangezogen wird:



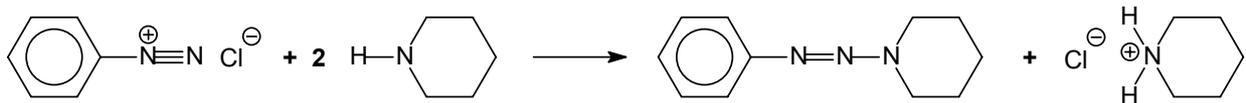
**Bild 18: Beispiele technischer Produkte mit fluorierten aromatischen Systemen**

Links: Beispiel eines "Super Fluorinated Material", SFR, eingesetzt als Flüssigkristallkomponente in TFT - Displays. R steht für einen Alkylrest. Rechts ein pharmazeutisch eingesetzter  $\beta$  – Antagonist (Noradrenalin Analoga).

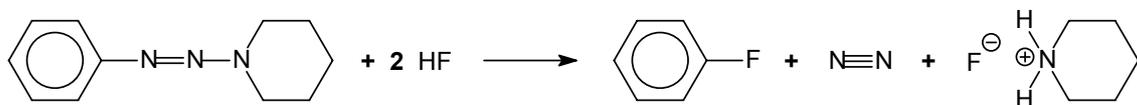
*Synthese nach Otto Wallach:*

In einer zweistufigen Reaktion (Bild 19) wird zuerst Phenyldiazoniumchlorid in das entsprechende Piperidinaddukt umgewandelt, welches im zweiten Schritt mit Fluorwasserstoff gespalten wird.

Erster Schritt:



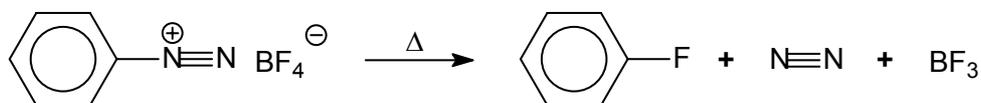
Zweiter Schritt:



**Bild 19: Die Synthese von Fluorbenzol nach Otto Wallach**

*Synthese nach Bergmann:*

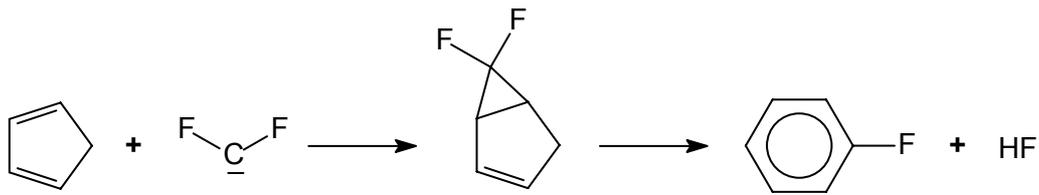
Ein weiterer Syntheseweg (Bergmann 1956 und Flood 1943) für Fluorbenzol besteht aus der thermischen Behandlung Phenylazoniumborofluorid, vergleiche Bild 20. Dieses Salz wird erhitzt, bis die exotherme Reaktion von allein weiterläuft. Das entstehende Fluorbenzol und das Bortrifluorid können durch eine fraktionierte Destillation abgetrennt werden. Die Ausbeute wird mit 50 % angegeben. Hierbei handelt es sich um die Balz - Schliemann – Reaktion. Industriell wird die Ausbeute erhöht, indem die Reaktion in Gegenwart von einer geringen Menge Kupferstaub katalytisch in Aceton bei Zimmertemperatur durchgeführt wird (Baeyer 1988).



**Bild 20: Die Synthese von Fluorbenzol nach E. D. Bergman**

*Radikalischer Syntheseweg:*

Bei diesem Syntheseweg von Fluorbenzol wird Cyclopentadien mit aus Fluoralkanen pyrolytisch erzeugtem Difluorcarben in Kontakt gebracht (Bild 20). Intermediär bildet sich ein Cyclopropanaddukt. Dieses lagert sich unter Fluorwasserstoffelimination zum Fluorbenzol um.



**Bild 21: Technische Synthese von Fluorbenzol**

Die Synthese von Fluorbenzol durch Ringerweiterung mittels eines intermediär erzeugten Carbenderivats.

*Toxische Wirkungen:*

Fluorbenzol reizt akut Augen und Schleimhäute, es kann durch die Haut resorbiert werden und ruft bei chronischer Exposition Leber- und Nierenschäden hervor. In hoher Konzentration inhaliert wirkt Fluorbenzol betäubend. Zu möglichen mutagenen, kanzerogenen und teratogenen Wirkungen des Fluorbenzols liegen keine Daten vor.

*Ökologische Wirkungen:*

Fluorbenzol ist ein echtes Xenobiotikum und besitzt einen höheren Dampfdruck und eine wesentlich geringere Wasserlöslichkeit als Chlorbenzol. So ist anzunehmen, dass sich Fluorbenzol in der Umwelt hauptsächlich in der Atmosphäre ansammelt und dort photolytisch und durch Hydroxylradikale abgebaut werden kann. Die EPA (Environmental Protection Agency der USA) gibt eine Halbwertszeit für Fluorbenzol in der Atmosphäre von 23,3 Tagen an. Zur Persistenz und dem Verhalten von Fluorbenzol in der Umwelt liegen keine Daten vor. Aufgrund der in den Vorarbeiten (Strunk 2000) erzielten Ergebnisse ist anzunehmen, dass der Abbauphänotyp für Fluorbenzol in der Natur nur äußerst selten anzutreffen ist. Für Fluorbenzol gibt die EPA ein Biokonzentrationsfaktor (BCF) von 11,17 an, damit reichert es sich über die Nahrungskette nur mäßig stark an. Der Oktanol / Wasser - Koeffizient wird mit  $\text{Log } K_{\text{OW}} = 2,19$  angegeben. Fluorbenzol erwies sich im Amestest als nicht mutagen.

Des Weiteren ist anzunehmen, dass Fluorbenzol im Boden und im Wasser wesentlich schwerer durch Mikroorganismen degradierbar ist als Chlorbenzol. Bei Emissionen von Fluorbenzol in das Grundwasser oder in den Boden ist wahrscheinlich mit einer höheren Persistenz als beim Chlorbenzol zu rechnen.

### 3.5.2. Chlorbenzol

#### *Allgemeines und Verwendung:*

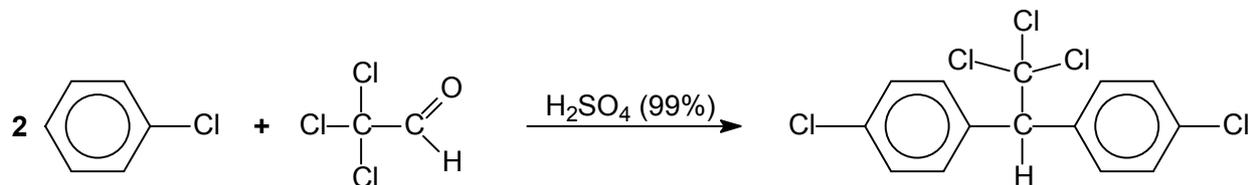
Chlorbenzol ( $C_6H_5Cl$ , PhCl) (Phenylchlorid, Monochlorbenzol, MCB, Benzol chloratum, englisch: chlorobenzene) ist wie Fluorbenzol eine farblose, brennbare, leicht bewegliche und aromatisch nach Mandeln riechende Flüssigkeit. In Wasser ist es schwerlöslich, jedoch ist es in Wasserdampf flüchtig. In organischen Lösungsmitteln ist Chlorbenzol gut löslich. Es kommt auch natürlicherweise vor (Gribble 1994 und 1996).

Erstmals wurde es im Jahre 1851 durch die Reaktion von Phenol mit Phosphorpentachlorid synthetisiert.

Chlorbenzol ist eine thermisch sehr stabile Verbindung, es zersetzt sich im glühenden Eisenrohr zu chlorierten Biphenylen. Bei  $450\text{ }^\circ\text{C}$  und unter Druck gesetzt, wird Chlorbenzol von wässrigen Alkalien zu Phenol hydrolysiert.

Chlorbenzol wird hauptsächlich als Ausgangsprodukt für weitere Synthesen verwendet. Wichtige Produkte, die aus Chlorbenzol hergestellt werden, sind: Phenol, Pestizide, Farbstoffe, Riechmittel, pharmazeutische Produkte und Textilhilfsstoffe. Es dient des Weiteren als Lösemittel für Fette, Harze und Kautschuk.

Chlorbenzol diente und dient als Edukt für die Synthese von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), ein jahrzehntelang weltweit verwendetes Pestizid, dessen Syntheseweg in Bild 22 beispielhaft dargestellt ist:



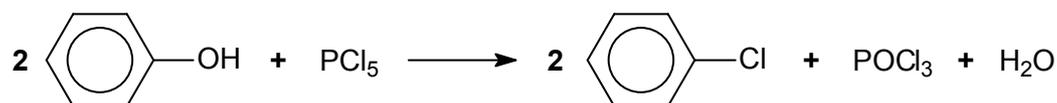
**Bild 22: Beispiel einer Synthese mit Chlorbenzol als Ausgangsprodukt**

Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) wird durch die Reaktion von Chlorbenzol mit Trichloroacetaldehyd in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure (99 %) hergestellt.

In der Bundesrepublik Deutschland werden 70 000 Tonnen Chlorbenzol pro Jahr produziert. Global werden jährlich etwa 300 000 Tonnen Chlorbenzol über Abwässer und Abluft emittiert. Chlorbenzol ist ein echtes Xenobiotikum. Bakterien mit der Fähigkeit, Chlorbenzol abzubauen, sind jedoch in der Natur wesentlich weiter verbreitet als Fluorbenzolabbauer.

*Klassische Synthese:*

Phenol reagiert mit Phosphorpentachlorid, einem starken elektrophilen Chlorierungsmittel zu Chlorbenzol, Phosphorylchlorid und Wasser, siehe Bild 25. Es finden noch Nebenreaktionen statt, bei denen Chlorwasserstoff und Chlorgas freigesetzt werden (Baeyer 1988).

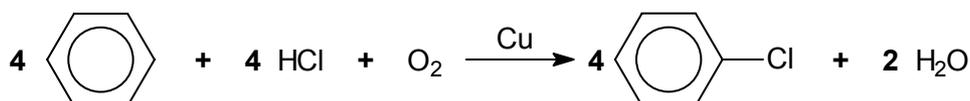
**Bild 23: Die klassische Synthese von Chlorbenzol (1851)**

Phenol wird durch Phosphorpentachlorid chloriert.

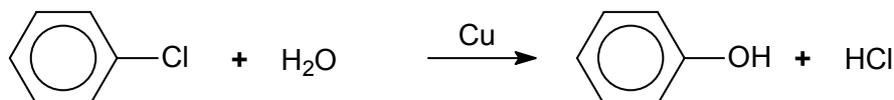
*Synthese von Chlorbenzol als Intermediat im Raschigverfahren:*

Chlorbenzol kann aus Chlorwasserstoff, Sauerstoff und Benzol unter Einbeziehung eines Kupferkatalysators synthetisiert werden (Erste Stufe des Raschig – Verfahrens zur Phenolsynthese, Baeyer 1988). Die Reaktion verläuft stark exotherm, es muss für eine gute Wärmeabfuhr gesorgt werden. In der zweiten Stufe wird das Chlorbenzol katalytisch hydrolysiert. Bis zu 99 % der eingesetzten Salzsäure kann zurück gewonnen werden.

Erster Schritt:



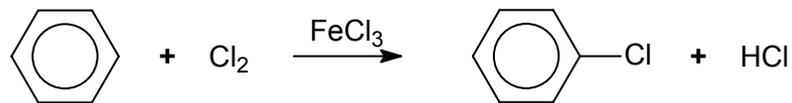
Zweiter Schritt:

**Bild 24: Im Raschig – Verfahren wird Phenol aus Benzol synthetisiert**

In der ersten Stufe des Verfahrens wird Benzol mit Hilfe von Chlorwasserstoff und Sauerstoff chloriert. Dieser Reaktionsschritt ist stark exotherm. Der zweite Schritt führt zum Phenol.

*Synthese durch direkte Chlorierung:*

Benzol kann direkt chloriert werden, dazu wird eine Lewisäure wie Eisen(III)chlorid als Katalysator benötigt, siehe Bild 25. Der Prozess ist schwer zu steuern, es entstehen stets auch kleine Mengen von Dichlor- und Trichlorbenzolen.



**Bild 25: Synthese von Chlorbenzol durch eine elektrophile Substitution**

*Toxische Wirkungen:*

Chlorbenzol führt bei chronischer Intoxikation zu Leber- und Nierenschädigungen. Chlorbenzol erwies sich bei Ratten weder mutagen noch kanzerogen, aber teratogene Wirkungen wurden beobachtet.

*Ökologische Wirkungen:*

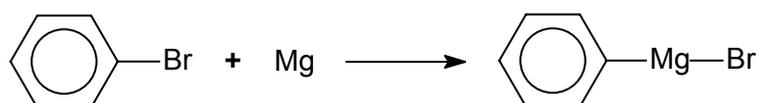
Aufgrund seiner guten Löslichkeit und seines hohen Dampfdrucks besitzt Chlorbenzol eine hohe Mobilität in der Umwelt. Es besitzt im Vergleich zu den höher chlorierten Benzolen eine geringere Persistenz. Chlorbenzol wird vor allem photolytisch und durch Hydroxylradikale in der Atmosphäre abgebaut, im Boden erfolgt ein mikrobieller Abbau (Dermietzel 1999 und 2000, Demnerova 2003). Der Octanol / Wasser - Koeffizient wird von der EPA mit  $\text{Log } K_{\text{OW}} = 2,64$  angegeben. Chlorbenzol wirkt auf Fische und Algen gleichtoxisch erst in der doppelten Konzentration von Fluorbenzol. Der bakteriell Abbau von Chlorbenzol in Wasser oder Luft ist oft beschrieben worden (siehe Reinecke 1984, Spain 1990, Pettigrew 1991, Nishino 1992, Zaitsev 1995, Mpanias 1998, van der Meer 1997 und 1998, Rosenbrock 2000, Song 2000, Vogt 2002A, 2002B und 2004, Müller 2003, Pieper 2004, Göbel 2004, Monferrán 2005).

### **3.5.3. Brombenzol**

*Allgemeines und Verwendung*

Brombenzol ist eine farblose, brennbare und aromatisch riechende Flüssigkeit. Es ist in Wasser schwer- und in Alkoholen, Ether und Benzol leicht löslich. Brombenzol wird als Speziallösungsmittel und als Zwischenprodukt zur Synthese von bromierten organischen

Verbindungen, beispielsweise für Grignard - Phenylierungen benutzt (Baeyer 1988). Hierbei reagiert Magnesium mit Brombenzol in Diethylether oder Tetrahydrofuran zu Phenylmagnesiumbromid (Bild 26), welches mit Carbonylgruppen weiterreagieren kann. Bei der Produktion einiger pharmazeutischer Produkte wird Brombenzol eingesetzt.



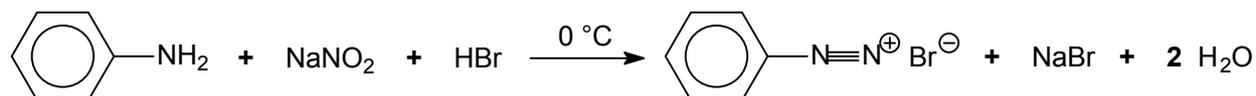
**Bild 26: Die Synthese von Phenylmagnesiumbromid, einem Grignardreagenz**

*Synthesewege von Brombenzol:*

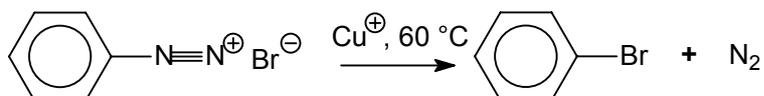
Durch eine elektrophile Bromierung von Benzol in Gegenwart von Eisen(III)-bromid kann Brombenzol gewonnen werden. Der Mechanismus (siehe Bild 25) erfolgt analog zur entsprechenden Synthese von Chlorbenzol.

Alternativ kann Brombenzol auch mittels der Sandmeyer – Reaktion gewonnen werden (Bild 27). Hierbei wird Anilin mit Natriumnitrit und Bromwasserstoff in Gegenwart von Kupfer(I)- Ionen zum Phenylazoniumbromid umgesetzt. Dieses geht unter Stickstoffelimination in Brombenzol über.

Erster Schritt:



Zweiter Schritt:



**Bild 27: Synthese von Brombenzol nach dem Sandmeyerverfahren**

Aus Anilin, Bromwasserstoff und Natriumnitrit wird Phenylazoniumbromid gewonnen, welches mit Katalysatorhilfe bei leicht erhöhter Temperatur zu Brombenzol umgesetzt wird.

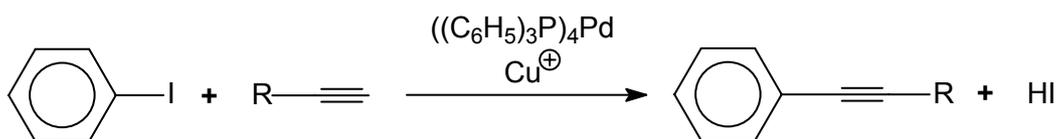
*Toxische und ökologische Wirkungen:*

Brombenzol wirkt wie alle Monohalogenbenzole lebertoxisch. Inhaliert kann es betäubend wirken. Ökologisch verhält sich Brombenzol höchstwahrscheinlich sehr ähnlich wie Chlorbenzol (Sperl 1988, Zaitsev 1995).

### 3.5.4. Iodbenzol

#### *Allgemeines und Verwendung*

Iodbenzol ist eine farblose, brennbare Flüssigkeit von leicht stechendem Geruch (Lucas 1939). Wird es längere Zeit dem Licht ausgesetzt, färbt es sich braun aufgrund von freigesetztem Iod. Iodbenzol ist in Wasser schwerlöslich, in Alkoholen, Aceton, Ether und Benzol leichtlöslich. Von allen vier Monohalogenbenzolen ist es das reaktivste, die Kohlenstoff – Iod Bindung ist schwächer als die entsprechenden anderen Halogen – Kohlenstoff - Bindungen. Daher wird es zu vielen organischen Synthesen herangezogen. Iodbenzol eignet sich zur Präparation von Grignardverbindungen. Es wird auch bei Sonogashira-Kupplungsreaktionen (Bild 28) eingesetzt (Sonogashira 1975). Hierbei wird ein Phenylring an ein Acetylen kondensiert, ohne dass dessen Struktur beeinflusst wird. Iodbenzol wurde früher zur Herstellung von iodhaltigen Röntgenkontrastmitteln verwendet.



#### **Bild 28: Beispiel einer Sonogashirakupplung**

Iodbenzol reagiert mit einem substituierten Acetylen mit Hilfe eines komplexen Katalysatorsystems unter Elimination von Iodwasserstoff. Die Acetylenstruktur bleibt dabei erhalten.

#### *Synthesewege von Iodbenzol:*

Iodbenzol kann mittels der im vorherigen Kapitel beschriebenen Sandmeyer - Reaktion hergestellt werden, allerdings muss Bromwasserstoff durch Kaliumiodid ersetzt werden. Iodbenzol wird auch durch Erhitzen von Benzol mit elementarem Iod in konzentrierter Salpetersäure im Reflux synthetisiert (Dains 1941). Weitere Synthesewege sind: Umsetzen von Benzol mit Iodchlorid und Zinkchlorid als Katalysator oder die Reaktion von Phenylmagnesiumchlorid mit Iodchlorid.

#### *Toxische und ökologische Wirkungen:*

Iodbenzol wirkt sehr aggressiv auf Schleimhäute. Zur ökologischen Wirkung von Iodbenzol ist wenig bekannt (Zaitsev 1995). Es dürfte aber aufgrund seiner Instabilität in der Umwelt recht rasch abiotisch angegriffen werden.

### 3.5.5. Toluol

#### *Allgemeines und Verwendung:*

Toluol (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>) (Methylbenzol, Monophenylmethan, Phenylmethan, Toluol, englisch: toluene) ist eine farblose, brennbare, aromatisch riechende Flüssigkeit. Es ist in Wasser schwerlöslich, mit Ethanol, Diethylether, Aceton, Methylenchlorid, Chloroform, Hexan und Schwefelkohlenstoff ist es in jedem Verhältnis mischbar. Der Name "Toluol" leitet sich vom Tolubalsam ab. Dieser wird aus der Rinde des Tolubalsambaumes (*Myroxylum balsamum*) gewonnen. Henri Etienne Sainte-Claire Deville gewann Anfang der Vierziger Jahre des neunzehnten Jahrhunderts erstmals Toluol aus Tolubalsam durch eine trockene Destillation (Pyrolyse) her (Deville 1841). Jöns Jakob Berzelius gab später dem Toluol seinen Namen.

Toluol findet sich im Erdöl, in Kokereigasen, in der Leichtölfraction der Steinkohleteerdestillation und in der C<sub>7</sub>-Fraktion der Crackbenzine. Es wird großtechnisch vor allem durch verschiedene Crack- und Reformierungsprozesse gewonnen und durch fraktionierte Destillation abgetrennt. Die weltweite Produktion an reinem Toluol beträgt schätzungsweise 10 Millionen Tonnen pro Jahr. Dazu kommt noch die wesentlich größere, nicht bezifferbare Menge an Toluol, die in den verschiedenen fossilen Kraftstoffen enthalten ist. Die weltweite Emission an Toluol in die Atmosphäre beträgt zwischen 2 und 5 Millionen Tonnen pro Jahr.

Toluol dient als Lösungsmittel z.B. für Farben, Lacke, Tinten und Fette, als Kraftstoffzusatz und als Ausgangsstoff für die Synthese von Benzaldehyd, Benzoesäure, Saccharin, Toluoldiisocyanat, Trinitrotoluol und vieler anderer organischer Verbindungen.

#### *Toxische Wirkungen:*

Toluol ist weit weniger toxisch als Benzol, es hat wegen dieser Eigenschaft das Benzol als Lösungsmittel, Schleppmittel für Wasser und Extraktionsmittel weitgehend verdrängt. Eine Toluolexposition führt beim Menschen zu Reizungen an den Augen und den Schleimhäuten, in höheren Konzentrationen ruft Toluol Schädigungen des zentralen Nervensystems, der Leber und der Niere hervor. Bis jetzt konnten keine Hinweise auf eine mutagene Wirkung von Toluol gefunden werden, eindeutige Aussagen zu seiner Kanzerogenität sind noch nicht möglich.

### Ökologische Wirkungen:

Toluol besitzt aufgrund seiner Flüchtigkeit und Wasserlöslichkeit in der Atmosphäre und in der Hydrosphäre eine hohe Mobilität. Es ist nicht sehr persistent, da es den Mikroorganismen leicht zugänglich ist. Die Enzyme für den Toluolabbau sind z.B. bei *Pseudomonas putida* auf einem eigenen Plasmid codiert, dem TOL – Plasmid (Fuchs 2007).

### 3.5.6. Benzol

#### Allgemeines:

Benzol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) (Benzen, englisch: benzene) ist die Ausgangssubstanz für eine ganze Klasse von Verbindungen, den benzoiden Aromaten. Es ist eine dünnflüssige, farblose und brennbare Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch. In Wasser ist Benzol nur schwer löslich, dagegen unbegrenzt in Alkohol und Ether (Baeyer 1988).

Im Jahre 1649 wurde Benzol vom Alchemisten Johann Rudolph Glauber bei er trockenen Destillation von Steinkohle erstmals erhalten (Engels 1989). Er nannte es ein "subtiles und liebliches Oleum". Die Zusammensetzung des Benzols blieb noch längere Zeit unbekannt. Benzol wurde 1825 von Michael Faraday aus Leuchtgas isoliert. Im Jahre 1834 gelang es Eilhard Mitscherlich Benzol durch Decarboxylierung von Benzoesäure zu gewinnen, er nannte es in Anlehnung an die Benzoesäure "Benzin". Der Name Benzol wurde von Justus von Liebig im gleichen Jahr geprägt. 1845 wurde Benzol von August Wilhelm Hofmann im Steinkohleteer nachgewiesen, dieser benutzte als erster den Begriff "Aromat" im Zusammenhang mit Benzol. Die Strukturformel wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Erst 1865 schlug Friedrich August Kekulé, später zu Kekule von Stradonitz geadelt (Kekule ohne é!) die bis heute verwendete mesomere Strukturformel von Benzol vor. Im Rahmen dieser Arbeit werden aromatische Systeme mit der von Thiele im Jahre 1899 vorgeschlagenen Formel, in der die  $\pi$  - Elektronen als Ring dargestellt werden, verwendet.

Benzol kommt, wie Toluol, im Erdöl, im Steinkohleteer und in Kokereigasen vor. Natürlicherweise wird Benzol in kleinen Mengen durch verbrennende Biomasse freigesetzt. Global werden etwa 15 Millionen Tonnen Benzol großtechnisch als Reinstoff erzeugt, dazu kommen 25 - 30 Millionen Tonnen Benzol, die in Treibstoffen enthalten sind. Die jährliche Emissionsmenge an Benzol in die Atmosphäre beträgt etwa 400 000 Tonnen.

Benzol ist der Grundkörper für die Synthese einer Vielzahl von aromatischen Verbindungen. Die Gewinnung erfolgt heute durch die Erdölraffination sowie durch die Reppesynthese aus Acetylen. Die Gewinnung von Benzol aus Steinkohleteer spielt heute nur noch eine untergeordnete Rolle. Benzol dient zur Herstellung von Gummiprodukten, Farbstoffen, Detergenzien, Pestiziden, Sprengstoffen, Ethylbenzol, Cumol, Cyclohexan, Nitrobenzol,

Alkylbenzolen, Chlorbenzol, Adipinsäure und Maleinsäureanhydrid. Nur ein kleiner Teil der jährlichen Produktionsmenge dient als Lösungsmittel, vor allem für Extraktionen.

#### *Toxische Wirkungen:*

Benzol hat ein hohes Gefährdungspotential, beim Menschen können durch Benzolexposition neurotoxische Wirkungen, Schädigungen des hämopoetischen Systems, Leber- und Nierenschäden sowie aufgrund seiner mutagenen Eigenschaften Leukämie auftreten.

#### *Ökologische Wirkungen:*

Aufgrund seines hohen Dampfdruckes ist die Atmosphäre das Zielkompartiment des Benzols in die Umwelt. Der Abbau erfolgt hauptsächlich durch Photolyse. Der Benzoleintrag in die Hydro- und Geosphäre ist verhältnismäßig gering, hier kann es zudem leicht durch Mikroorganismen abgebaut werden.

### **3.5.7. 1,4-Difluorbenzol**

1,4-Difluorbenzol (p-Difluorbenzol, para-Difluorbenzol, englisch: 1,4-Difluorobenzene) ist eine klare Flüssigkeit mit aromatischem Geruch. Difluorbenzole zeichnen sich durch ein stärker deaktiviertes aromatisches System als beim Monofluorbenzol aus. 1,4-Difluorbenzol ist eine Spezialchemikalie.

Zur Toxikologie von 1,4-Difluorbenzol liegen keine Daten vor. Im Boden und im Wasser dürfte es persistent sein, in der Atmosphäre kann mit photolytischem Abbau gerechnet werden.

### **3.5.8. 4-Fluortoluol**

4-Fluortoluol (IUPAC: 1-Fluor-4-methylbenzol, Synonyme: p-Fluortoluol, Benzylfluorid, 4-Fluormethylbenzol, englisch: 4-Fluorotoluene) ist eine farblose, brennbare, aromatisch riechende Flüssigkeit. Es wird zur Produktion von Pharmaka und Pflanzenschutzmitteln herangezogen.

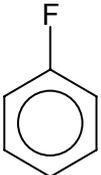
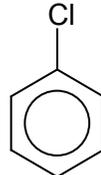
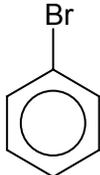
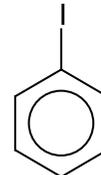
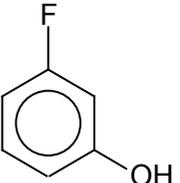
Zu dieser Verbindung stehen keine toxikologischen Daten zur Verfügung. 4-Fluortoluol dürfte in der Umwelt etwas weniger persistent als 1,4-Difluorbenzol sein, da die Methylgruppe von Bakterien leicht zur Carboxylgruppe oxidiert werden kann. Das so erzeugte fluorierte Benzoat kann nur von wenigen Bakterien vollständig mineralisiert werden, wahrscheinlicher ist, daß die Metabolite des Abbaus in der Bodenmatrix festgelegt (humifiziert) werden.

### **3.5.9. Monofluorphenole**

Alle Monofluorphenole (2-Fluorphenol, 3-Fluorphenol und 4-Fluorphenol) zeichnen sich durch einen intensiven Geruch aus. Die Geruchsschwelle liegt niedrig, schon kleinste Konzentrationen an Fluorphenolen in der Luft können wahrgenommen werden. In wässriger Lösung reagieren sie saurer als unsubstituiertes Phenol. Fluorphenole dienen als Ausgangsprodukte für die Synthese von Pharmazeutika.

Wie die Chlorphenole auch reizen die Fluorphenole Haut und Schleimhäute, toxikologische Daten liegen nicht vor.

**Tabelle 2: Einige ausgewählte physikalische Eigenschaften der wichtigsten Substrate**

Name	Fluorbenzol	Chlorbenzol	Brombenzol	Iodbenzol	Toluol	Benzol	1,4-Difluorbenzol	1-Fluor-4-methylbenzol	3-Fluorphenol
Strukturformel									
FP [°C]	-41	-45	-31	-29	-95	5,5	-19	-56,8	13,7
KP [°C]	85	132	156	188	110,6	80,1	89	116,6	178
Dichte bei 20°C [g/cm³]	1,03	1,11	1,50	1,83	0,87	0,88	1,11	1,00	1,24
Molekulargewicht [g/mol]	96,11	112,56	157,01	204,01	92,14	78,12	114,09	110,13	112,10
Dampfdruck [mbar] bei 20 °C	83	12	4,3	2,1	29	101	19	77	6,1
Henry Koeff. [mol/bar·m³]	0,16	0,27	0,49	0,77	0,15	0,18	0,13		
Wasserlöslichkeit bei 20°C [mg/L]	440	491	443	346	1749	473	1222		2800
Gefahrensymbole									
Dipolmoment bei 20 °C [D]		1,55			0,36	.			

### 3.6. Der Stamm FLU 100

Der Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 wurde im Jahre 2000 aus einer Probe Biofilterpackungsmaterial isoliert. Als Anreicherungssubstrat diente Fluorbenzol (Strunk 2000). Die Probe stammte von einer großen Firma der chemischen Industrie, diese stellt vielerlei aromatische Verbindungen her, darunter auch zahlreiche halogenierte Spezies. Diese dienen vor allem als Ausgangsprodukt für die Produktion von Pflanzenschutzmitteln und von Pharmazeutika. Bei der Produktion von Halogenaromaten fallen große Mengen Abwasser an, welches mit den Edukten und Produkten der Produktionsprozesse verunreinigt ist. Dieses Abwasser wird in der betriebseigenen Kläranlage behandelt. Nach einem Neutralisationsschritt und der Vorklärung folgt eine biologische Stufe. Diese ist gekapselt, denn durch das Einblasen von Luft werden viele der im Wasser enthaltenen flüchtigen organischen Verbindungen ausgestrippt. Die in die biologische Stufe eingeblasene Luft sammelt sich über dem Belebungsbecken und wird von dort abgezogen. Sie wird danach über einen Kohlefilter geführt und letztlich nachverbrannt.

Zwischen 1996 und 2000 wurde ein Pilotbiofilter mit  $6 \text{ m}^3$  Packungsvolumen betrieben. Dieser wurde mit  $300 \text{ m}^3$  Rohgas pro Stunde mit einem Gehalt an organischem Kohlenstoff zwischen  $300 - 2600 \text{ mg} / \text{m}^3$  belastet, was einer spezifischen Filtervolumenbelastung zwischen 15 und  $130 \text{ g C}_{\text{org}} / \text{m}^3 \text{ h}$  (typischerweise wird  $50 \text{ g C}_{\text{org}} / \text{m}^3 \text{ h}$  angegeben) entsprach. Der Wirkungsgrad bezüglich Fluorbenzol pendelte zwischen 60 und 80 %.

Die Anreicherung fluorbenzolverwertender Stämme gelang nach einigen Fehlversuchen Anfang 2000. Dabei wurde das Filtermaterial in steriler Saline aufgeschlämmt und diese Suspension wurde auf Minimalmedien ausplattiert und im Dunklen bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in einer fluorbenzolphaltigen Atmosphäre inkubiert. Der Stamm FLU 100 konnte solchermaßen angereichert werden.

### 3.7. Der Einfluss von freien Halogenidionen

Fluoridionen wirken in der Regel sehr toxisch auf Zellen. Für den Menschen gilt eine oral aufgenommene Menge von  $6,8 \text{ mg} / \text{Kg}$  Körpergewicht als letal. Die deutsche Trinkwasserverordnung schreibt einen Grenzwert von  $1,5 \text{ mg} / \text{L}$  vor. Für *Pseudomonas putida* ist für Natriumfluorid im EG – Standard Sicherheitsdatenblatt (Merck 1994) eine  $\text{EC}_{01}$  (Abschnürkonzentration, bei der kein Wachstum mehr zu beobachten ist) von  $231 \text{ mg} / \text{L}$  in 16 Stunden angegeben. Dies entspricht  $105 \text{ mg} / \text{L}$  ( $5,5 \text{ mmol} / \text{L}$ ) Fluorid (siehe auch Whitford 1977, Sutton 1987).

Da FLU 100 beim Wachstum auf Fluorbenzol äquimolare Mengen an Fluoridanionen freisetzt, ist es nötig, auch im Hinblick auf seinen Einsatz in Biotricklingfiltern, die toxischen Effekte des Fluorids auf die Wachstumsraten zu ermitteln. Des Weiteren sollen auch die Effekte der anderen Halogenide erforscht werden.

### **3.8. Biofiltersystem im Technikumsmaßstab zur Abreinigung von fluorbenzolbelasteter Abluft**

#### **3.8.1. Biologische Verfahren zur Abluftreinigung**

Schon vor fast hundert Jahren wurde die Machbarkeit der biologischen Reinigung von belasteten Ablüften erkannt. Schon 1923 erkannte Bach, dass auf Kläranlagen "(...) Schwefelwasserstoff durch chemische Bindung oder durch biochemische oder katalytische Zersetzung aus den sonst ungehindert austretenden Gasen" abreinigbar sind (Bach 1923, Plaggemeier 2000). Bereits im Jahre 1932 wurde von Prüß und Blunk ein "Verfahren zur Reinigung von luft- oder sauerstoffhaltigen Gasgemischen" zum Patent angemeldet. In diesem wurde ein mit Schwefelwasserstoff belasteter Luftstrom mittels eines Tropfkörpers, auf dem ein Biofilm aufgewachsen war, abgereinigt. Die in der Patentschrift dargestellte Skizze zeigt bereits wesentliche Merkmale des mittlerweile etablierten Biotropfkörperverfahrens (Plaggemeier 2000). Leider wurde damals keine Anlage für den längerfristigen Betrieb etabliert.

Die Idee der biologischen Filtration von belasteten Ablüften wurde in den fünfziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wieder aufgenommen. Damals experimentierte man mit Erdfiltern, diese waren jedoch aufgrund des hohen Druckverlustes nicht kosteneffizient (Schirz 1996). Erst 1972 baute Helmer einen wirtschaftlich funktionierenden, mit Kompost gefüllten Biofilter zur Abreinigung von vor allem mit Geruchsstoffen belasteter Abluft (Helmer 1972, Plaggemeier 2000).

Heutzutage existieren eine Vielzahl von etablierten und gut funktionierenden Systemen zur biologischen Abreinigung von belasteter Abluft (Engesser 1997). Die Verfahren werden grob in drei Gruppen kategorisiert, den Biofilter, den Biotricklingfilter und den Biowäscher, die hier im folgenden vorgestellt werden sollen.

##### **3.8.1.1. Der Biofilter**

Der Biofilter stellt eine baulich und verfahrenstechnisch sehr einfache Methode dar. Allerdings wird diese Einfachheit durch gewisse Anforderungen an den Zustand des Anluftstroms erkauft. Dieser durchströmt ein festes Volumen, gefüllt mit einer mehr oder weniger porösen Packung. Auf dieser Packung sitzen Mikroorganismen, zumeist in einem Biofilm organisiert. Durch den Stoffaustausch zwischen gasförmiger Phase und der flüssigen Phase, die im Biofilm eingebunden ist, werden die Schadstoffe zu den Mikroorganismen befördert und von diesen schließlich abgebaut. Der Filter kann offen, also der Witterung ausgesetzt sein. Es gibt aber auch geschlossene Varianten. Als Packungsmaterialien werden häufig organische Naturmaterialien wie Holzhack, Rindenmulch, Kompost oder Torf verwendet. Diese können mit anorganischen Materialien wie Perlit, Blähton oder zerkleinerten Ziegelsteinen aufgelockert

werden. Um das Austrocknen des Filters zu verhindern, kann eine externe Befeuchtung eingesetzt werden. Allerdings wird das Eluat verworfen. Bild 29 zeigt ein Schema.

Die dem Filter zugeführte Rohluft muss feuchtigkeitsgesättigt sein, um ein Austrocknen des Biofilters zu verhindern, sonst würde die Anlage ausfallen. Des Weiteren muss die Rohluft frei von Stäuben und Fetten sein. Wichtig ist auch die Temperatur der Rohluft. Diese sollte sich im Bereich von 20 bis 30 °C bewegen. Um diese Anforderungen an die Rohluft zu erfüllen, wird bei lipophilen Schadstoffen dem Biofilter zweckmäßigerweise ein Gaswäschersystem vorgeschaltet. Dieses entfernt den Staub und sorgt für die vollständige Durchfeuchtung des Gasstroms.

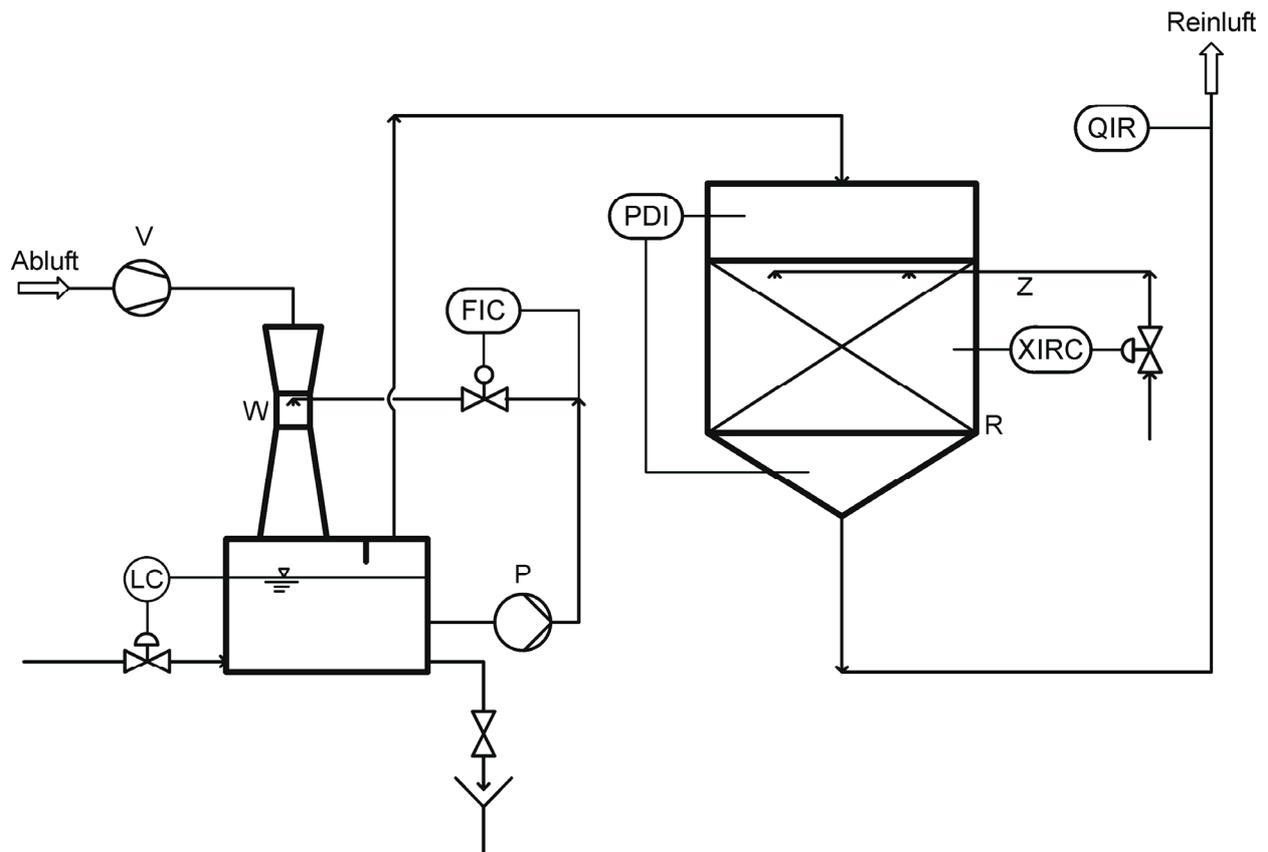
Probleme beim Betrieb solcher Biofilter kann vor allem eine inhomogene Durchströmung darstellen. Hierbei bilden sich Stromröhren in der Packung, an deren Rändern das Material austrocknet. Biofilter müssen hin und wieder gedüngt werden, ansonsten kann es zur Verarmung vor allem von Stickstoff kommen, was mit einer schwindenden Leistungsfähigkeit gekoppelt ist. Dekompositionsprozesse führen zum "Setzen" des Materials, also einer Verringerung des Volumens mit gekoppelter Erhöhung der Dichte. Diese Prozesse können biologisch oder mechanisch bedingt sein. Dies führt zum Anstieg des Druckverlustes und fördert auch die Bildung von Stromröhren. Abhilfe schafft eine Auflockerung durch Umsetzen des Material oder der partielle oder totale Austausch des Filtermaterials.

Biofilter sind nicht zur Reinigung von Schadstoffen geeignet, die nichtflüchtige Metaboliten zurücklassen, wie beispielsweise chlor-, fluor- oder schwefelhaltige Stoffe, da der Biofilter über kein Austragssystem für die entstehenden Metabolite wie HCl, HF oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bietet. Diese Metabolite akkumulieren im System und führen aufgrund ihrer Säurewirkung rasch zum Absterben der Biologie.

Auch falsch geführte Anfahrverfahren können einen Biofilter schädigen. So führen Schadstoffe, die gut am Filtermaterial sorbieren, beispielsweise Benzylalkohol an Holz, zur Akkumulation im Filtermaterial. Dies kann das Aufwachsen einer leistungsfähigen Biologie effektiv verhindern (Strunk und Karas, unveröffentlichte Ergebnisse). Es wächst dann beispielsweise eine suboxidierende Biozönose aus, die organische Metabolite wie Benzoesäure und Essigsäure ausscheidet. Der Filter versauert in diesem Fall (Strunk 2006).

Wenn erwärmte, mit Wasserdampf gesättigte Rohluft durch einen Biofilter streicht, kann sie sich dort abkühlen. Dies führt vor allem bei freistehenden Anlagen im Winter zur Kondensation von Wasser im System, welches ein oft hochbelastetes Eluat bildet, was fachgerecht entsorgt werden muss.

Gut eignet sich der Biofilter zur Abreinigung von Schadstoffen, die keine nichtflüchtigen Metabolite zurücklassen und biologisch abbaubar sind. Sie können lipophil und hydrophil sein, wobei hydrophile Substanzen sicherer im Biowäscher abgereinigt werden. Beispiele sind Hexan, Geruchsstoffe, Phenole und Toluol. Biofilter sind das Mittel der Wahl, wenn geruchsintensive Stoffe aus einem Abluftstrom entfernt werden sollen.



**Bild 29: Schematischer Aufbau eines Biofilters im Gleichstrombetrieb**

Dargestellt ist eine Verfahrensführung mit Rohgaswäscher, Befeuchtung und typischen Messeinrichtungen. Der Wäscher entstaubt und befeuchtet das Rohgas. Er verfügt über einen Sumpf, der in Intervallen abgeschlämmt werden kann. Der Feuchtigkeitsgehalt des eigentlichen Biofilters wird überwacht und die externe Befeuchtung kann automatisch aktiviert werden. Der Druckverlust im Biofilter wird gemessen. Gegebenenfalls kann das System durch zusätzliche Sensoren wie pH – oder Leitfähigkeitsmessungen des Eluates ergänzt werden. Folgende Bezeichnungen werden verwendet:

FIC	Durchflussüberwachung des Vorwäschers	LC	Füllstandmessung des Wäschersumpfs
P	Pumpe für die Waschlösung	PDI	Messung des Druckabfalls im Biofilter
QIR	Messung der Reinluftqualität	V	Verdichter
W	Rohgaswäscher	Z	Zusatzbefeuchtung
XIRC	Feuchtemessung der Filterschüttung, automatische Aktivierung der Befeuchtung		

### 3.8.1.2. Der Biowäscher

Der Biowäscher kombiniert den klassischen Gaswäscher mit der aus der Abwasserbehandlung bekannten Belebungs technik. Das wichtigste Charakteristikum dieses Anlagentyps ist die konstruktive und bauliche Trennung zwischen der Absorption der Schadstoffe in einem flüssigem Medium und dessen biologischer Regeneration. Bild 30 zeigt einen schematischen Aufbau.

Die Absorption erfolgt im Wäscher. Hier wird die Rohluft zumeist im Gegenstromverfahren mit der flüssigen Phase, dem Kreislaufwaschwasser, konfrontiert. Dieses wird in einem turmförmigen Wäschermodul möglichst gleichmäßig über den ganzen Querschnitt verdüst. Der Wäscher kann auch mit einer Packung (geordnet oder ungeordnet) befüllt sein. Die löslichen Inhaltsstoffe der Rohluft gehen im Wäscher mit einer gewissen Rate in Lösung. Diese ist abhängig von der Konzentration der Inhaltsstoffe im zugeführten Kreislaufwaschwasser, sowie vom Dampfdruck der Inhaltsstoffe und der Temperatur. Je höher diese ist, umso weniger Inhaltsstoffe werden aus der Rohluft ausgewaschen. Das Kreislaufwaschwasser wird in einem Sumpf unterhalb des Wäschermoduls gesammelt.

Von dort aus wird das Kreislaufwaschwasser in ein Belebungsbecken gepumpt. Hier findet der eigentliche biologische Abbau der Schadstoffe statt. Im Vergleich zum Biofilter und zum Biorieselbettreaktor sind die Mikroorganismen beim Biowäscher nicht auf einem Trägermaterial immobilisiert, sondern schwimmen frei in der Suspension. Durch die Belüftung ist das Kreislaufwaschwasser im Belebungsbecken sehr gut durchmischt. Dies erlaubt eine einfache Regelung des pH – Wertes sowie der Konzentration von wichtigen anorganischen Ionen, die von Stoffwechselprodukten und Nährsalzen herrühren. Ein Teil des Kreislaufwassers kann regelmäßig ausgeschleust und durch Frischwasser ersetzt werden.

Ein Schlüsselparameter für den erfolgreichen Betrieb einer Biowäscheranlage ist die Schadstoffkonzentration im Belebungsbecken. Dieses entspricht näherungsweise einem kontinuierlich gerührtem Reaktor (CSTR). Es gelten also die Gesetzmäßigkeiten der kontinuierlichen Kultur.

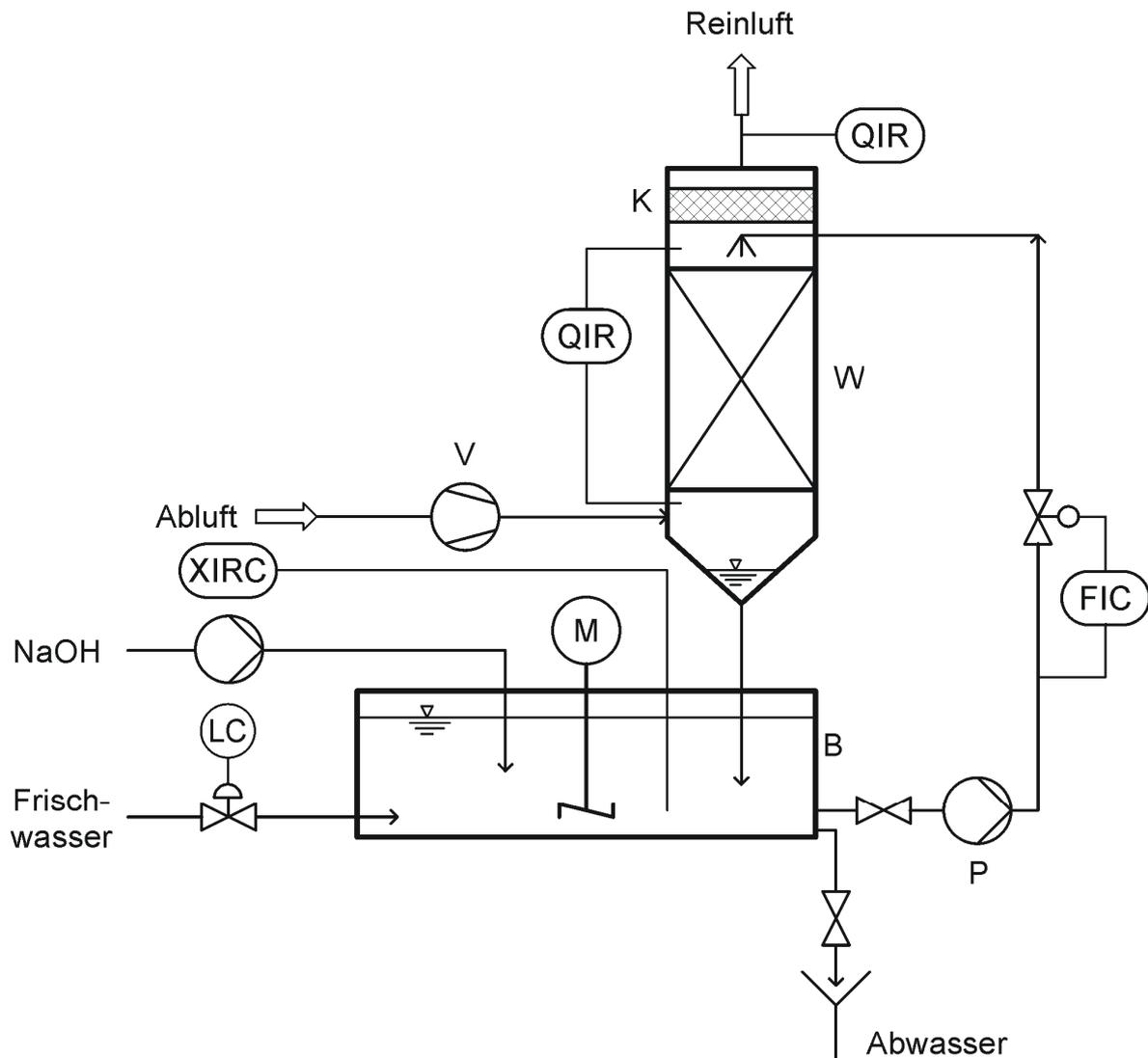
Die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen im Belebungsbecken ist von der Gleichgewichtskonzentration der Substrate in ihrem Medium abhängig, es gilt Idealerweise die Monod – Kinetik (Monod 1949). In einem gewissen Konzentrationsbereich der Substrate ist die Wachstumsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration (mechanistisch: Reaktion erster Ordnung). Mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen steigt auch deren Substratumsatzgeschwindigkeit. Die Konzentration an Substraten im Auslauf des Belebungsbeckens entspricht der Gleichgewichtskonzentration im Becken. Das aus dem Belebungsbecken entnommene Kreislaufwaschwasser wird zurück in das Waschmodul geleitet. Es sollte also eine möglichst geringe Konzentration an Substraten aufweisen, da diese ja möglichst effektiv aus der Rohluft ausgewaschen werden sollen. Dies sind also zwei

gegenläufige Forderungen an die Konzentration der Substrate im Belebungsbecken. Sollen die Mikroorganismen sehr effektiv arbeiten, dann muss diese hoch gehalten werden, soll möglichst effektiv ausgewaschen werden, dann muss diese niedrig gehalten werden.

Den Ausweg aus diesem Dilemma lieferte die Definition des Betriebspunktes für Biowäscher (Homans 1989). Hier wird die Auswaschrates und die Wachstumsrate gegen die Konzentration der Substrate im Belebungsbecken aufgetragen. Der Betriebspunkt ist dann der Schnittpunkt beider Funktionen.

Biowäscher werden naturgemäß zur Abreinigung von gut wasserlöslichen Substanzen eingesetzt. Es können aber auch lipophile Komponenten ausgewaschen werden. Hierzu wird dem Kreislaufwaschwasser eine weitere flüssige, aber schwerflüchtige Phase zugesetzt. Hierbei kann es sich beispielsweise um hochsiedendes Silikonöl handeln. Dieses dient als eigentliches Absorbens für die lipophilen Schadstoffe in der Rohluft, während die Wasserphase als Lebensraum für die Mikroorganismen dient. Der Abbau im Belebungsbecken findet dann durch Anlagerung der Zellen an die Silikonöltröpfchen statt.

Problemzustände im Biowäschersystem sind beispielsweise der unerwünschte Aufwuchs von Biomasse im Wäschermodul. Ein weiteres Problem stellt der unvollständige Abbau von leicht flüchtigen Verbindungen im Belebungsbecken dar. Diese können dann von der Belüftung ausgestrippt werden. Das Kreislaufwaschwasser enthält Zellen und Zellagglomerate welche das Bedüsungssystem abrasiv beeinflussen und so zu einem erhöhten Verschleiß dieser Bauteile führt. Ist die Biomassekonzentration im Kreislaufwaschwasser zu hoch, können Verstopfungen die Effektivität der Auswaschung von Schadstoffen aus dem Rohgasstrom beeinträchtigen.



**Bild 30: Schematischer Aufbau eines Biowäschersystems**

Die Rohluft wird über einen Verdichter in das Waschmodul (W) geleitet. Hier wird das Kreislaufwaschwasser im Gegenstrom eingedüst. Es sammelt sich im Sumpf des Waschmoduls. Von dort aus gelangt es in das Belebungsbecken (B). Dieses wird belüftet und kann auch gerührt werden, hier findet der eigentliche biologische Abbau der Schadstoffe statt. Vom Belebungsbecken aus wird Kreislaufwaschwasser entnommen und wieder in das Waschmodul geführt. Folgende Bezeichnungen wurden verwendet:

W	Waschmodul	B	Belebungsbecken
K	Tropfenabscheider	V	Verdichter
P	Pumpe (Kreislaufwaschwasser)	M	Rührer
QIR	Messung der Reinluftqualität	LC	Füllstandkontrolle Belebungsbecken
D	Düngerdosierung	PDI	Messung des Druckabfalls im Waschmodul
XIRC	Überwachung von wichtigen Parametern wie der pH - Wert der Waschflüssigkeit	FIC	Überwachung der Waschflüssigkeitszirkulation

### 3.8.1.3. Der Biotricklingfilter (Biorieselbettreaktor)

Der Biotricklingfilter vereint die Vorteile der beiden vorangegangenen diskutierten Verfahren. So verfügt er über eine umlaufende flüssige Phase (Tricklinglösung), was die Befeuchtung der Biozönose sicherstellt und die Möglichkeit bietet, die physikalischen (pH) und chemischen (Ionenstärken, Nährsalze) Bedingungen zu beeinflussen (Lu 2002, Delhoméie 2001, 2003A und 2005) . Er bietet die Möglichkeit, auch Rohgase mit lipophilen Schadstoffkomponenten biologisch abzureinigen. Im Biotricklingfilter findet die Absorption und der Abbau der von der Rohluft herangezogenen Schadstoffe im gleichen Kompartiment statt.

Der Biotricklingfilter verfügt ebenso wie der Biofilter über eine Packung, die als Träger für die Biozönose dient, welche idealerweise in einem Biofilm organisiert vorliegt. Als Packungsmaterialien kommen allerdings andere Materialien als beim Biofilter zum Einsatz. Diese müssen inert gegenüber biologischen Angriffen sein, da der Biotricklingfilter als geschlossenes System zu betrachten ist. Die Packungsmaterialien sollten auch resistent gegen mögliche saure oder basische Metabolite des Schadstoffabbaus sein. Die Auswahl der Geometrie der Füllkörper ist kritisch für die Funktionsfähigkeit des Biotricklingfilter. Die innere Oberfläche der Packung sollte hinreichend hoch sein, um den Mikroorganismen genügend Oberfläche für den Stoffaustausch zu bieten. Zu kleine Hohlvolumina in der Packung neigen jedoch zum raschen Zuwachsen (siehe unten). Bild 31 zeigt den schematischen Aufbau eines Biotricklingfilters.

Die Packung sollte möglichst homogen durchfeuchtet sein. Dies wird durch eine kontinuierliche oder eng getaktet umlaufende Tricklinglösung gewährleistet. Sie wird über den Kopf der Packung verdüst und sollte die ganze Fläche des Reaktorquerschnitts homogen bestreichen. Die Rohluft durchströmt die Packung im Gleich-, Kreuz- oder Gegenstrom zur flüssigen Phase. Zumeist werden die Biotricklingfilter im Gleichstrom betrieben. Beim Gegenstromverfahren kann es vorkommen, dass sich Schadstoffe in der flüssigen Phase lösen. Dann besteht die Gefahr, dass diese beim nächsten Umlauf der Lösung im oberen Bereich des Biotricklingfilters ausgestrippt werden und so in die Reinluft gelangen, denn hier kommt die Tricklinglösung in Kontakt mit der strömenden Luft. Dieses Problem tritt nicht auf, wenn ein hinreichend großes Sumpfvolumen vorhanden ist, denn auch hier findet, in gewissen Grenzen, ein biologischer Schadstoffabbau durch suspendierte Mikroorganismen statt.

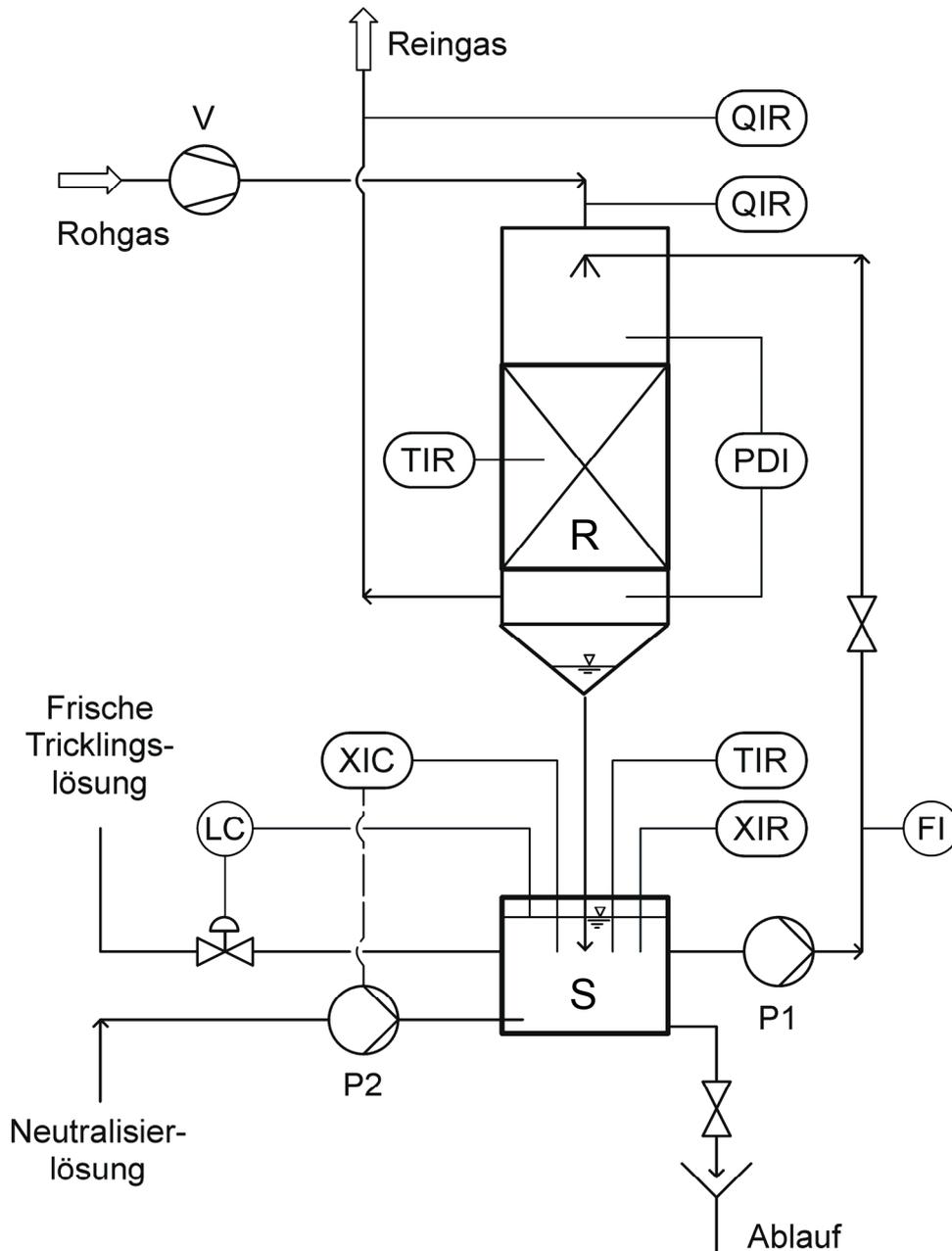
Die Packung muss in der Regel nicht vorbefeuchtet werden. Allerdings wird bei sehr trockenen Rohgasen oder sehr großen Volumenströmen trotzdem eine Vorbefeuchtung durch einen dem Biotricklingfilter vorgeschalteten Gaswäscher durchgeführt. Auch bei hoch staubbelasteten Rohlüften empfiehlt sich die Verwendung eines Gaswäschers. Beim Durchströmen der Packung kommt die Rohluft in Kontakt mit dem Biofilm. Der Stoffübergang erfolgt direkt von der Gasphase in den Biofilm.

Die Tricklinglösung versorgt die Biozönose mit anorganischen Nährfaktoren, wie Stickstoff, Phosphor und Spurenelementen. Sie homogenisiert die Verhältnisse über die Packung hinweg. Dead – end - Metabolite und nicht flüchtige anorganische Metabolite wie HCl, HF oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> akkumulieren im Reaktorsumpf. In diesem Fall kann mit geeigneten Reagenzien wie NaHCO<sub>3</sub> oder NaOH neutralisiert werden. Es muss von Zeit zu Zeit ein Teil der Tricklinglösung ausgetauscht werden, um eine Aufsatzung zu verhindern.

Ein wichtiges Störphänomen ist das so genannte "Clogging" des Biofilters. Es tritt auf, wenn die Biomasse auf der Packung kontinuierlich zunimmt. Dann verstopfen die Stromröhren und der Druckverlust über der Packung nimmt zu. Chemoorganoheterotrophe Mikroorganismen nutzen die ihnen angebotene Kohlenstoffquelle in zwei Weisen. Zum Einen brauchen sie wie alle lebenden Zellen einen stetigen Energieumsatz, um ihre Struktur zu bewahren (Erhaltungsstoffwechsel, zweiter Hauptsatz der Thermodynamik). Andererseits nutzen sie die Kohlenstoffquelle, um sich zu vermehren, um also weitere Biomasse aufzubauen. Ein stabiler Betriebspunkt eines Biotricklingfilters ist also erreicht, wenn die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle in Summe vollständig für den Erhaltungsstoffwechsel genutzt wird. Wird zuviel verwertbare organische Substanzen eingetragen, dann kommt es zu einem Biomasseüberschuss - der Filter cloggt. Als Gegenmaßnahme kann der Anteil des Baustoffwechsels der Biozönose im System durch zusätzliche Stressfaktoren erhöht werden, wie beispielsweise durch Einstellung "unbequemer pH – Werte" oder einer Erhöhung der Ionenstärke im System.

Symbole in Bild 31:

R	Reaktorpackung	S	Reaktorsumpf
K	Tropfenabscheider	V	Verdichter
P1	Pumpe (Tricklinglösung)	P2	Pumpe für das Neutralisierungsmittel
QIR	Messung der Reinluftqualität	LC	Füllstandskontrolle Reaktorsumpf
TIR	Temperaturmessung der Tricklinglösung	PDI	Messung des Druckabfalls im Waschmodul
XIRC	Kontrolle des pH – Wertes der Tricklings- lösung und Steuerung der Neutralisation		



**Bild 31: Schematischer Aufbau eines Biotricklingfilters (Biorieselbettreaktor)**

Der dargestellte Biorieselbettreaktor wird im Gleichstromverfahren betrieben. Die Rohluft braucht nicht vorbefeuchtet zu sein, sie wird durch einen Kompressor verdichtet (V). Die Tricklinglösung läuft kontinuierlich oder eng getaktet um. Im Reaktorsumpf (S) können Parameter wie pH, Konzentration an Nährsalzen und Metaboliten (LC, TIR, XIRC) konstantgehalten werden. Dazu wird Neutralisierungsmittel (P2) zudosiert. Getaktet kann auch eine bestimmte Menge Tricklinglösung pro Zeiteinheit ausgetauscht werden. Die Bakterien bilden einen Biofilm auf der Reaktorpackung (R). Dem Reaktor nachgeschaltet ist die Überwachung der Konzentration an organischen Komponenten (QIR). Folgende Bezeichnungen wurden verwendet:

### 3.8.3. Konzeption eines Biotricklingfiltersystems zur Reinigung von Monohalogenaromaten - belasteter Luft

Die Zielsetzung dieses Experiments war, die prinzipielle biologische Abreinigbarkeit von fluorbenzolhaltiger Abluft durch den Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 zu demonstrieren. Darüber hinaus sollte bei der Durchführung dieser Arbeit eine Mischung aus Fluorbenzol und Chlorbenzol abgebaut werden (zu Chlorbenzol in Biofilter siehe Delhoméne 2003B, Mathur 2006, in Bodenfiltern siehe Demnerova 2003, zu Halogenaromatenmischungen siehe Kobelt 1997, Lynch 1997). Bei der Durchführung dieser Arbeit konnte glücklicherweise auf bereits bestehende Anlagen zur biologischen Abluftreinigung im Technikumsmaßstab zurückgegriffen werden. Diese mussten jedoch an die Aufgabenstellung angepasst werden. Dazu war eine Reihe von Vorüberlegungen notwendig, die hier vorgestellt werden. Zu den Stoffeigenschaften von Fluorbenzol und Chlorbenzol sei auf Kapitel 3.5.1. und 3.5.2 verwiesen. Technische Details der Reaktoren werden in Kapitel 4.9. dargestellt.

#### 3.8.3.1. Erwartete Metabolite

Beim vollständigen Abbau, also bei der Totaloxidation von Fluorbenzol, wird Fluorwasserstoff (HF) freigesetzt. Dieser Metabolit ist dreifach problematisch:

1. Fluorwasserstoff ist eine mittelstarke Säure: Flusssäure,  $pK_S = 3,14$ . In höherer Konzentration kann es den pH – Wert des Mediums auf für FLU 100 intolerable Bereiche absenken, siehe Kapitel 4.4.9.
2. Fluorwasserstoff ist äußerst korrosiv und löst fast alle Metalle unter Wasserstoffentwicklung auf (Ausnahme: Gold, Platin und Blei, welches nur oberflächlich angegriffen wird). Dies kann zu Schädigungen an den Materialien des Biofilters führen. Auch Glas und keramische Werkstoffe werden von ihr angegriffen, Kunststoffe jedoch in der Regel nicht.
3. Fluorid, das Anion des Fluorwasserstoffs, das bei neutralen und alkalischen pH - Werten überwiegend vorliegt, ist ein sehr toxisches Anion. Es fällt das für Bakterien essentielle Calcium ( $Ca^{2+}$ ) als  $CaF_2$  aus. Es muss also dafür gesorgt werden, dass die Fluoridanionen nicht das ganze im System vorhandene Calcium "wegfangen" (mehr zur Calciumfluoridproblematik siehe Kapitel 3.8.4.6).

Beim vollständigen Abbau von Chlorbenzol wird Salzsäure (in Wasser gelöster Chlorwasserstoff, HCl) freigesetzt. Auch dieser Metabolit ist problematisch:

1. Salzsäure ist eine sehr starke Säure, HCl liegt in Lösung vollständig dissoziiert vor. Sind keine weiteren protonenaktiven Substanzen anwesend, dann gilt:

$$\text{pH} = -\log [\text{HCL}]$$

Es ist beim Abbau von Chlorbenzol also mit einer starken Ansäuerung zu rechnen. Diese findet bei gleicher Produktionsrate wesentlich schneller als beim Abbau von Fluorbenzol statt.

2. Auch Salzsäure kann zu Korrosionsproblemen, namentlich an Metallen, führen.

### 3.8.3.2. Wahl des Verfahrenstyps

Wegen der erwarteten Produktion von problematischen Metaboliten beim Abbau von Fluorbenzol und Chlorbenzol kam kein Biofilter in Frage. Hier können diese Metabolite nicht aus dem Packungsmaterial ausgetragen werden. Die Löslichkeit der Substrate in Wasser ist nur gering. Dies sprach gegen ein Biowäschersystem, wie auch der große Aufwand, den die Umrüstung der vorhandenen Technikumsanlagen erfordert hätte. So war das Verfahren der Wahl ein Biotricklingfiltersystem, bestehend aus zwei baugleichen Reaktoren.

### 3.8.3.3. Anforderungen an das Packungsmaterial

An das Packungsmaterial wurden folgende Anforderungen gestellt:

- Der Stamm FLU 100 sollte aufwachsen können
- Genügend Oberfläche zur Ansiedelung eines leistungsfähigen Biofilms
- Genügend hohe Pufferkapazität für Feuchtigkeit
- Inert gegenüber dem Angriff von HCl und HF

Als Material kam Blähton in Frage. Dieser erfüllt die ersten drei genannten Punkte, der letzte könnte problematisch sein, da Fluorwasserstoff das Material nach folgender Gleichung angreifen kann:



Allerdings waren die über diese Reaktion notwendigen hohen Konzentrationen an Fluorwasserstoff in einem Biotricklingfiltersystem nicht zu erwarten. Um den zu erwartenden Druckverlust über der Packung gering zu halten, wurde vom Blähton nur die ausgesiebte Fraktion mit einem Durchmesser von mehr als 11 mm verwendet.

#### **3.8.3.4. Anforderungen an die Verfahrensparameter**

Die Reaktoren sollen möglichst ohne Ausfälle für einen längeren Zeitraum (etliche Monate) betrieben werden. In dieser Zeit muss die Substratversorgung sichergestellt werden (Tros 1996). Auch müssen stets genügend Nährsalze zur Verfügung stehen sowie toxische Metabolite entfernt werden. Mehr hierzu im Kapitel 4.9.

#### **3.8.3.5. Anforderungen an die Sensorik der Biotricklingfilter**

Der wichtigste zu messende Parameter sind die Konzentrationen von organischen Verbindungen im Roh- und im Reingas. Diese müssen kontinuierlich aufgezeichnet werden, um den Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Reinigungswirkung beurteilen zu können. Des Weiteren sollen Temperaturen an ausgewählten Punkten und die relative Feuchtigkeit im Roh- und Reingas Aussagen über eintretende Störfälle liefern. Als besonders wichtig für den stabilen Betrieb der Biofilter stellten sich der pH – Wert und die Fluoridionenkonzentration heraus. Daher wurde der pH – Wert der Tricklinglösung überwacht.

#### **3.8.3.6. Die Calciumfluoridproblematik**

In Minimalmedien mit einem hohen Fluoridgehalt kommt es zur Ausfällung von Calciumfluorid, Calciumphosphate, allerdings stark pH – abhängig, und Calciumsulfat (siehe Tabelle 3). Dies dazu führen, dass nur noch geringe Konzentrationen an freien Calciumionen vorhanden sind, das Calcium also limitierend für das Wachstum von Bakterien wird. Um diesem Effekt zu begegnen enthält die Tricklinglösung der Reaktoren eine ausreichend hohe Konzentration an Calciumionen (siehe Kapitel 4.2.1.). Es ist während des Betriebs der Reaktoren mit Ausfällungen des Calciumfluorides zu rechnen, vor allem, wenn das Wasservolumen im Sumpf aufgrund der Verdampfung zurückgeht und alle gelösten Ionen aufkonzentrieren.

**Tabelle 3: Löslichkeitsprodukte und Sättigungskonzentrationen von schwerlöslichen Calciumverbindungen**

(Löslichkeitsprodukte nach Mortimer 1987, angegeben für eine Temperatur von 25 °C)

Verbindung	Formel	Löslichkeitsprodukt	Sättigungskonzentration
Calciumsulfat	CaSO <sub>4</sub>	$2,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol}^2 / \text{L}^2$	$4,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} / \text{L}$ 667 mg / L
Calciumdihydrogenphosphat	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$4,0 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^3 / \text{L}^3$	$7,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} / \text{L}$ 100 mg / L
Calciumhydrogenphosphat	CaHPO <sub>4</sub>	$1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol}^3 / \text{L}^3$	$4,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} / \text{L}$ 632 mg / L
Calciumphosphat	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	$1,3 \cdot 10^{-32} \text{ mol}^5 / \text{L}^5$	$4,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / \text{L}$ 130 µg / L
Calciumfluorid	CaF <sub>2</sub>	$3,9 \cdot 10^{-11} \text{ mol}^3 / \text{L}^3$	$3,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} / \text{L}$ 26 mg / L

### 3.9. Methoden der Gentechnik

Genetische Methoden, also das molekularbiologische Arbeiten mit DNA, sind im Alltag der modernen Mikrobiologie nicht mehr wegzudenken. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten genetischen Methoden werden in diesem Kapitel dargestellt und erläutert.

#### 3.9.1. Genetisches Fingerprinting bei Bakterien

Offt ist es wichtig, die genaue Spezies eines Bakterienstammes zu kennen (z.B. in der Medizin rasch eine sichere Aussage über den Erreger einer Infektionskrankheit zu erhalten, in der Forschung potentiell pathogene Spezies auszusortieren). Bei der angewandten Mikrobiologie ist es wichtig, dass die verwendeten Kulturen auf ihre Reinheit untersucht werden können. Es ist also wichtig, Identifikationssysteme für Bakterienspezies zur Verfügung zu haben. Zwei Ansätze werden häufig verwendet, Stoffwechseltests und DNA-Sequenzierung, bzw. Fingerprintingmethoden.

##### 3.9.1.1. Integrierte Stoffwechseltests

Aus der Erkenntnis heraus, dass Methoden der klassischen Mikrobiologie überraschend aufwändig werden, weil die Morphologie von Zellen und Kolonien hierzu selten zielführend sind, haben einige Firmen die integrierten Stoffwechseltests entwickelt (siehe Kapitel 4.3.6.). Diese Tests enthalten in der Regel eine Anzahl von Substraten in kleinen Kammern, die mit Bakteriensuspension gefüllt werden müssen. Danach wird der Test einige Tage bebrütet. Die Auswertung erfolgt nach optischen Veränderungen. Mittels einer Datenbank werden die Ergebnisse einem Bakterienstamm zugeordnet. Diese Stoffwechseltests weisen allerdings einen recht großen Fehlerbereich auf. Auch sind nicht alle Bakterienspezies in den Datenbanken eingepflegt.

### 3.9.1.2. DNA-Sequenzierung

Wegen ihrer raschen Entwicklung sind die DNA - Sequenziermethoden zu einem Konkurrenten der Stoffwechseltests geworden. Die damit gewonnenen Sequenzdaten erlauben, Bakterienstämme anhand von Schlüsselsequenzen in Datenbanken taxonomisch einzuordnen. Hierzu wurden bis vor kurzem unumstritten die DNA – Sequenzen herangezogen, welche für die 16S und 23S rRNA kodieren. Innerhalb kurzer Zeit wurden diese Gene zahlreicher Bakterienstämme sequenziert. Sequenzvergleiche führten dazu, dass der Stammbaum der Bakterien komplett neu geschrieben werden musste. Auch erkannte man, dass wohl viel mehr Bakterienspezies existieren, als man lange Zeit angenommen hatte. Nachteil dieser Methode waren die anfangs schlechte Verfügbarkeit und die hohen Kosten der Methoden.

Die Aussagen der Methode der Sequenzierung der Gene für die 16S rRNA lässt vor allem eine Klassifizierung von isolierten Bakterien verschiedener Spezies zu (Alfreider 2002). Sollen aber verschiedene Untergruppen einer Spezies eingeordnet werden, gerät das Verfahren an die Grenzen seiner Auflösungsfähigkeit (Rademaker 1998).

### 3.9.1.3. DNA-Fingerprinting

Das DNA - Fingerprinting ermöglicht den raschen Vergleich eines Bakterienstammes mit einem *vorhandenen* Referenzstamm mittels unspezifisch bindender Primern in einer PCR (Polymerase – Kettenreaktion) dar. Diese Methode erlaubt eine wesentlich höhere Auflösung beim Vergleich von Subspezies miteinander als die anderen taxonomischen Methoden inklusive der Analyse von Schlüsselsequenzen. Sie erlaubt eine Aussage über nahe und nahesten Verwandtschaftsgrade von Bakterienstämmen.

Die Methode des DNA – Fingerprinting beruht auf dem Vorhandensein von repetitiven Sequenzen in den Genomen der Bakterien. Diese Sequenzen kodieren keine Gene (Brock 2002). Identische repetitive Sequenzen kommen über das gesamte Genom verteilt vor.

Die BOX – PCR kommt mit einem einzigen Primer (BOXA1R, siehe Kapitel 4.3.6) aus. Dieser bindet an boxA – Untersequenzen des Bakterienchromosoms. Diese Untereinheit befindet sich an verschiedenen Stellen im Genom. Sie ist mit ihrer Schlüsselsequenz auf beiden Strängen der DNA zu finden. Deshalb werden zahlreiche, verschieden lange Amplifikate erzeugt. Diese ordnen sich nach ihrer Trennung im Agarosegel zu einem sehr charakteristischen Muster. Durch Vergleiche dieser Muster kann ein Bakterienstamm leicht einem Referenzstamm zugeordnet werden. Diese Muster entsprechen dem bakteriellen "Fingerprint".

Insgesamt stellt sich die Methode sehr einfach und preisgünstig dar. Es hat sich in dieser Arbeit gezeigt, dass nicht einmal eine aufwändige DNA – Isolierung zur Durchführung der PCR notwendig ist (siehe Kapitel 4.6.1.2.). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Primer für das BOX und das ERIC Element verwendet. Diese Sequenzen sollen im Folgenden beschrieben werden.

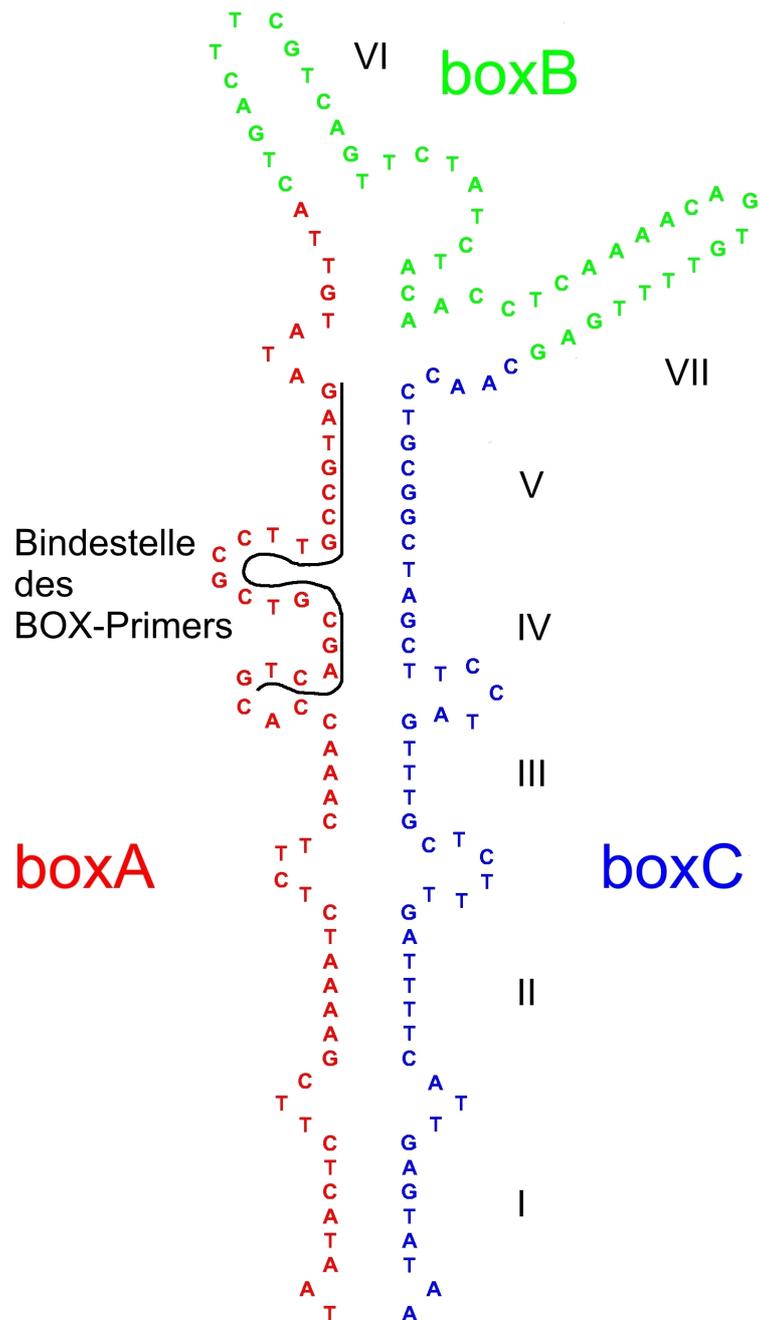
#### 3.9.1.4. Das BOX – Element

In den frühen neunziger Jahren wurden in der DNA des grampositiven Stammes *Streptococcus pneumoniae* sogenannte "dispersed-repeat motif" - Sequenzen identifiziert (Martin 1992). Diese sind hochkonserviert und wurden als BOX – Elemente benannt. Das Genom dieses Stammes enthält mehr als 25 dieser Elemente. Ein BOX - Element besteht aus drei Untersequenzen (boxA, boxB und boxC) verschiedener Länge. Bild 32 zeigt die Sequenz und die vermutete Sekundärstruktur des BOX – Elementes (Martin 1992).

Untersuchungen des BOX-Elements zeigten (van Belkum 1998), dass die boxB - Untersequenz als Hauptelement anzusehen ist, denn diese ist mindestens einmal, manchmal auch mehrfach in einem BOX – Element enthalten. Möglicherweise interagieren die BOX – Elemente mit anderen Genen und beeinflussen deren Expression.

#### 3.9.1.5. Das ERIC – Element

Im Jahre 1991 wurde in Enterobakterien eine repetitive Sequenz entdeckt. Diese ERIC - Elemente ("enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence") umfassen 126 Basenpaare, deren Zentrum hoch konserviert ist. Hier binden die ERIC – Primer ERIC1R und ERIC2. Die ERIC – Elemente finden sich in gramnegativen Eubakterien nicht im proteinkodierenden Bereich des Genoms, sondern häufig upstream und downstream von open reading frames. Ähnlich wie bei der BOX – PCR entstehen bei der ERIC – PCR viele Amplifikate mit unterschiedlichen Längen. Diese werden durch die Agarosegelelektrophorese getrennt und liefern ein für den jeweiligen Stamm charakteristisches Bandenmuster (Versalovic 1991, de Bruijn 1992, Niemann 1999).



**Bild 32: Sequenz und vermutete Sekundärstruktur des BOX – Elementes**

Die römischen Ziffern bezeichnen autohelicale Bereiche. Markiert mit der schwarzen Linie ist die Bindestelle des BOX - Primers. Die Genabschnitte boxA, boxB und boxC sind farblich abgehoben (nach Martin 1992).

### 3.9.2. Transposon Mutagenese

Die Transposonmutagenese ist ein elegantes und mittlerweile wohl etabliertes Verfahren, um bakterielle Fremdstoffabbauwege aufzuklären. Ein wichtiger Teil dieser Arbeit, die Analyse der Fluorbenzolabbauweges in FLU 100, basiert auf dieser Methode (siehe Kapitel 5.6.1. und 6.7.). Durch Insertion eines Transposonfragmentes in das Bakteriengenom wird ein spezifisches Enzym ausgeschaltet. Es entsteht eine knock – out Mutante. Dies führt zum Verlust einer bestimmten Fähigkeit der betroffenen Zelle. Durch die Insertion der Fremd – DNA kann ein Protein nicht mehr funktionsfähig synthetisiert werden, oder ein regulatorischer Bereich wird funktionslos (gene disruption). Das vermittelte Insert besitzt keine Transposase mehr, es kann sich also nicht mehr selbst deletieren. Bei der Transposition wird eine Antibiotikaresistenz vermittelt, die zur Selektion der Mutanten benutzt wird. Wichtig ist, dass die Methode der Transposonmutagenese das Hantieren mit mutagenen Substanzen vermeidet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Zellen des Stammes *Burkholderia fungorum* FLU 100 durch geeignete Transposons mutiert werden. Dabei sollen Gene des Aromatenabbaus getroffen werden. Wird ein Gen für ein Enzym eines Aromatenabbauweges getroffen, so wird das zugehörige Enzym, bzw. das gebildetete Protein mit höchster Wahrscheinlichkeit inaktiv sein. Solche defekten Enzyme werden in der Zelle erkannt und rasch wieder abgebaut. Das entsprechende Enzym in der Aromatenabbaukette ist somit ausgeschaltet, die Kette ist unterbrochen. Das Substrat dieses fehlenden Enzyms wird dann, wenn keine Isoenzyme zur Verfügung stehen, nicht weiter akkumuliert. Es sammelt sich zuerst im Cytosol der betroffenen Zelle an und wird nach einer gewissen Zeit an das die Zelle umgebende Medium abgegeben. Giftige Metabolite können sich hierbei sogar soweit in der Zelle anreichern, dass diese abstirbt. Werden nun die Metabolite, die verschiedene Mutanten produzieren, in ausreichenden Mengen präpariert, so kann mit verschiedenen Methoden wie GC-MS (Gaschromatographie – Massenspektrometerkopplung), HPLC (Hochdruckflüssigphasenchromatographie) und NMR (Kernresonanzspektroskopie) deren Struktur aufgeklärt werden. Bei einer hinreichend großen Anzahl bekannter Metabolite kann ein Abbauweg für das entsprechende Substrat postuliert werden (Hesse 1991).

#### 3.9.2.1. Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien

Bakterien sind haploide Organismen, sie pflanzen sich vegetativ fort. Dennoch existieren zahlreiche Möglichkeiten, genetisches Material zwischen den Zellen auszutauschen. Bakterien können dadurch das Fehlen von sexueller Fortpflanzung zumindest teilweise kompensieren. Bessere Anpassungsfähigkeit und Evolution sind die Vorteile, die sich für die Bakterien aus der Übertragung von genetischem Material ergeben. Die Vorgänge des Gentransfers bei Bakterien lassen sich in drei Gruppen einteilen: Transformation, Transduktion und Konjugation.

### *Transformation:*

Frederick Griffith hat 1928 zum ersten Mal das Phänomen der Transformation beschrieben (Griffith 1928). Er zeigte, dass abgetötete Pneumococcen die Fähigkeit haben, phänotypische Merkmale auf vitale Zellen zu übertragen, diese also zu *transformieren*. Im Jahre 1944 gelang es Oswald T. Avery und seinen Mitarbeitern, aufbauend auf den Arbeiten von Griffith, zu beweisen, dass die DNA den Träger der Erbinformation in biologischen Systemen ist (Avery 1944).

Einige Bakterien, etwa ein Prozent der untersuchten Spezies, vor allem grampositive Stämme (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*), können frei im Medium gelöste DNA aufnehmen. Die Fähigkeit zur Aufnahme von Zellkontext - freier DNA ist je nach Organismus von den dazu zur Verfügung stehenden Enzymsystemen abhängig. Transformation kann bei grampositiven und gramnegativen Bakterienstämmen beobachtet werden. Allerdings können die Zellen nicht in jeder Wachstumsphase Fremd-DNA aufnehmen. Die *Kompetenz* der Bakterienzelle hierfür läuft von Medium, Sauerstoffkonzentration und vom Stamm ab.

Bakterienstämme können durch geeignete Behandlungen auch künstlich kompetent gemacht werden. Kompetente Zellen von beispielsweise *Escherichia coli* werden kommerziell angeboten und können tiefgekühlt längere Zeit gelagert werden.

Mechanistisch bindet die Fremd-DNA an ein membranständiges Protein. Durch eine Exonuclease wird einer der Stränge abgebaut, während der andere Strang in die Zelle befördert wird. Dort kann die Fremd-DNA mit der genomischen DNA der Zelle rekombinieren. Hierfür sind zelleigene Reparaturenzyme verantwortlich.

Es existieren auch Methoden, um nicht - kompetente Zellen zur Aufnahme extrazellulärer DNA zu bringen, beispielsweise die Elektroportation.

### *Transduktion:*

Bei diesem Mechanismus des Austausches von genetischer Information zwischen Bakterienzellen wird die DNA durch Phagen transportiert. Infizierte Zellen produzieren während des lytischen Zyklusses große Mengen an Phagen. Hierbei kann zufälligerweise ein Phagenkopf mit genomischer DNA der Wirtszelle beladen werden. Infiziert solch ein Phage eine andere Bakterienzelle, so wird die genomische DNA der Wirtszelle in deren Genom eingebaut. Phagen können sowohl ssDNA, dsDNA (linear oder zirkulär) als auch mRNA transduzieren. In der Molekularbiologie werden Phagen als Vektoren eingesetzt.

### *Konjugation:*

Als Konjugation wird der Austausch von Genmaterial zweier Bakterien im direkten Kontakt zueinander bezeichnet. Sie wurde im Jahre 1946 von Lederberg und Tatum entdeckt (Lederberg 1953). Sie beobachteten, dass unterschiedliche, mehrfach auxotrophe Stämme von *Escherichia coli* beim Kontakt miteinander ihre Auxotrophien komplementieren konnten.

Es werden auf dem Wege der Konjugation Plasmide oder chromosomale DNA übertragen. Die Konjugation stellt wahrscheinlich die am häufigsten stattfindende Quelle für den Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien in der Natur dar. Sie wurde in zahlreichen Kompartimenten beobachtet, wie im Boden oder im menschlichen Darm. Sie tritt bei grampositiven und bei gramnegativen Bakterienstämmen auf. Transformationsvorgänge in nosokomialen Bakterienstämmen stellen eine bedeutende Bedrohung dar, da hier vor allem Antibiotikaresistenzgene ausgetauscht werden und multiresistente pathogene Bakterienstämme entstehen, die nur schwer zu bekämpfen sind (Dionisio 2002).

Bei den Konjugationsmechanismen ist zwischen grampositiven und den gramnegativen Zellen zu unterscheiden. Die Konjugationsmechanismen grampositiver Zellen wurden anhand von *Enterococcus faecalis* untersucht (Andrup 1999). Rezipientenzellen dieses Stammes leiten die Konjugation durch Ausschleusen von kleinen Mengen eines kurzen hydrophoben Peptids ein. Dieses besteht nur aus sieben oder acht Aminosäuren. Dieses Peptid wirkt wie ein Pheromon und lockt Donorzellen an. Beide Zellen kommen in Kontakt und ein Plasmid wird vom Donor auf den Rezipienten übertragen.

Die Konjugationsmechanismen gramnegativer Zellen gestalten sich komplizierter als diejenigen der grampositiven Zellen. In *Escherichia coli* existiert das knapp 100 Kilobasen umfassende Fertilitätsplasmid (F - Plasmid). Zellen, die über dieses Plasmid verfügen, werden als F<sup>+</sup> - Zellen bezeichnet. Das Plasmid trägt alle Informationen, die für seine eigene Übertragung auf andere Zellen im Wege der Konjugation notwendig sind. Bei Hfr - Stämmen (high frequency of recombination) ist das F - Plasmid im Chromosom integriert. Stämme, die nicht über das F - Plasmid verfügen, werden F<sup>-</sup> - Stämme genannt (Knippers 2006).

F<sup>+</sup> - Zellen bilden F - Pili (Sexpili) aus. Das sind lange Schläuche, die aus dem Protein F - Pilin aufgebaut sind. Sie sind an der inneren Membran verankert. Der Bauplan hierfür wird in der tra - Region (transfer) des Plasmids kodiert. Die Konjugation zwischen einer F<sup>+</sup> - Zelle und einer F<sup>-</sup> - Zelle beginnt mit der Kontaktaufnahme eines F - Piluses der Donorzelle mit der Außenmembran der Rezipientenzelle. Danach verkürzt sich der Pilus und die Zellmembranen verschmelzen miteinander. Danach wird der Transfer der DNA eingeleitet. Das Plasmid wird in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt und am oriT geschnitten, es findet eine "rolling circle replication" statt. Einer der Einzelstränge wird auf die Rezipientenzelle übertragen. In beiden Zellen werden die Einzelstränge des Plasmids zu Doppelsträngen ergänzt. Die Übertragung erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ca. 1000 Basen pro Sekunde. Die Rezipientenzelle ist

hernach zu einer F<sup>+</sup> - Zelle geworden. Hfr – Stämme können ihr gesamtes Chromosom auf eine Rezipientenzelle übertragen. Dieses kann dort mit dem vorhandenem Chromosom rekombinieren.

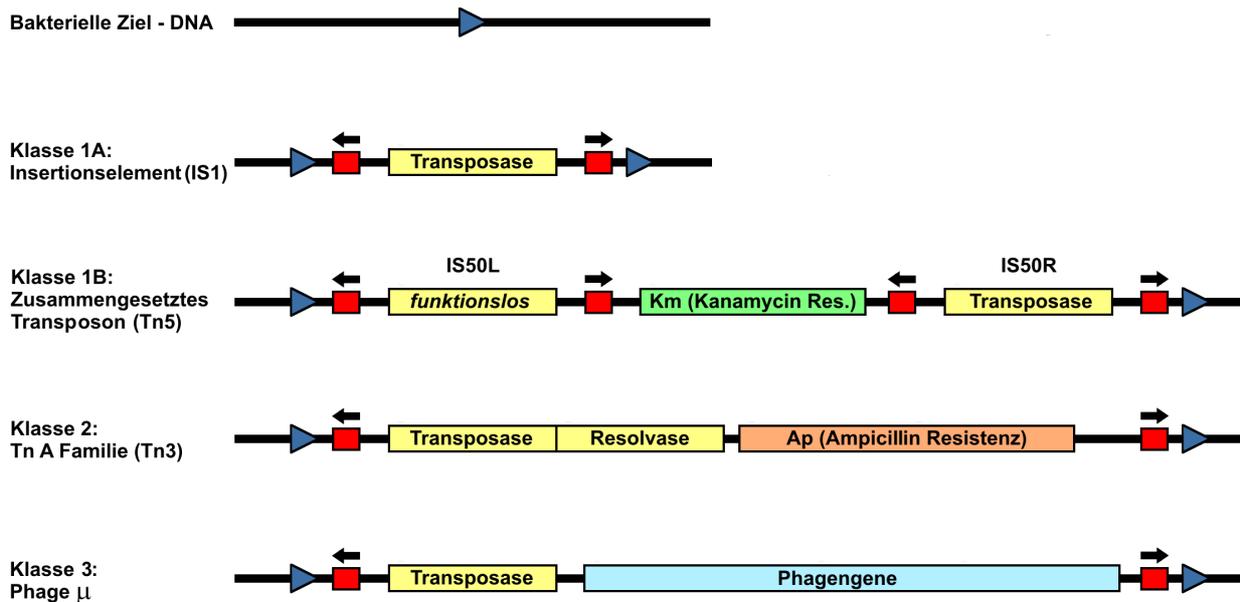
Im Rahmen der Transposonmutagenese findet die Konjugation zwischen dem Donorstamm (*Escherichia coli*) und dem Rezipientenstamm (*Burkholderia fungorum* FLU 100) statt. Hierbei wird das Plasmid pCro2A von Zelle zu Zelle übertragen.

### 3.9.2.2. Eigenschaften von mobilen genetischen Elementen

Zu den mobilen genetischen Elementen werden IS – Elemente (Insertionssequenzen), Transposons und einige Phagen gezählt. Diese sind in allen Organismenklassen gefunden worden. Allen diesen Gensequenzen ist gemein, dass sie ihre Position im Genom des Wirtes mit Enzymhilfe verändern können.

Die Wirkungsweise von mobilen genetischen Elementen ("jumping genes", "mobile genetic elements") wurde erstmals von Barbara McClintock im Jahre 1950 anhand von Phänomenen in Maispflanzen beschrieben (McClintock 1950). Ihr wurde für diese Entdeckung der Nobelpreis für Medizin im Jahre 1983 verliehen.

Mobile genetische Elemente enthalten neben den Sequenzen, die für die Transposition notwendig sind, auch eine oder mehrere proteinkodierende Sequenzen. Sie werden in drei Klassen eingeteilt (siehe Bild 33): Einfache Transposons werden als Klasse 1 (Insertionssequenzen, Retrotransposons) bezeichnet, typische Vertreter sind IS1, Tn5, Tn9 und Tn10. Hiervon spielt im Rahmen dieser Arbeit das Tn5 eine Rolle. Komplexe Transposons werden der Klasse 2 (DNA Transposons) zugeordnet, wozu beispielsweise Tn3 gerechnet wird. Einige Phagen, wie beispielsweise der Phage  $\mu$  werden in ihrem Stadium als Provirus zu den mobilen genetischen Elementen gezählt.



**Bild 33: Die Klassen der Transposons**

Dargestellt ist die bakterielle Ziel – DNA (blaue Dreiecke). Die Klasse 1A der Transposons umfasst alle reinen IS-Elemente. Sie sind relativ kurze Sequenzen, die ein Gen für eine Transposase enthalten, dieses ist von repetitiven Sequenzen (direct repeats, rote Quadrate) flankiert. Die in der Klasse 1B der Transposons eingeordneten Strukturen transportieren neben einer Transposase auch ein Nutzgen, beispielsweise eine Antibiotikaresistenz (siehe Text). Die komplexen Transposons der Klasse 2 verfügen neben der Transposase auch über eine Resolvase. Zur Klasse 3 der Transposons werden verschiedene Phagen in ihrem Stadium als Provirus gezählt. Diese transportieren neben der eigentlichen Transposase auch einen kompletten Satz Phagengene.

*Klasse 1A: Insertionselemente (IS - Elemente):*

IS – Elemente sind relativ kurze Gensequenzen, die ein transposables Element darstellen. Sie erreichen einen Umfang zwischen 768 (IS1) und 2132 (IS21) Basenpaaren (Henning 2002). Normalerweise enthalten sie nur eine einzige proteinkodierende Sequenz, in der Regel ist dies eine Transposase (siehe Bild 33). Manchmal findet sich auch eine zweite proteinkodierende Sequenz, die regulatorisch auf die Transposase wirkt. An den Enden der IS – Elemente befinden sich repetitive, zueinander komplementäre Sequenzen, die "inverted repeats". IS - Elemente können an verschiedenen Stellen im Chromosom von Bakterien inserieren. Dort unterbrechen sie die vorhandene Sequenz. Verlassen sie das Chromosom oder Plasmid so bleiben einsträngige Reste der inverted repeats zurück. Diese Stellen werden von den zelleigenen Reparatursystemen erkannt und vervollständigt. Es bleiben also zusätzliche Basenpaare an dieser Stelle zurück, wenn das IS – Element bereits weiter gewandert ist.

*Klasse 1B: zusammengesetzte Transposons:*

Die Transposons der Klasse 1 bestehen aus zwei Insertionssequenzen, welche eines oder mehrere Gen flankieren (siehe Bild 33). Sie ähneln in gewissem Sinne den Retroviren (Henning 2002). Die Transposition erfolgt in der Regel nach dem "copy and paste" Schema (replikative Transposition). Die Ausgangssequenz des Transposons verbleibt im Genom, sie sind in der Regel dispers im Genom verteilt. Klasse 1 Transposons können mehrere proteinkodierende Sequenzen transportieren wie beispielsweise Antibiotikaresistenzen.

*Klasse 2: komplexe Transposons:*

Transposons der Klasse 2 sind komplizierter aufgebaut. Hier ist die erfolgreiche Transposition auf die Anwesenheit einer Transposase angewiesen. Verlassen sie das Genom, dies geschieht mit Hilfe ihrer Resolvase, so bleiben "sticky ends" zurück. Diese werden von zelleigenen Reparaturenzymen wieder zur Doppelhelix aufgefüllt, allerdings wird in keinem Fall die Ursprungssequenz, die vor der Anwesenheit des Transposons an diesem Ort vorlag, wieder hergestellt. Es bleibt stets eine Mutation durch zusätzliche Basenpaare zurück. Die vom Transposon mitgeführte Transposase inseriert das ausgeschnittene Transpon wieder im Genom. Dies kann, je nach Typ der Transposase unabhängig von der Sequenz des Zielortes erfolgen oder aber von einer bestimmten Concensussequenz abhängen. Klasse 2 Transposons funktionieren also nach dem "cut and paste" (Ausschneiden und Einfügen) Prinzip. Sie verfügen über das Gen zu einem zweiten Enzym, einer Resolvase.

*Klasse3: Phagen (Prophagen):*

Die Transposonsequenz der Phagen wird durch zelleigene Polymerasen auf RNA umkopiert. Das Transposon enthält zumeist eine proteinkodierende Sequenz für eine Reverse Transkriptase. Diese kopiert die erstellte RNA zurück nach DNA. Diese kann dann wieder in das Genom inseriert werden.

**3.9.2.3. Tn5 und abgeleitete Transposons**

Tn5 gehört zur Klasse 1, also den zusammengesetzten Transposons und verfügt über 5700 Basenpaare, es sind Gene für eine Kanamycin-, Streptomycin- und Bleomycinresistenz vorhanden. Flankiert wird Tn5 von zwei IS50 Insertionssequenzen (1535 Basenpaare), von denen nur die rechte (IS50R) funktionsfähig ist, d.h. ein vollständiges Transposasegen trägt. Sie kann auch als eigenständige Einheit transponiert werden. In der linken Insertionssequenz (IS50L) ist das Transposasegen defekt, ein Stoppcodon in seiner Mitte verhindert, dass keine

funktionsfähige Transposase gebildet wird. Sie enthält jedoch einen Promotor für die upstream nachfolgende Kanamycinresistenz.

Aufgrund seiner Struktur benötigt Tn5 keine längeren homologen Sequenzen für seine Insertion in das Genom des Wirtes. Dies ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu Transposons wie beispielsweise Tn3, die der Klasse 2 zuzuordnen sind. Es kann sich nahezu wahlfrei in das Genom inserieren. Jedoch hat sich herausgestellt, dass Tn5 gewisse Consensussequenzen für seine Insertion bevorzugt. Diese werden als Hotspots bezeichnet, hier inseriert sich Tn5 etwa fünfmal häufiger als in nicht – Hotspot - Sequenzen (Berg 1983).

Bei der Insertion von Tn5 werden neun Basenpaare von der Transposase dupliziert. Analysen dieser neun Basenpaare zeigten, dass diese statistisch am häufigsten von GC – Paaren flankiert sind. Diese bilden die Consensussequenz (GNTYWRANC). Weniger häufig wird durch die Transposase an solchen Sequenzen inseriert, die nur von einem GC – Paar flankiert sind, sich also deutlich von der Consensussequenz unterscheiden. Selten wird an Stellen inseriert, die von GC – Flanken frei sind. Die Wahrscheinlichkeit für die Insertion ist also in GC reichen Bereichen des Genoms erhöht.

Des Weiteren hat auch der Zustand der Ziel-DNA einen Einfluss auf die Transpositionswahrscheinlichkeit von Tn5. Dieses scheint aktiv transskribierte sowie hoch supercoilte DNA zu bevorzugen. Dies liegt möglicherweise an der einfacheren Trennbarkeit der supercoilten DNA-Stränge, was wiederum das Schneiden des Zielstranges durch die Tn5 Transposase erleichtert.

Dennoch eignet sich Tn5 für eine Zufallsmutagenese von Bakterienstämmen, denn in den Zielsequenzen des Transposons, den katabolen Genen von Aromatenabbauwegen, sind hinreichend Attraktoren für Tn5 vorhanden. Es sollte jedoch immer im Bewusstsein des Experimentators bleiben, dass bestimmte Hotspots bevorzugt werden.

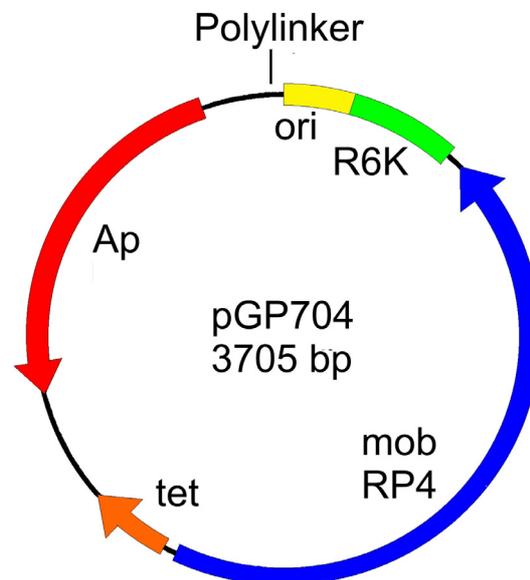
Gramnegative Bakterien eignen sich gut als Zielorganismen für das Transposon Tn5. Es kann dort Gen- oder regulatorische Sequenzen disruptieren. Trifft Tn5 eine proteinkodierende Sequenz, so wird ein funktionsloses Protein gebildet. Die Expression nachfolgender Proteine kann beeinflusst werden. Promotoren und Operatoren, die von Tn5 getroffen werden, führen zur Verminderung der Expression oder zum Ausfall eines ganzen Operons. Es kann aber auch die Expression von Genen verstärkt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Tn5 – Varianten zur Mutagenese in FLU 100 verwendet. Diese sollen jetzt beschrieben werden.

*pUT - mini Tn5 - Km*

Die Arbeitsgruppe um de Lorenzo konstruierte Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts eine Gruppe von Plasmiden in *Escherichia coli*, speziell zur Transposonmutagenese von Eubakterien. Diese wurde vor allem auf eine gute Inserierbarkeit in Bodenbakterien wie *Pseudomonas* entwickelt (Lorenzo 1990).

Ursprünglich wurde das Plasmid pGP704 entworfen (siehe Bild 34). Dieses trägt ein R6K-Fragment aus Mbol (*oriV*). Das Plasmid wird nur in Zellen repliziert, die das zugehörige  $\pi$ -Protein exprimieren. Hierzu zählt beispielsweise ein  $\lambda$ *pir* Lysogen aus *Escherichia coli* K-12. Des weiteren ist auf dem Plasmid eine mobRP4 Sequenz (*oriT* – origin of transfer). *Escherichia coli*-Spezies, die über ein in ihr Chromosom integriertes RP4 verfügen, können das Plasmid durch Konjugation auf andere Stämme übertragen.



**Bild 34: Karte des Plasmids pGP704**

Das Plasmid trägt ein Ampicillinresistenzgen (Ap) als Marker. Die mobRP4 - Region erlaubt die Konjugation aus Donorstämmen heraus, die über ein in ihr Chromosom integriertes RP4 verfügen. Das R6K – Fragment erlaubt die Replikation in Stämmen, die das zugehörige  $\pi$  - Protein exprimieren können (nach Miller 1988).

Das Plasmid pGP704 wurde zu pUT weiter entwickelt (Lorenzo 1990). Dieses enthält zusätzlich Strukturelemente aus Tn5, darunter eine Transposase, deren Sequenz sich jedoch außerhalb der 19 Basenpaare der "terminal repeat sequences" von Tn5 befindet. Diese Repeats flankieren nun verschiedene Standard-Antibiotikaresistenzgene (Kanamycin, Streptomycin, Spectinomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin). Es wurde auf Tn5 zurückgegriffen, da dieses Transposon mit einem breiten Spektrum von möglichen Wirten kompatibel ist und seine terminal repeats nur 19 Basenpaare umfassen (Makris 1988).

Diese neue Struktur (Bild 35) wird als miniTn5 bezeichnet (Lorenzo 1990). Es wird also nur die Antibiotikaresistenz transponiert, nicht aber die Elemente, die zur Transposition notwendig sind. Einmal inseriert, kann sich das miniTn5 nicht mehr mit Hilfe einiger exprimierter Sequenzen weiter im Genom verbreiten.

Der Donorstamm, *Escherichia coli* S17.1 dyT miniTn5-Km produziert das  $\pi$ -Protein und enthält RP4 in seinem Genom. Das Plasmid *pUT-miniTn5-Km* liegt einige Generationen lang stabil vor. Es besteht eine kleine Chance, dass es sich in das Chromosom integriert. Diese Zellen können nicht mehr für die Transposonmutagenese von Eubakterien verwendet werden. Das Plasmid veranlasst durch seine *mobRP4*-Sequenz den Wirt F-Pili auszubilden. Über diese kann das Plasmid auf Rezipientenstämme übertragen werden. Innerhalb des Rezipientenstammes wird die Transposase des Plasmides exprimiert. Das auf dem Plasmid mitgeführte Tn5 kann sich in das Genom des Rezipientenstammes inserieren. Da ein geeigneter Rezipient kein  $\pi$ -Protein produzieren kann, wird das Plasmid nicht repliziert. Tochterzellen enthalten also kein *pUT-miniTn5-Km* mehr. Das Insert, das nur aus den flankierenden Repeats von Tn5 und dem Kanamycinresistenzgen besteht, wird auch nicht innerhalb des Rezipienten weiter transponiert, da mit dem Donorplasmid auch die Transposase verloren gegangen ist.

Die Transposition findet also einmalig statt. Die Antibiotikaresistenz wird fest und stabil im Genom des Rezipienten verankert. Mittels geeigneter Screeningmethoden ermöglicht dies die Selektion auf Zellen, bei denen die Transposition erfolgreich stattgefunden hat. Die Insertion findet ausreichend zufällig auf dem Genom des Rezipienten statt. So kann das betroffene Gen deaktiviert werden. Dies kann nur funktionieren, wenn der Rezipientenstamm selbst keine natürliche oder erworbene Antibiotikaresistenz besitzt.

Für diese Arbeit standen eine Reihe von *pUT-miniTn5-Km*-Transposonmutanten von FLU 100 zur Verfügung. Die Analyse der von ihnen produzierten Metabolite konnte erste Hinweise auf den Abbauweg von Fluorbenzol geben.



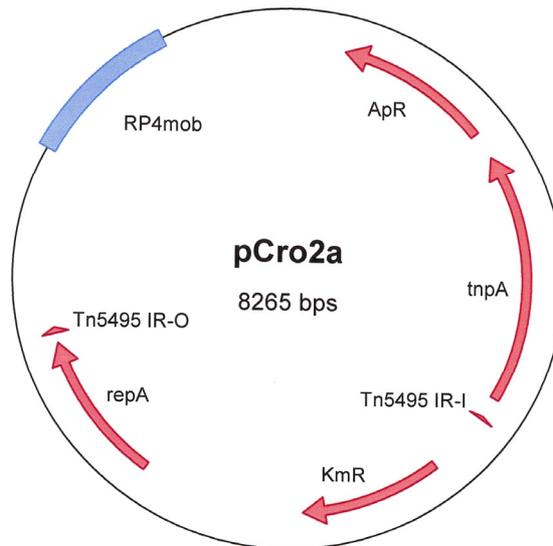
**Bild 35: Struktur des Minitransposons miniTn5Km**

Das Insert enthält ein Standard-Kanamycinresistenzgen (grün dargestellt). Die der "terminal repeat sequences" sind rot gekennzeichnet. Es befindet sich auch noch eine kurze, hier gelb gezeichnete Sequenz aus Tn5 im Insert. Des weiteren sind noch zwei starke Transkriptionsterminatoren (hier mit "T" markiert) enthalten (Abbildung nach Lorenzo 1990, Herrero 1990).

*pCro2A / minTn5495*

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen miniTn5 eignen sich gut, um Mutanten zur Metabolitproduktion zu gewinnen. Die Sequenz des vom Transposon unterbrochenen Gens ist jedoch von großer Bedeutung. Aus ihr lassen sich Art des betroffenen Enzyms sowie dessen Verwandtschaftsverhältnisse zu bekannten Sequenzen ableiten. Bei Transposonmutanten, die mit Hilfe von *pUT-miniTn5-Km* erzeugt wurden, ist dies ein arbeitsreicher und fehleranfälliger Prozess. Daher wurden die Minitransposons von Dr. J. Altenbuchner und C. Onaca mit dem Ziel weiterentwickelt, das Umklonieren der transposonflankierenden Sequenzen zu erleichtern (Onaca 2005, 2006). Am Ende dieser Arbeiten stand das Plasmid pCro2A (Donorstamm: *Escherichia coli* S17-1). Dieses Plasmid besitzt einige Ähnlichkeiten mit dem Plasmid miniTn5Tc von de Lorenzo (Bild 36). Es besitzt ein Kanamycinresistenzgen zwischen zwei repetitiven Tn5 Enden, eine RP4mob-Sequenz ist ebenfalls vorhanden. Damit kann pCro2A vom Donorstamm auf einen gramnegativen Rezipientenstamm übertragen werden. Zusätzlich trägt es ein Ampicillinresistenzgen, dieses befindet sich ebenso wie das Transposasegen außerhalb der repetitiven Tn5 Enden. Diese werden also nicht transponiert. Innerhalb der repetitiven Tn5-Enden befindet sich neben dem Kanamycinresistenzgen eine *ori repA*-Sequenz. Dies erleichtert das Umklonieren von transposonflankierenden Sequenzen in *Escherichia coli*.

Hierzu wird die genomische DNA aus einem erkannten knock-out-Mutanten präpariert und mit Restriktionsenzymen verdaut. Diese dürfen nicht innerhalb des Tn5 - Inserts schneiden. Die geschnittene DNA wird gereinigt und mittels T4 – Ligase zyklisiert. Mit den so gewonnenen Protoplasmen werden kompetente Zellen von *Escherichia coli* transformiert und auf die Kanamycinresistenz gescreent.



**Bild 36: Das Plasmid pCro2a/miniTn5495**

Dieses trägt als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen (ApR). Die RP4mob-Sequenz ermöglicht einem Stamm, der chromosomal RP4 enthält, die Konjugation mit einem anderen gram-negativen Stamm. Das Gen für eine Transposase (tnpA) verhilft dem von Tn5495 IR-O und Tn5495 IR-I begrenzten Minitransposon, sich in das Genom des Rezipientenstammes zu inserieren. Sie selbst liegt außerhalb der transponierten Sequenz. Das Transposon verbleibt also stabil im Rezipientenstamm. Es enthält ein Kanamycinresistenzgen (KmR) sowie einen origin of replication (repA) für *Escherichia coli*, was das Klonieren von DNA – Fragmenten, die diese Sequenz enthalten, dramatisch erleichtert. Die vermittelte Kanamycinresistenz dient als Selektionsmarker nach der erfolgreichen Transposition. (Bild von Christina Onaca, siehe Onaca 2005).

#### 3.9.2.4. Das Antibiotikum Kanamycin als Selektionsmarker

Um die Transformanten bei der Transposonmutagenese selektieren zu können, muss das Transposon einen Selektionsmarker transponieren. Dazu dient bei beiden verwendeten Transposons (miniTn5Km und pCro2a/miniTn5495) ein Kanamycinresistenzgen. Mit dessen Hilfe können Transformanten vom FLU 100 Wildtyp und vom *E. coli* Donorstamm sicher unterschieden werden, denn ersterer ist sensitiv auf Kanamycin und letzterer kann wegen seiner Auxotrophien durch Verwendung eines Minimalmediums ausgeschlossen werden.

Kanamycin ist ein auf Bakterien wirkender Ribosomenhemmer. Es gehört zur Gruppe der Aminoglykosid - Antibiotika. Es stammt ursprünglich aus dem Stamm *Streptomyces kanamyceticus*. (Caysa 2005). Es ist ein basisch reagierender Stoff und wird normalerweise als Sulfat in den Handel gebracht.

In Bakterienzellen wirkt Kanamycin auf die Proteinsynthese. Es gelangt durch passive Diffusion oder durch sauerstoffabhängigen aktiven Transport in die Zelle. Es bindet an die

30S-Untereinheit der Ribosomen. Dies führt dazu, dass die N-Formylmethional-t-RNA nicht mehr gebunden werden kann. Die Proteinbiosynthese ist somit unterbunden. Ein weiterer Wirkungsmechanismus von Kanamycin ist die Bindung an die Aminoacyl-t-RNA. Dies verhindert die Proteinbiosynthese der Bakterien. Bakterienzellen, die sensitiv auf Kanamycin reagieren, produzieren dann nur noch defekte und unvollständige Proteine. Die Zellen sterben rasch ab. Das Antibiotikum tötet im Gegensatz zum Penicillin auch Zellen ab, die sich nicht aktiv teilen.

Hier soll angemerkt werden, dass Kanamycin im menschlichen Körper zu einer Verletzung (Läsion) des Perikaryons eines Neurons führt. Es kommt zu einer Degenerierung der gesamten Nervenzelle, die anschließend abstirbt (Eisenbrand 2002), es wird daher als toxisch eingestuft, da es zudem als nierenschädlich erkannt wurde. In Deutschland wird Kanamycin pharmakologisch nur noch äußerlich, beispielsweise in der Augenheilkunde angewendet. Kanamycin ist verschreibungs- und apothekenpflichtig (Caysa 2005). Es gilt jedoch als Reserveantibiotikum in der Humanmedizin (Tuberkulose).

### **3.10. Ansätze aus der Proteomik**

Das Proteom ist in Analogie zum Genom definiert und umfasst die zu einem definierten Zeitpunkt in einem Organismus vorhandenen Proteine. In Bakterien unterliegt das Proteom je nach Induktionszustand und Position im Zellzyklus dramatischen Veränderungen (Tropel 2004). Es wird durch die ständige Neusynthese und den Abbau von nicht mehr benötigten Enzymen verändert. Das Proteom von Bakterienzellen kann bildgebend nach einem Zellaufschluss durch Gelelektrophorese dargestellt werden. Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese werden die denaturierten Proteine nach ihrer Masse und ihrer Diffusionsfähigkeiten im Polyacrylamidgel getrennt. Das Gelbild ist allerdings nur wenig aussagefähig. Erst die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese lässt nahezu jedes Protein sichtbar werden, das in einer hinreichenden Konzentration vorhanden ist.

Die 2D-Gelelektrophorese stellt die derzeit empfindlichste Methode zur Auftrennung komplexer Proteingemische dar (Görg 2000). Das der 2D-Gelelektrophorese zugrunde liegende Prinzip wurde 1975 von O'Farrell, Klose und Scheele eingeführt (Klose 1975). Hier werden die Proteine in einem Gelstreifen mit einkondensiertem pH - Gradienten im elektrischen Feld nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt (isoelektrische Fokussierung, IEF). Je nach pH-Wert liegen die Carboxyl- oder Aminogruppen ja entweder in protonierter oder deprotonierter Form vor, was eine unterschiedliche Ladung der Seitenketten zur Folge hat. Als isoelektrischer Punkt ist derjenige pH-Wert definiert, an dem sich alle positiven und negativen Teilladungen eines Proteins gegenseitig aufheben, das Protein also Nettoladung null besitzt, es nach außen hin also elektrisch neutral ist und im elektrischen Feld nicht mehr wandern kann.

Die IEF stellt die erste Dimension dar. Um die unterschiedlichen Proteine, die sich am selben isoelektrischen Punkt sammeln, zu separieren, werden die Proteine orthogonal dem Verlauf der isoelektrischen Punkte klassisch im Polyacrylamidgel nach ihrer Länge und ihren Diffusionseigenschaften aufgetrennt. Jedes Protein erscheint nach einer geeigneten Färbemethode oder nach einer radioaktiven Markierung im Gel als Punkt (Spot). Das zweidimensionale Proteinspotmuster kann mehrere tausend Proteine pro Gel umfassen. Die Spots können leicht aus dem Gel ausgeschnitten werden. Durch massenspektroskopische Methoden können die Sequenzen der isolierten Proteinspots ermittelt werden.

In dieser Experimentengruppe wurden Gel - Streifen mit immobilisierten pH - Gradienten (IPG) der Firma Amersham Biosciences verwendet. Diese sind seit Ende der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts verfügbar und garantieren eine gute Reproduzierbarkeit der 2D-Gelelektrophorese. Bei diesen Streifen wird der pH - Gradient aus Acrylamid - Derivaten mit puffernden Gruppen, den Immobilinen, durch Copolymerisation mit den Acrylamid-Monomeren in einem Polyacrylamidgel erzeugt.

Entscheidend für den Erfolg der 2D-Gelelektrophorese ist die Probenaufarbeitung. Am Anfang steht die Auswahl des zu untersuchenden Bakterienansatzes. Dieser muss sich im gewünschten Induktionszustand befinden. Danach folgt ein effektiver Zellaufschluß mittels French - Presse, Ultraschallbehandlung oder Lysis-Puffer. Dabei ist die Inhibierung zelleigener Proteasen wichtig. Ansonsten können Proteindegradationsphänomene auftreten. Für ein hochauflösendes Ergebnis ist es erforderlich, Proteine mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften gemeinsam in Lösung zu bringen. Schlecht gelöste Proteine können die Gelmatrix verstopfen und zu langgezogenen Proteininseln, dem so genannten pointstreaking im Gel führen (Görg 2000).

Besonders Membranproteine mit hydrophoben Domänen und Proteine mit extremen isoelektrischen Punkten, also sehr basische oder saure Proteine zeigen eine geringe Löslichkeit. Am isoelektrischen Punkt liegt die größtmögliche Zahl der Aminosäuren als Zwitterion vor. Die Löslichkeit in Wasser ist hier am geringsten, da Kation- und Anionform ja stärker hydratisiert werden.

Die meisten Solubilisierungslösungen enthalten Harnstoff, ein nichtionisches oder zwitterionisches Detergenz und ein Reduktionsmittel. Harnstoff zerstört als chaotropes Agens Entropie-erhöhend die regelmäßige, auf der Bildung von Wasserstoffbrücken beruhende Struktur des Wassers. Ebenso greifen chaotrope Agenzien in die Wasserstoffbrückenstruktur der Proteine ein. Hierdurch kommt es zu einer Verminderung des hydrophoben Effekts, die Proteine denaturieren. Ein Detergenz, beispielsweise Natriumdodecylsulfat verhindert die Aggregation von Proteinen und stellt die Löslichkeit sicher. Disulfidbrücken im Protein werden durch Dithiothreitol (DTT) oder 2-Mercaptoethanol reduziert. Zusammengenommen zerstören diese Agenzien die Sekundär-, Tertiär- und, wenn vorhanden, auch die Quartärstruktur des

Proteins, während die Primärstruktur, also die Abfolge der Aminosäuren in den nun denaturierten Aminosäurefäden erhalten bleibt.

Die Probenaufarbeitung muß immer an die Versuchsfragestellung angepasst werden (Kim 2004). Um Proteine, die nur in wenigen Kopien in der Zelle vorliegen, neben stärker exprimierten überhaupt darstellen zu können, oder wenn nur ein Teil der Proteine interessiert (z. B. bestimmte Abbauenzyme), ist eine eventuelle Vorfraktionierung sinnvoll. Auf solche Verfahrensschritte wurde aber im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

### 3.11. Bestimmung der Verdampfungsenthalpie

Die Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol ist ein wichtiger Parameter. Sie entscheidet, ob das Fluorbenzol bei der Aufgabe in den Luftstrom der Reaktoren ohne externe Beheizung verdampfen kann.

Diese Werte sollten experimentell überprüft werden. Dazu erfolgte zuerst eine theoretische Betrachtung. Als Ausgangspunkt dient die Gleichung von Clausius und Clapeyron (Atkins 1990). Sie definiert die Steigung einer Dampfdruckkurve nach folgender Beziehung:

Gleichung 2: 
$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta_{\text{vap}}H}{T(V_g - V_l)}$$

Mit folgenden Symbolen:

$\Delta_{\text{vap}}H$	molare Verdampfungsenthalpie	[J / mol]
$V_g$	Molvolumen des Dampfes	[m <sup>3</sup> / mol]
$V_l$	Molvolumen der Flüssigkeit	[m <sup>3</sup> / mol]
T	Temperatur der Flüssigkeit	[K]

Diese Gleichung lässt sich vereinfachen. Wenn der Temperatur / Druck – Bereich weit genug unterhalb der kritischen Temperatur und dem kritischen Druck liegt, dann ist  $V_l$  sehr viel kleiner als  $V_g$ . Es kann deshalb vernachlässigt werden. Man erhält:

Gleichung 3: 
$$\frac{dp}{dT} = \frac{\Delta_{\text{vap}}H}{T \cdot V}$$

In erster Näherung gilt das ideale Gasgesetz:

Gleichung 4: 
$$p \cdot V_g = R \cdot T$$

Mit:  $p$  = Sättigungsdampfdruck der verdampfenden Flüssigkeit.

Gleichung 4 in Gleichung 3 eingesetzt führt zu:

Gleichung 5: 
$$\frac{d \ln p}{dT} = \frac{\Delta_{vap} H}{R \cdot T^2}$$

Diese Gleichung lässt sich integrieren, wenn die Verdampfungsenthalpie nicht von der Temperatur abhängt. Dies kann in erster Näherung innerhalb eines kleinen Temperaturbereichs als erfüllt angesehen werden. Die Separation von  $p$  und  $T$  und Umstellung führt zu:

Gleichung 6: 
$$\ln p = \frac{\Delta_{vap} H}{R} \cdot \frac{1}{T} + const$$

Eine graphische Auftragung dieser Geraden mit  $\ln p$  als Ordinate und  $1 / T$  als Abszisse ergibt als Steigung:

Gleichung 7: 
$$m = -\frac{\Delta_{vap} H}{R}$$

Durch Bestimmung von Siedetemperatur / Druck – Wertepaaren kann also die Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol bestimmt werden

.



# Kapitel 4: Materialien und Methoden

## 4. Material und Methoden

Dieses Kapitel enthält die Zusammenstellung aller von mir verwendeten Medien, Lösungen und Verfahren. Siehe auch: Gerhardt 1981, Cappuccino 1992, Bast 1999 und Süßmuth 1997.

### 4.1. Verwendete Organismen

Im Verlauf der Forschungsarbeiten wurde der Stamm FLU 100 eingesetzt. Andere Stämme (Tabelle 4) dienten als Referenzstämmen für zahlreiche Experimente oder als Plasmid-Donoren.

**Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Verwendung als Referenz bei
<i>Burkholderia Fungorum</i> FLU 100	Fluorbenzol verwertender Stamm (Strunk 2000)
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>1</sup>	Referenz für den Gramtest
<i>Escherichia coli</i> DSM 4779 <sup>1</sup>	Referenz für den Gramtest und den Oxidasetest
<i>Escherichia coli</i> pCro 2 <sup>2</sup>	Plasmiddonorstamm
<i>Pseudomonas putida</i> DSM 549 <sup>1</sup>	Referenzstamm der Gattung <i>Pseudomonas</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM 5190 <sup>1</sup>	Referenzstamm der Gattung <i>Pseudomonas</i>
<i>Escherichia coli</i> Klon4 <sup>3</sup>	Stamm zur Erzeugung von Muconsäurederivaten

<sup>1</sup> Stamm aus der Institutsstammsammlung

<sup>2</sup> Der Stamm wurde freundlicherweise von Dr. J. Altenbuchner, Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart, zur Verfügung gestellt

<sup>3</sup> Der Stamm wurde freundlicherweise von Dr. D. Pieper, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, zur Verfügung gestellt.

### 4.2. Medien

Medien für Aufbewahrung und Aufzucht von Mikroorganismen stellen das Basiswerkzeug für den Mikrobiologen dar. Man unterscheidet zwischen Minimalmedien (auch Selektionsmedien) und Vollmedien (auch Komplexmedien). Eine genau definierte Zusammensetzung der verwendeten Medien ist essentiell für das Erzielen von reproduzierbaren Ergebnissen. Die Medien für die Bakterienzucht und –aufbewahrung können flüssig oder gelatinös (Festmedien) sein.

Bei der Präparation von Festmedien wurden alle Lösungen sowie der im Wasser (bidest.) aufgeschlammte Agar separat autoklaviert und erst nach dem Abkühlen auf 45 °C, bzw. unmittelbar vor dem Gießen der Festmedien vermischt (Bast 1999).

Flüssigmedien und Festmedien wurden stets nach denselben Rezepturen hergestellt, den Festmedien wurde 15 g Agar-Agar zugesetzt. Der Agar wurde im bidest. Wasser suspendiert. Minimalmedien enthalten alle für das Leben von Bakterien notwendigen mineralischen Komponenten sowie einen Trägerstoff, in der Regel Agar-Agar. Eine Kohlenstoffquelle (Substrat) wird bei Bedarf separat zugegeben, damit wird ein Selektionsdruck hinsichtlich des eingesetzten Substrats erzeugt.

Vollmedien enthalten alle für das Leben von Bakterien notwendigen mineralischen Komponenten sowie organische Komponenten wie z.B. Aminosäuren, Kohlenhydrate etc. Sie dienen der raschen Vermehrung von Bakterien ohne speziellen Selektionsdruck.

#### 4.2.1. Minimalmedien

*Standard Minimalmedium, einfach gepuffert:*

50 mL	Phosphatpuffer 20-fach, pH 7,1
10 mL	Mineralsalzlösung 100-fach
1 mL	Calciumnitratlösung 1000-fach
15 g	Agar Agar (nur für Festmedien)
	bidest. Wasser ad 1000 mL

*Standard Minimalmedium, einfach gepuffert für Flüssigkulturen, nitratfrei:*

50 mL	Phosphatpuffer 20-fach, pH 7,1
10 mL	Mineralsalzlösung 100-fach
1 mL	Calciumchloridlösung 1000-fach
	bidest. Wasser ad 1000 mL

*Minimalmedium zur Berieselung von Technikumsbiorieselbettreaktoren*

Zusammensetzung:

1 L	Phosphatpuffer 20-fach, pH 7,1
250 mL	Mineralsalzlösung 100-fach
50 g	Calciumchlorid $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
50 g	Ammoniumchlorid $\text{NH}_4\text{Cl}$
50 g	Ammoniumnitrat $\text{NH}_4\text{NO}_3$
	Trinkwasser ad 120 L

#### 4.2.2. Vollmedien

##### *Luria Bertani Medium (LB)*

- 10 g Pepton aus Casein (Roth, Karlsruhe)
  - 10 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
  - 5 g Hefeextrakt (Merck, Darmstadt)
  - 15 g Agar Agar (nur für Festmedien)
- bidest. Wasser ad 1000 mL

##### *Nutrient Broth Festmedium (NB)*

- 8 g Nutrient Broth
  - 15 g Agar Agar (nur für Festmedien)
- bidest. Wasser ad 1000 mL

#### 4.2.3. Ausgangslösungen für die Minimalmedien

##### *Phosphatpuffer 20-fach, pH < 7*

- 100 mL 0,5 m Kaliumdihydrogenphosphatlösung  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- x mL 0,5 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$   
(bis der gewünschte pH erreicht ist)

##### *Phosphatpuffer 20-fach, pH 7,1*

- 20 g Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 70 g Dinatriumhydrogenphosphat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- bidest. Wasser ad 1000 mL

##### *Phosphatpuffer 20-fach, pH >7*

- 50 mL 0,5 m Dinatriumhydrogenphosphatlösung  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- x mL 0,5 m Kaliumdihydrogenphosphatlösung  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
(bis der gewünschte pH - Wert erreicht ist)

*Mineralsalzlösung 100-fach "SL 100" (Dorn 1974)*

100 g	Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
20 g	Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1 g	Ammoniumeisen(III)citrat	
100 mL	Spurenelementlösung SL6, 1000 – fach	
	bidest. Wasser ad	1000 mL

*Calciumnitratlösung 1000-fach "Ca 1" (Dorn 1974)*

50 g	Calciumnitrat	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	bidest. Wasser ad	1000 mL

*Calciumchloridlösung 1000-fach "Ca 2"*

25 g	Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	bidest. Wasser ad	1000 mL

*Spurenelementlösung, 1000-fach "SL6" (Pfennig 1966, modifiziert)*

100 mg	Zinksulfat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
30 g	Mangan(II)chlorid	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
300 mg	Borsäure	$\text{H}_3\text{BO}_3$
200 mg	Cobalt(II)chlorid	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
10 mg	Kupfer(II)chlorid	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
20 mg	Nickel(II)chlorid	$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
30 mg	Natriummolybdat(VI)	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	bidest. Wasser ad	1000 mL

**4.2.4. Zusätze zu Medien***pH – Indikatoren:*

Um acide Metaboliten detektieren zu können, wurde das Minimalmedium fallweise mit zugesetzten pH - Indikatoren (siehe Tabelle 5) präpariert.

**Tabelle 5: Eigenschaften der dem Minimalmedium zugesetzten Indikatoren**

Indikator	Umschlagspunkt [pH]	Agarfarbe (sauer)	Agarfarbe (neutral)	Agarfarbe (alkalisch)
BTB (Bromthymolblau)	6,0 – 7,6	gelb	blaugrün	blau
BKP (Bromkresolpurpur)	5,3 – 6,8	gelb	violett	violett
BPB (Bromphenolblau)	3,0 – 4,6	gelb	blau	blau

*Antibiotika:*

Die Zusatzlösungen sind nicht autoklavierbar, da deren Inhaltsstoffe durch hohe Temperaturen zerstört werden. Aus diesem Grund wurden diese Lösungen sterilfiltriert (220 nm Spritzenfilter). In Tabelle 6 sind die Charakteristika der verwendeten Lösungen zusammengestellt.

**Tabelle 6: Konzentrationen der Antibiotika in ihren Stammlösungen und deren Nennkonzentrationen**

Stoff	Konzentration der Stammlösung	Nenn-Konzentration	Lösemedium
Ampicillin	10 g / L	100 mg / L	Wasser
Penicillin	50 g / L	100 mg / L	Wasser
Chloramphenicol	25	25 mg / L	Ethanol
Tetracyclin	2	10 mg / L	70 % Ethanol
Streptomycin	25	50 mg / L	Wasser
Kanamycin	2 g / L	20 – 50 mg / L	Wasser

*Sonstige Medienzusätze und deren Charakteristika:***Tabelle 7: Konzentrationen sonstiger Medienzusätze in ihren Stammlösungen und deren Nennkonzentrationen**

Stoff	Konzentration der Stammlösung	Nenn-Konzentration
Glucose	180 g / L	0,18 – 1,8 g / L
Natriumcitrat	25,8 g / L	0,774 g / L
Natriumacetat	8,02 g / L	0,241 g / L
IPTG	23 g / L	0,024 g / L

#### 4.2.5. Saline

Saline dient zum Waschen und Resuspendieren von Bakterienpellets.

*Saline 0,9% (w/v)*

9 g NaCl  
bidest. Wasser ad 1000 mL

#### 4.2.6. Lösungen für Stoffwechselltests und Enzymtests

*TRIS – HCl - Puffer pH 8 für Enzymtests*

250 mL 0,1 m Tris(hydroxymethyl)aminomethan  
x mL 0,1 m HCl (bis pH 8 erreicht ist)  
bidest. Wasser ad 500 mL

*Phosphatpuffer pH 8 für Enzymtests*

400 mL 0,1 m Dinatriumhydrogenphosphat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$   
x mL 0,1 m Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (bis pH 8 erreicht ist)

*Substratstammlösungen für Stoffwechselltests*

30mmol Substrat  
bidest. Wasser ad 100 mL  
Bei sauren Substraten wie z.B. 2-Chlorbenzoesäure wurde der pH-Wert mittels Natronlauge auf pH 7 eingestellt

### 4.3. Identifikation und Beschreibung von Bakterienstämmen

#### 4.3.1. Aminopeptidase – Schnelltest

Dieser Farbttest überprüft die Anwesenheit der bei gramnegativen Stämmen zumeist an der Zelloberfläche vorhandenen L-Alaninaminopeptidase, bis auf wenige Ausnahmen ist diese bei grampositiven Zellen nicht anzutreffen.

Für den eigentlichen Test wurde ein Teststäbchen (enthält das Substrat L-Alanin-4-nitroanelid) in eine wässrige Suspension des zu untersuchenden Stamms getaucht und bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Aminopeptidase spaltet das Substrat in L-Alanin und das gelb gefärbte 4-Nitroanelid. Die Auswertung erfolgte nach Anweisung des Herstellers anhand einer Farbskala. Als Referenzstämme wurden *Escherichia coli* DSM 4779 und *Bacillus subtilis* mitgeführt.

### 4.3.2. KOH-Test (Schnelltest auf das Gramverhalten)

Die Zellwände von gramnegativen Bakterien sind durch Kaliumhydroxid (KOH) leicht zerstörbar, während grampositive Zellen dem Laugenangriff in der Regel länger widerstehen können. Diese Eigenschaft der Bakterienzellwände kann zur Bestimmung ihres Gramverhaltens herangezogen werden. Bakterien mit zerstörter Zellwand emittieren unter diesen Bedingungen ihr Cytosol in das sie umgebende Medium. Wird die Impföse in diese Lösung getaucht, können die durch die Lyse freigesetzten selbstadhäsierenden DNA-Bündel als makroskopisch sichtbarer Faden aus der Suspension gezogen werden.

Eine Einzelkolonie des zu untersuchenden Stammes wird auf einem Objektträger ausgestrichen und in einem Tropfen (10 – 20 µL) 3 % (w/v) Kaliumhydroxidlösung suspendiert. Gramnegative Zellen lysieren unmittelbar nach der Konfrontation mit der Lauge, grampositive Zellen benötigen hierzu mindestens 30 Sekunden. Als Kontrollstämme dienen *Escherichia coli* (gramnegativ) und *Bacillus subtilis* (grampositiv).

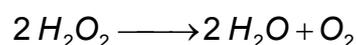
### 4.3.3. Oxidase – Schnelltest

Ein weiterer elementarer Test zur Beschreibung von bakteriellen Isolaten ist der Nachweis der Cytochrom-c-Oxidase, einem bei vielen Prokaryonten vorkommenden peripheren terminalen Membranprotein der Atmungskette. Als Endoxidase überträgt es in der Atmungskette 4 Elektronen auf ein Molekül Sauerstoff.

Mit der Impföse wird etwas Zellmaterial auf ein Teststäbchen Merck Bactident Oxidase 1.13300 aufgetragen und verteilt. Nach einer Minute wird die Färbung des Teststreifens bewertet und mit den Referenzversuchen bzw. der Referenzfarbskala verglichen (bei einer positiven Reaktion blau). Als oxidasepositive Referenz wurde *Pseudomonas putida* DSM 549, als oxidasenegative *Escherichia coli* DSM 4779 eingesetzt.

### 4.3.4. Nachweis von Katalase

Nebenprodukte der Sauerstoffatmung durch die Atmungskettenenzyme sind Hydroperoxidradikale und vor allem Wasserstoffperoxid. Diese Metabolite sind außerordentlich toxisch und daher verfügen alle aerob lebenden Zellen über spezielle Entgiftungsenzyme wie die Superoxiddismutase, Peroxidase und die Katalase. Letztere entgiftet Wasserstoffperoxid.



Die Anwesenheit von Katalase in Bakterienzellen wird durch Konfrontation der Zellen mit einer 3 % (v / v) Wasserstoffperoxidlösung und der nachfolgenden raschen Schaumbildung erkannt.

#### **4.3.5. Gramfärbung**

Die oben beschriebenen Schnelltests geben bei richtiger Durchführung einen schnellen Überblick über das Gram-Verhalten eines Bakterienstammes. Sie können jedoch die Gram-Färbung nicht ersetzen. Die klassische Färbung nach Christian Gram erfolgte nach dem von Süßmuth 1997 beschriebenen Verfahren. Von einem geeigneten bewachsenen Medium wurde mit der Impföse eine Kolonie entnommen, in 20 µl steriler Saline (0,9 %) direkt auf einem frischen Objektträger suspendiert.

Es wurde darauf geachtet, dass die Suspension keine Zellagglomerate enthält, denn bei deren Vorhandensein wird die sichere Aussage des Gramverhaltens verhindert. Anschließend wurde der Objektträger bei 40-50 °C getrocknet. Danach erfolgte eine Hitzefixierung, indem der Objektträger durch eine Bunsenbrennerflamme gezogen wurde. Dieser Schritt ist kritisch für den Erfolg der Bestimmung des Gramverhaltens. Werden die Zellen zu stark erhitzt, dann können später keine eindeutigen Aussagen mehr gemacht werden..

Die so vorbereiteten Ausstriche wurden mit einer Kristallviolettlösung überschichtet und 2 min lang gefärbt. Nach Abgießen des Farbstoffes wurden dann die Objektträger mit Lugolscher Lösung nachbehandelt. Noch anhaftender Farbstoff wird dabei entfernt. Durch Auftropfen von Iodlösung auf die Objektträger wurden die hitzefixierten Zellen für 15 Sekunden gebeizt. Die Präparate wurden danach mit Ethanol gespült, dabei musste darauf geachtet werden, dass nicht zuviel Farbstoff entfernt wurde. Es folgte ein Waschschrift unter fließendem Leitungswasser und die Gegenfärbung mit Carbol-Fuchsin (bei Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops kann auf die Gegenfärbung verzichtet werden). Das Präparat mußte noch getrocknet werden und konnte dann mikroskopisch ausgewertet und fotografiert werden. Gramnegative Bakterienzellen erscheinen im Hellfeld rot bis rosa, während gramnegative Bakterienzellen dunkelblau bis schwarz dargestellt werden.

#### **4.3.6. Verwendung kommerzieller Schnelltests zur biochemischen Beschreibung und Identifizierung der isolierten Stämme**

##### *BIOLOG*

BIOLOG<sup>®</sup>-Mikrotiterplatten dienen zur Identifizierung gramnegativer Mikroorganismen (Fa. Biolog Inc., Hayward CA, USA). Das System bietet den zu bestimmenden Zellen 95 verschiedene Substrate und eine Blindprobe in vials zu je 150 µL Suspension an. Die

Verwertung der Substrate wird durch einen Farbumschlag von klar nach violett mittels eines Redoxindikators angezeigt.

Die zu untersuchenden Stämme wurden bei 30 °C auf BUGM<sup>®</sup>-Medium angezogen, entweder über Nacht oder solange, bis genügend Zellmaterial aufgewachsen war. Die Versuchsdurchführung folgte den Anweisungen des Herstellers. Die aufgewachsenen Kolonien wurden anschließend in Saline suspendiert, auf eine OD<sub>546</sub> (siehe Kapitel 4.4.2.) von 0,2 eingestellt und dann mit einer Multipipette in die Vials der BIOLOG – MicroPlate pipettiert (150 µL je Vial). Anschließend wurde die Platte verschlossen und bei 30°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h und (bei Bedarf) 48 h mittels der Auswertesoftware BIOLOG<sup>®</sup> MicroLog<sup>™</sup>. Dabei wurde der Grad der Färbung in drei Klassen eingeteilt, positiv, negativ und borderline. Diese Ergebnisse wurden mit der BIOLOG<sup>®</sup> MicroLog Software aus deren integrierter Datenbank einer oder mehreren Spezies zugeordnet. Zu jeder Nennung wurde ein "Similarity" – Wert ausgegeben. Eine "Similarity" von über 75 % wird dabei als erfolgreiche Identifizierung betrachtet.

#### *API 20 NE*

Als weiteres Identifizierungssystem diente der API 20 NE – Test der Firma Bio Mérieux (Marcy-l'Étoile, Frankreich). Mit diesem Stoffwechselfest können gramnegative Bakterien, die nicht zu den Enterobakterien gehören, identifiziert werden. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Als Vorkulturen dienten Kulturen, die auf Nutrient Broth Agarplatten gewachsen waren, oder Flüssigkulturen. Die befüllten Teststreifen wurden bei 30 °C für 24 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach den Kriterien des Herstellers und mittels der Software APILAB und der Datenbasis NE V5.1. Eine "Identifizierung" von über 90 % wird dabei als erfolgreich betrachtet.

#### **4.3.7. Morphologische Bewertung**

Die Beobachtung der Isolate hinsichtlich Zellform, Größe, Beweglichkeit, Sporenbildung und Aggregation erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops Zeiss Axioplan 1 Standard 25 mit bis zu 1000 - facher Vergrößerung, Ham (Strunk 2007).

#### **4.4. Methoden der klassischen Mikrobiologie**

##### **4.4.1. Stammerhaltung**

FLU 100 wurden über den gesamten Versuchszeitraum hinweg, spätestens nach zwei Wochen des Bebrütens auf frische Minimalfestmedien überimpft. Alle Platten wurden in Inkubatoren bei 30 °C inkubiert. Nach sechs Wochen im Inkubator wurden die Medien ohne weitere Substratversorgung im Kühlschrank bei 6 °C gelagert.

Von allen gewonnenen Stämmen standen immer mindestens zehn frisch bewachsene Minimalmedien bereit.

##### **4.4.2. Bestimmung der optischen Dichte**

Die optische Dichte (OD) stellt ein Maß für die Konzentration von Zellen in einem flüssigen Medium dar. Sie wird mit einem Photometer gemessen und gibt die Extinktion, also den Logarithmus des Intensitätsverhältnisses von Messstrahl zu Referenzstrahl an. Als zweckdienliche Wellenlänge hat sich  $\lambda = 546 \text{ nm}$  für Bakterien bewährt. Angegeben wird die optische Dichte als OD mit der benutzten Wellenlänge als Index, also als  $OD_{546}$ .

Zur eigentlichen Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen wurde mittels eines Transmissionsphotometers (Ultrospec III, Amersham Pharmacia, Freiburg) die Absorption einer Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 546 nm und 10 mm Schichtdicke in Polystyrolküvetten (Roth, Karlsruhe) bestimmt. Vor der eigentlichen Bestimmung wurde das Photometer mit frischem Medium, ohne Zellen in identischen Küvetten kalibriert (Nullpunktseinstellung). Bei höheren Bakterienkonzentrationen kann von einer Selbstabschattung der Zellen und einem damit verbundenem Minderbefund ausgegangen werden. Der lineare Bereich erstreckt sich bis zu einer  $OD_{546}$  von 0,5. Höhere optischen Dichten werden durch Verdünnen der Ansätze auf eine  $OD_{546}$  von unter 0,5 und anschließender Multiplikation des Ergebnisses mit dem Verdünnungsfaktor bestimmt.

##### **4.4.3. Herstellung von Flüssigkulturen und Bakteriensuspensionen**

Zur Herstellung der Zellsuspensionen von FLU 100 für die Experimente wurden verschiedene Wege beschrieben. Meistens wurden Flüssigkulturen im Litermaßstab angezchtet. Dazu wurde 1 L Minimalmedium in einem 3-Liter Schikanenkolben mit Seitenhals oder Verdampfereinsatz gegeben und mit 3 mL bereits vorhandener Bakteriensuspension inokuliert. Alternativ wurden von bewachsenen Minimalmedien drei bis fünf Impfösen Zellmaterial als Inokulum verwendet. Alternativ wurden auch in Flüssigkulturen gewachsene Bakterien zur Herstellung von Bakteriensuspensionen herangezogen. Dazu wurde das Medium der Flüssigkulturen durch

Zentrifugieren abgetrennt, das Pellet wurde mit Saline gewaschen, diese abzentrifugiert und die Zellen anschließend erneut in Saline resuspendiert.

Alle Flüssigkulturen wurden bei 30 °C im Dunklen inkubiert. Substrate wurden entweder direkt im Medium gelöst oder über die Gasphase zugeführt.

#### **4.4.3. Substratpattern**

##### **4.4.3.1. Test auf produktives Wachstum**

Von einer Flüssigkultur des Stamms FLU 100 wurde jeweils 1 mL in 30 mL frischem Minimalmedium inokuliert. Als einzige Kohlenstoffquelle lagen die Testsubstrate in einer Konzentration von 3 mmol vor. Die Ansätze wurden bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es wurde die  $OD_{546}$  aller Ansätze zu Beginn des Experiments und danach alle 48 Stunden gemessen. Trat eine Steigerung der  $OD_{546}$  um über 100 % auf, wurde dies als positives Ergebnis gewertet. Bei halogenierten Substraten wurde die Suspension nach Ende des Experiments zusätzlich noch per Ionenchromatographie (siehe Kapitel 4.8.2.2.) auf freigesetzte Halogenidionen und mittels der HPLC – Anlage (siehe Kapitel 4.8.2.1.) auf die Produktion von detektierbaren Metaboliten geprüft.

##### **4.4.3.2. Test auf Substratumsatz**

Als Vorkultur diente stets eine 1 L Flüssigkultur von FLU 100, die auf Fluorbenzol angezogen wurde. Diese befand sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase, eine optische Dichte von  $OD_{546} = 0,3$  bis  $0,5$  wurde angestrebt. Während des ganzen Vorgangs wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Zellen wurden für 8 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert und mit steriler 0,9 % Saline gewaschen. Dies wurde zweimal durchgeführt. Danach wurde abermals zentrifugiert und das Pellet in 50 ml Minimalmedium aufgenommen. Dadurch wurden Zelldichten von  $OD_{546} = 2,5$  bis  $5,0$  erzielt. Dieser Grundsuspension wurden die zu testenden Substrate angeboten. Die Kulturen wurden in 100 mL Schikanenkolben bei 30 °C geschüttelt. Die Konzentrationen an Substrat, Metabolit und Halogenidionen wurden fallweise in 15 bis 30 Minutenabständen bestimmt.

#### **4.4.4. Bestimmung der Halogenidfreisetzung durch FLU 100 bei der Degradation halogenierter Substrate**

In 3 L Schikanenkolben wurde 1 L Minimalmedium präpariert. Dieses wurde mit FLU 100, aus einer Fluorbenzol-gewachsenen Vorkultur inokuliert, so dass sich eine  $OD_{546}$  von ca. 0,1 einstellte. Diese Ansätze wurden sechs Stunden bei 30 °C im Dunklen geschüttelt. Danach wurde eine Probe des Mediums entnommen und eingefroren. Jetzt wurde das zu untersuchende Substrat zugegeben, so dass sich eine Konzentration von 1 mmol / L einstellte. Diese Kulturen wurden sieben Tage bei 30 °C im Dunklen inkubiert. Danach wurde eine weitere Probe entnommen.

Alle Proben wurden 10 Minuten bei 14000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Von den Überständen wurden mittels der Ionenchromatographieanlage die Konzentrationen der Halogenid-Anionen bestimmt. Der Blindwert, repräsentiert durch die Proben, die vor der Substratzugabe genommen wurden, musste von den Ergebnissen abgezogen werden. Das Ergebnis wurde ins Verhältnis zur initialen Substratkonzentration gesetzt.

#### **4.4.5. Wachstumskurven**

*Klassischer Ansatz:*

Wachstumskurven wurden unter verschiedenen Randbedingungen aufgezeichnet, im Allgemeinen mit folgenden Verfahrensschritten: Von dem zu untersuchenden Bakterienstamm wurde eine Vorflüssigkultur auf dem zu untersuchenden Substrat hergestellt. Dabei wurde Sorge getragen, dass sich die Zellen zu Beginn des eigentlichen Experiments in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die  $OD_{546}$  der Vorkultur wurde bestimmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (8 min, 9000 rpm), mindestens einmal, standardmäßig jedoch zweimal in steriler Saline (0,9 %) resuspendiert und dann abermals abzentrifugiert. Das Pellet wurde in dem für diesen Versuch verwendeten Flüssigmedium resuspendiert, dabei wurde darauf geachtet, dass die  $OD_{546}$  dieser Stammsuspension größer als 2,0 war. Von dieser Stammsuspension ausgehend wurden die Arbeitssuspensionen durch Verdünnen mit dem verwendeten Flüssigmedium präpariert, zumeist 100 oder 200 mL, um eine Ziel- $OD_{546}$  von 0,2 zu erreichen. Danach wurde das Substrat zugegeben und die  $OD_{546}$  in Intervallen von 15 bis 60 Minuten bestimmt. Dazu kamen Bestimmungen von Substrat- und Metabolitkonzentrationen durch chromatographische Methoden.

### *Wachstumskurven bei gleichzeitiger Bestimmung der Konzentration von Monohalogenbenzolen, Toluol und Benzol im Medium:*

Die Vorkulturen zu dieser Experimentengruppe wurden nach dem oben beschriebenen Schema produziert, abweichend wurde mit sterilem bidest. Wasser gewaschen. Es wurde eine möglichst hohe  $OD_{546}$  ( $>20$ ) der gewaschenen und resuspendierten Zellen erzielt. In dem Flüssigmedium, das die Zellen aufnehmen soll, wurden die Substrate, (Monohalogenbenzole, Toluol und Benzol) bereits durch vorhergehendes Schütteln für 30 Minuten bei 30 °C gelöst. Die Kolben waren mit Deckel versehen, die ein Septum beinhalten. Die Bakteriensuspension wurde mittels einer Injektionsspritze und einer Kanüle durch das Septum zugegeben, die Kolben wurden nicht mehr geöffnet, es konnte also kein Substrat aus der Gasphase entweichen. Die Start -  $OD_{546}$  wurde auf 0,2 berechnet, danach wurden mittels einer Spritze Proben der Ansätze entnommen. Es wurde die  $OD_{546}$ , mittels HPLC die Konzentration der Substrate und mittels der IC die Konzentration an Halogenidionen bestimmt. Diese Messungen wurden alle 30 oder 45 Minuten wiederholt.

#### **4.4.6. Korrelation zwischen koloniebildenden Einheiten und optischer Dichte**

Für verschiedene Experimente war es wichtig, die Beziehung zwischen Zellkonzentration und optischer Dichte bei 546 nm zu kennen. Standardmäßig wurde von dem zu untersuchenden Stamm eine Vorkultur in einem Vollmedium (NB oder LB, 100 mL) angezogen. Die Zellen befanden sich am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Diese Zellsuspension wurde durch Verdünnen mit frischem Medium auf eine  $OD_{546}$  von 0,1 bis 0,5 eingestellt. Es wurden 2 – 5 Verdünnungsstufen präpariert.

Als Erfahrungswert gilt die empirisch ermittelte Beziehung  $OD_{546} = 1 \approx 10^9$  KBE / mL (KBE = Kolonie - bildende Einheiten). Es wurden dekadische Verdünnungsstufen der vorbereiteten Ansätze präpariert (Volumen 1 mL, sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße, vorgelegt wurden 900  $\mu$ L 0,9 % sterile Saline). Die verdünnten Suspensionen wurden unmittelbar nach ihrer Präparation weiterverarbeitet. Dazu wurden jeweils 100  $\mu$ L Suspension mittels eines Drigalskyspatels auf Festmedien ausplattiert. Dabei wurden diejenigen Verdünnungen herangezogen, bei denen eine Koloniezahl von 20 bis 200 zu erwarten war. Auch die benachbarten Verdünnungsstufen wurden ausplattiert. Die Platten wurden nach dem Plattieren mit Parafilm verschlossen und mindestens 48 Stunden inkubiert. Um die statistische Sicherheit zu erhöhen, wurden stets mindestens Dreifachbestimmungen vorgenommen.

Die aufgewachsenen Kolonien wurden ausgezählt, dabei wurden nur Kolonien gewertet, deren Durchmesser größer als 1 mm war. Gewertet wurden alle Platten, die zwischen 20 und 200 Kolonien aufweisen. Aus den so erhaltenen Ergebnissen wird der Mittelwert der KBE aus den gewerteten Platten berechnet.

#### 4.4.7. Der Einfluss von Fluorid auf die Wachstumsrate von FLU 100

In 250 mL Schikanenkolben wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknetes Natriumfluorid eingewogen. Es sollen Zielkonzentrationen von 0 bis 300 mmol / L erreicht werden. Mittels einer Vollpipette wurde 100 mL Nutrient Broth Medium zugegeben. Das Covolumen des Natriumfluorids wurde vernachlässigt. Die Kolben wurden gewogen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Kolben abermals gewogen. Der Gewichtsverlust, bezogen auf das Medium, durch das Autoklavieren lag in der Regel bei 7 bis 8 %. Dies wurde genutzt, um die Ansätze zu inokulieren und dennoch das Zielvolumen von 100 mL, auf das die Natriumfluoridmenge berechnet war, nicht zu überschreiten.

Als Vorkultur diente FLU 100, der in einem Liter Nutrient Broth gewachsen war und sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Dieser wurde abzentrifugiert und zweimal mit bidest. Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in nur 25 mL Wasser aufgenommen. Die  $OD_{546}$  dieser sehr dichten Bakteriensuspension wurde bestimmt.

Die Fluoridansätze wurden mit der entsprechenden Menge Suspension inokuliert, so dass eine Start- $OD_{546}$  von 0,2 erreicht wurde. Das jetzt noch fehlende Gewicht wurde durch steriles bidest. Wasser ersetzt.

Die optischen Dichten aller Ansätze wurden alle 30 Minuten für mindestens vier Stunden bestimmt. Eine danach durchgeführte exponentielle Regression lieferte die Wachstumsrate.

#### 4.4.8. Osmotik und Zellertrag

Im Medium gelöste Ionen sorgen für einen osmotischen Druck in suspendierten Mikroorganismen. Verschiedene Spezies reagieren unterschiedlich auf identische osmotische Verhältnisse. Eine zu hohe Konzentration von gelösten Ionen ist ein Stressfaktor für Bakterien und kann sich auf das Wachstum und die Substratumsatzrate auswirken. Einige Mikroorganismen haben spezielle Systeme entwickelt, um in Medien mit einer hohen Konzentration an gelösten Ionen überleben zu können, dazu zählen beispielsweise Ionenexporter. In dieser Versuchsgruppe wurde ausschließlich der Einfluss der Halogenidanionen auf FLU 100 untersucht, andere Ionen wurden nicht untersucht.

Bei der vollständigen Degradation von halogenierten Substraten durch Bakterienzellen werden durch diese zwangsweise Halogenidionen ins Medium freigesetzt. Dies führt bei isochoren Bedingungen zu einer Konzentrationserhöhung von Halogenidanionen im Medium. Dies kann konzentrationsabhängig zu einer Wachstumshemmung der Bakterien führen. Vor allem für den biotechnologischen Einsatz ist es wichtig, die Toleranzgrenzen von FLU 100 gegenüber den vier stabilen Halogenidanionen zu kennen.

Im sterilen NB - Medium wurden verschiedene Konzentrationen von Alkalimetallhalogeniden vorgelegt. Es kamen dabei ausschließlich Natriumsalze zum Einsatz. Das Volumen wurde auf

25 mL in 100 mL Schikanenkolben normiert. Angesetzt wurden mindestens zehn verschiedene Konzentrationen, sowie Blindwerte, d.h. Ansätze ohne externe Halogenidionenquelle. Es wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Alle Kulturen wurden mit einer FLU 100 – NB Kultur aus deren exponentieller Phase inokuliert. Die Start-OD<sub>546</sub> wurde auf 0,1 eingestellt. Anschließend wurden die Ansätze bei 30 °C für 3 Tage im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Nach dieser Phase wurden die OD<sub>546</sub> aller Ansätze bestimmt.

Die erreichten optischen Dichten wurden danach grafisch gegen die voreingestellten Salzkonzentrationen aufgetragen.

#### **4.4.9. pH - Abhängigkeit des Zellertrages**

Die Degradation von halogenierten Aromaten durch FLU 100 ändert das pH-Milieu des Mediums. Die Halogenidionen werden als Halogenwasserstoffe ausgeschleust. Diese stellen chemisch starke Säuren dar ( $pK_s \leq -1,74$ ) und verschieben den pH – Wert, wodurch die Bakterienzellen verlangsamt wachsen und bei Erreichen von extremen Werten sogar absterben. Es muss daher bei der Anzucht von Kulturen und Einsatz von FLU 100 in der biotechnologischen Praxis stets Rücksicht auf das pH - Milieu genommen werden. Daher ist die Kenntnis, in welchem pH - Bereich das Wachstum von FLU 100 stattfinden kann und wo das Wachstumsoptimum liegt, sehr bedeutsam.

Zur Ermittlung des Wachstumsverhaltens bei verschiedenen pH-Werten wurden Anzuchtversuche in 100 mL Minimalmedium mit unterschiedlichen Phosphatpuffern angesetzt. Als Inokulum diente 100 µL Bakteriensuspension, es wurde eine Glucosekonzentration von 10 mmol / L eingestellt. Monohalogenbenzole als Substrate können für dieses Experiment nicht eingesetzt werden, da die bei deren Abbau produzierten Halogenwasserstoffe den pH – Wert des Mediums dramatisch verändern, bzw. den Puffer durchschlagen können.

Die optische Dichte bei 546 nm wurde zu Beginn und nach drei oder acht Tagen bestimmt. Die erzielte OD<sub>546</sub> ist ein Maß für den Hemmeffekt des eingestellten pH - Milieus. Aufgetragen gegen den pH - Wert des Mediums liefern diese optischen Dichten eine Kurve mit klar erkennbarem Maximum und Abschnürungsgrenzen, d.h. diejenigen pH - Werte unter oder über denen gar kein Wachstum mehr stattfindet.

#### **4.4.10. Antibiotikaresistenzen**

Die Kenntnis von möglichen intrinsisch vorhandenen Antibiotikaresistenzen von FLU 100 ist wichtig im Hinblick auf die Auswahl der Donorstämme und Plasmide für die geplante Transposonmutagenese (siehe Kapitel 4.6.2.).

#### 4.4.10.1. Der Disktest

Für dieses Experiment wurde eine flüssige Vorkultur des Stamms FLU 100 in Nutrient Broth präpariert. Als diese eine  $OD_{546}$  von 0,4 erreicht hatte, wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  mittels des Drigalskyspatels auf Nutrient Broth Agar ausplattiert. Aus normalem rundem Filterpapier wurden kleine Scheibchen ("Disks") gelocht und anschließend im Autoklaven sterilisiert. Jeweils drei Disks wurden mittels einer sterilen Pinzette auf die inokulierten Nutrient Broth Agarplatten gelegt und vorsichtig angedrückt. Danach wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  einer Antibiotika-Stammlösung auf eine Disk getropft. Die Platten wurden danach mit Parafilm verschlossen und für drei Tage bei 30 °C im Dunklen inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Ausmessen des Hemmhofes. Je größer dieser ist, umso sensibler reagiert der Stamm FLU 100 auf das entsprechende Antibiotikum in seiner Nennkonzentration.

#### 4.4.10.2. Qualitative Bestimmung der Kanamycinlabilität

Die verwendeten Transposons übertragen eine Kanamycinresistenz, die als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Transposition dient, auf ihren Rezipientenstamm (siehe Kapitel 4.6.). Der Rezipientenstamm darf daher über keine oder nur eine sehr schwache Kanamycinresistenz verfügen.

Zum Überprüfen der Kanamycinresistenz werden Wachstumsversuche in NB vorgenommen. Die Zellen von FLU 100 werden dabei mit verschiedenen Konzentrationen von Kanamycin konfrontiert.

Es wurde eine Reihe von 25 mL Ansätzen NB – Flüssigmedium in 100 mL Schikanenkolben mit Hilfe einer Vollpipette präpariert und anschließend gewogen. Dies ist wichtig, da bei der Sterilisation im Autoklaven ca. 10 % des Volumens verdampft. Dies wird genutzt, um nach dem Abkühlen der Ansätze verschiedene Mengen Kanamycin - Stammlösung (siehe Kapitel 4.2.4.) zuzupipettieren. Alle Ansätze werden mit FLU 100 aus einer NB – Vorkultur inokuliert. Danach wird das ursprüngliche Gewicht der Kolben durch Zupipettieren von sterilem bidestilliertem Wasser wiederhergestellt. Die Start  $OD_{546}$  wird bestimmt.

Die Ansätze werden drei Tage lang bei 30 °C im Dunkeln geschüttelt und die End  $OD_{546}$  wird bestimmt. Jetzt ist klar ersichtlich, bis zu welcher Kanamycinkonzentration noch Wachstum stattgefunden hat. Der Versuch wird wiederholt, allerdings werden jetzt diejenigen Kanamycinkonzentrationen untersucht, bei denen gerade noch ein Wachstum stattgefunden hat.

## 4.5. Stoffwechsel- und Enzymtests

### 4.5.1. Lösungen für Stoffwechselltests und Enzymtests

#### *TRIS-HCl-Puffer pH 8 für Enzymtests*

250 mL 0,1 m Tris(hydroxymethyl)aminomethan  
x mL 0,1 m HCl (bis pH 8 erreicht ist)

#### *Phosphatpuffer pH 8 für Enzymtests*

400 mL 0,1 m Dinatriumhydrogenphosphat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$   
x mL 0,1 m Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (bis pH 8 erreicht ist)

#### *Substratstammlösungen für Stoffwechselltests*

30mmol Substrat  
bidest. Wasser ad 100 mL  
Bei sauren Substraten wie z.B. 2-Chlorbenzoesäure wurde der  
pH-Wert mittels Natronlauge auf pH 7 eingestellt

### 4.5.2. Vorkulturen und Zellaufschluss

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden in 1000 mL Minimalmedium unter Verwendung des gewünschten Substrates mindestens drei Tage lang bei 30 °C kultiviert.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde in einer Kühlzentrifuge bei 9600 rpm (8 Minuten, 6 °C) abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in TRIS / HCl – Puffer resuspendiert und abermals bei 9600 rpm (15 Minuten, 6 °C) abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 8 mL TRIS / HCl – Puffer suspendiert. Die so erhaltene Suspension wurde in einer French - Presse (Firma SIM Instruments, Microcell) bei ca. 1400 bar, mindestens zweimal, meistens jedoch dreimal aufgeschlossen.

### 4.5.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Coomassie-Blue Reaktion. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 µg Protein (absolut). Als Standard wurde Rinderserumalbumin V verwendet, die Eichgerade wurde durch Messungen von 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg Rinderserumalbumin V bestimmt. Die Reagenzlösung enthielt:

100 mg Coomassie Blue G 250  
50 mL Methanol  
100 mL ortho-Phosphorsäure, 85%  
bidest. Wasser ad 1 mL

Zur Proteinbestimmung wurden 0,2 mL Probe oder Standard mit 5 mL Reagenzlösung gemischt. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (Süssmuth 1997).

#### 4.5.4. Ringspaltungsenzyme

##### 4.5.4.1. Catechol-2,3-Dioxygenase

Catechol-2,3-Dioxygenase ist eine Metapyrocatechase. Sie verwandelt aromatische Diole in "Semialdehyde" oder "Semiketone". Diese Enzyme benötigen oft Manganionen als Cofaktor (Boldt 1995). Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

50 µmol Phosphatpuffer, pH 8,0  
1 µmol Brenzcatechin oder substituiertes Brenzcatechin  
5 µl Mangan(II)-chloridlösung 1 mmol / L  
50 µl Rohextrakt  
bidest. Wasser ad 1 mL

Der Ansatz wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Absorption bei 375 nm gemessen. Die gebildeten Semialdehyde dienen als Maß der Enzymaktivität (nach Sala-Trepat 1971). Als Blindprobe diente der gleiche Ansatz, nur wurde auf die Zugabe von Brenzcatechin verzichtet. Als Positivreferenz diente *Pseudomonas putida* mt2, als Negativreferenz *Pseudomonas* sp. B13, beide auf Benzoat gewachsen.

##### 4.5.4.2. Catechol-1,2-Dioxygenase

Catechol-1,2-Dioxygenase ist eine Orthopyrocatechase. Sie überführt aromatische Diole in Muconsäuren. Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

33 µmol TRIS-HCl-Puffer, pH 8,0  
1,3 µmol EDTA  
0,5 µmol Brenzcatechin oder substituiertes Brenzcatechin  
50 µl Rohextrakt  
bidest. Wasser ad 1 mL

Zur Messung der Aktivität des Enzyms wurden die aus den Brenzcatechinen gebildeten Muconsäuren durch eine photometrische Absorptionsbestimmung bei 260 nm ermittelt.

Bei Vorhandensein von Catechol-2,3-Dioxygenase wurde der Testansatz vor der Messung 10 Minuten mit 30 µl einer 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Lösung zur Inaktivierung dieses Enzyms inkubiert (Nakazawa 1973).

Als Positivreferenz diente *Alcaligenes eutrophus* JMP 134, als Negativreferenz diente *Pseudomonas putida* mt2. Alle Referenzstämme wurden auf Benzoat angezüchtet.

Zur den Catecholdioxygenasen siehe Broderick 1991.

## **4.6. Genetik**

Genetische Methoden haben in den letzten 25 Jahren die Mikrobiologie wesentlich weiterentwickelt. Tieferes Verständnis und Manipulierbarkeit genetisch gespeicherter Information stehen damit dem Mikrobiologen als mächtige Werkzeuge zum Verständnis zellinterner Vorgänge zur Verfügung. Sequenzanalysen haben die Taxonomie der Bakterien völlig verändert, so dass deren Stammbaum völlig umgeschrieben werden musste.

### **4.6.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

#### **4.6.1.1. Reagenzien für die PCR**

Folgende Reagenzien (Produktnamen) wurden für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Polymerasekettenreaktionen verwendet:

##### *Taq-Polymerase*

Taq DNA Polymerase, 5 units/µl, (Qiagen GmbH, 40724 Hilden)

Taq DNA Polymerase, 5 units/µl, (biomaster GmbH, 51570 Windeck)

##### *dNTP's*

dNTP-Mix, 10 mM each, (Qiagen GmbH, 40724 Hilden)

dNTP-Set 3, 100 mM, (Carl Roth GmbH+Co. KG, 76231 Karlsruhe)

dNTP-Mix, 10 mM each, (biomaster GmbH, 51570 Windeck)

*PCR-Puffer*

PCR Buffer, 10x, (Qiagen GmbH, 40724 Hilden)

10x amplify. buffer without MgCl<sub>2</sub>, 10x, (biomaster GmbH, 51570 Windeck)

10x amplify. including MgCl<sub>2</sub>, 10x, (biomaster GmbH, 51570 Windeck)

*Enhancer*

Q-Solution, 5x, (Qiagen GmbH, 40724 Hilden)

*Magnesiumquelle*

MgCl<sub>2</sub>, 25 mM, (Qiagen GmbH, 40724 Hilden)

MgCl<sub>2</sub>, 50 mM, Stocksolution, (biomaster GmbH, 51570 Windeck)

*PCR – grade Wasser*

Hochreines und vor allem DNA – freies Wasser wurde dankenswerterweise von Dr. Josef Altenbuchner, Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt.

*Primer*

Alle Primer wurden von der Firma Operon Biotechnologies GmbH, 50829 Köln geliefert. Die Primer (Tabelle 8) wurden in der angegebenen Menge PCR – grade Wasser gelöst. Die Konzentration betrug stets 100 µmol / L.

**Tabelle 8: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer für PCR-Reaktionen**

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Verwendung</b>
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	BOX-Fingerprinting
ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	ERIC-Fingerprinting
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	ERIC-Fingerprinting
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	16S rRNA Gen Sequenzierung
1492R	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	16S rRNA Gen Sequenzierung

#### 4.6.1.2. Präparation der Template-DNA

Die Template-DNA wurde aus vitalen Zellen des jeweiligen Stammes präpariert. Diese lagen als Kolonie auf Agarplatten oder in Flüssigkultur vor.

*Einsatz eines kommerziellen Kits:*

Genomische DNA wurde mit dem Tissue Kit der Firma Qiagen gewonnen. Die Präparation erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.

#### *Thermischer Aufschluss von Bakterienzellen*

Speziell für PCR Fingerprinting Methoden reicht ein thermischer Aufschluss der Bakterienzellen. Die DNA befindet sich danach in der flüssigen Phase und kann durch eine einfache Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden. Die so gewonnene DNA - Fraktion genügt den meisten Aufgaben. Die Verfahrensschritte sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9: Thermischer Aufschluss von Bakterienzellen**

	<b>Gramnegative Bakterienzellen</b>	<b>Grampositive Bakterienzellen</b>
1.	Template Präparation: Suspension einer Kolonie in 100 µL PCR – grade Wasser. Alternativ wurde 100 µL Flüssigkultur direkt eingesetzt	1. Template Präparation: Suspension einer Kolonie in 100 µL PCR – grade Wasser. Alternativ wurde 100 µL Flüssigkultur direkt eingesetzt
2.	Erhitzen im Thermocycler auf 103 °C für 10 Minuten	2. Erhitzen im Thermocycler auf 103 °C für 2 Minuten
3.	Abkühlen auf 20 °C	3. Abkühlen im Thermocycler auf -3 °C für 2 Minuten
4.	Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten in der Eppendorf Tischzentrifuge	4. Dreimaliges Wiederholen von Schritt 2 und 3. Bei Bedarf auch öfters
5.	Abtrennen des Überstandes durch Pipettieren in neue Eppendorf - Reaktionsgefäße	5. Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 Minuten in der Eppendorf Tischzentrifuge
		6. Abtrennen des Überstandes durch Pipettieren in neue Eppendorf - Reaktionsgefäße

#### 4.6.1.3. PCR - Ansätze

Die Komponenten der PCR – Ansätze wurden entweder direkt zusammenpipettiert oder es wurde ein geeigneter Mastermix erstellt. Dieser enthielt zumeist alle für die PCR notwendigen Komponenten ohne die Template DNA oder die Primer. Der Mastermix umfasste ein Volumen von:

$$\text{Volumen im Mastermix} = (\text{Anzahl der Ansätze} + 0,2) \times \text{Nennvolumen der Komponenten}$$

##### *Ansatz BOX - PCR:*

PCR-grade Wasser	78,6 µL	
Template	5 µL	Thermisch aufgeschlossene genomische DNA
PCR Puffer	10,0 µL	Zielkonzentration von $\text{Mg}^{2+} = 2,5 \text{ mmol / L}$
dNTPs (4 x 10 mmol / L)	2,0 µL	
DMSO	2,0 µL	
BOX1AR	2,0 µL	Zielkonzentration des Primers = 2 µmol / L. Dies entspricht 200 pmol Primer pro Ansatz
Taq Polymerase	0,4 µL	Dies entspricht 2 U Enzym

##### *Ansatz ERIC - PCR*

PCR-grade Wasser	76,6 µL	
Template	5 µL	Thermisch aufgeschlossene genomische DNA
PCR Puffer	10,0 µL	Zielkonzentration von $\text{Mg}^{2+} = 2,5 \text{ mmol / L}$
dNTPs (4 x 10 mmol / L)	2,0 µL	
DMSO	2,0 µL	
ERIC1R	2,0 µL	Zielkonzentration jedes Primers = 2 µmol / L.
ERIC2	2,0 µL	Dies entspricht 200 pmol Primer pro Ansatz
Taq Polymerase	0,4 µL	Dies entspricht 2 U Enzym

#### 4.6.1.4. PCR - Programme

Leider verfügt der verwendete Thermocycler (Minicycler der Firma MJ Research) nicht über eine Beheizung des Deckels. Um Kondensationsvorgänge während der PCR zu vermeiden wurden Sarstedt Reaktionsröhrchen verwendet. Diese sind für ein Ansatzvolumen von 100 µL vorgesehen und schließen dieses Volumen mit einem Stempel ab. Die Programme für die BOX- und ERIC – PCR sind in den Tabellen 10 und 11 zusammengestellt.

*Ansatz BOX - PCR:*

**Tabelle 10: Programm für die BOX – PCR**

Schritt	Vorgang	Temp.	Haltezeit
1	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2	Denaturierung	94 °C	30 sec
3	Annealing	55 °C	1 min
4	Extension	72 °C	6 min
5	gehe 44 mal zu Schritt 2	-	-
6	finale Extension	72 °C	10 min
7	Resting	04 °C	∞

*Ansatz ERIC - PCR:*

**Tabelle 11: Programm für die ERIC – PCR**

Schritt	Vorgang	Temp.	Haltezeit
1	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2	Denaturierung	94 °C	30 sec
3	Annealing	52 °C	1 min
4	Extension	72 °C	2 min
5	gehe 29 mal zu Schritt 2	-	-
6	finale Extension	72 °C	10 min
7	Resting	04 °C	∞

#### 4.6.1.5. Agarose Gelelektrophorese

*TAE – Puffer*

Der TAE - Puffer dient als Träger für die Agarose sowie als Laufpuffer. Es wurde stets eine TAE – Stammlösung angesetzt. Diese wird bei Bedarf auf die Nennkonzentration verdünnt.

*TAE - Stammlösung 50 - fach*

242 g TRIS  
57,1 g EDTA  
100 ml Eisessig

*TAE – Puffer in Nennkonzentration*

20 ml TAE - Stammlösung 50 - fach  
bidest. Wasser ad 1000 mL

*10 x Auftragspuffer / Blaupuffer*

5 g Glycerin  
336 mg EDTA Dinatriumsalz, pH8  
25 mg Bromphenolblau  
25 mg Xylencyanol  
bidest. Wasser ad 10 mL

*DNA Längenstandards / DNA Marker*

- $\lambda$  - Phagen DNA, mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut
- 100 bp DNA Leiter (Carl Roth GmbH+Co. KG, 76231 Karlsruhe)

*Zusammensetzung der Gele*

Agarose GTQ (Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe)  
TAE-Puffer einfach  
Ethidiumbromid 10 mg/mL, (Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe)

*Durchführung*

Die Agarose wird je nach Anwendung eingewogen, anschließend wird der einfache TAE-Puffer dazugewogen und die Agarose mit Hilfe eines Mikrowellenofens geschmolzen. Das Gel wurde erst verwendet, nachdem es glasklar geworden war und keine Agarosefragmente mehr zu sehen waren. In das heiße, flüssige Gel wird Ethidiumbromid – Stammlösung pipettiert. Danach wurde die Lösung in die Gelform gegossen. Nach dem Abkühlen und dem Entfernen von Kamm und Spacern wurde das Gel in die Gelkammer gegeben und mit TAE – Puffer ca. 2 mm

hoch überschichtet. Je nach verwendetem Kamm konnten zwischen 2 und 25  $\mu\text{L}$  Probenlösung aufgetragen werden. Die Gele wurden bei Spannungen zwischen 60 und 120 V betrieben. Die Auflösungsgrenzen der Gele sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

**Tabelle 12: Übersicht über die Agarosekonzentration im Gel und die Basenpaar - Äquivalentlaufstrecken der Markierungs-Farbstoffe**

DNA Fragmentlänge	Agarose- konzentration [%]	Äquivalenz- laufweite Bromphenolblau	Äquivalenz- laufweite Xylenyanol
1 bis 30 kb	0,5	1000 bp	10 kb
0,8 bis 12 kb	0,7	700 bp	6 kb
0,4 bis 6 kb	1,2	200 bp	1,5 kb
0,2 bis 3 kb	1,5	120 bp	1 kb
0,1 bis 2 kb	2	70 bp	0,8 kb

#### 4.6.2. Transposonmutanten

Zur Aufklärung der Aromatenabbauwege in FLU 100 erwies sich die Transposonmutagenese als das am besten geeignete Mittel. In Kapitel 3.9.2. wurden bereits die theoretischen Grundlagen und Hintergründe dieser Methode erläutert. Das hier beschriebene Verfahren ist für beide verwendeten Transposons identisch, wird aber nur für *E. coli* S17-1 beschrieben.

Die Durchführung der Transposonmutagenese erstreckt sich über mehrere Arbeitstage, die allerdings kalendarisch nicht direkt hintereinander liegen. Die Arbeiten sind zeitlich an die verschiedenen Stadien der Mutagenese gebunden.

##### 4.6.2.1. Erster Arbeitstag

Die Transposonmutagenese benötigte zwei Vorkulturen. Als Rezipientenstamm diente FLU 100. Dieser wurde in Minimalmedium und mit Fluorbenzol als Substrat angezogen. Der Donorstamm (*E. coli* S17-1) wurde in LB – Medium mit Ampicillin und Kanamycin in Nennkonzentration angezogen. Diese Vorkulturen sollen an geeigneten Zeitpunkten gestartet werden, so dass sie sich bei Beginn des zweiten Arbeitstages in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

#### 4.6.2.2. Zweiter Arbeitstag

Die Vorkulturen sollten im Falle von FLU 100 eine  $OD_{546}$  von mindestens 0,5 und im Falle von *E. coli* S17-1 von mindestens 1,0 erreicht haben und sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Zellen wurden 8 Minuten bei 9000 rpm bei 4 °C in der Sigmazentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit jeweils 200 mL steriler 0,9 % Saline gewaschen und abermals unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Die so gewonnenen Pellets wurden in 15 mL steriler Saline resuspendiert, wovon dann Proben für eine  $OD_{546}$  - Bestimmung entnommen wurden. Durch Verdünnung der Suspension wurde die  $OD_{546}$  so eingestellt, dass genau  $10^9$  Zellen pro mL vorlagen. Im Falle von FLU 100 ist dies bei  $OD_{546} = 1,4$  sichergestellt; im Falle von *E. coli* S17-1 bei  $OD_{546} > 2$ . Dieses Verhältnis der Zellkonzentrationen von FLU 100 zu *E. coli* S17-1 von 1:1 stellt sicher, dass für jede FLU 100 Zelle mindestens eine *E. coli* S17-1 zur Verfügung steht, diese jedoch nicht im Überschuss vorhanden sind.

Von jeder Suspension wurde 1 mL in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei 14000 rpm für drei bis vier Minuten in der Eppendorf - Tischzentrifuge pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in jeweils 50 µL steriler 0,9 % Saline mittels intensivem Vortexen resuspendiert. Von jeder dieser Suspensionen war die Anzahl der gewünschten Mutageneseansätze plus ein Satz für die Kontrollen zu präparieren.

Das eigentliche Mating zwischen Donor- und Rezipientenstamm findet auf sterilen Membranfiltern oder sterilen Cellulose – Filterpapierscheibchen ( $d = 20$  mm) statt. Diese wurden auf sterile Minimalmedium – Agarplatten gelegt und dann die Suspensionen von Donor- und Rezipientenstamm vorsichtig auf die Filterscheibchen pipettiert. Diese stellten somit die Matingansätze dar. Auf jeweils ein Filterscheibchen wurde einer der Reinstämme pipettiert. Diese stellten die Kontrollansätze dar. Alle Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und im Dunklen bei 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Es musste beachtet werden, dass die Ansätze nicht bewegt oder anderen mechanischen Erschütterungen ausgesetzt wurden, damit die Konjugation zwischen den Zellen ungestört stattfinden konnte. Während dieser Inkubationszeit übertrug der Donorstamm *E. coli* S17-1 mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit sein Transposon auf den Rezipientenstamm FLU 100. Das Transposon wird dabei idealerweise unspezifisch eingebaut und verursachte somit eine polare Mutation.

Alternativ dazu kann das Mating auch direkt in der Suspension stattfinden. Dazu müssen beide Stämme zusammen pipettiert werden, die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden dann 24 Stunden inkubiert. Dieses Vorgehen ist zwar einfacher als das oben beschriebene, führte aber zu einer zehnmal schlechteren Ausbeute an Transformanten.

### 4.6.2.3. Dritter Arbeitstag

Die Filterscheiben und der sich darunter befindliche Agar absorbierten die flüssige Phase der Zellsuspensionen fast vollständig. Die Zellen befanden sich nun auf deren Oberfläche. Nach dem Öffnen der MM-Platten wurden die Filterscheibchen vorsichtig zusammengerollt und in ein steriles Eppendorf - Reaktionsgefäß (1,5 mL) gegeben. Dazu wurden 500 – 1000 µL sterile 0,9 % Saline pipettiert. Durch intensives Vortexen der Eppendorf Reaktionsgefäße wurden die Zellen von der Oberfläche der Filterscheibchen gelöst und erneut in Suspension gebracht. Die so gewonnenen Bakteriensuspensionen wurden auf bereitstehende Medien in 100 µL Quantitäten mittels des Drigalskyspatels ausplattiert. Von den Ansätzen mit nur einem Stamm wurden Kontrollen angesetzt. Dieses Schema ist in Tabelle 13 beschrieben. Alle Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 30 °C im Dunkeln für vier Tage inkubiert.

**Tabelle 13: Typen der Ansätze**

<b>Ansatz</b>	<b>Medium</b>	<b>Verfahren</b>
FLU 100	Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin	Negativkontrolle (FLU 100 ist sensitiv auf Kanamycin)
FLU 100	Minimalmedium mit Fluorbenzol	Positivkontrolle (FLU 100 wächst auf Fluorbenzol)
<i>E. coli</i> S17-1	Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin	Negativkontrolle ( <i>E. coli</i> S17-1 besitzt Auxotrophien)
<i>E. coli</i> S17-1	Luria Bertani Medium mit Ampicillin und Kanamycin	Positivkontrolle ( <i>E. coli</i> S17-1 wächst auf diesem Medium)
Mischung	Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin	FLU 100 Zellen können hier nur wachsen, wenn sie über die Kanamycinresistenz durch das Inserts des Transposons verfügen.

#### *Negativkontrollen:*

Hierbei wurde untersucht, ob von einem der verwendeten Stämme ein Hintergrundwachstum auf dem Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin zu erwarten war. Bei einer nicht erfüllten Erwartung, also wenn Wachstum auftrat, musste das Experiment mit einer erhöhten Kanamycinkonzentration in allen verwendeten Medien wiederholt werden. Hier kann auch eine Kontamination mit einem Fremdstamm erkannt werden.

*Positivkontrollen:*

Hierbei wurde der Zustand der Ausgangsstämme überprüft. Es musste ein reichhaltiges Wachstum beobachtbar sein. Im Falle eines Ausbleibens hätte das ganze Experiment wiederholt werden müssen.

*Konjugationsansätze:*

Diese Kulturen enthielten den Donorstamm *E. coli* S17-1, den Rezipientenstamm FLU 100, sowie transformierte Zellen von FLU 100. Der Donorstamm konnte nicht auf den verwendeten Medien (Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin) wachsen, da er mehrere Auxotrophien besaß. Das Medium war frei von den zum Wachstum notwendigen Aminosäuren. Der Rezipientenstamm konnte hier ebenfalls nicht wachsen, denn er ist sensitiv auf Kanamycin, welches in der zehnfachen Abschnürkonzentration im Medium vorlag.

Die Transformanten konnten also ungestört aufwachsen. Der Zeitpunkt des Überimpfens stellte sich als kritisch heraus. Dies liegt in der Funktion der Kanamycinresistenz, welches von den resistenten Zellen abgebaut wurde. Je länger die Platten inkubiert wurden, umso geringer wurde die Kanamycinkonzentration. Unterschritt diese, auch lokal, den Wert von 2,5 mg/L, so konnten auch FLU 100 - Wildtyp Zellen aufwachsen. Dies wurde dadurch sichtbar, dass sich nach zu langer Inkubation neben den großen Kolonien der Transformanten auch kleinere Wildtypkolonien gebildet haben.

**4.6.2.4. Vierter Arbeitstag und Folgende**

Die gewonnenen Transformanten wurden mittels sterilisierten Zahnstochern auf gerasterte (50 Felder pro Platte) Agarplatten überimpft. Jede Kolonie wurde einerseits auf Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin und andererseits auf reinem Minimalmedium überimpft, welches später einer fluorbenzolhaltigen Atmosphäre ausgesetzt wurde. Dabei war darauf zu achten, dass die Bezeichnungen auf den Platten eindeutig waren, damit sich die Transformanten zweifelsfrei auf ihren Parallelplatten zueinander zuordnen ließen. Auf den glucosehaltigen Platten sollten alle Transformanten rasch aufwachsen. Die mit Fluorbenzol substratierten Platten ließen nur diejenigen Transformanten gedeihen, welche noch über einen funktionsfähigen Fluorbenzolabbauweg verfügten. Alle Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für eine Woche bei 30 °C im Dunklen inkubiert.

Die interessanten Transformanten waren diejenigen, die eben diesen Abbauphänotyp verloren hatten. Hier konnte damit gerechnet werden, dass die entsprechenden Gene durch die Insertion des Transposons beschädigt wurden.

Die erkannten, fluorbenzoldefekten Transformanten wurden nun Mutanten genannt. Sie wurden auf frische Medienpaare überimpft. Dieses Selektionsverfahren wurde in dieser Arbeit insgesamt viermal angewandt.

#### **4.6.2.5. Untersuchung der Transposonmutanten**

Das in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene Verfahren liefert im Idealfall einige Duzend von identifizierten fluorbenzolnegativen Mutanten von FLU 100. Das Insert des Transposons hat bei diesen Mutanten ein Gen für ein Abbauenzym, Transportenzym, Entgiftungsenzym oder einen regulatorischen Bereich getroffen, welcher in den Fluorbenzolabbau involviert ist.

Diese Mutanten werden nun mit Fluorbenzol konfrontiert. Ist ein nicht initiales Abbaugen getroffen, so kann mit der Produktion von Metaboliten gerechnet werden. Um dies zu überprüfen, werden die Kandidaten in Flüssigkultur angezogen. Das Medium enthielt dabei neben den üblichen Komponenten des Minimalmediums auch noch 10 mmol / L Glucose und 20 mg / L Kanamycin. Letzteres dient zur Selektion. Dies verhindert das Aufwachsen von FLU 100 Wildtypzellen oder von Rückmutanten. Glucose dient als Stützsubstrat, damit überhaupt ein Wachstum erzielt werden kann. Den Ansätzen wurde noch Fluorbenzol, Benzol und Toluol und gegebenenfalls Chlorbenzol über die Gasphase zugegeben (25 µL in einem 25 mL Ansatz) und anschließend bei 30 °C im Dunkeln für 3 bis 7 Tage inkubiert, wobei die aromatischen Substrate ein bis zweimal nachgefüttert wurden.

Danach wurden Proben der Bakteriensuspension entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde mittels einer HPLC (siehe Kapitel 4.8.2.1.) auf mögliche Metabolite bei 210 und 270 nm untersucht.

#### **4.6.3. 16S rRNA Gen Analyse**

Der Stamm FLU 100 wurde auf LB Medium angezogen und seine genomische DNA wurde präpariert. Die zur 16S rRNA zugehörigen Gene wurden durch eine PCR amplifiziert. Dabei kamen die Primer 27f und 1492r (Moore 1996, Lane 1991) zum Einsatz. Das PCR – Produkt wurde aufgereinigt und sequenziert. Die komplette Sequenz wurde mittels der Software "Sequencher, Version 4.0.5" (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) ermittelt und editiert. Passende Vergleichssequenzen wurden mittels des Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>) gefunden.

#### 4.6.4. Präparation von substituierten Muconsäuren mittels *Escherichia coli* Klon4

Der Stamm *Escherichia coli* Klon4 wird in 1 L Minimalmedium, welches 10 mmol / L und 100 mg / L Kanamycin enthält, bei 37 °C über Nacht angezogen. Danach werden der Suspension weitere 3 mmol / L Glucose und 1 mmol / L IPTG zugesetzt, um die einklonierte Catechol-1,2-dioxygenase zu induzieren. Danach werden 3 mmol / L substituiertes Catechol zugesetzt und drei Stunden inkubiert. Die Zellen werden bei 9600 rpm geerntet, mit Saline gewaschen und in 100 ml frischem Minimalmedium aufgenommen. Die Produktbildung der Muconate wird durch HPLC – Analysen des Überstandes unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.8.2.1.) bei 270 oder 280 nm verfolgt. Diese Messung wird alle 30 Minuten wiederholt.

#### 4.7. Methoden der Proteomik

##### 4.7.1. Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D SDS PAGE)

Der gesamte Prozess der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D SDS PAGE) läuft in fünf Schritten ab:

1. Probengewinnung und Probenaufarbeitung
2. Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension)
3. SDS PAGE (zweite Dimension)
4. Färbung bzw. Detektion
5. Sequenzierung der Proteine

##### 4.7.2. Lösungen für die Proteinaufarbeitung

*Lösung für die TCA- / Acetonfällung*

6 g Trichloressigsäure (TCA)  $C_2HO_2Cl_3$   
Aceton ad 100 ml

Die Fällungslösung wurde vor ihrem Einsatz auf -30 °C gekühlt

*IEF-Probenaufnahmebuffer / Rehydratisierungslösung*

12 g	Harnstoff	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$
250 mg	Dithiothreitol	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$
130 $\mu\text{L}$	Triton X 100	$\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$
500 $\mu\text{L}$	Pharmalyte pH 3-10	

$\text{H}_2\text{O}$  bidest. ad 25 mL

*Equilibrationslösung*

72 g	Harnstoff	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$
10 ml	1,5 M TRIS-Lösung, pH 8	
69 ml	Glycerin 85 %	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$
4 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$
100 $\mu\text{g}$	Bromphenolblau	$\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{NaO}_5\text{S}$

$\text{H}_2\text{O}$  bidest. ad 200 mL

**4.7.3. Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE***Pipettierschema für zwei Minigele, T=10 %*

5 mL	Wasser, bidest.	$\text{H}_2\text{O}$
4 mL	Acrylamid/Bis- 37,5:1, 30 %, C = 2,6 %	
3 mL	1,5 M TRIS-Lösung, pH 8,8 (enthält 0,4 % w/v Natriumdodecylsulfat)	
100 $\mu\text{L}$	Ammoniumperoxosulfatlösung, 10 % w/v	
14 $\mu\text{L}$	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$

*Pipettierschema für zehn Maxigele, T=10 %*

434 mL	Wasser, bidest.	$\text{H}_2\text{O}$
367 mL	Acrylamid/Bis- 37,5:1, 30 %, C = 2,6 %	
386 mL	1,5 M TRIS-Lösung, pH 8,8 (enthält 0,4 % w/v Natriumdodecylsulfat)	
11 mL	Ammoniumperoxosulfatlösung, 10 % w/v	
1,9 mL	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$

*Verdrängungslösung*

100 mL	Glycerin 85 %	$C_3H_8O_3$
50 mL	1,5 M TRIS-Lösung, pH 8,8 (enthält 0,4 % w/v Natriumdodecylsulfat)	
100 µg	Bromphenolblau	$C_{19}H_9Br_4NaO_5S$
	H <sub>2</sub> O bidest. ad 200 mL	

*Anodenpuffer*

30 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	$C_4H_{11}NO_3$
144 g	Glycin	$C_2H_5NO_2$
10 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$
	H <sub>2</sub> O bidest. ad 1000 mL	

*Agaroselösung 0,5 %*

Die Agaroselösung dient zum Überschichten der IPF-Streifen. Sie muss vor ihrem Einsatz auf ca. 60 °C erhitzt werden.

50 mg	Agarose
	H <sub>2</sub> O bidest. ad 10 mL

**4.7.4. Lösungen zum Anfärben der Proteine im Polyacrylamidgel***Fluoreszenzfärbung*

Für die Fluoreszenzfärbung wurde Sypro - Ruby Fertiglösung (Fa. Invitrogen) eingesetzt.

*Fixier- / Entfärbelösung für die Fluoreszenzfärbung*

100 mL	Ethanol	$C_2H_6O$
70 mL	Essigsäure 100 %	$C_2H_4O_2$
	H <sub>2</sub> O bidest. ad 1000 mL	

*Fixierlösung für die Silberfärbung*

100 mL Ethanol  $C_2H_6O$   
25 mL Essigsäure 100 %  $C_2H_4O_2$

H<sub>2</sub>O bidest. ad 25 mL

*Sensitivierungslösung für die Silberfärbung*

75 mL Ethanol  $C_2H_6O$   
1,3 mL Glutardialdehyd 25 % w/v  $C_5H_8O_2$   
10 mL Natriumthiosulfat 5 % w/v  $Na_2S_2O_3$   
17 g Natriumacetat  $NaC_2H_3O_2$

H<sub>2</sub>O bidest. ad 250 mL

*Silberlösung für die Silberfärbung*

17 g Silbernitratlösung 2,5 % w/v  $AgNO_3$   
100 µL Formaldehydlösung 37 % w/v  $CH_2O$

H<sub>2</sub>O bidest. ad 250 mL

*Entwicklerlösung für die Silberfärbung*

100 µL Formaldehydlösung 37 % w/v  $CH_2O$   
6,25 g Natriumcarbonat decahydrat  $Na_2CO_3 \cdot 10 H_2O$

H<sub>2</sub>O bidest. ad 250 mL

*Stoplösung für die Silberfärbung*

3,65 g EDTA-Natrium

H<sub>2</sub>O bidest. ad 250 mL

#### **4.7.5. Induktion von Proteinen in FLU 100**

Für den Vergleich des Proteinspektrums bei Induktion durch Fluorbenzol mit dem von glucoseinduzierten Zellen wurde FLU 100 in jeweils 1 L Minimalmedium mit Glucose (5 mmol/L) bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert. Danach wurde Fluorbenzol (1 mmol/L) über den Verdampferaufsatz zugegeben und eine erste Probe ( $V = 100$  mL) entnommen. Diese und die weiteren Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Insgesamt wurden acht Proben in Abständen von jeweils 8 h entnommen.

Des Weiteren wurde FLU 100 in Flüssigkultur (Minimalmedium) auf den Substraten Glucose (5 mmol / L), 3-Fluorphenol (1 mmol / L), Fluorbenzol, Toluol, und Benzol (100  $\mu\text{L}$  / L) angezogen. Dazu kam noch eine Kultur in Nutrient Broth Vollmedium. Die Probennahme erfolgte nach drei Tagen mittels des im Folgenden beschriebenen Protokolls.

#### **4.7.6. Ernte der Zellen und Aufarbeitung des Zell -Lysats**

Die Zellen wurden in der Zentrifuge (Sigma) bei 9600 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min abzentrifugiert und zweimal mit Wasser (bidest.) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 20 mL Wasser (bidest.) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in der French - Presse bei einem Druck von 1400 bar. Jeder Ansatz wurde doppelt aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zur Entfernung von Zelltrümmern bei 13000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  und 45 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich die lösliche Proteinfraction.

#### **4.7.7. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford**

Zur Aufnahme und zum Vergleich von Proteinspotmustern ist es erforderlich, daß gleiche Proteinmengen auf die Gele aufgetragen werden. Hierzu muss die Gesamtkonzentration an Protein im verwendeten Rohextrakt bekannt sein. Die Proteinbestimmung nach Bradford findet im sauren Milieu statt (Bradford 1979), welches sämtliche freien Aminogruppen am Protein protoniert. Coomassie Brilliantblau G 250 lagert sich als anionisches Chromophor infolge elektrostatischer Wechselwirkungen an den protonierten Aminogruppen an. Dadurch wird das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben. Die Methode muss vor jeder Anwendung mit einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin-Lösung kalibriert werden.

Zur eigentlichen Bestimmung wurden 800  $\mu\text{L}$  Bradfordlösung mit 200  $\mu\text{L}$  der löslichen Proteinfraction in einer geeigneten Verdünnung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei der Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Ergebnis wurde der Mittelwert dreier unabhängiger Bestimmungen angegeben.

#### **4.7.8. Proteinfällung**

Um ionische Nichtproteine aus den Proben auszuschließen, muss ein Reinigungsschritt eingefügt werden. Dazu wurden die löslichen Proteine umgefällt. Für silbergefärbte Gele wurden die Proben durch eine kombinierte TCA- / Acetonfällung aufgereinigt. Für Sypro - Ruby - gefärbte Gele diente eine alleinige Acetonfällung zur Aufreinigung. Diese hat den Vorteil, dass sich die Proteine besser im Probenaufnahmepuffer solubilisieren lassen.

##### **4.7.8.1. TCA- / Acetonfällung**

Die genutzte Acetonfällung erfolgte nach Görg 1999A. Von der löslichen Proteinfraction wurde das Äquivalentvolumen von 100 µg Protein mit Wasser (bidest.) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß auf 1 mL aufgefüllt und mit TCA-Lösung versetzt, so dass eine Endkonzentration von 6 % erreicht wurde. Anschließend wurde 30 Minuten bei 0° C inkubiert. Dann wurde bei 13000 rpm, 4° C für 20 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge) und zweimal mit vorgekühltem Aceton (-20° C) gewaschen. Das Pellet wurde bei 37° C auf dem Heizblock getrocknet, mit 125 µL Rehydratisierungspuffer versetzt und weitere 20 Minuten auf dem Heizblock inkubiert.

##### **4.7.8.2. Acetonfällung**

Bei der Acetonfällung wurden 100 µg oder 500 µg Gesamtprotein mit dem vierfachen Volumen Aceton bei -20° C versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 13000 rpm, 4° C für eine Stunde zentrifugiert. Danach erfolgte eine Trocknung im evakuierten Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure. Das Präzipitat wurde in 125 µL Rehydratisierungslösung (7 cm IPG-Streifen) oder in 340 µL (18 cm IPG-Streifen) resuspendiert.

#### **4.7.9. Rehydratisierung und Beladung der IPG-Streifen**

Für einen ersten Überblick über das Proteinspotmuster wurde bei den 7 cm IPG-Streifen eine Proteinmenge von 100 µg, bei den 18 cm IPG-Streifen eine Proteinmenge von 500 µg gewählt. Die aktive Rehydratisierung der IPG-Streifen erfolgt in Anwesenheit von Protein, die passive Rehydratisierung erfolgt im "reswelling tray", einer speziell geformten Kammer, ohne Protein über Nacht.

Bei Benutzung des Ettan IPGphor wurde stets eine aktive Rehydratisierung, bei Benutzung des Multiphor II Systems eine passive Rehydratisierung durchgeführt.

#### **4.7.10. Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension der 2D SDS PAGE)**

##### **4.7.10.1. Multiphor II System**

Die über Nacht rehydratisierten Streifen wurden in das Multiphor II System eingesetzt. Die Basis des Systems besteht aus einer wassergekühlten Kupferplatte. Auf dieser ist die eigentliche Fokussierkammer montiert. Diese trägt die Elektroden und eine Halterung (Schablone) für die IPG-Streifen. Eine externe Spannungsquelle liefert bis zu 3,5 kV Gleichspannung. Der Vorteil des Multiphor II Systems besteht in der Möglichkeit, die Probe in einem bestimmten pH-Bereich aufzutragen. Dies verhindert Proteinpräzipitationen in extremen pH-Bereichen.

Die Proben wurden stets über "sample cups" im neutralen Bereich des IPG-Streifens aufgetragen. Um eine optimale Wärmeableitung und einen Schutz vor Verdunstung zu gewährleisten, wurde zwischen Schablone und Fokussierkammer ca. 15 mL Silikonöl ("DryStrip Cover Fluid") pipettiert. Der Kontakt zwischen IPG - Streifen und den Elektroden wurde über ein 1 cm langes, befeuchtetes Whatman - Papier hergestellt.

##### **4.7.10.2. Ettan IPGphor System**

Das System besteht aus einer Einheit mit integriertem Netzteil. Die Fokussierungsspannung kann bis zu 8 kV betragen. Dieses Maximum wird nur selten erreicht, da die Stromstärke auf 50  $\mu$ A pro IPG - Streifen begrenzt ist. Die IPG - Streifen werden in Keramikschißchen fixiert. Die Probe wird über den ganzen Streifen verteilt. Die Spannung wird durch vergoldete Kupferelektroden an den IPG - Streifen gelegt. Die Keramikschißchen werden gekühlt.

Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, wird der IPG - Streifen mit Paraffinöl überschichtet. Das System hat gegenüber dem Multiphor II System den Vorteil, dass die einzelnen Fokussierungsschritte einprogrammiert werden können und damit die Fokussierung über Nacht ohne Beaufsichtigung erfolgen kann.

#### 4.7.10.3. Laufbedingungen der isoelektrischen Fokussierung

7 cm Streifen:

Ettan IPGphor

50 V 12 h

500 V 0,5 h

1000 V 0,5 h

5000 V 3-7 h

$I_{\max} = 50 \mu\text{A} / \text{Streifen}$

18 cm Streifen:

Ettan IPGphor

50 V 12 h

500 V 1 h

1000 V 1 h

8000 V 4-8 h

$I_{\max} = 50 \mu\text{A} / \text{Streifen}$

Multiphor II System

500 V 1h

3500 V 18 h

#### 4.7.10.4. Equilibrierung der IPG - Streifen

Die Proteine können aufgrund von unvollständiger Denaturierung und noch vorhandenen Disulfidbrücken nicht direkt nach der isoelektrischen Fokussierung in das SDS - Gel transferiert werden. Es ist zuerst eine Umpufferung bzw. Equilibrierung notwendig. Diese verläuft in zwei Schritten. Zunächst werden sämtliche Disulfidbrücken mit Dithiothreitol reduziert und die nun freien -SH Enden durch Alkylierung geschützt.

Des Weiteren werden die Proteine mit SDS beladen. Die Eigenladungen der Proteine wird dabei effektiv überdeckt, es entstehen anionische Micellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseneinheit. Die gestreckten, mit SDS beladenen Proteinketten bilden Ellipsoide und es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und relativer Wanderungstrecke im Gel (Westermeier 1990).

Die IPG-Streifen wurden für jeweils 15 Minuten in den Equilibrierlösungen mit Dithiothreitol und Iodacetamid unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend kurz mit Wasser (bidest.) gespült.

#### 4.7.11. SDS-PAGE (zweite Dimension der Gelelektrophorese)

##### 4.7.11.1. Präparation der Gele

Es wurde das Hoefer-Dalt-System verwendet, mit dem 18 cm Gele verarbeitet werden können. Diese wurden mit Hilfe des dazugehörenden Gelgießstandes hergestellt. Nach Reinigung mit Ethanol konnten die Gelkassetten in den Gießstand eingesetzt und befüllt werden. Die Gele wurden mit Verdrängungslösung unterschichtet und mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Die Polymerisationszeit betrug 3 Stunden.

Minigele (7 cm) wurden mit Hilfe des BioRad Minigelsystems hergestellt. Die frisch hergestellte Lösung wurde zwischen die Glasplatten, die mit Abstandshaltern von 1 mm versehen waren, gegossen und mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Die Polymerisationszeit betrug hier eine Stunde.

Nach der Polymerisation wurden die Gelkassetten mit Wasser (deion.) gewaschen. Anhaftende Acrylamidreste und restliches n-Butanol wurden dadurch entfernt. Die equilibrierten IPG-Streifen wurden auf das Gel aufgesetzt und mit heißer Agaroselösung blasenfrei überschichtet. Als Größenstandard diente ein nicht vorgefärbter "broad range" Marker (16 – 200 kDa).

##### 4.7.11.2. Laufbedingungen der SDS-PAGE

*Minigele (7 cm)*

150 V      1,5 h

*Maxigele (18 cm)*

50 V      15 h

Die Elektrophorese wurde in der zum Hoefer – Dalt - System gehörenden Elektrophoreseeinheit bei 20° C so lange durchgeführt, bis sich die Bromphenolblau - Front bis auf 1 cm an das Ende des Gels angenähert hatte. Die Gele wurden dann aus den Gelkassetten entnommen und wie unten beschrieben weiterbehandelt.

## **4.7.12. Färben der Polyacrylamidgele**

### **4.7.12.1. Silberfärbung**

Die Silberfärbung erfolgte nach Shevchenko 1995. Die aus ihren Glashalterungen entnommenen Gele wurden in Glaswannen überführt. Im ersten Schritt wurden die freien Gele 30 Minuten in der Fixierlösung geschwenkt. Danach wurde dreimal mit Wasser (bidest.), jeweils 5 Minuten lang gewaschen. Die Sensitivierung erfolgte 30 Minuten lang. Das dabei verwendete Glutardialdehyd erzeugt kovalente Bindungen zwischen Protein und der Polyacrylamid-Gelmatrix. Auch hiernach wurde dreimal wie oben beschrieben gewaschen. Die eigentliche Färbung erfolgte durch Schwenken in Silberlösung. Dabei lagern sich  $\text{Ag}^+$ -Ionen an Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cysteinsäure-Reste an. Danach wurde zweimal jeweils eine Minute lang mit Wasser (bidest.) gewaschen. Die Entwicklung der Gele erfolgte durch Reduktion der Silberionen mittels Formaldehyd im alkalischen Milieu. Das elementare Silber lagert sich an die Gelmatrix an und erscheint braun. Je nach Konzentration der vorhandenen Proteine dauerte dieser Schritt zwischen 30 und 90 Sekunden. Die Entwicklung wurde durch die Stopplösung abgebrochen, wenn der Schwärzungsgrad als ausreichend eingeschätzt wurde. Sie fängt noch freie Silberionen durch Komplexierung ab. Danach wurden die Gele mit einer Farbtiefe von 24 bit und einer Auflösung von 600 dpi eingescannt.

Leider erfasst die Silberfärbung auch Nichtproteinanteile einer Probe. Dies macht eine gewissenhafte Reinigung der Ausgangsprobe unumgänglich. Der Silberfärbung ist eigen, dass verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden. Die Detektionsempfindlichkeit liegt bei 10 – 100 ng (0,1 – 1 fmol). Der lineare Intensitäts-Mol-Bereich erstreckt sich über zwei Größenordnungen.

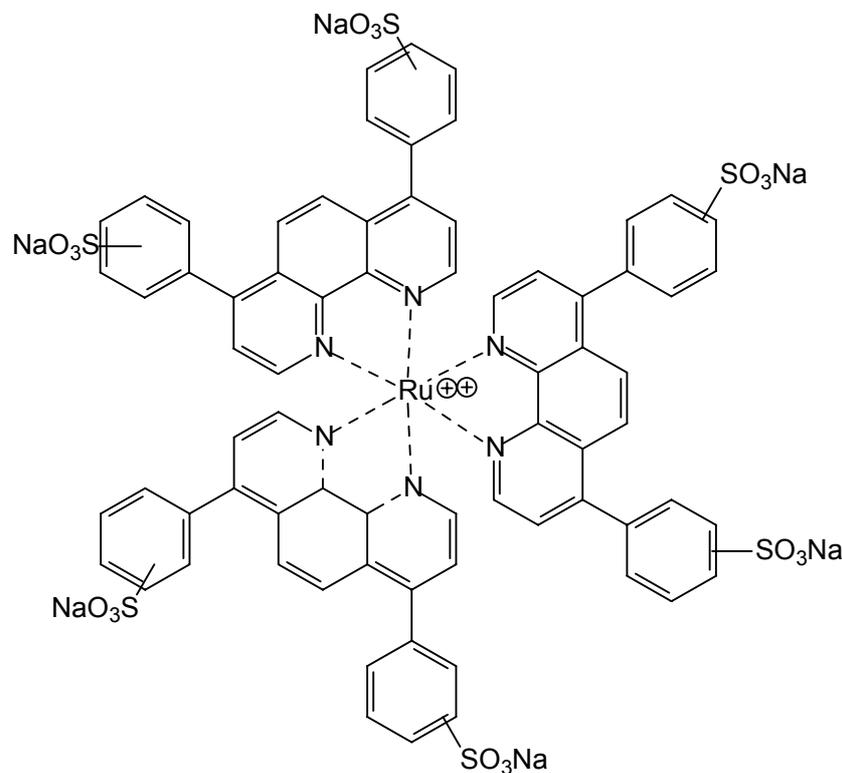
### **4.7.12.2. Fluoreszenzfärbung**

Wichtig für die Fluoreszenzfärbung ist, dass die Gele in Behältern mit hydrophober Oberfläche, z.B. Metallwannen, behandelt werden. Im ersten Schritt werden die aus ihren Glashaltern befreiten Gele eine Stunde lang in Fixierlösung geschwenkt. Danach werden die Gele in Sypro - Ruby Fertiglösung überführt. Bei dieser Färbemethode handelt es sich im Gegensatz zur Silberfärbung um eine Endpunktfärbung, ist also nicht zeitkritisch und problemlos über Nacht durchführbar. Danach wurden die Gele 30 Minuten mit Entfärbelösung behandelt. Die fertig gefärbten Gele wurden im Transilluminator mit einem Camilla - System mit 8 Megapixeln fotografiert.

Sypro - Ruby ist die Handelsbezeichnung für einen Rutheniumkomplex (siehe Bild 37:). Dieser lagert sich reversibel über hydrophobe Wechselwirkungen an SDS-Protein-Micellen an und

besitzt Exzitationsmaxima bei 270 und 470 nm. Wird der Farbstoff mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm angeregt, dann fluoresziert er bei 618 nm.

Vorteil dieser Färbemethode ist ein linearer Bereich über fünf Größenordnungen. Sypro - Ruby ist in etwa so sensitiv wie die Silberfärbung (20 – 100 ng bzw. 0,2 – 1 fmol). Der Nachteil dieser Färbemethode liegt im hohen Preis des edelmetallhaltigen Farbstoffes.



**Bild 37: Strukturformel von Sypro - Ruby**

Schön zu sehen ist das sechsfach koordinierte Rutheniumion im Zentrum des Komplexes.

#### 4.7.13. Auswertung der Gele und Identifikation einzelner Proteinspots

Die Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Corel Draw 11. Die Gelbilder wurden als Negativ dargestellt und gegenübergestellt.

Zur besseren Orientierung wurde ein Raster in das Gel eingefügt, um signifikante Bereiche auf den Gelen miteinander vergleichen zu können.

Erschienen prominente Spots sowohl beim ersten als auch beim zweiten, unabhängigen Experiment, so wurden diese aus dem Gel ausgestochen und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20° C bis zur Identifizierung gelagert.

Die Analyse erfolgte durch MS – MS (Massenspektrometer) Kopplung mit Q – TOF (Quadrupol – Time of Flight). Die Ionisierung erfolgt mittels eines Elektronensprayionisator. In der ersten MS - Stufe werden die Molekülonen durch einen Quadrupolfilter geleitet, wobei die Molekülonen durch Kollisionen zerbrechen können. Das Fragmentmuster ist spezifisch für die

zu analysierende Substanz. Die so erhaltenen Fragmente können auch mehrfach geladen sein. Die zweite MS – Stufe funktioniert nach dem "Time – of – Flight" Prinzip. Hier werden die Molekülonen nach dem Verhältnis Masse zu Ladung getrennt. Mit dieser Methode können Peptidfragmente mit einer Länge von bis zu 30 Aminosäuren sequenziert werden.

## **4.8. Analytik**

### **4.8.1. Messung physikalischer und chemischer Parameter**

Hier sollen die Messmethoden einzelner physikalischer und chemischer Parameter beschrieben werden. Die Messung der optischen Dichte wurde schon in Kap 4.4.2. behandelt, die im Rahmen des Betriebs der Reaktoren erfassten Parameter werden zweckmäßigerweise im zugehörigen Kapitel (4.9.) beschrieben.

#### **4.8.1.1. pH – Wert - Bestimmung**

Zur Bestimmung des pH-Werts bei Laborarbeiten wurde eine pH - Einstabmesskette (Typ pH 539, WTW, Weilheim) mit Berücksichtigung der Testsubstanztemperatur, gemessen mittels eines zusätzlichen Fühlers, genutzt. Die Kalibrierung des Messgerätes wurde nach Anleitung des Herstellers wahlfrei mit zwei von drei unterschiedlichen Pufferlösungen nach DIN 19266 (pH 4,01; 6,86 und 9,18) vorgenommen.

Außerdem kam auch pH - Universalindikatorpapier zum Einsatz, welches allerdings nur eine sehr grobe Abschätzung des pH-Wertes im Bereich von pH 1 – 11 erlaubt.

#### **4.8.1.2. Messung der optischen Dichte**

Die Messung der optischen Dichte wurde im Rahmen dieser Arbeit standardmäßig bei einer Wellenlänge von 546 nm in 1 mL Polystyrolküvetten mit 10 mm Schichtdicke mit Hilfe eines Spektralphotometers Ultrospec III (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Zur Bestimmung der Leerwerte der Kunststoffküvetten wurden diese, mit dem entsprechenden Medium gefüllt, in das Spektralphotometer eingeführt. Die so erhaltene Absorption wurde als Referenzwert eingestellt.

Die Ergebnisse werden als OD (optische Dichte) und mOD (Tausendstel der optischen Dichte) angegeben. Die zugrunde liegende Wellenlänge wird dabei der OD als Indexzahl nachgestellt. Oberhalb einer  $OD_{546}$  (optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 546 nm) von 0,5 wurde die Probe entsprechend mit Medium verdünnt.

#### 4.8.1.3. Sauerstoffgehalt

Dieses Messverfahren dient der Bestimmung der Sauerstoffzehrungsraten verschiedener Bakteriensuspensionen. Das Messgerät (Firma Oregon Scientific) wurde am Beginn jedes Arbeitstages mit Hilfe von sauerstoffgesättigtem Wasser (100 %) und mit Schwefelsäure angesäuerter Natriumsulfidlösung (0 %) kalibriert.

Von der zu testenden Bakteriensuspension wurden ca. 3 mL in die Messkammer der Sauerstoffelektrode gegeben. Danach wurde die Suspension mit Sauerstoff gesättigt, indem ein konstanter Luftstrom mittels einer Kanüle durch die Suspension gedrückt wurde. Der Sättigungspunkt wurde durch ein Abflachen der Messkurve angezeigt. Die Messzelle wurde geschlossen, um die Ruherespiration zu bestimmen, dieser Zeitpunkt wurde auf dem Schreiberpapier markiert.

Das Testsubstrat wurde mittels einer Injektionsspritze mit Kanüle in die Messzelle eingeführt, auch dieses Ereignis wurde auf dem Schreiberpapier markiert.

Die relative Respiration ergibt sich aus der Differenz der Steigung der Messkurve vor und nach der Substratzugabe.

#### 4.8.1.4. Bestimmung der Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol

Zur Bestimmung der Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol müssen Siedetemperatur / Druck – Wertepaare bestimmt werden. Dies geschieht mittels einer einfachen Vakuumdestillationsapparatur (siehe Bild 38).

In einem 250 mL Rundkolben werden 150 mL Fluorbenzol gegeben. Der Rundkolben befindet sich in einem Wärmebad. Dieses wird mittels eines Magnetheizrührers mit Kontaktthermometer temperiert. Ein Teflon - Rührfisch im Rundkolben verhindert durch sanfte Rührung einen möglichen Siedeverzug. Ein Thermometer misst die Temperatur der Gasphase direkt über dem Flüssigkeitsspiegel. Der entstehende Dampf wird in einem angeschlossenen Liebigkühler kondensiert und in einer gekühlten Vorlage gesammelt.

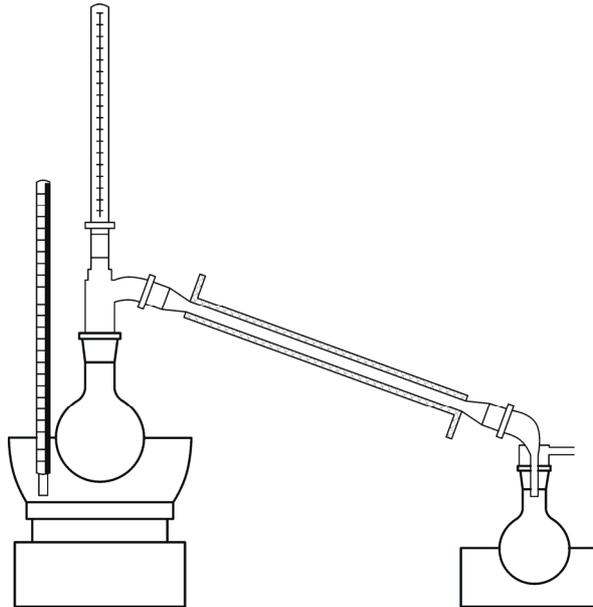
Die Apparatur wird auf ca. 150 mbar evakuiert, das Wärmebad auf ca. 40 °C eingestellt. Sobald das Fluorbenzol siedet und sich die Dampftemperatur stabilisiert hat, kann das erste Wertepaar abgelesen werden. Durch sukzessive Erhöhung des Druckes in der Apparatur können nach einer Equilibrierungszeit von 5 – 10 Minuten weitere Wertepaare abgelesen werden.

Zur Auswertung werden die logarithmierten Druckwerte gegen die zugehörigen reziproken Temperaturwerte aufgetragen. Durch eine lineare Regression wird eine Gerade aufgestellt, deren Steigung analytisch bestimmt werden kann. Diese liefert die Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol nach folgender Beziehung:

Gleichung 8: 
$$\Delta_{\text{vap}}H = -m \cdot R$$

Mit folgenden Symbolen:

$\Delta_{\text{vap}}H$	molare Verdampfungsenthalpie [J / mol]
m	Steigung
R	Gaskonstante = 8,314 J / (mol · K)



**Bild 38: Apparatur zur Bestimmung der Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol**

Durch einen Magnetrührer mit Heizfunktion wird eine definierte Temperatur des Wärmebades eingestellt. Die Apparatur wird evakuiert. Die Siedetemperatur wird in der Gasphase oberhalb des Flüssigkeitsspiegels bestimmt. Der Dampf kondensiert im Liebigkühler und das Kondensat sammelt sich in der eisgekühlten Vorlage. Schrittweise wird nun der Druck in der Apparatur erhöht. Nach jeweils einigen Minuten Equilibrierungszeit werden weitere Wertepaare abgelesen.

#### 4.8.2. Chromatographische Methoden

In diesem Kapitel sollen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Verfahren und die verwendeten Geräte vorgestellt werden. Diese dienen in der Regel dazu, Konzentrationen verschiedener chemischer Stoffe und Ionen aus verschiedenen Medien zu bestimmen. Durch Aufstockungen mit Referenzstoffen und Vergleich von optischen Spektren und Retentionsvolumina können auch in einem gewissen Rahmen Aussagen über die Identität unbekannter Komponenten gemacht werden.

Die Chromatographie wurde Ende des neunzehnten Jahrhunderts mit der Papierchromatographie entwickelt. Ihr folgte rasch die Entwicklung der Säulenchromatographie. Der Begriff "Chromatographie" wurde bereits seit dem 18. Jahrhundert verwendet und bezeichnete die allgemeine Farbenlehre. Die heutige Bedeutung dieses Begriffs bezieht sich auf eine Vielzahl von Methoden, Techniken und Verfahren, die sich in der Wissenschaft, Technik und Industrie auf breiter Basis etabliert haben. Ausgehend von Heidelberg (Kuhn 1931) trat die Säulenchromatographie ihren Siegeszug an. Im Jahre 1941 fanden Martin und Syngé (Nobelpreis 1952) die Verteilungschromatographie an Kieselgel (Martin 1941). Sie legten die theoretische Grundlage für die chromatographischen Verfahren, sie erwähnten auch erstmals die Möglichkeiten von Gaschromatographie und Hochdruck - Flüssigkeitschromatographie.

#### **4.8.2.1. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie**

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC für High Pressure / Performance Liquid Chromatography) eignet sich vor allem zur quantitativen Analyse von Stoffen und mit einigen Einschränkungen auch zur qualitativen Bestimmung von Komponenten.

Die HPLC trennt im Eluenten, also in der mobilen Phase gelöste Stoffe voneinander, indem diese temporär mit unterschiedlicher Stärke an eine feste Phase (Trennsäule) gebunden werden. Diese erscheinen dann zu definierten Retentionszeiten (Retentionsvolumina) am Ausgang der Trennsäule und können detektiert werden.

Die verwendete HPLC-Anlage stammt von Thermo Separation Products und wurde nach längerer Stillstandzeit im Labor vom Autor für Zwecke dieser Arbeit aufgearbeitet und angepasst. Als Pumpe kam eine P 200 Gradientenpumpe zum Einsatz. Diese ist voll programmierbar und kann einen Druck von bis zu 418 bar erzeugen. Der Volumenstrom wird über eine Stahl- Kapillare in den Probenaufgabeblock des Autosamplers AS 100 geleitet. Alternativ ist auch eine manuelle Probenaufgabe mittels einer Spritze mit Kanüle möglich, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht benutzt. Der Autosampler ist programmierbar. Er kann bis zu 120 Proben fassen. Multiple Probenaufgaben sind ebenfalls möglich. Die Probenaufgabe erfolgt mittels eines Sechsweg-Ventils mit fest installierter Probenschleife, das Einspritzvolumen lag bei allen im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Analysen bei 20 µL. Der Autosampler zieht hierzu ca. 100 µL aus dem Probengefäß. Überschüssige Probenflüssigkeit wird verworfen.

Das Säulensystem besteht aus einer 100 mm Protosil C18 (5,0 µm) SC-04 Haupttrennsäule von Bischoff Chromatography. Eine 10 mm Vorsäule aus identischem Material schützt die Hauptsäule vor möglicherweise im Eluenten mitgeführten Partikeln. Das Säulensystem wurde nicht temperiert, so konnten sich die Retentionsvolumina mit dem Gang der Jahreszeiten leicht verschieben.

Die zeitlich aufgetrennten Substanzen des Eluentenstroms werden mit einem UV 200 photometrischen Detektor gemessen. Dieser Detektor misst die optische Absorption im Eluentenstrom zwischen 190 und 900 nm bei ein oder zwei Wellenlängen und liefert eine Signalspannung, die proportional zur gemessenen Absorption ist. Eine weitere wichtige Funktion des Detektors ist seine Fähigkeit, das Absorptionsspektrum der flüssigen Phase zu einem frei gewählten Zeitpunkt über einen gewissen Bereich des Spektrums aufzuzeichnen. Normalerweise fand die im Rahmen dieser Arbeit zwischen 200 und 350 nm statt. Sinnvollerweise fand dies bei abgeschalteter Pumpe statt, da der sich sonst weiterbewegende Eluentenstrom das Ergebnis verfälschen würde.

Die Signale des Detektors wurden von einem Chromjet Integrator aufgezeichnet. Der Integrator wird vom Autosampler im Moment des Einspritzens der Probe in den Eluentenstrom gestartet und beendet die Integration nach einer programmierbaren Zeitspanne. Danach wird das fertig integrierte Chromatogramm auf einem 220 mm Endlospapierstreifen ausgegeben. Leider lässt der Integrator keine einfache Weiterverarbeitung der Chromatogramme im PC zu. Daher wurden wichtige Spektren eingescannt und dann weiterverarbeitet. Über den Integrator wurden auch die vom Detektor gemessenen optischen Absorptionsspektren ausgegeben. Auch diese wurden eingescannt, siehe beispielsweise Bild 92.

Es werden zwei Methoden der Trennung von Komponenten unterschieden: Normalphase (NP) und Umkehrphase (engl. reversed phase, RP). Die NP – HPLC verfügt über eine polare stationäre Phase in der Trennsäule, beispielsweise Silicagel oder Kieselgel, während der Eluent aus unpolaren Substanzen besteht. Je polarer nun die mobile Phase ist, desto schneller wird eine Substanz von der stationären Phase eluiert. Polare Moleküle werden auf der Säule länger zurückgehalten als unpolare Moleküle und verfügen deshalb über ein größeres Retentionsvolumen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde stets eine C18 Reversed Phase Trennsäule verwendet. In diesem Fall ist die stationäre Phase unpolar, während die zu analysierenden Stoffe im polaren Eluenten gelöst sind. Diese Form der HPLC wird überwiegend angewandt. Die RP – HPLC hat den Vorteil, dass mit wässrigen Eluenten gearbeitet werden kann. Die stationäre Phase der verwendeten Trennsäule besteht aus einem Silicagelgerüst, dem C18 – n – Alkylreste ankondensiert sind. Als Eluenten für dieses Säulensystem kommen wässrige Lösungen aus Acetonitril oder Methanol infrage, wobei im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit methanolhaltigen Eluenten gearbeitet wurde.

#### *Eluenten / Fließmittel:*

Je nach Anforderung wurden Eluenten mit verschiedenen Methanolgehalten verwendet. Diese wurden jedoch stets nach demselben Verfahren präpariert. Das Nennvolumen HPLC - grade Methanol wurde vorgelegt und mit bidest. Wasser und 1 mL

*ortho* - Phosphorsäure auf einen Liter aufgefüllt. Die Eluenten wiesen einen pH – Wert von ca. 4 auf. Danach wurde der frisch präparierte Eluent entgast.

Eluent zur Analyse von hydrophilen aromatischen und ungesättigten Verbindungen:

250 mL HPLC grade Methanol CH<sub>3</sub>OH

1 mL 80 % *ortho*-Phosphorsäure

---

Wasser bidest. ad 1 L

Eluent zur Analyse von hydrophoben aromatischen Verbindungen:

600 mL HPLC grade Methanol CH<sub>3</sub>OH

1 mL 80 % *ortho*-Phosphorsäure

---

Wasser bidest. ad 1 L

Die Lösung wurde entgast, indem sie für 5 Minuten bei mildem Rühren einem Unterdruck von 175 mbar ausgesetzt wurde. Danach wurde sie möglichst luftblasenfrei in das Vorratsgefäß der HPLC – Anlage gegeben.

#### *Probenvorbereitung:*

Da die zu bestimmenden Stoffe zumeist in Bakteriensuspensionen vorlagen, war eine Probenaufbereitung unumgänglich. Partikel, wie beispielsweise Bakterienzellen, würden die HPLC – Säulen sonst rasch verstopfen.

Von allen Proben wurden 0,5 bis 1,5 mL in Eppendorfgefäße pipettiert und in der Eppendorf Tischzentrifuge bei 14000 rpm für 10 Minuten pelletiert. Bei sehr fein-dispersen Suspensionen wurden die Proben bei 14000 rpm und 2 °C in der Kühlzentrifuge behandelt. Danach wurde der Überstand, ohne das Pellet zu berühren, in HPLC – Probengefäße überführt. Diese wurden mit Gummi- oder Teflondichtungen verschlossen und konnten sofort in der HPLC – Anlage analysiert werden.

#### *Quantitative Analyse mit der HPLC*

Zur quantitativen Analyse von bestimmten Stoffen wurden die Messverfahren mittels Eichfunktionen kalibriert. Zuerst wurden Urlösungen (Verbindungen mit einem Phenylring oder zwei konjugierten Doppelbindungen) mit einer Konzentration von zumeist 1 mmol / L präpariert. Dazu wurde jeweils eine definierte Menge einer möglichst reinen Referenzchemikalie auf der Analysenwaage im Messkolben eingewogen. Danach wurde mit bidest. Wasser bis zum

Eichstrich aufgefüllt. Von den Urlösungen wurden weitere Verdünnungen, zwischen 5 und 15, mit Präzisionspipetten präpariert. Von diesen wurden unter Versuchsbedingungen die HPLC – Spektren aufgezeichnet. Die Integrationsflächen der Peaks wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen, woraus sich mittels linearer Regression die Kalibrierfunktion ergab.

#### *Qualitative Analyse mit der HPLC*

Mittels der HPLC konnten einige Stoffe bekannten Referenzstoffen zugeordnet werden. Wenn der Kontext des zu bestimmenden Stoffes bekannt war, konnten auch Stoffe zugeordnet werden, für die kein Referenzstoff zur Verfügung stand.

Bei der Identifikation eines Stoffes wurde zuerst das Retentionsvolumen mit in Frage kommenden Referenzstoffen verglichen. Stimmt diese näherungsweise überein, so wurde die Probe mit dem zu bestimmenden Stoff mit der Referenzsubstanz aufgestockt. Trat nun kein Doppelpeak auf, so wurden die optischen Spektren beider Stoffe zwischen 200 und 350 nm bestimmt. Diese Spektren wurden mittels einer Grafiksoftware übereinander gelegt, wodurch dann gegebenenfalls Übereinstimmungen leicht zu erkennen waren.

#### **4.8.2.2. Ionenchromatographie**

Die Ionenchromatographie vereinigt die etablierte Methode der HPLC mit den Trenneigenschaften von Ionenaustauscherharzen. Sie entwickelte sich aus der klassischen Säulenchromatographie. Hier wurde das Ionenaustauscherharz zuerst mit Anionen oder Kationen beladen, die dann mittels eines geeigneten Eluens fraktionsweise wieder abgelöst und nasschemisch analysiert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Komplettsystem 761 Compact IC von Methrom eingesetzt. Als Eluent diente eine Mischung aus 4 mmol / L Natriumhydrogencarbonat und 1 mmol / L Natriumcarbonat in entgastem, deionisiertem Wasser. Der Supressor wurde mit 50 mmol / L Schwefelsäure und bidest. Wasser gegengeschpült.

Die IC - Anlage besteht in weiten Teilen aus ähnlichen Komponenten wie ein HPLC – System. Eine Pumpe erzeugt den nötigen Druck des Eluenten von 70 bis 90 bar. Der Flüssigkeitsstrom wird durch einen Sechshege - Schleifeninjektor geleitet. Hier wird die Probe HPLC-typisch mit Hilfe einer Injektionsschleife von 20 µL in den Strom gegeben. Danach durchläuft der Strom zuerst eine Vorsäule zum Schutz der Hauptsäule (Metrosep A Supp4), welche unmittelbar danach durchströmt wird. Um die Hintergrundleitfähigkeit des Eluenten zu vermindern, wird der Volumenstrom durch einen Supressor geleitet. Die eigentliche Messung erfolgt durch Bestimmung der Leitfähigkeit. Sie wird in Siemens pro cm angegeben und gegen die Zeit aufgetragen.

Je nach Mobilität und Ladungsdichte des zu messenden Ions erscheint dieses zu reproduzierbaren Retentionszeiten (Retentionsvolumina) im Detektor. Die Leitfähigkeit eines Ionentyps ist in weiten Bereichen proportional zu dessen Konzentration, sie ist ein Mischparameter aus Ladungszahl der Ionen und Beweglichkeit der Ionen. Die Methode ist also kalibrierbar. Die Leitfähigkeiten werden intern im Gerät digitalisiert und per serieller Schnittstelle zu einem Standard-PC aufgenommen.

Die zur Anlage gehörende Software erlaubt die vollständige Steuerung der Anlage. Mit ihrer Hilfe können Kalibriergeraden aufgestellt werden sowie die gemessenen Spektren qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

*Elutionsmittel / Fließmittel:*

10 mL	100 mmol / L Natriumcarbonatlösung $\text{Na}_2\text{CO}_3$
40 mL	100 mmol / L Natriumhydrogencarbonatlösung $\text{NaHCO}_3$
<hr/>	
Wasser bidest. ad 1 L	

Um die Lösung zu entgasen, wurde diese für 5 Minuten bei mildem Rühren einem Unterdruck von 175 mbar ausgesetzt. Danach wurde sie möglichst luftblasenfrei in das Vorratsgefäß der IC – Anlage gegeben

*Säurelösung:*

50 mL	1 mol / L Schwefelsäure $\text{H}_2\text{SO}_4$
<hr/>	
Wasser bidest. ad 1 L	

Konzentrierte Schwefelsäure (96 %, ca. 18 mol / L) wurde unter Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen im Eisbad auf 1 mol / L verdünnt. Von dieser Stocklösung wurde bei Bedarf durch eine weitere Verdünnung die Säurespüllösung präpariert, die danach, wie eben beschrieben, entgast wurde.

*Spüllösung:*

Als Spüllösung wurde bidest. Wasser verwendet, welches wie eben beschrieben entgast wurde.

### 4.8.2.3. Gaschromatographie

Prinzipiell funktioniert die Gaschromatographie nach dem gleichen Prinzip wie die anderen oben beschriebenen chromatographischen Methoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Carlo Erba HRGC5300 Mega Series (Split / Splitless Injector) eingesetzt. Das Ausgangssignal des Flammenionisationsdetektors (FID) wurde mittels einer Carlo Erba HRGC 5300 Instrumentenverstärkereinheit mit einem passenden Faktor verstärkt. Das Messsignal wurde mit einem Shimadzu C-R6A integriert und direkt auf Thermopapier ausgegeben.

Als mobile Phase dient "Helium 5.0". Dieses Gas ist definitiv inert gegenüber der zu untersuchenden Substanzen und der Säulenpackung. Die Proben werden in flüssiger oder fester Form über den Splitinjektor aufgegeben. Dieser war während der Messungen auf 200 °C beheizt und auf ein Verhältnis von 1 : 5 eingestellt, d.h. nur ein Fünftel der Probenmenge wurde auf die Säule gegeben.

Die eigentliche Trennung der zu analysierenden Stoffe erfolgte in der 60 m Supleco SFB-5 Polydiphenylsiloxan (5 %) und Polydimethylsiloxan (95 %) Kapillarsäule. Diese konnte bis zu 250 °C im Dauerbetrieb beheizt werden, kurzzeitig bis zu 320 °C. Während der Messungen wurde ein auf die zu analysierenden Komponenten angepasstes Temperaturprogramm verwendet (siehe Tabelle 14).

Detektiert wurden die organischen Komponenten des Gasstromes mittels eines Flammeninduktionsdetektors (FID, 300 °C, Brenngas: Wasserstoff 5.0 mit ca. 900 mbar Druck und auf 450 °C vorgewärmte synthetische Luft mit ca. 1 bar Druck, als "make up gas" diente Stickstoff mit einem Druck von 1,2 bar).

*Temperaturprogramm:*

**Tabelle 14: Universelles Temperaturprogramm für die in dieser Arbeit verwendete GC - Anlage**

Schritt	Vorgang	Starttemperatur	Endtemperatur	Gradient	Haltezeit
1	Injektion	60 °C	60 °C	0 °C / min	1,0 min
2	Heizen	60 °C	250 °C	6 °C / min	31,7 min
3	Halten	250 °C	250 °C	0 °C / min	15 min
4	Kühlen	250 °C	60 °C	maximal	minimal

*Kalibrierung zur Bestimmung von Monohalogenbenzolen in der Gasphase:*

Die flüssigen Monohalogenbenzole wurden in verschiedenen Konzentrationen in GC – grade Dichlormethan gelöst. Von diesen verschiedenen Mischungen wurde jeweils eine definierte

Menge mittels einer Glasspritze mit präziser Skala durch ein Septum in eine gasdicht verschlossene und genau ausgeliterte Gasmaus gespritzt. Nach 60 Minuten Ruhezeit wurden 100  $\mu\text{L}$  bzw. 500  $\mu\text{L}$  Gasphase aus der Gasmaus entnommen und in das GC eingespritzt.

Die durch die Integration erhaltenen Peaks wurden in Beziehung zur Konzentration des jeweiligen Monohalogenbenzols in der Gasphase gesetzt. Eine lineare Regression lieferte die Beziehung zwischen ausgegebenen Flächeneinheiten des Integrators und der Konzentration in  $\text{mg} / \text{m}^3$ .

#### *Bestimmung der Konzentrationen von Chlorbenzol und Fluorbenzol im Roh- und Reingas von Reaktor 1:*

Aus den Roh- und Reingasströmen von Reaktor 1 wurden Proben in einer 1 L – Gasmaus gesammelt. Dazu wurde Gas aus den Volumenströmen durch die Gasmaus mittels einer Aquariumspumpe für drei Minuten gezogen. Mittels einer 500  $\mu\text{L}$  GC – Spritze wurde eine Probe durch das Septum der Gasmaus gezogen, wobei mindestens zehnmals mit der Spritze durch deren volles Volumen gepumpt wurde. Diese Probe wurde unmittelbar danach auf die Säule des GCs gespritzt, danach wurde das Temperaturprogramm gestartet. Die Gasmaus wurde bei Bedarf im Wärmeschrank bei 105 °C oder durch Anschließen an die hausinterne Druckluftversorgung für 20 Minuten getrocknet.

### **4.8.3. Strukturanalysen**

Die Arbeiten zu direkten Strukturaufklärungen von Metaboliten wurden außer Haus vorgenommen.

#### **4.8.3.1. Kernspinresonanz**

In der organischen Chemie und der Aufklärung bakterieller Abbauwege (Bertini 2003, Cass 1987) sind Kernresonanzspektrometer (nuclear magnetic resonance, NMR) zur Aufklärung von Strukturen schon seit Jahrzehnten unverzichtbare Werkzeuge. Atomkerne, die über einen Spin von  $I = \frac{1}{2}$ , wie  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{19}\text{F}$  verfügen, eignen sich für diese Art der Strukturaufklärung. Diese Kerne richten sich in einem angelegten Magnetfeld parallel oder antiparallel aus. Durch Anlegen einer Ultrakurzwellenstrahlung (eingesetzt werden 60 bis 900 MHz) kann der energetisch günstige in den energetisch ungünstigeren Zustand überführt werden, welches im Resonanzfall mit besonders hohem Wirkungsgrad abläuft. Die Energiemenge, die dabei absorbiert wird, ist dabei charakteristisch für das entsprechende Atom im Molekül. Praktischerweise wird mit einer festen Frequenz der elektromagnetischen Strahlung gearbeitet.

Das Resonanzspektrum kommt durch die apparativ leichtere Variation des angelegten Magnetfeldes zustande.

Das Kernresonanzspektrum eines Moleküls stellt einen eindeutigen Fingerabdruck dar. Zusammen mit anderen Analysearten, wie Elementaranalyse, Massenspektrum und optische Absorptionsspektralanalyse, kann zumeist die Konstitution eines unbekanntes Stoffes aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Kernresonanzspektren einiger Metabolite freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Pieper, HZI Braunschweig aufgenommen. Es wurden  $^1\text{H}$  – Spektren bei 600 MHz bestimmt (Pieper 2002).

#### 4.8.3.2. Chromatographie – Massenspektrometer Kopplungen HPLC – MS (LC – MS)

Diese Methode verbindet die HPLC, welche dem Auftrennen eines Substanzgemisches dient, mit der Massenspektrometrie (MS), welche die Molekülmasse ermittelt und teilweise auch der Struktur der einzelnen Komponenten aufdecken kann.

Der Volumenstrom, den die HPLC liefert, wird zu einem Großteil verworfen, bzw. durch einen UV / VIS – Detektor geleitet. Nur eine kleine Menge Eluent und Analyt gelangen in das Massenspektrometer. Der Eluent ist in der Regel niedermolekular im Vergleich zum Analyten. Der Eluent wird mit Hilfe eines Trocknungsgases verdampft und abgezogen. Der zurückbleibende Analyt wird anschließend bei hohen Temperaturen verdampft und in das Massenspektrometer eingesogen. Dort wird der Analyt durch ein Elektronenspray ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Durch geeignete magnetische Filter (Quadrupolfilter) werden die Analytionen nach ihrer Masse getrennt und schließlich detektiert. Dabei können die Analytionen auch charakteristische Zerfallsmuster und Umlagerungen erfahren. Es werden komplette Spektren in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Es kann auch die Molekülmasse von postulierten Analyten über die Zeit verfolgt werden. Tauchen Analytmoleküle auf, so wird dieses Ereignis mit dem Signal des UV / VIS – Detektors korreliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Institut für Lebensmitteltechnologie, Lehrstuhl Lebensmittel pflanzlicher Herkunft der Universität Hohenheim durch Dr. D. Kammerer durchgeführt.

#### **HPLC-System:           Agilent 1100**

Säule:	Prontosil Eurobond C18, 5,0 $\mu\text{m}$ (Bischoff, Leonberg) 125 x 5,0 mm
Eluent:	Methanol / Wasser = 25 / 75 (v/v) + 0,1 % Ameisensäure
Gradient:	isokratisch
Laufzeit:	15 min
Flussrate:	1,0 mL / min
Detektion (DAD):	Einzelwellenlängen: 210 nm, 260 nm, 270 nm Spektrum: 200 – 350 nm

**MS-System: Esquire 3000+; Ion Trap (Fa. Bruker, Bremen)**

MS-Bedingungen:	Electrospray Ionization (ESI), negative mode, Auto-Fragmentierung
Nebulizer	4,8 bar
Dry Gas (Nitrogen)	12 L / min
Dry Temp.	365 °C
Capillary Exit	-100.0 V
HV Capillary	4000 V
Scan-Bereich	50 – 500 <i>m/z</i>
Fragmentierungsampl.	1,5 V

**4.8.4. Elementaranalyse mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (EDS)**

Die kristallinen Ablagerungen in den Reaktorsümfen wurden einer Elementanalyse mittels der zerstörungsfreien energiedispersiven Röntgenanalyse (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS) unterzogen. Diese rein physikalische Methode nutzt die Tatsache, dass ein hoch angeregtes Atom sogenannte charakteristische Röntgenstrahlung aussendet, die für jedes Atom verschieden ist. Man misst die von einem, durch einen Elektronenstrahl angeregten Material ausgesandten Röntgenstrahlen und nutzt eine Datenbank zur Bestimmung der vorhandenen Elemente anhand der bekannten charakteristischen Strahlung.

Alternativ kann zu Anregung Röntgenstrahlung eingesetzt werden, ebenso Protonen oder sogar Elementstrahlen. Der einfachste Ansatz ist, die Energie der Röntgenquanten mit einem Halbleiterdetektor zu messen (energiedispersive Analyse), der sich im Rastermikroskop befindet. Die aufwendige Alternative in diesem Falle ist die Messung der Röntgenwellenlänge. Wichtig bei diesem Verfahren ist, dass neben der Identifizierung der vorliegenden chemischen Elemente auch deren Konzentration aus der Intensität der charakteristischen Röntgenstrahlung ermittelt werden kann.

## 4.9. Reaktoren

Mit dem Betrieb einer biologischen Abluftreinigungsanlage im Technikumsmaßstab soll gezeigt werden, dass die Reinigung von Abluft, die mit Fluorbenzol oder ein Gemisch aus Fluorbenzol und Chlorbenzol (Oh 1994, Seignez 2002) belastet ist, prinzipiell möglich ist. Als Verfahrenstypus wurde ein Biotricklingfilter benutzt.

### 4.9.1. Aufbau und Betrieb der Reaktoren

Die im Rahmen dieser Arbeit betriebenen Biotricklingfilter basieren auf bereits vorhandenen Anlagen. Diese wurden hinsichtlich des geplanten Einsatzgebietes modifiziert (siehe Bild 39), Tabelle 15 gibt die Randbedingungen der Biotricklingfilter wieder.



**Bild 39: Die Biotricklingfilter**

Die Reaktoren sind mechanisch einsatzbereit, die Messtechnik ist noch nicht installiert.

**Tabelle 15: Daten zu den Biotricklingfiltern**

Parameter		Reaktor 1	Reaktor 2
Geometrie der Anlage			
Gesamthöhe der Anlage	[m]	1,000	1,000
Innendurchmesser	[m]	0,318	0,318
Schütthöhe	[m]	0,650	0,650
Angeströmte Fläche	[m <sup>2</sup> ]	0,080	0,080
Volumen der Packung	[m <sup>3</sup> ]	0,052	0,052
Sumpfvolumen	[m <sup>3</sup> ]	0,120	0,120
Stoffströme			
Rohgas	[m <sup>3</sup> / h]	5	5
Pumpdauer	[min / h]	12	12
Pumptaktung (an ; aus)	[min; min]	1; 4	1; 4
Förderleistung	[L / min]	8	8
Abgeleitete Größen			
Filterflächenbelastung	[m <sup>3</sup> / m <sup>2</sup> h]	62,5	62,5
Filtervolumenbelastung	[m <sup>3</sup> / m <sup>3</sup> h]	96,2	96,2
Verweilzeit	[s]	37,4	37,4
Rohgas			
Substrat		Fluorbenzol	Fluorbenzol Chlorbenzol
Zielkonzentration im Rohgas [g / m <sup>3</sup> ]		0,120	0,120 / 0,240
Substratvolumenlast	[g / m <sup>3</sup> h]	11,5	11,5 / 23,0
Supplie			
Dünger		Mineralsalzmischung (siehe Text)	
Neutralisation		NaOH; NaHCO <sub>3</sub>	
Sensorik			
FID – Messungen, getaktet		Rohgas/Reingas	Rohgas/Reingas
Temperaturmessungen		Rohgas/Reingas	Rohgas/Reingas
pH		-	Sumpf
Metabolite im Eluat		diskontinuierlich	diskontinuierlich
Halogenidkonzentration im Sumpf		diskontinuierlich	diskontinuierlich

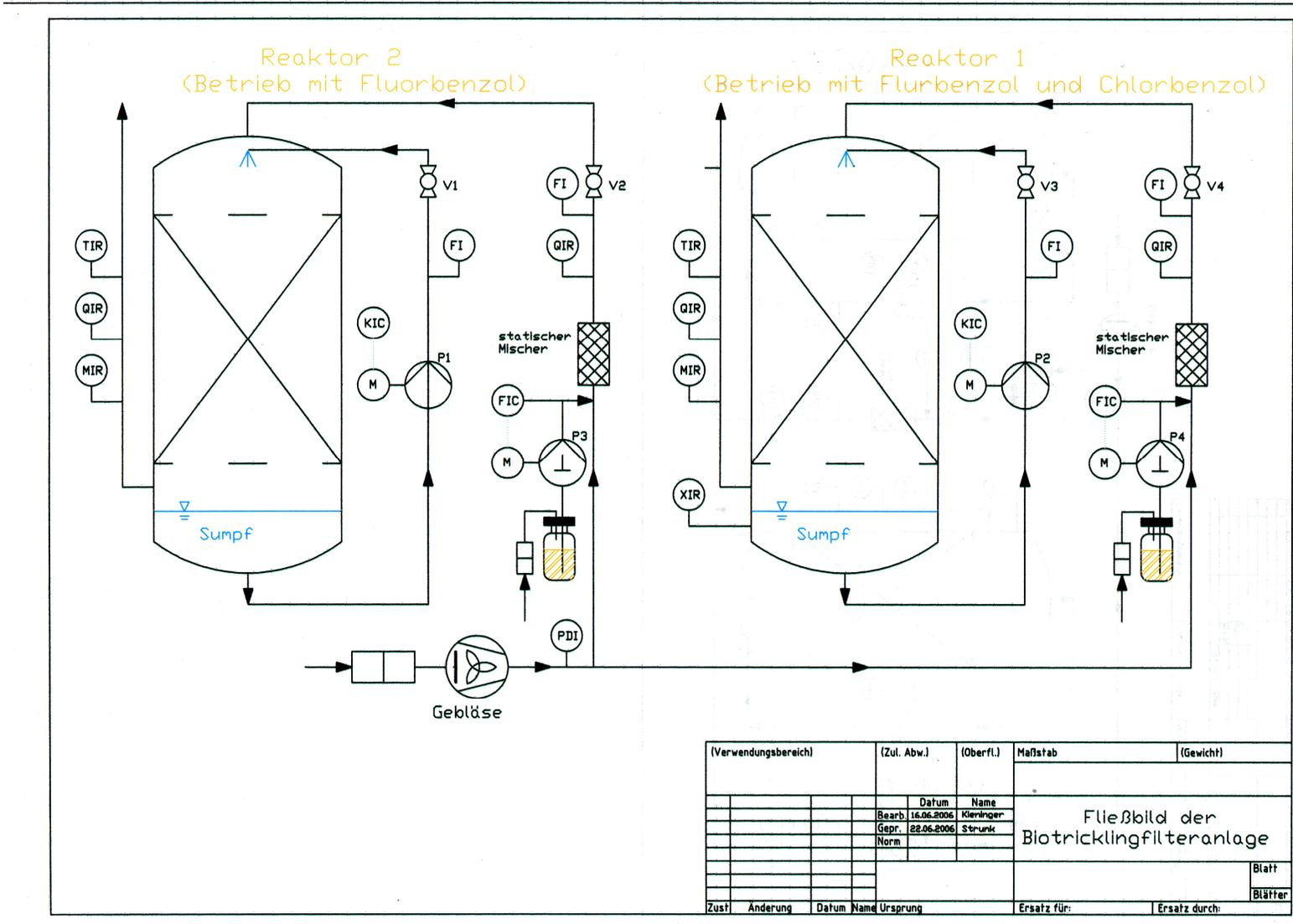


Bild 40: Schemazeichnung der eingesetzten Biotricklingfilter

**Tabelle 16: Anmerkungen zu Bild 42 (Bezeichnungen nach DIN):**

V1, V3	Absperrhahn	QIR	Konzentrationsaufzeichnung
V2, V4	Drosselventil	TIR	Temperaturaufzeichnung
XIR	pH Aufzeichnung	MIR	Feuchteaufzeichnung
FIC	Durchflusssteuerung	PDI	Druck-Differenzanzeige
FI	Durchflussanzeige	KIC	Zeitsteuerung
M	Motor	Gebläse	Radialverdichter
P1, P2	Umwälzpumpe Tricklinglösung	P3, P4	Dosierpumpen

Alle in den Biotricklingfiltern auftretenden Gas- und Flüssigkeitsströme sowie die Position der verwendeten Messtechnik sind in Bild 40 dargestellt.

Beide Reaktoren wurden zuerst mit reinem Fluorbenzol beaufschlagt. Nach sechs Monaten Dauerbetrieb wurde Reaktor 1 auf eine äquimolare Mischung aus Chlorbenzol und Fluorbenzol umgestellt. In den Strom der Rohgase waren Durchflussmesser eingebaut. Der Volumenstrom konnte mittels Kugelventilen genau eingestellt werden und war im gesamten Betriebszeitraum konstant. Der Staudruck des Gasstromes wurde direkt nach dem Kompressor, also vor der Gasstrom-Teilung auf die verschiedenen Reaktoren, mittels eines Sensors aufgezeichnet.

Der Auslass für das Reingas ist am unteren Ende des Biotricklingfilters angebracht und führt ins Freie.

Die Packung bestand aus gesiebttem Blähton, es wurde die Fraktion mit einem Durchmesser von mehr als 11 mm verwendet.

Die Temperaturen von Roh- und Reingasen wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Zusätzlich wurde noch die relativen Feuchtigkeitsgehalte von Roh- und Reingas des Reaktors 1 sowie der pH – Wert dessen Sumpfs aufgezeichnet.

Die Konzentrationen aller Gasströme wurden mittels eines Flammeninduktionsdetektors aufgezeichnet (siehe Kapitel 4.9.2.6). Da nur ein einziges Gerät zur Verfügung stand, wurde zwischen den vier Messstellen automatisch mit einer Taktung von zwei Stunden umgeschaltet. Im Falle von Reaktor 1, nach der Umstellung auf das zusammengesetzte Substrat, wurde einmal am Tag die Konzentrationen der Komponenten im Reingas und im Rohgas mittels einer gaschromatographischen Analyse bestimmt.

Die Biotricklingfilter sollten über einen längeren Zeitraum betrieben und beobachtet werden. Da es sich um die Reinigungsverfahren für Abluft handelt, wurde der Luftstrom mit einem Seitenkanalverdichter erzeugt. Die Substrate wurden in flüssiger Form zugesetzt. Sie verdampften zügig in dem vom Kompressor erwärmten Luftstrom. Dieses künstlich erzeugte Rohgas wurde dann in die Biotricklingfilter geführt und dort abgereinigt.

Das Prinzip des Biotricklingfilters beruht auf einer externen Befeuchtung der Filterpackung. Dadurch können auch Abluftströme abgereinigt werden, die nicht mit Wasserdampf gesättigt

sind. Die im Filter umlaufende Tricklinglösung verhindert das Austrocknen des auf dem Packungsmaterial befindlichen Biofilms. Sie equilibriert die Bedingungen im Biofilter, z.B. pH, Redoxpotential und die osmotischen Verhältnisse. Sie versorgt die Mikroorganismen mit essentiellen anorganischen Ionen. In ihr akkumulieren Stoffwechselprodukte. In den verwendeten Reaktoren war es nicht vorgesehen, das Volumen der Tricklinglösung konstant zu halten. Da ständig Wasser verdampfte (das Reingas war stets feuchtigkeitsgesättigt), sank ihr Volumen kontinuierlich ab und wurde alle zwei bis drei Tage ersetzt. Die Lösung wurde alle vier Wochen komplett ausgetauscht. Die Zusammensetzung der Tricklinglösung ist in Kapitel 4.2.1. zusammengefasst. Der Phosphatpuffer ist in einem Sechstel seiner Nennkonzentration enthalten. Er dient hier nicht als pH-Puffer, sondern als Phosphorquelle für die Mikroorganismen. Stickstoff wird diesen durch Ammoniumnitrat zur Verfügung gestellt, Calciumchlorid dient als Calciumquelle und als Puffer für Fluoridionen. Der Umlauf der Tricklinglösung wurde getaktet. Über den gesamten Betriebszeitraum hinweg wurde stets 1 Minute gepumpt gefolgt von 4 Minuten Inaktivität.

#### 4.9.2. Definition der Kenngrößen der Reaktoren

Die hier von den Stoffströmen, der Reaktorgeometrie und den Messwerten abgeleiteten Leistungsdaten stellen grundlegende Parameter für die Beurteilung des Reinigungsprozesses durch die betriebenen Biotricklingfilter dar. Diese Leistungsdaten sind normiert und ermöglichen den Vergleich unterschiedlicher Biofiltersysteme.

##### 4.9.2.1. Filterflächenbelastung

Die Filterflächenbelastung  $\dot{V}_A^G$  setzt den Volumenstrom  $\dot{V}^G$  mit der angeströmten Fläche  $A_{Filter}$  in Beziehung, siehe Gleichung 9. Ist die Filterflächenbelastung zu hoch, dann kann es beispielsweise zu Austrocknungsphänomenen an der Packungsoberfläche führen. Erfahrungswerte für die Filterflächenbelastung liegen, je nach biologischer Abbaubarkeit des Schadstoffs oder Schadstoffgemischs bei 50 – 200 m<sup>3</sup> / m<sup>2</sup> h. Da Fluorbenzol als schwieriger Schadstoff in der biologischen Abluftreinigung einzustufen ist, wurde die Filterflächenbelastung  $\dot{V}_A^G$  auf 63,5 m<sup>3</sup> / m<sup>2</sup> h festgeschrieben.

Gleichung 9:

$$\dot{V}_A^G = \frac{\dot{V}^G}{A_{Filter}}$$

#### 4.9.2.2. Filtrervolumenbelastung

Die Filtrervolumenbelastung  $\dot{V}_V^G$  setzt den Volumenstrom  $\dot{V}^G$ , mit dem ein Biofiltersystem beaufschlagt wird, in Beziehung zu dem Volumen  $V_{Filter}$  seiner Packung, siehe Gleichung 10. Erfahrungswerte liegen bei 50 - 150 m<sup>3</sup> / m<sup>2</sup> h, je nach biologischer Abbaubarkeit des Schadstoffs oder Schadstoffgemisches. Die Filtrervolumenbelastung  $\dot{V}_V^G$  der Technikumsreaktoren lag bei 96,2 m<sup>3</sup> / m<sup>2</sup> h.

Gleichung 10:

$$\dot{V}_V^G = \frac{\dot{V}^G}{V_{Filter}}$$

#### 4.9.2.3. Der Wirkungsgrad

Der Wirkungsgrad  $\eta$  beschreibt das Verhältnis der Konzentrationen  $\rho^G$  oder der Massenströme von den abzureinigenden Schadstoffen im Roh- und Reingas. Der Wirkungsgrad als Maß für die Effektivität eines Biofilters sollte natürlich so hoch wie möglich sein. Allerdings sollte er stets mit den anderen Parametern eines Biofiltersystems angegeben werden. Denn wenn nur geringe Konzentrationen oder geringe Volumenbelastungen in einem Filtersystem vorliegen, kann ein zu optimistischer Wirkungsgrad den wahren Zustand des Biofiltersystems verdecken, welcher in einer zu geringen Eliminationskapazität besteht. Langzeitstabile Werte des Wirkungsgrads pendeln sich in der Regel bei ca. 90 % ein.

Gleichung 11:

$$\eta(\%) = \frac{(\rho_{Rohgas}^G - \rho_{Reingas}^G) \cdot 100}{\rho_{Rohgas}^G}$$

#### 4.9.2.4. Die Eliminationskapazität

Die Eliminationskapazität  $E_V$  ist der wichtigste Leistungsparameter eines Biofilters, siehe Gleichung 12. Sie beschreibt die Leistungsfähigkeit der Biozönose. Zu ihrer Berechnung wird die tatsächlich verschwundene Menge an Schadstoffen zwischen Roh- und Reingas in Beziehung mit dem Filtrervolumen gesetzt. Sie gibt an, wieviel Schadstoff tatsächlich pro Volumeneinheit Filterpackung abgebaut wird. Die Eliminationskapazität kann durch Sorptionseffekte verzerrt werden. Die Eliminationsleistung beschreibt also, welche Masse des Schadstoffs pro Kubikmeter Schüttung und pro Stunde von den Mikroorganismen im Filter abgebaut wird. Je nach biologischer Abbaubarkeit des Schadstoffs oder des Schadstoffgemischs finden sich hier Werte zwischen 5 und 100 g C<sub>org</sub> / m<sup>3</sup> h. Die Substratlast

beträgt bei den im Technikumsmaßstab betriebenen Reaktoren  $11,50 \text{ g C}_{\text{org}} / \text{m}^3 \text{ h}$ . Bei 90 % Wirkungsgrad ist also mit einer Eliminationsleistung von  $10,35 \text{ g C}_{\text{org}} / \text{m}^3 \text{ h}$  zu rechnen.

Gleichung 12:

$$E_V = \frac{(\rho_{\text{Rohgas}}^G - \rho_{\text{Reingas}}^G) \cdot \dot{V}^G}{V_{\text{Filterschüttung}}} = \frac{\eta \cdot \rho_{\text{Rohgas}}^G \cdot \dot{V}^G}{V_{\text{Filterschüttung}}}$$

#### 4.9.2.5. Die Schütthöhe

Die optimale Schüttungshöhe bei Biofilter und Biotricklingfilter liegt zwischen 1 und 1,5 m. Aus geometrischen Gründen war die Schütthöhe in den Technikumsreaktoren nur 0,65 m.

#### 4.9.2.5. Anforderungen an das Rohgas

Das Rohgas sollte fett- und staubfrei sein, da sonst Ablagerungen in den Rohren und der Filterpackung auftreten können. Es darf keine sauren oder basischen Komponenten enthalten, ebenso wie keine starken Oxidations- und Reduktionsmittel und Metallspäne oder -stäube. Die Temperatur des Rohgases sollte zwischen 15 und 40 °C liegen. All diese Erfordernisse konnten in den Technikumsanlagen gut erfüllt werden, mit einer Ausnahme. Die Feuchtigkeit des Rohgases sollte größer als 98 % (rel. hum.) liegen, sie lag jedoch nur bei ca. 60 %. Dieser geringere Wert wurde jedoch durch die enge Taktung der internen Befeuchtung der Reaktoren kompensiert.

#### 4.9.3. Messtechnik für die Reaktoren

Die Funktion der Reaktoren ist stark von äußeren Einflüssen abhängig. Kurzfristige Änderungen der Betriebsparameter können langfristige Änderungen am System verursachen. Es ist außerdem wichtig für eine geplante Modellierung des Verfahrens, verlässliche Daten zu sammeln. Um diesen Ansprüchen zu genügen, wurde eine automatische Datenaufnahme installiert. Nur durch eine Vollzeitaufzeichnung der Betriebsparameter können alle relevanten Ereignisse nachvollzogen werden. Die aufgezeichneten Daten sollen in digitaler Form vorliegen, was deren Auswertung bedeutend erleichtert.

Die meisten Sensoren wurden selbst entwickelt, aufgebaut und eingesetzt. Dieser Weg wurde gewählt, um die Funktion aller verwendeten Sensoren in aller Einzelheit nachvollziehen zu können. Ein weiterer Vorteil dieser Sensoren ist die schnelle Reparierbarkeit im Schadensfall. Des Weiteren können alle den Sensor betreffenden Parameter frei gewählt werden, so dass für jede Anwendung optimal angepasste Sensoren zur Verfügung stehen. Zuletzt verhalf auch der hohe Anschaffungspreis kommerzieller Lösungen der selbstgebauten Lösung zum Vorzug.

Alle Sensoren basieren auf Operationsverstärkerschaltungen (Marston 1985). Um diese sinnvoll einsetzen zu können, ist eine duale, symmetrische Spannungsversorgung unumgänglich. Bei der Planung des Messsystems stellte sich die Frage, ob diese Spannungen zentral erzeugt werden oder ob eine einfache Spannungsversorgung eingesetzt wird und die symmetrische Spannung in der Sensorschaltung selbst erzeugt wird. Es wurde zugunsten der zentralen Versorgung entschieden, da dieses Verfahren einige Vorteile bringt. So wird der Bauteileaufwand in den Sensoren reduziert. Außerdem werden die Anforderungen an eine hohe Stabilität der Spannungsversorgung leichter erfüllbar. Außerdem wurde über die gesamte Messkampagne die Versorgungsspannung kontrolliert und protokolliert.

Als Datenaquisitionssystem kam eine Advantech PCL818L Karte zum Einsatz. Diese bietet 16 single ended 12 Bit AD – Kanäle. Der Eingangspannungsbereich ist schaltbar. Die Karte ist gegen Überspannungen von bis zu  $\pm 40$  Volt geschützt.

Als allgemeine Betriebsparameter galten also:

- Die Spannungsversorgung ist symmetrisch ausgelegt: + 12 V und – 12 V.
- Der Messwert wird als Spannung im Bereich von + 10 V bis – 10 V in digitalisierter Form ausgegeben.
- Die von den Sensorschaltungen gelieferten Spannungen werden vom 12 - Bit AD - Wandler digitalisiert. Ein Digit entspricht also einer Spannungsänderung von 4,88 mV.

#### **4.9.3.1. Entwicklung und Aufbau elektronischer Sensorschaltungen**

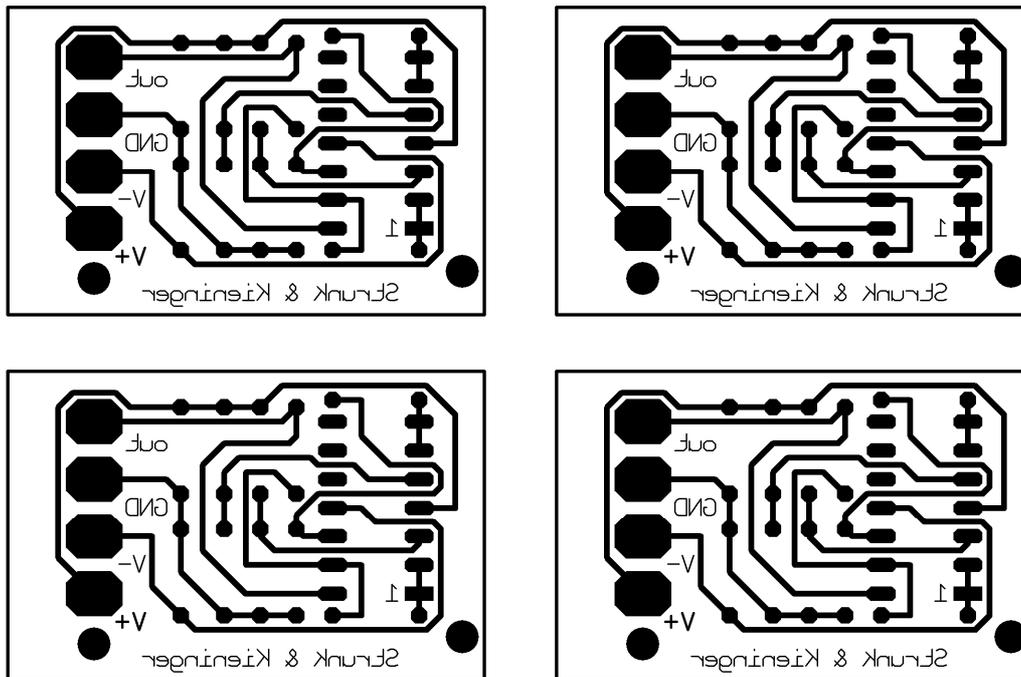
*Entwurf einer Sensorschaltung:*

Zur Entwicklung einer Sensorschaltung wurden Lehrbücher der Elektronik (Wirsum 2000) und Datenblätter der zur Verwendung geplanten Bauteile herangezogen. Die entwickelten Schaltungen wurden auf Steckplatinen getestet und optimiert, Prototypen wurden auf Lochrasterplatinen aufgebaut. Erst wenn diese ihre Funktionsfähigkeit im praktischen Einsatz bewiesen hatten, wurden Platinenlayouts der Schaltungen erstellt und die Sensoren in Kleinstserie hergestellt.

*Erstellen eines Platinenlayouts:*

Zum Entwurf der Platinenlayouts wurde die Software TARGET 3001! V11 light (Ing.-Büro Friedrich, 36124 Eichenzell) genutzt. Diese Software verfügt über Autorouter - Funktionen. Die Bauteile können aber auch manuell auf dem Layout angeordnet werden.

Nachdem die Bauteile platziert sind, können die Pins der Gehäuse mit Leiterbahnen verbunden werden. Um Fehler zu vermeiden, lässt die Software dabei nur Verbindungen zu, die auch im Schaltplan verbunden sind. Die fertigen Platinenlayouts (Bild 41) werden mittels eines Laserdruckers auf Folie gedruckt. Hierbei ist zu beachten, dass das Layout spiegelverkehrt abgebildet wird (siehe unten). Das Layout steht also sofort für die Herstellung von Platinen zur Verfügung.



**Bild 41: Ein fertiges Platinenlayout**

Dieses wurde mittels der CAD – Software Target 3001 V11 hergestellt. Die Layouts sind seitenverkehrt dargestellt. Sie werden mittels eines Laserdruckers auf Kopierfolien gedruckt. Durch die spiegelverkehrte Darstellung liegt später der eingebrannte Toner direkt auf dem Photoresist der Kupferkaschierung. So kann kein Streulicht seitlich durch das transparente Folienmaterial eindringen, wodurch die Kanten der Leiterbahnen unscharf würden.

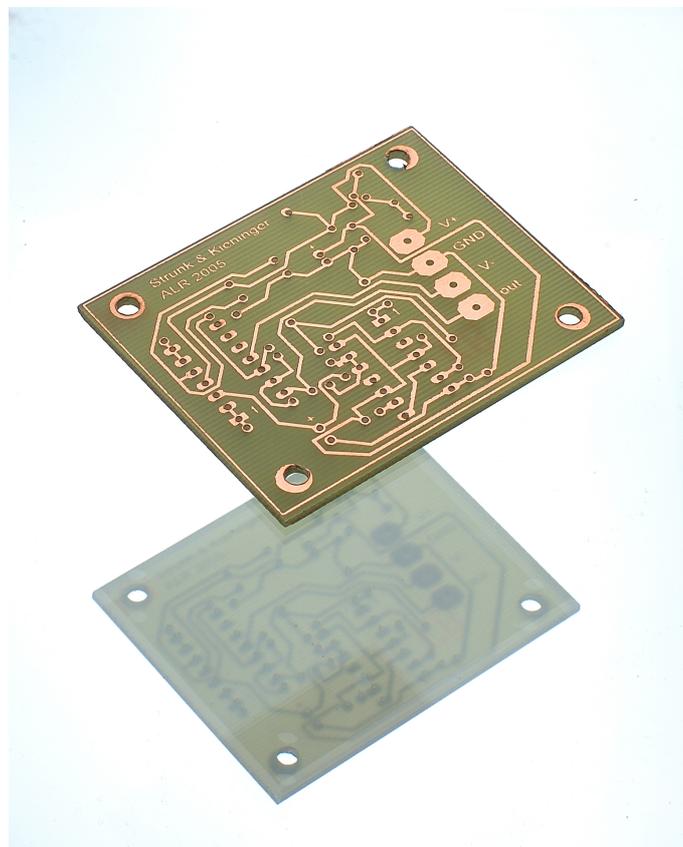
#### *Leiterplatten:*

Die ausgedruckte Folie mit dem Platinenlayout wird unter Beachtung der Vorsichtsmaßnahmen auf eine einseitig photokaschierte, kupferüberzogene (35 µm) Epoxidplatine gelegt. Dabei ist zu beachten, dass die bedruckte Seite der Folie direkt mit der Photokaschierung in Kontakt kommt. So kann ein Schattenwurf vermieden werden. Um Faltenbildung zu vermeiden, wird auf die Folie eine Glasplatte gelegt und vorsichtig auf die Platine gedrückt. Anschließend wird die Platine für 8 Minuten unter einem 500 W Halogen-Strahler in 30 cm Abstand belichtet.

Als Entwicklerlösung dient 1,3 g NaOH ad 100 mL Wasser. Nach dem Belichten wird die Photoschicht der Platine in einer Kunststoffschale unter ständigem Schwenken entwickelt. Wenn die Leiterbahnen klar sichtbar geworden sind, wird die Entwicklerlösung abgegossen.

Die Platine wurde anschließend mit der Entwicklerlösung abgerieben, um auch letzte Reste des Photoresists zu entfernen. Anschließend wird die Platine mit Leitungswasser gespült. Es wurde darauf geachtet, dass sich stets ein Wasserfilm auf der Kupferschicht befindet, um eine Oxidation der Oberfläche zu vermeiden. Die belichteten Stellen der Platine sind nun frei vom Photoresist. Dieser bedeckt nur noch die unbelichteten Stellen.

Das abschließende Ätzen der Platine geschieht in einer ca. 60°C warmen  $\text{FeCl}_3$  Lösung mit einer Konzentration von 250 g / L in einer weiteren Kunststoffschale unter leichtem Schwenken. Das Ätzen ist beendet, wenn der GFK- oder Hartpapier - Träger der Platine zu erkennen ist. Danach wird die Platine an den vorgesehenen Stellen gebohrt. Bild 42: zeigt eine fertig geätzte und gebohrte Platine.



**Bild 42: Fertige Platine**

Nach Belichten und Entwickeln des Photoresists verbleibt dieser nur an den nichtbelichteten Stellen auf der Kupferbeschichtung der Platine. Mittels einer 60 °C warmen Eisen(III)-chloridlösung mit einer Konzentration von 25 % werden die freien Stellen der Kupferkaschierung weggeätzt. Die fertige Platine wird mittels Aceton vom restlichen Photoresist befreit und dann gebohrt

### *Bestückung, Test der Schaltung und Einhausung:*

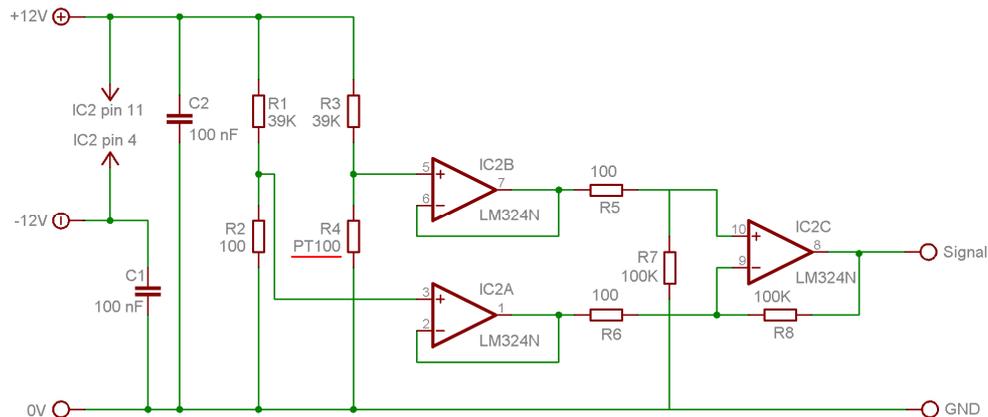
Die Platinen werden mit den Bauteilen bestückt und verlötet (0,5 mm starkes Lötzinn mit Kolofoniumkern). Die integrierten Schaltungen (Operationsverstärker, Spannungswandler) wurden gesockelt. Nach der Platinenbestückung wurde der fertig aufgebaute Sensor einem Funktionstest unterzogen. Nur Sensoren mit voller Funktionalität können kalibriert und betrieben werden. Zum Schutz vor Nässe und anderen äußeren Einflüssen wird der Sensor zum Schluss eingehaust (Bild 43).



**Bild 43: Ein fertig aufgebauter und eingehauster Sensor**  
Rechts Sensor, links Elektronikgehäuse.

#### **4.9.3.2. Temperatursensor**

Zur Messung der Temperaturen standen viele verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Es gibt bereits fertig aufgebaute integrierte Schaltungen für die Temperaturmessung. Diese verfügen über eine digitale Schnittstelle (I<sup>2</sup>C, 1-Wire) und können direkt mit Mikrocomputersystemen kommunizieren. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass diese nicht die geforderte Präzision und Auflösung aufweisen, des Weiteren sind sie nicht kalibrierbar. Daher wurde jeder Temperatursensor mit einem PT 100 Metallfilmwiderstand aufgebaut, dessen elektrischer Widerstand sich mit steigender Temperatur erhöht. Diese Sensoren genügen der DIN IEC 60751 Norm. PT 100 Sensoren werden in verschiedensten Bauweisen und Größen gefertigt. Der ausgewählte Sensor selbst hat ein Gehäuse aus dem widerstandsfähigen V4A - Stahl, da der Sensor in korrosiver Umgebung (HCl und HF) eingesetzt wird (siehe Bild 45).



**Bild 44: Schaltung der verwendeten Temperatursensoren**

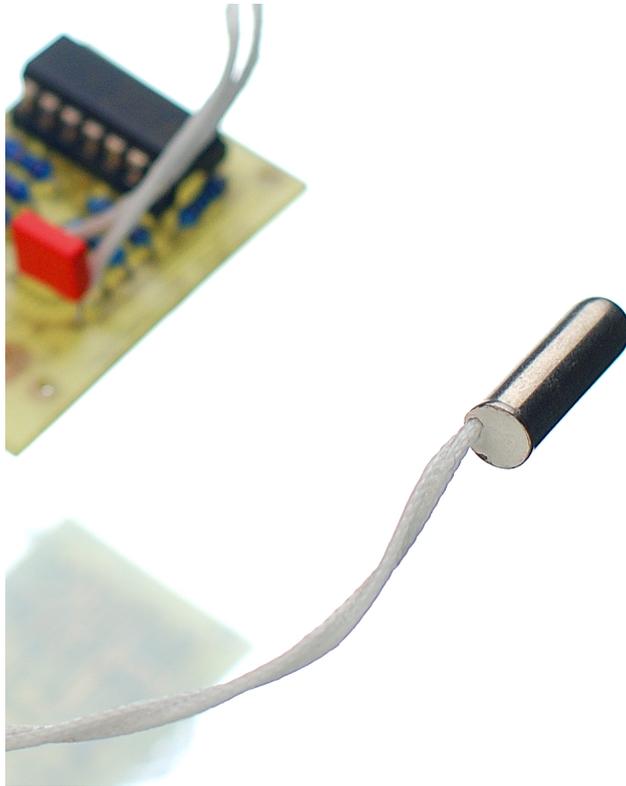
Das verwendete bipolare Bauteil LM324N enthält vier voneinander unabhängige Operationsverstärker, von denen drei genutzt werden. Die gemessene Größe ist der Widerstand des Sensors, welcher mit zunehmender Temperatur ansteigt. Die Messung erfolgt durch den Einsatz einer Wheatstonschen Brücke (siehe Text). Durch das Operationsverstärkernetzwerk wird ein Offset subtrahiert und das Messsignal auf den geforderten Spannungsbereich gespreizt.

Die verwendete Sensorschaltung ist in Bild 44 dargestellt. Das Messprinzip besteht aus einer Wheatstoneschen Brücke, die neben einer konstanten Referenzspannung (Glieder R1-R2) die variierende Messspannung (Glieder R3-R4) liefert. Bei einer Temperaturänderung verändert sich der Widerstand des Sensors PT 100 (R4) und damit auch diese Messspannung, welche in sehr guter Näherung im genutzten Temperaturbereich proportional zur Temperatur ist. Beide von der Wheatstoneschen Brücke abgegebenen Spannungen liegen bei nur wenigen mV. Die Widerstände R1 und R3 sind so gewählt worden, dass ein möglichst geringer Strom durch die Brücke fließt, ca. 300  $\mu\text{A}$  pro Strang. Je höher der Strom, umso unpräziser ist die Temperaturmessung.

Die von der Wheatstoneschen Brücke abgegebenen Spannungen werden durch jeweils einen als Spannungsfollower geschalteten Operationsverstärker (OPAMP) mit einem hinreichend hohen Eingangswiderstand (typischerweise  $10^6 \Omega$ ) vom Rest der Schaltung entkoppelt. In einem weiteren als Differenzverstärker geschalteten Operationsverstärker wird das temperaturabhängige Signal gewonnen und auf einen geeigneten Pegel verstärkt. Dabei ist ein Verstärkungsfaktor von 1000 eingestellt. Dieser kann allerdings durch Variation der Widerstände R5 – R8 verändert werden, womit der Messbereich eingestellt werden kann.

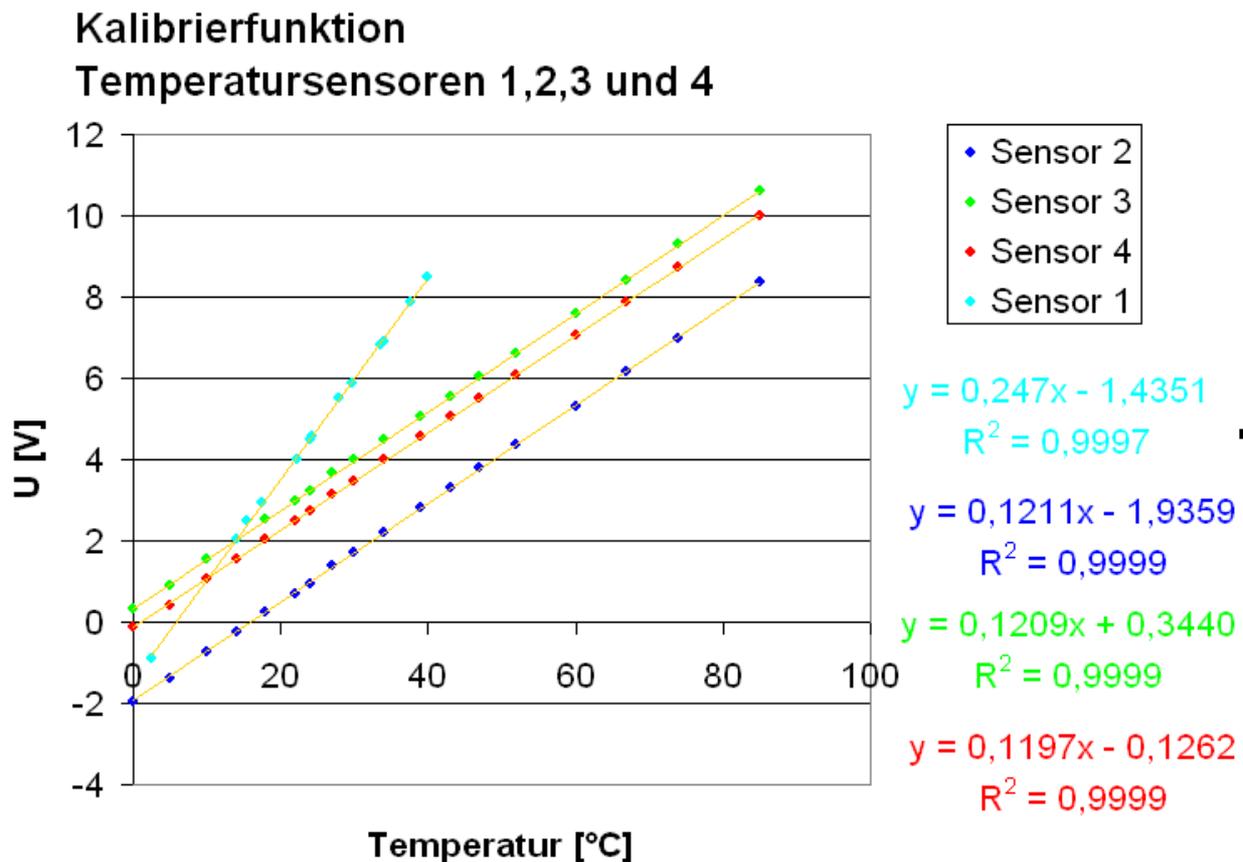
Das temperaturproportionale Ausgangssignal der Schaltung muss kalibriert werden. Dazu werden die Sensorfühler in Wasserbäder gegeben, deren Referenztemperaturen mit einem geeichten Quecksilberthermometer gemessen werden. Die Kalibrierung erfolgt an den fertig aufgebauten Sensoren, d.h. mit allen bereits angeschlossenen Kabeln unter Verwendung der

fertig aufgebauten Spannungsquelle (siehe unten) und dem AD – Wandlersystem, welches später zur Überwachung der Technikumsreaktoren eingesetzt wird. So werden störende Effekte, die durch den ohmschen Widerstand der Zuleitungen hervorgerufen werden, eliminiert. Die Kalibrierung erfolgt durch eine lineare Regression der bestimmten Temperatur / Spannungspaare, siehe Bild 46.



**Bild 45: Fertig aufgebauter und kalibrierter Temperatursensor**

Das Sensorelement ist für Temperaturen bis 600 °C zertifiziert, daher rühren die glasfaserspunnenen Anschlussdrähte. Der Sensorkopf ist aus V4A – Stahl gefertigt, welches der korrosiven Umgebung im Biofilterbetrieb standhalten sollte.



**Bild 46:** Kalibrierfunktionen der Temperatursensoren 1 – 4

Sensor 1 verfügt über einen anderen Verstärkungsfaktor, was wegen der vorgegebenen Spanne in der Ausgangsspannung zu einem engeren Messbereich führt und zu einer veränderten Steigung im Diagramm. Aufgenommen wurden die Kalibrierfunktionen durch sukzessives Abkühlen von Wasser in einem Becherglas. Das Wasser wurde mittels eines Magnetrührers gerührt und die Temperaturen wurden mittels eines Präzisionsthermometers abgelesen. Es wurden Spannungs – Temperaturwertepaare notiert.

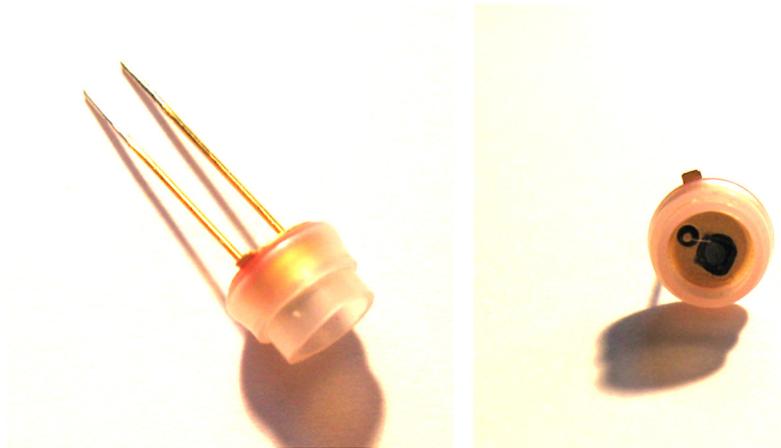
#### 4.9.3.3. Feuchtigkeitssensor

Beim Betrieb eines Biotricklingfilter muss dauerhafte Befeuchtung gesichert sein. Am besten wird der Biofilter mit Wasserdampf-gesättigter Luft beaufschlagt. Lässt sich dies nicht verwirklichen, so kann man die Packung kontinuierlich oder semikontinuierlich befeuchten. In den hier dargestellten Reaktorsystemen wurde die semikontinuierliche Befeuchtung gewählt. Es trockneten niemals mehr als 2-3 mm der Packung aus.

Der verwendete Feuchtigkeitssensor (MiniCap 2, GE-Panametrics, siehe Bild 47) basiert auf dem kapazitiven Messprinzip. Der Sensor besteht aus zwei Elektroden, zwischen denen sich ein hygroskopisches Polymer befindet, welches als Dielektrikum dient. Die Kapazität des Sensors ist proportional zur Dielektrizitätskonstante, die sich wiederum mit dem Wassergehalt ändert. Die Messluft strömt durch den Sensor, dessen resultierende Kapazität wird gemessen.

Der eingesetzte Sensor ist gegen Kondensation und zusätzlich gegen Kurzschlüsse gesichert. Der Sensor ist in einem Temperaturbereich von  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  einsetzbar.

Aufgrund des Messprinzips hat der Sensor eine Ansprechzeit von 120 Sekunden, er kann also rasche und große Sprünge in der Luftfeuchtigkeit nicht direkt erfassen. Im verwendeten Reaktorsystem treten solche wegen der generell geringen Feuchtigkeitsunterschiede nicht auf, daher konnte dieser Sensortyp problemlos eingesetzt werden.



**Bild 47: Der MiniCap ist ein kurzschlussfester und feuchteempfindlicher Kondensator, hergestellt von der Firma Panametrics**

Bild 49 zeigt die Schaltung der Auswerteelektronik, Bild 48 den aufgebauten Feuchtesensor. Teile dieser Schaltung basieren auf einem Referenzentwurf aus dem Datenblatt des Sensors. Um den Messwert abzugreifen, wird die aktuelle Kapazität des Sensors indirekt gemessen, indem der Kondensator als zeitbestimmendes Glied in einer Modulationsschaltung eingebunden ist.

Ein 555 – Kern eines 7556 CMOS - Doppeltimerchips liefert eine symmetrische Rechtecksspannung mit einer Frequenz von 60 kHz. Diese steuert den zweiten Kern des Chips. Dieser produziert ein pulsweitenmoduliertes Rechtecksignal gleicher Frequenz, indem bei steigender Flanke des Rechtecksignals der Sensor-Kondensator geladen wird. Dieser entlädt sich mit seiner aktuellen Zeitkonstante. Sinkt die Spannung am Kondensator unter  $1/3$  des ursprünglichen Wertes, beendet der zweite Timerkern seinen Aktivitätszyklus und wartet auf den nächsten Takt. Die Modulation ändert sich hierbei linear mit der Kapazität des Sensors. Die modulierte Rechtecksspannung wird über ein R-C – Glied zu einer Mess- Gleichspannung umgeformt. Diese ändert sich proportional zum Feuchtigkeitsgehalt der gemessenen Luft, ist aber mit einem Offset behaftet. Messungen haben ergeben, dass je nach Teilstreuung mit einem Offset von 1,2 bis 1,5 V zu rechnen ist. Die eigentliche Signalspreizung liegt bei 200 mV. Die gemessene Offsetspannung wird durch einen Spannungsteiler aus zwei Festwiderständen (R8 und R9 in Bild 50) nachgebildet. Die weitere Schaltung - betrieben mit der vollen Versorgungsspannung von  $+/- 12\text{ V}$ - entspricht der des Temperatursensors, die Spannungen

der offset-Nachbildung und der Mess-Gleichspannung werden über zwei Verstärker entkoppelt, deren Ausgang einem Differenzverstärker (Verstärkungsfaktor 500) zugeführt werden, der gleichzeitig die Polarität am Ausgang invertiert.

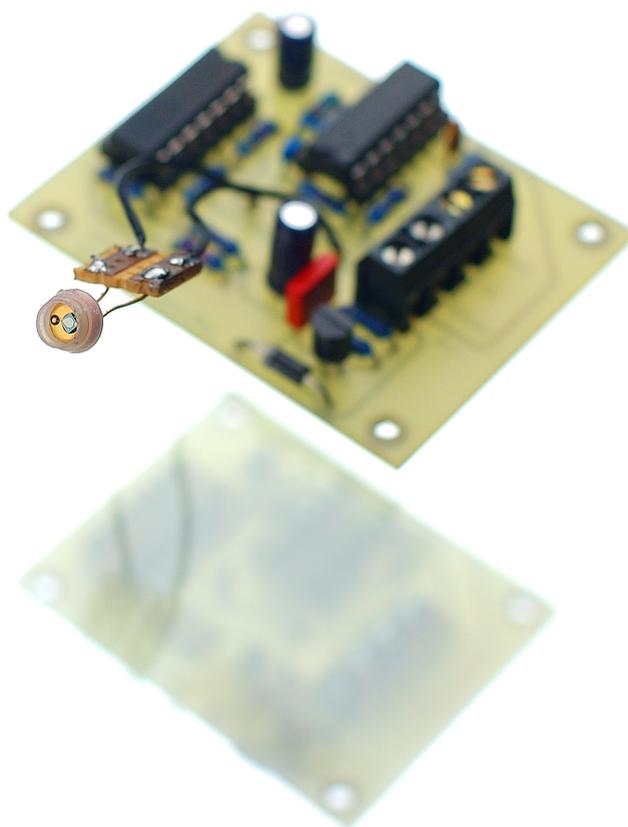
Der gewählte Sensor-Baustein hat eine Spannungsfestigkeit von 2,5 V. Daher wird aus der 12 V Versorgungsspannung mittels eines LM 317 und einem geeigneten Widerstandspaar (R1 und R2 in Bild 50) eine Arbeitsspannung von 2,5 V erzeugt. Das fertig prozessierte Messsignal ist also negativ zum 0 V – Potential der Spannungsversorgung. Dies hatte den Vorteil die Feuchtigkeitssignale von den Temperatursignalen zu unterscheiden.

Die Kalibrierung erfolgt analog zu der der Temperatursensoren nach Zusammenstellung aller Bauteile und Zuleitungen. In einem Exsikkator wurde mittels einer kleinen Menge Phosphorpentoxid ( $P_4O_{10}$ ) in einer Petrischale eine nahezu wasserfreie Atmosphäre geschaffen. Dies wurde mittels eines meteorologischen Hygrometers verfolgt. Daraufhin wurde das Phosphorpentoxid entfernt. Der Sensor wurde durch den Deckelzugang des Exsikkators gegeben, der danach mit Parafilm verschlossen wurde. Durch Einspritzen kleiner Wassermengen konnten nun selektiv verschiedene Luftfeuchtigkeiten erzeugt werden. Diese wurden mit dem jeweiligen Ausgangssignal der Sensorschaltung in Beziehung gesetzt. Insgesamt zieht sich der Kalibrierprozess über einen ganzen Arbeitstag hin, da nach jedem Einspritzen abgewartet werden muss, bis sich die Luftfeuchtigkeit im Exsikkator equilibriert. Bild 50 zeigt eine typische Kalibrierkurve des Feuchtigkeitsmesssystems.

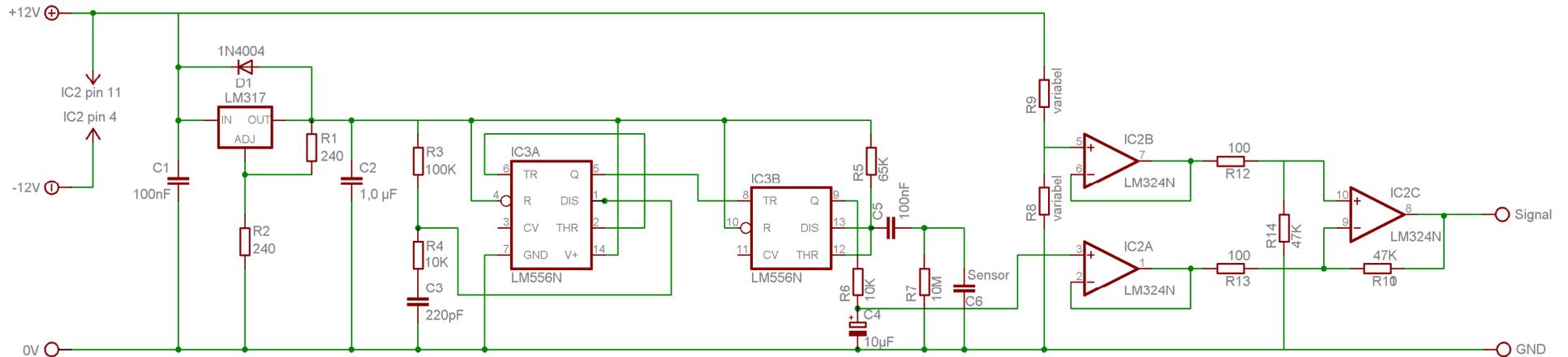
Die relative Feuchtigkeit lässt sich unter Berücksichtigung der aktuellen Temperatur oberhalb von 0 °C nach Gleichung 13: in die zugehörige absolute Feuchtigkeit umrechnen:

Gleichung 13: 
$$AF = 10^5 \cdot \frac{m_w}{R} \cdot \frac{6,1078 \cdot 10^{\frac{a \cdot T}{b+T}}}{T_K}$$

- Mit: a = 7,5 (Magnusparameter a für Temperaturen oberhalb von 0 °C)  
 b = 237,3 (Magnusparameter b für Temperaturen oberhalb von 0 °C)  
 $m_w$  = 18.016 kg (Molekulargewicht des Wasserdampfes)  
 R = 8314,4 J / (kmol · K) ideale Gaskonstante  
 T = Gastemperatur in °C  
 $T_K$  = Thermodynamische Gastemperatur  
 AF = Absolute Feuchte in g / m<sup>3</sup>

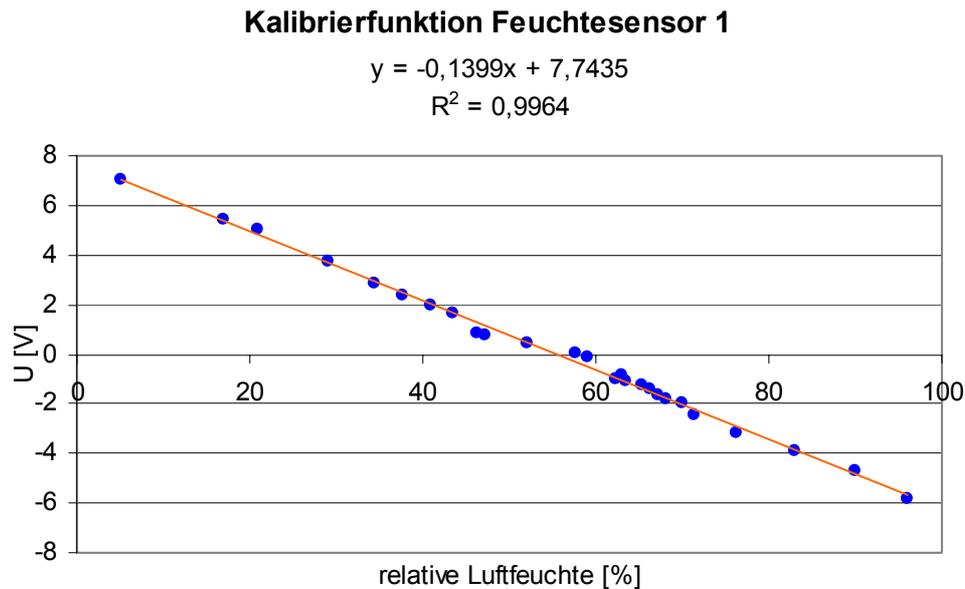


**Bild 48: Fertig aufgebauter und kalibrierter Feuchtesensor vor der Einhausung**  
Schön zu erkennen ist die aktive Oberfläche des eigentlichen Sensorelementes.



**Bild 49: Schaltung der verwendeten Feuchtigkeitssensoren**

Der Sensorbaustein verhält sich elektrisch als Kondensator (C6), dessen Kapazität sich mit der Feuchtigkeit der umgebenden Luft ändert. Diese wird durch eine geeignete Multivibratorschaltung in eine Gleichspannung umgewandelt (siehe Text). Durch ein nachfolgendes Operationsverstärkernetzwerk wird diese von einem Offset befreit und auf den Messbereich des Analog / Digitalwandlers gespreizt.



**Bild 50: Kalibrierfunktion des Feuchtesensors Nr. 1**

Die Kalibrierung erfolgte durch Bildung von Spannungs – Feuchtigkeitswertepaaren. Dazu wurde in einem Exsikkator über Phosphorpentoxid ( $P_4O_{10}$ ) trockene Luft erzeugt. Das Trocknungsmittel wurde entfernt und ein Hygrometer sowie der Sensor wurden in den Exsikkator gegeben. Sukzessive Wasserzugaben erhöhten die relative Feuchtigkeit im Messvolumen.

#### 4.9.3.4. Drucksensor

Es wurde ein Drucksensor im Reaktorsystem vorgesehen, welcher den Differenzdruck zwischen Staudruck unmittelbar neben dem Kompressor und dem Umgebungsdruck verfolgt. Mit Hilfe dieses Sensors konnten die Funktion des Kompressors sowie Verstopfungen im System detektiert werden. Ebenso wurden Wartungszyklen während des Betriebs aufgezeichnet.

Als eigentlicher Sensor wurde ein MPX5500DP von Motorola (heute Freescale) eingesetzt (Bild 51). Dieser ist werksseitig vorkalibriert und kann einen Differenzdruck von bis zu 500 kPa (5 bar) bestimmen. Der Sensor basiert auf einer piezoresistiven Membran. Er umfasst eine Auswerteschaltung, die ein Signal von 0 – 5 V proportional zum Differenzdruck liefert. Das Sensormodul ist intern temperaturkompensiert. Das zugehörige Datenblatt nennt einen relativen Fehler von maximal 2,5 %.

Die aufgebaute Schaltung findet sich in Bild 52. Die Versorgungsspannung wird durch einen 7805L Festspannungswandler aus der 12 V Schiene der allgemeinen Spannungsversorgung der Sensorsysteme gewonnen. Das Ausgangssignal des MPX5500DP wird durch einen als

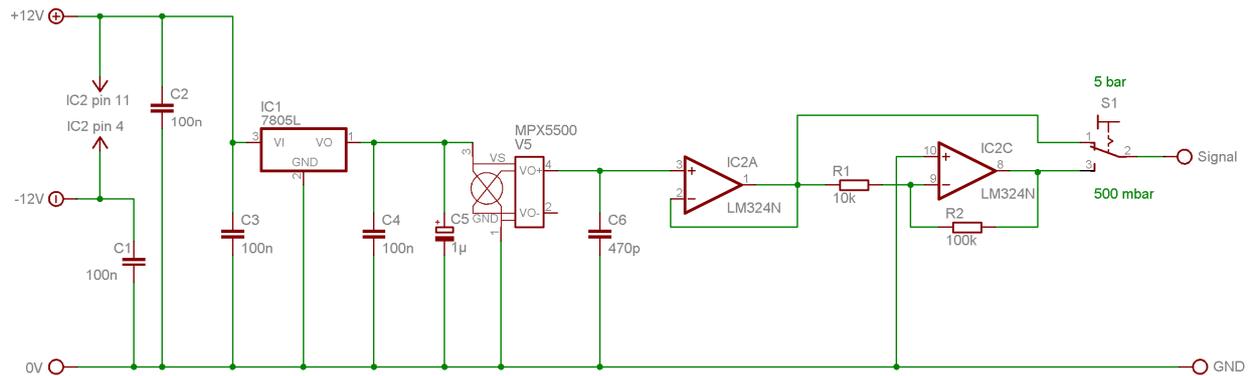
Spannungsfolger geschalteten Operationsverstärker des vierfach - Operationsverstärkers des Typs LM 324 entkoppelt. Dieser wird mit + / - 12 Volt versorgt.

Das Signal des MPX5500DP ist stabil genug, um einen Teil des Messbereichs selektiv herauszuverstärken. Eine zweite Operationsverstärkereinheit verstärkt das Signal um den Faktor 10, definiert durch zwei speziell ausgemessene Widerstände (R1 und R2 in Bild 53). Dadurch wird ein Messbereich von 0 – 1 bar auf einen Ausgangsspannungsbereich von 0 – 10 V abgebildet, das unverstärkte Signal umfasst 0 - 5 bar in einem Bereich von 0 - 5 V. Der Drucksensor enthält einen Schalter zur Wahl des Messbereichs. Im gesamten Betriebszeitraum der Anlage wurde der Messbereich von 0 – 1 bar genutzt.



**Bild 51: Das Drucksensormodul MPX5500DP**

Der Drucksensor ist werksseitig vorkalibriert und liefert Ausgangsspannungen von 0 bis 5 V, welche einem Differenzdruck von 0 bis 5 bar entsprechen.



**Bild 52: Schaltung der verwendeten Feuchtigkeitssensoren**

Mittels eines Festspannungsreglers wird aus der anliegenden 12 V Versorgungsspannung eine 5 V Spannung zur Versorgung des Sensors gewonnen. Der Sensor liefert eine dem anliegenden Differenzdruck proportionale Ausgangsspannung. Der Ausgangsbereich ist schaltbar, entweder wird das Sensorsignal direkt ausgegeben oder durch eine Operationsverstärkerschaltung um den Faktor 10 verstärkt. Dadurch wird eine höhere Auflösung im Bereich von 0 bis 500 mbar Differenzdruck erreicht, zusätzlich wird das Sensorsignal durch einen eingebauten Spannungsfollower entkoppelt.

#### 4.9.3.5. Das pH – Sensor System

Als pH – Sensor System kam ein pH-Hi8510E System der Firma Hannah zum Einsatz. Dieses verfügt über einen 0 – 10 V Ausgang für das Messsignal. Auf diesen Spannungsbereich wird die pH – Skala von 0 – 14 abgebildet. Als eigentlicher Sensor kam eine Einstabmesskette der Firma Carls Roth (Karlsruhe) mit 5 m langem Anschlusskabel zum Einsatz (siehe Bild 53). Das System verfügt über eine interne Temperaturkompensation. Dazu wird ein externer PT 100 Sensor angeschlossen und räumlich nahe an der Glaselektrode angebracht. Das System wurde mit drei Standardpufferlösungen nach DIN 19266 (4,01; 6,86 und 9,18) kalibriert.



**Bild 53:** Die zur pH – Messung verwendete Einstabmeßkette

#### **4.9.3.6. Anbindung des Flammenionisationsdetektor - Systems**

In den in dieser Arbeit beschriebenen Biotricklingfiltern im Technikumsmaßstab wurden die Substratkonzentrationen am Einlass in die jeweiligen Filter und an deren Ausgang gemessen. Dadurch kann der Wirkungsgrad und die Filtervolumenbelastung des Biotricklingfilters leicht errechnet werden.

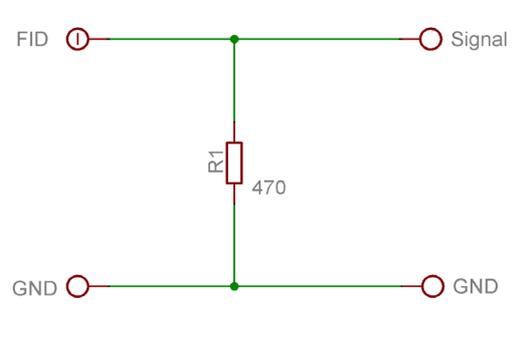
Zur Messung der Substratkonzentrationen wird ein Flammenionisationsdetektor (FIDAMAT 2, Siemens) eingesetzt. Dieses verfügt über eine interne Pumpe, die einen Unterdruck von ca. 300 mbar erzeugt. Die Gase werden von den jeweiligen Messstellen durch Teflonschläuche und die verwendete Messstellenumschaltung in das FID gezogen. Dort werden sie in eine Brennkammer geleitet. Hier brennt eine Wasserstoffflamme unter möglichst konstanten Bedingungen. Die Brennluft sollte möglichst kohlenwasserstofffrei sein und wird ebenfalls von Außen zugeführt. Die Flamme wird von einem Elektrodenblech eingefasst. Eine zweite Elektrode stellt die Flammdüse dar. Zwischen diesen Elektroden liegt eine sauber gesiebte Gleichspannung von 200 V an. Es fließt stets ein kleiner Strom durch die Flamme. Dieser wird durch das Kalibrierverfahren als Nullpunkt definiert.

Gelangen organische Kohlenstoffverbindungen in diese Flamme, entstehen intermediär ionische Spezies wie z.B.  $\text{CHO}^+$ . Diese werden durch das hohe elektrische Feld zu den Elektroden abgelenkt, es fließt ein stärkerer Strom. Dieser wird gemessen und das Signal wird intern im Gerät durch eine Instrumentenverstärkerschaltung auf Operationsverstärkerbasis in ein Standardindustriesignal (4 – 20 mA) umgeformt. Wasserstoff, Sauerstoff und Heteroatome

liefern keinen nennenswerten Beitrag zum Flammenstrom, daher ist das Messsignal proportional zur Konzentration an Kohlenstoffatomen im Messgas.

Da diese Verstärkerschaltung sehr flexibel angelegt ist, kann das Gerät vielseitig kalibriert werden und verfügt über einen großen Messbereich und eine hohe Empfindlichkeit. Das Messsignal ist in gewissen Grenzen proportional zur Menge an organischen Verbindungen im Probengas. Es kann durch eine Kalibrierung (siehe unten) in Milligramm organischem Kohlenstoff pro Kubikmeter ( $\text{mg C}_{\text{org}} / \text{m}^3$ ) umgerechnet werden.

Das vom FID gelieferte 4 – 20 mA Signal kann nicht direkt mit dem verwendeten AD - Wandler gemessen werden. Das FID erlaubt jedoch eine Bürde bis zu 700  $\Omega$ . Ein Shuntwiderstand von 470  $\Omega$  konnte eingesetzt werden, welcher den Signalumfang des FID auf 1,88 V (Nullgas) bis 9,40 V (Vollausschlag) abbildet (siehe Bild 54).



**Bild 54: Shuntwiderstand zur Anbindung des FID an die Messwerterfassung**

Laut Handbuch des FIDAMAT kann dieses eine Bürde bis zu 700  $\Omega$  treiben. Es wurde ein 470  $\Omega$  eingesetzt um das 4 bis 20 mA Signal in ein 1,88 bis 9,40 V Signal umzuwandeln, welches problemlos mit dem Analog / Digitalwandler erfasst werden kann.

Die Kalibrierung des FID erfolgt mit einem Gas definierter Zusammensetzung. Zuerst wird der Nullpunkt des Gerätes mit einem Nullgas (kohlenwasserstofffreie synthetische Luft) bestimmt. Danach wird als Kalibriergas gereinigtes Propan mit 492 ppm = 796,4  $\text{mg C}_{\text{org}} / \text{m}^3$  in das FID geleitet, um den Proportionalitätsfaktor zu bestimmen. Bei beiden Messpunkten, Nullgas und Kalibriergas wird das Ausgangssignal des FID gemessen. Dabei wird auch der am FID eingestellte Messbereich notiert.

Zur Berechnung der richtigen Konzentration des Kalibriergases, ist es notwendig die Volumenkonzentration  $\sigma_x$  in eine Massenkonzentration  $\beta_x$  umzurechnen. Die Volumenkonzentration ist definiert durch das Partialvolumen des Stoffes  $V_x$  durch das Gesamtvolumen  $V$ :

Gleichung 14: 
$$\sigma_x = \frac{V_x}{V}$$

Für die Massenkonzentration  $\beta_x$  gilt analog (mit  $m_x$ : Masse):

Gleichung 15: 
$$\beta_x = \frac{m_x}{V}$$

Mit der Masse eines Stoffes ( $M_x$ : Molgewicht,  $n_x$ : Zahl der Mole):

Gleichung 16: 
$$m_x = M_x \cdot n_x$$

und der allgemeinen Gasgleichung ergibt sich der Zusammenhang zwischen Massenkonzentration Molgewicht und Volumenkonzentration:

Gleichung 17: 
$$\beta_x = A \cdot M_x \cdot \sigma_x$$

Mit  $A = p / RT$  ( $p$ : Druck,  $R$ : Allgemeine Gaskonstante,  $T$ : Absolute Temperatur)

Die Kalibrierung liefert für Null- und Messgas (Propan) zwei Spannungswerte, deren Differenz die für diesen Messbereich gültige Spannungsdifferenz darstellt:

Gleichung 18: 
$$\Delta U_{MB} = U_{\text{Propan}} - U_{\text{Nullgas}}$$

Die Spannungsdifferenz des Messbereichs und die Mengenkonzentration lässt sich in Beziehung setzen:

Gleichung 19: 
$$\beta_{x, \Delta U_{MB}} = \frac{\beta_x}{\Delta U_{MB}}$$

Das verwendete FID verfügt über zahlreiche Konzentrationsbereiche, in denen gemessen werden kann. Diese müssen manuell an der Konsole des FID eingestellt werden. Intern entsprechen diese Messbereiche verschiedenen Verstärkungsfaktoren des Elektrometerverstärkers. Um dies zu berücksichtigen, nutzt man den Verstärkungsfaktor  $f_{\text{Verstärkung}}$ :

Gleichung 20: 
$$f_{\text{Verstärkung}} = \frac{f_{\text{Kalibrierung}}}{f_{\text{Messung}}}$$

Wird eine niedrigere Verstärkung gewählt, so wird der Messbereich für die Massenkonzentration  $\beta_x$  verkleinert, die zu messende Spannungsdifferenz bleibt erhalten. Dies führt dazu, dass der Spannungsbereich eine niedrigere Massenkonzentration abbildet. Um den Verstärkungsfaktor mit in die Berechnung einzubeziehen, wird die Spannungsdifferenz in Gleichung 19 mit dem Faktor multipliziert und es folgt:

Gleichung 21: 
$$\beta_{x,\Delta U_{MB},f_{Verstärkung}} = \frac{\beta_x}{\Delta U_{MB} \cdot f_{Verstärkung}}$$

Die bisherigen Berechnungen haben sich bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich auf die Kalibrierung mit Propan bezogen. Daher ist eine Umrechnung auf die in den Gasen enthaltene Konzentration an organischen Kohlenstoff  $C_{org}$  vorzunehmen:

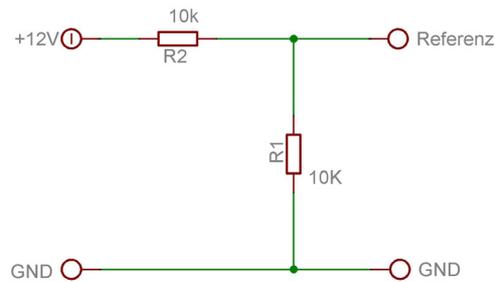
Gleichung 22: 
$$C_{org} = \frac{M_{Propan} - 8 \cdot M_H}{M_{Propan}}$$

Damit ergibt sich die Mengenkonzentration an organischem Kohlenstoff zu:

Gleichung 23: 
$$\beta_{C_{org}} = C_{org} \cdot \beta_{x,\Delta U_{MB},f_{Verstärkung}}$$

#### 4.9.3.7. Referenzspannung

Die Qualität der Daten der Temperatur- und Feuchtesensoren sind von der Stabilität der Versorgungsspannung abhängig. Diese kann jedoch nicht direkt gemessen werden, da sie den Bereich des AD – Wandlers der Messwertkarte überschreitet. Ein Spannungsteiler aus selektierten Metallfilmwiderständen (R1 und R2 in Bild E14) halbiert die Spannung von +/- 12 V nach +/- 6 V. Es wurde jeweils nur eine der beiden Versorgungsspannungen aufgezeichnet, da anfangs nicht genügend AD – Kanäle zur vollständigen Überwachung der beiden Spannungen zur Verfügung standen.



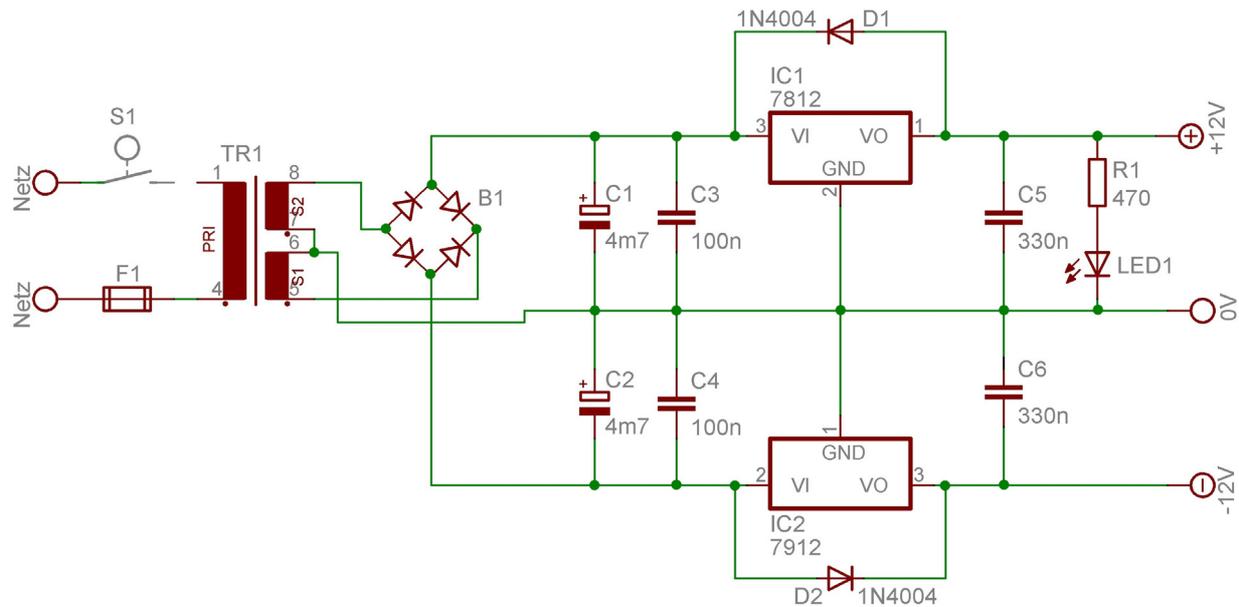
**Bild 55: Schaltung der Referenzspannungsquelle**

Da die Analog / Digitalwandler nur Spannungen im Bereich von -10 V bis +10 V messen können, musste die zu überwachende Versorgungsspannung, die +/- 12 V beträgt, durch einen Spannungsteiler halbiert werden. Es wurden speziell ausgemessene hochgenaue Widerstände eingesetzt.

#### 4.9.3.8. Versorgungsspannung des Systems

Die Versorgung der verschiedenen Sensorsysteme erforderte eine leistungsfähige, präzise und stabile Spannungsversorgung. In den Sensorschaltungen wurden Operationsverstärker vom Typ LM 324 eingesetzt, welche nicht "rail to rail" fähig sind, d.h. die Spannungen der Ausgänge können nicht die der Versorgungsspannung erreichen. Aus Vorversuchen hat sich eine Versorgungsspannung von +/- 12 V ergeben, damit die angestrebte maximale Ausgangsspannung von +/- 10 V erreicht wird, um so den gesamten Messbereich der AD – Wandler nutzen zu können. Bei der realisierten Schaltung erreichen die Operationsverstärker +/- 10,7 V auf ihren Ausgängen.

Das entwickelte Netzteil verfügt über einen primärseitig mittelträg mit 200 mA abgesicherten 25 VA-Printtrafo mit zwei Sekundärwicklungen mit jeweils nominal 15 V. Nach dem Gleichrichter mit gut dimensionierten Siebteilen folgen zwei Linearspannungswandler vom Typ 7812 und 7912, die laut Datenblatt einen Strom von bis zu 2 A für eine sehr stabile und präzise Versorgungsspannung liefern können. Potentielle Schwingungsneigungen der Linearregler wurden durch den Einbau weiterer Kondensatoren in das System unterbunden.



**Bild 56: Schaltung des Netzteils**

Das Netzteil liefert zwei symmetrische Spannungen von +/- 12 V. Die Spannungen werden nach der Gleichrichtung und Glättung durch Halbleiter – Festspannungsregler festgelegt.

#### 4.9.4. Verfahrensführung der Anlage

##### 4.9.4.1. Inokulation der Reaktoren und Anfahrphase

Nach einer vorausgehenden Instandsetzungsphase wurden beide Reaktoren im April 2005 mit jeweils zwei Liter FLU 100 – Suspension in Minimalmedium,  $OD_{546} = 0,5$  angeimpft, indem diese direkt auf die Packung gegeben wurden. Danach wurden die Reaktoren mit 100 mg Fluorbenzol pro  $m^3$ , bei einem Volumenstrom von  $5 m^3$  pro Stunde beaufschlagt. Der Sumpf wurde alle drei Tage auf einen pH – Wert von 7,5 bis 8 eingestellt und alle vier Wochen komplett ausgetauscht. Im August 2006 war die Messtechnik vollständig installiert und der Regelbetrieb der Reaktoren konnte beginnen.

##### 4.9.4.2. Regelbetrieb der Reaktoren

Reaktor 1 verfügte neben den Temperatursensoren und den FID – Messstellen auch über eine Überwachung der relativen Feuchtigkeiten im Roh- und im Reingas sowie des pH – Wertes der Tricklinglösung im Reaktorsumpf. Daher wurde dieser Reaktor für das später beginnende Mischsubstratexperiment ausgewählt.

Zunächst jedoch wurden beide Reaktoren ausschließlich mit Fluorbenzol als Substrat betrieben. Dabei wurden neben der automatischen Datenaufnahme die in Tabelle 17 dargestellten Wartungsarbeiten durchgeführt.

Im Zeitraum bis November 2005 wurden die Reaktorsümpfe mit 1 m NaOH neutralisiert, danach mit einer 4 m NaHCO<sub>3</sub> – Lösung.

**Tabelle 17: Allgemein während des Regelbetriebs zwischen August 2005 und Oktober 2006 durchgeführte Wartungsarbeiten**

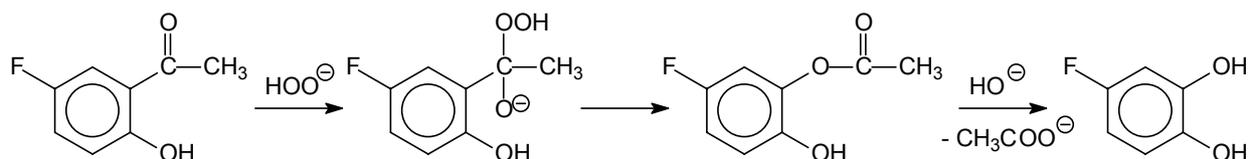
<b>Wartungsarbeit</b>	<b>Intervall</b>
Sichtprüfung der Anlage	werktäglich
Neutralisierung des Sumpfs	5 – 8 Tage
Sumpfwechsel	3 Wochen
Datenaufnahme auswerten	3 Tage
FID kalibrieren	4 Wochen
pH – Elektrode kalibrieren	4 Wochen
Dosimatfüllung	2 Monate

Im Februar 2006 wurde Reaktor 1 auf ein äquimolares Gemisch aus Fluorbenzol und Chlorbenzol umgestellt. Die Umstellung geschah fliegend, also ohne den laufenden Betrieb anzuhalten. Die Substratmischung bestand aus 498 ml Chlorbenzol und 394 mL Fluorbenzol. Um die jeweiligen Anteile beider Komponenten im Roh- und Reingas zu bestimmen, wurden einmal täglich Proben mittels einer Gasmaus entnommen und mittels des Gaschromatographie analysiert (siehe Kapitel 4.8.2.3.).

#### **4.10. Die Synthese von 4-Fluorcatechol**

4-Fluorcatechol ist ein vermuteter Metabolit beim Fluorbenzol und Fluorphenolabbau in *Burkholderia fungorum* FLU 100. Leider ist diese Chemikalie nicht kommerziell erhältlich. Daher musste sie synthetisiert werden. Die Synthese erfolgte nach dem von Corse und Ingraham beschriebenen Verfahren (Corse 1951), siehe Bild 57. Das  $\alpha$  - Kohlenstoffatom der Seitenkette wird von der Oxidationsstufe +2 nach +3 oxidiert. Dadurch wird aus der Ketonfunktion eine Esterfunktion, mit dem Phenylring als Alkoholpartner. Dieser Ester wird im sauren Milieu gespalten, der freie Alkohol, das erwünschte Produkt der Reaktion wird freigesetzt.

Abweichend von der Beschreibung wurde bei der durchgeführten Synthese mit einem kleineren Ansatz gearbeitet, statt 100 mmol Edukt wurde mit 32,5 mmol Edukt begonnen. Alle anderen Mengen und Volumina wurden entsprechend angepasst.



### Bild 57: Syntheseweg von 4-Fluorocatechol

Hauptedukt ist das kommerziell erhältliche 5-Fluoro-2-hydroxyphenon. Dieses wird in Ethanol im alkalischen Milieu mit Hydroxyperoxid an der Seitenkette oxidiert. Durch Ansäuerung mit Essigsäure wurde der gebildete Ester unter Freisetzung von 4-Fluorocatechol gespalten.

Zuerst wurden 5 g (32,5 mmol) 5-Fluoro-2-hydroxyacetophenon in einer Mischung aus 33 mL einer 1 m Natronlauge und 16 mL Ethanol (99 %) in einem Rundkolben mit Schliff gelöst. Die Mischung wurde vorsichtig auf 40 °C erwärmt. Danach wurden 57 mL Wasserstoffperoxid (3 %) zugegeben. Die Mischung erwärmte sich von selbst auf ca. 60 °C. Es musste mit Wasser (Raumtemperatur) leicht gekühlt werden, da die Temperatur des Ansatzes nicht über 70 °C steigen darf. Innerhalb der nächsten Stunde wurde 5,3 mL einer 6 m Natronlauge zugetropft. Der Ansatz wurde danach über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde der pH - Wert des Ansatzes mit Essigsäure (80 %) langsam unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers und eines pH – Meters auf etwa 6 eingestellt. Dabei mussten insgesamt knapp 0,2 mol NaOH neutralisiert werden. Abweichend von der Vorschrift konnte kein Niederschlag beobachtet werden, so dass die Mischung nicht filtriert werden musste. Der Ansatz wurde danach im Exsikkator über Phosphorpentoxid ( $\text{P}_4\text{O}_{10}$ ) bei 25 mbar Druck bis zur vollständigen Trockenheit eingeengt. Dieser Prozess nahm insgesamt vier Tage in Anspruch. Dabei wurde das Trocknungsmittel dreimal ausgetauscht.

Nach dem Trocknen hatte sich eine kristalline Masse am Boden des Rundkolbens abgesetzt. Diese war an ihren Randbereichen weiß gefärbt, in ihrem Zentrum bräunlich. Sie wurde insgesamt fünfmal mit jeweils 33 mL siedendem Toluol für jeweils 20 Minuten extrahiert. Die Toluolfractionen wurden vereinigt und das Toluol wurde bei 50 mbar abdestilliert, bis ca. 30 mL übrig waren. Diese wurden bei Raumtemperatur verdampft. Es fiel eine ockerfarbene Kristallmasse an, die bereits den typischen Catecholgeruch aufwies.

Die Masse wurde mittels einer Sublimille bei einem Druck von 40 mbar und einer Temperatur von 70 °C gereinigt. Nach drei Stunden hatten sich 1,4 g 4-Fluorocatechol am Kühlfinger abgesetzt. HPL- Analysen zeigten, dass es sich um ein sehr reines Produkt handelte. Die Ausbeute entsprach mit 33,6 % etwa der Hälfte der Literaturangaben (63 %, Corse 1951)

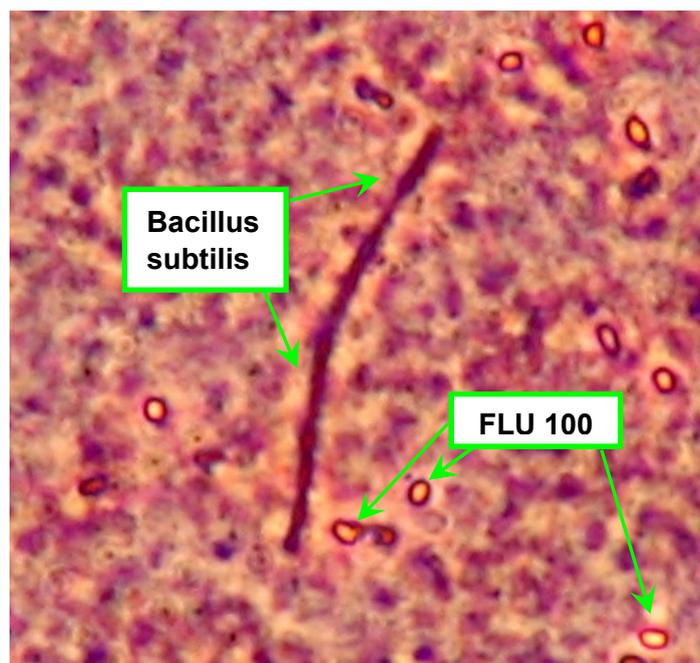
# Kapitel 5: Experimente und Ergebnisse

## 5. Experimente und Ergebnisse

### 5.1. Der Stamm FLU 100 – Taxonomische Einordnung

Der Stamm FLU 100 verfügt über die äußerst ungewöhnliche Fähigkeit, Fluorbenzol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können. FLU 100 erscheint als Kurzstäbchen mit einer Länge von 2 µm und einem Durchmesser von weniger als einem µm. Zellen, die sich in der stationären Wachstumsphase befinden verkürzen sich, sie werden kokoid (siehe Tabelle 18). Exponentiell wachsende Zellen bilden kettenartige Agglomerate. FLU 100 bildet, je nach Art des Substrates weiße bis hellgelbe Kolonien. Bei Versorgung mit Fluorbenzol als Substrat färben sich die Kolonien nach einiger Zeit braun.

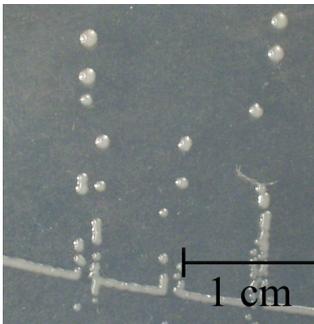
Schnelltests wie der KOH- und der Aminopeptidasetest ergaben, dass es sich bei FLU 100 um einen gramnegativen Stamm handelt. Dieser Befund konnte mit einer Gramfärbung weiter verstärkt werden (siehe Bild 58, Goodfelloe 1994, Lengler 1999, Madigan 2006).



**Bild 58: Gramfärbung: FLU 100 (gramnegativ) und Bacillus subtilis (grampositiv)**

Beide Stämme liegen im Gemisch nach einer erfolgreich durchgeführten Gramfärbung vor. Schön zu erkennen sind die hellroten gefärbten Zellen von FLU 100 gegenüber den dunkel gefärbten länglichen Zellen des Bacillus.

**Tabelle 18: Eigenschaften von FLU 100**

Der Stamm FLU 100			
Koloniemorphologie		Zellmorphologie	
Koloniefarbe	weiß, mit zunehmender Inkubationszeit erfolgt eine Braunfärbung	Zellmorphologie	Kurzstäbchen, immobil Länge: 2 µm Durchmesser: <1µm werden bei Substratmangel kokoid
Koloniemorphologie	rund, leicht erhabene, undurchsichtige Kolonien mit glattem Rand		
Suspendierbarkeit	leicht zu suspendieren		
Identifizierung laut API 20 NE	<i>Burkholderia cepacia</i>	KOH – Test	+
Similarity	99,9 %	Oxidase – Test	+
Identifizierung laut BIOLOG® GN, GP	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Aminopeptidase – Test	+
Identification	23,6 %	Gramfärbung	gramnegativ
Identifizierung laut 16s rRNA Sequenz	<i>Burkholderia fungorum</i>	Gramverhalten	Gramnegativ (3 von 3 Tests)
Identität	1441 / 1442 Basen		

### 5.1.1. Genetische Identifikation von FLU 100

Die Analyse des zur 16S rRNA zugehörigen Genes ergab eine Sequenz von 1442 Basenpaaren. Diese wurde mittels einer Datenbankrecherche mit den bereits bekannten und validierten Sequenzen verglichen. FLU 100 zeigt in diesem Genabschnitt 1441 identische Basen zu *Burkholderia fungorum* LMG16225 (accession no. AF215705), (Coenye 2001A und 2001B). Daher wurde der Stamm FLU 100 provisorisch mit *Burkholderia fungorum* FLU 100 benannt. (Die Sequenzdaten finden sich in Kapitel 7.5).

### 5.1.2. Einordnung der Gattung *Burkholderia*

Die Gattung *Burkholderia* wurde 1992 / 1993 von Eiko Yabuuchi und ihren Mitarbeitern nach Walter H. Burkholder benannt (Yabuuchi 1992). Davor waren die Stämme unter der Gattung *Pseudomonas* eingeordnet z.B. als *Pseudomonas cepacia* (Holt 1984, Salles 2002).

Der *Burkholderia* Genus ist vor allem durch seine pathogenen Mitglieder wie *Burkholderia mallei* (Erreger des Melioidismus, ICD-10: A24.0), *Burkholderia pseudomallei* (Erreger der Melioidose, ICD10: A24.1), und *Burkholderia cepacia* bekannt geworden. Zum Beispiel kann *Burkholderia cepacia* zu einer Infektion von Patienten mit zystischer Fibrose und einer erhöhten Sterblichkeit führen (Mahenthalingam 1995). Erwachsene mit zystischer Fibrose sind Menschen, die seit ihrer Geburt einen Gendefekt auf dem langen Arm des Chromosom 7 besitzen. Dieser Defekt ist dafür verantwortlich. Der Körper produziert einen zähflüssigen Schleim, der die Atemwege und Verdauungsgänge verklebt. Die Lebenserwartung bei diesen Menschen ist daher stark eingeschränkt. Sämtliche Drüsen des Körpers sind davon betroffen. Diese pathogenen Eigenschaften von *Burkholderia cepacia* stehen auch einer breiten Verwendung des Organismus als Biopestizid im Weg.

*Burkholderia* Spezies verfügen zumeist über natürlich vorhandene Antibiotikaresistenzen, was ihre Gefährlichkeit erhöht. *Burkholderia mallei* und *Burkholderia pseudomallei* werden im Zusammenhang mit biologischen Waffen genannt (Deutschland, erster Weltkrieg; Japan, zweiter Weltkrieg).

Burkholderien wurden lange Zeit dem *Pseudomonas* Genus zugeordnet. Sie kommen ubiquitär vor und sind gramnegative, bewegliche, obligat aerobe, stäbchenförmige Bakterien.

*Burkholderia cepacia* (früher *Pseudomonas cepacia*) wurde erstmals 1949 von Walter Burkholder an der Cornell University, USA, als verantwortliche Spezies für die bakterielle Verrottung von Speisezwiebeln isoliert (Burkholder 1950). Das Bakterium ist in der Natur weit verbreitet, es behindert das Wachstum einiger Pilze, wie z.B. *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* und *Cylindrocarpum* (Holmes 2000). Das Bakterium erhöht dadurch den Ertrag einiger Pflanzen, wie z.B. Getreide oder Bohnen, und wird als Biopestizid eingesetzt. *Burkholderia cepacia* ist resistent gegen viele Antibiotika.

Die Fähigkeiten von *Burkholderia* Species, Xenobiotika verwerten zu können, sind beachtlich. So kann *Burkholderia cepacia* beispielsweise 3-Fluorbenzoat und 4-Fluorbenzoat produktiv verwerten (Schlömman 1990A). Trichlorethylen kann ebenfalls degradiert werden (Shields 1992) und *Burkholderia cepacia* AC 1100 besitzt die Fähigkeit, das Herbizid 2,3,5-Trichlorphenoxyessigsäure abzubauen (Danganan 1994; Chatterjee 1982). *Burkholderia cepacia* besitzt eine große Diversität in Anzahl und Größe seiner Chromosome. So wurden Stämme isoliert, die über bis zu fünf Chromosomen verfügen, deren Größe von 0,3 bis 5,3 Millionen Basenpaaren variiert. Insgesamt verfügt *Burkholderia cepacia* je nach Stamm zwischen 4,6 und 8,5 Millionen Basenpaaren. Leider verliert das Bakterium leicht eines oder

mehrere seiner Chromosome, so dass Abbauwege unterbrochen werden oder gar nicht mehr initiiert werden können (Lessie 1996).

Der Genus *Burkholderia fungorum* wurde erstmals 1986 von einem Forscherteam der General Electric Research von einer Deponie im Staat New York isoliert, und besitzt mit  $9,7 \cdot 10^6$  bp eines der größten prokaryotischen Genome. Diese Spezies ist in der Lage nicht nur Fluorbenzol, sondern auch ein breites Spektrum an polychlorierten Biphenylen (PCB) zu mineralisieren (Coenye 2001B und 2003, Gerrits 2005).

## **5.2. Substratpattern**

Bei der biologischen Reinigung von Stoffströmen ist es selten der Fall, dass nur ein einzelner Schadstoff enthalten ist. Zumeist liegt eine Mischung von verschiedenen Komponenten vor. Die Kenntnis, welche anderen Substanzen ein Bakterienstamm neben seinem Anreicherungssubstrat degradieren kann, ist im Hinblick auf dessen technischen Einsatz sehr hilfreich. Sind die abzubauenen Komponenten eines Stoffstroms bekannt, wird es möglich, Stämme zu empfehlen, die mehrere in einer Abluft enthaltene Substrate nutzen können.

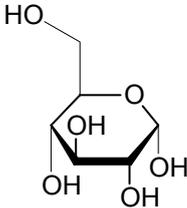
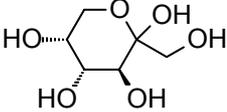
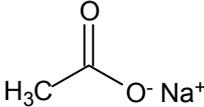
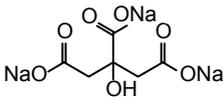
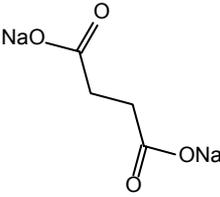
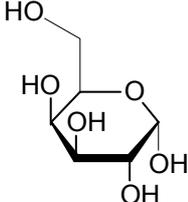
Alle Versuche (siehe Kapitel 4.4.3.) wurden in flüssigem Minimal Medium vorgenommen. Einzig die beiden getesteten Vollmedien, streng genommen keine Reinsubstrate, bilden hiervon eine Ausnahme.

FLU 100, obwohl über ein vergleichsweise enges Substratspektrum verfügend, weist einige außergewöhnliche Degradationsphänotypen auf. Als Ergebnis dieses Kapitels findet sich insbesondere, dass FLU 100 alle vier Monohalogenbenzole, Benzol und Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann.

### **5.2.1. Nicht aromatische Substrate**

Die von FLU 100 verwertbaren nichtaromatischen Substrate entsprechen weitgehend dem, was für Bodenbakterien zu erwarten ist. FLU 100 verwertet die Standardsubstrate wie Zucker, lineare Alkancarbonsäuren und Intermediate der Hauptstoffwechselwege wie beispielsweise Citrat (siehe Tabelle 19 und Anhang 7.3.3.). Diese Ergebnisse wurden mittels des in Kapitel 4.4.3.1 beschriebenen Verfahrens erhalten oder stammen aus dem BIOLOG GN – Test (siehe Kapitel 4.3.6.).

Tabelle 19: Substratpattern von FLU 100: Wichtige nichtaromatische Referenzsubstrate.

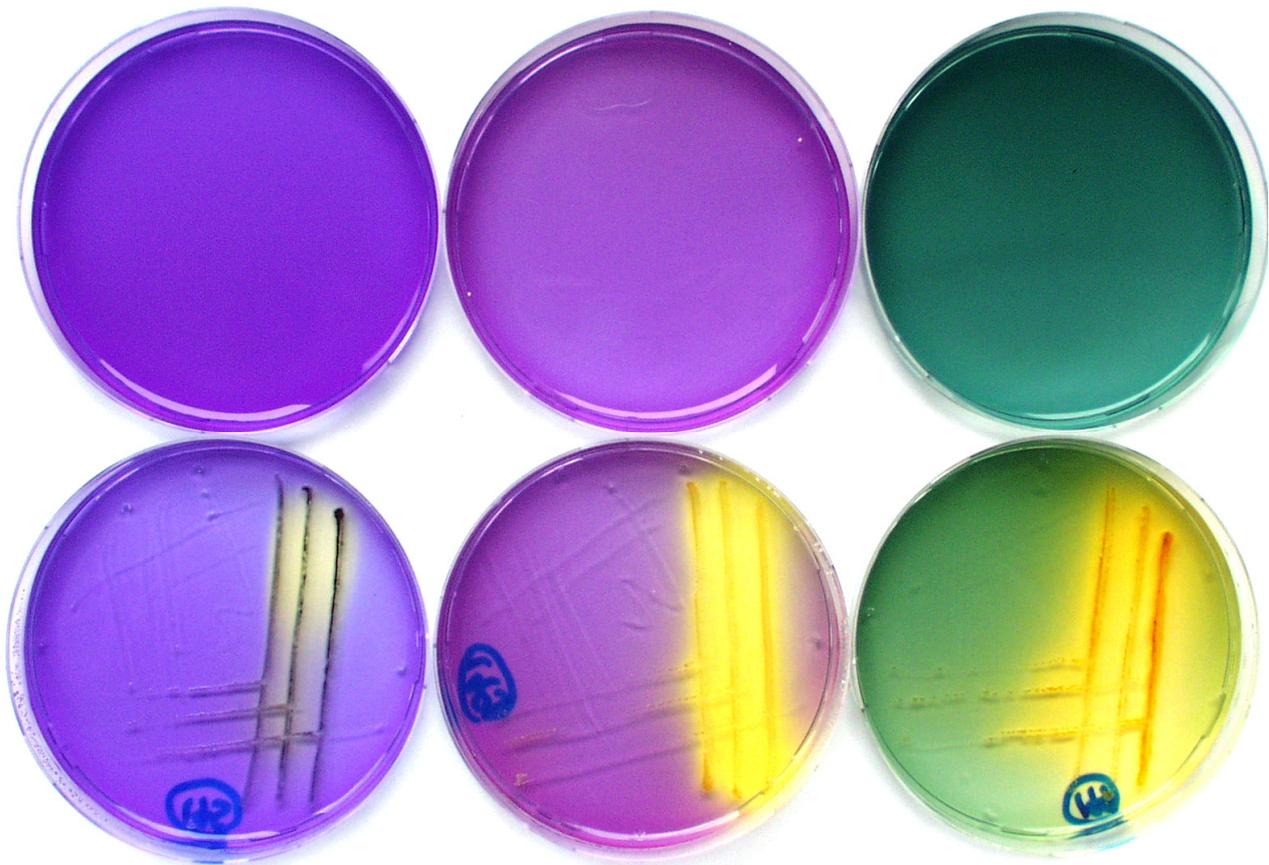
Substrat	Nutrient Broth	Luria Bertani	$\alpha$ -D-Glucose	D-Fructose
<b>Struktur</b>	Pepton Fleischextrakt Natriumchlorid	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid		
<b>Degradation</b>	+	+	+	+
<b>Bemerkung</b>	Vollmedium	Vollmedium	Standardsubstrat in der Mikrobiologie	Standardsubstrat in der Mikrobiologie
Substrat	Natriumacetat	Natriumcitrat	Natriumsuccinat	$\alpha$ -D-Galacose
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	+	+	+	+
<b>Bemerkung</b>	Salz der Essigsäure, Ac-CoA, ist ein zentraler Metabolit der Hauptstoffwechselwege.	Salz der Zitronensäure, Citrat, ist ein zentraler Metabolit des Zitronensäurezyklus	Zentraler Metabolit des Zitronensäurezyklus	Hexose, wird vor allem durch Enterobakterien abgebaut

### 5.2.2. Benzol und monosubstituierte Benzole

Die große Stärke von FLU 100 liegt in der Fähigkeit, monosubstituierte Benzole zu degradieren (siehe Tabelle 20). Monohalogenbenzole werden vollständig zu Kohlendioxyd, Wasser und dem entsprechendem Halogenwasserstoff degradiert. Ebenso baut FLU 100 Benzol vollständig ab. Bei dem Abbau von Toluol werden von den Zellen kleine Mengen von 3-Methylcatechol ausgeschleust. Dieses oligo- und polymerisiert bei den Standardbedingungen (pH 7,1) und verfärbt deshalb mit der Zeit das Medium zuerst grau, dann schwarz. Bei pH 5 ist das gebildete Catechol stabil und die Bakteriensuspension bleibt Reinweiß. Durch Erhöhung der Toluolkonzentration steigt auch die produzierte Menge von 3-Methylcatechol und damit auch seine Konzentration im Medium. Andere, mit Kohlenwasserstoffresten substituierten monosubstituierte Benzole wie Ethylbenzol, Styrol, Trifluormethylbenzol und Cumol werden von

FLU 100 nicht produktiv verwertet, es konnte kein Metabolit detektiert werden. Zum bakteriellen Trifluormethylbenzolabbau siehe Engesser 1982, zu Ethylbenzol siehe Gibson 1973, zum Cumolabbau siehe Eaton 1986.

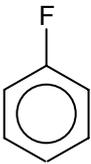
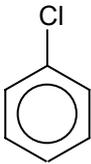
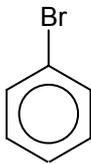
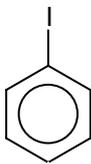
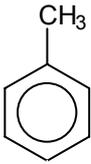
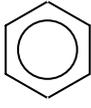
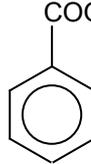
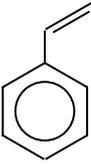
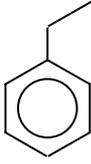
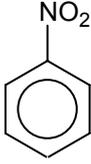
Natriumbenzoat konnte von FLU 100 anfangs als Wachstumssubstrat vollständig abgebaut werden. Nach vier Jahren hatte der Stamm diese Fähigkeit verloren, nunmehr verhält er sich gegenüber Benzoat inert. Nitrobenzol wird von FLU 100 nicht verwertet. Es findet auch keine Metabolitproduktion statt. Anilin kann als Substrat dienen, allerdings findet nur ein sehr langsames Wachstum statt.

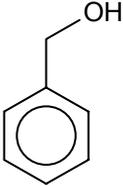
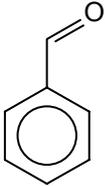
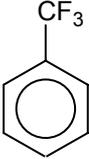
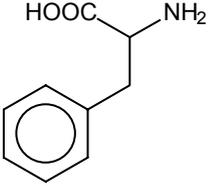


**Bild 59: Produktion von sauren Metaboliten durch den Stamm FLU 100**

Der Stamm FLU 100 produziert beim Wachstum auf Monohalogenbenzolen (hier: Fluorbenzol) Halogenwasserstoffe (hier: Fluorwasserstoff) als finale, saure Metabolite. Diese können durch in feste Minimalmedien eingewobene pH – Indikatoren aufgezeigt werden. Das Bild zeigt in der unteren Reihe drei verschiedene Indikatoren, von links nach rechts Bromphenolblau (Umschlagbereich blau nach gelb: pH 3,0 – 4,6), Bromkresolpurpur (Umschlagbereich violett nach gelb: pH 5,3 – 6,8) und Bromthymolblau (Umschlagbereich grün nach gelb: pH 6,0 – 7,6). FLU 100 wurde auf den Platten in der dreizehn - Strich – Technik ausplattiert und eine Woche in fluorbenzolhaltiger Atmosphäre im Dunklen inkubiert. Als Referenz werden in der oberen Reihe unbewachsene Medien dargestellt, die gleich behandelt wurden, wie die unten dargestellten.

Tabelle 20: Substratpattern von FLU 100: Benzol und monosubstituierte Aromaten.

Substrat	Fluorbenzol	Chlorbenzol	Brombenzol	Iodbenzol
Struktur				
Degradation	+	+	+	+
Bemerkung	Vollständiger Abbau, HF akkumuliert im Medium.	Vollständiger Abbau, HCl akkumuliert im Medium.	Vollständiger Abbau, HBr akkumuliert im Medium.	Vollständiger Abbau, HI akkumuliert im Medium.
Substrat	Toluol	Benzol	Natriumbenzoat	Cumol
Struktur				
Degradation	+	+	+/-	-
Bemerkung	Spuren von 3-Methylcatechol werden ausgeschieden.	Vollständiger Abbau.	Vollständiger Abbau/ Kein Umsatz (siehe Text).	Kein Umsatz.
Substrat	Styrol	Ethylbenzol	Nitrobenzol	Anilin
Struktur				
Degradation	-	-	-	+/-
Bemerkung	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Sehr langsames Wachstum.

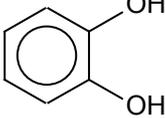
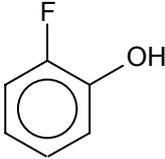
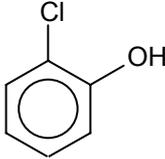
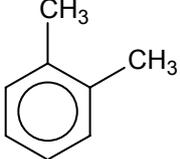
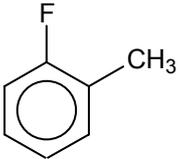
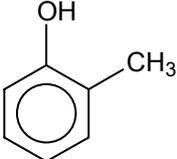
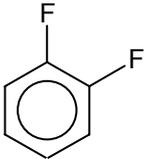
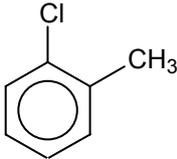
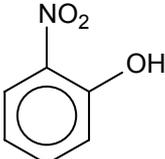
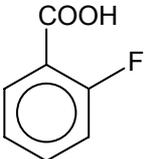
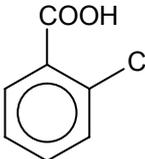
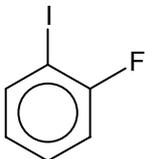
Substrat	Benzylalkohol	Benzylaldehyd	$\omega,\omega,\omega$ -Trifluor-methylbenzol	Phenylalanin
Struktur				
Degradation	-	-	-	-
Bemerkung	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.

### 5.2.3. Benzole, die an der 1,2 – Position substituiert sind

Die an der 1,2-Position substituierten Benzole werden von dem Stamm FLU 100 nur dann umgesetzt, wenn mindestens einer der Substituenten eine Hydroxylgruppe ist (siehe Tabelle 21). So wird Catechol, unter substratkonservierenden Bedingungen, sprich einem pH - Wert von unter 5.5, von FLU 100 vollständig umgesetzt. An der 2-Position halogenierte Phenole werden zwar angegriffen, es findet aber kein produktiver Umsatz statt, die Zellkonzentration von FLU 100 erhöht sich nicht in Gegenwart dieser Substrate. Dennoch wird nach sieben Tagen Inkubation in Gegenwart von 1 mmol / L 2-Halogenphenol eine kleine Menge Halogen als Halogenid freigesetzt, mit sinkender Halogenphenolkonzentration wird die Halogenidausbeute erhöht (siehe Kapitel 5.3.6.). Offensichtlich können diese Stoffe nicht als Wachstumssubstrat dienen. In 1,2-Position doppelhalogenierte Benzole werden von FLU 100 nicht angegriffen (in der Literatur wird ein Angriff in Orthoposition beschrieben: Haigler 1988 und 1992, Brunsbach 1990), ebenso in 2-Position halogenierte Benzoate und 2-Nitrophenol sowie das 2-Xylol. Einzig das 2-Fluortoluol wird zu einem bislang unbekanntem Metaboliten umgesetzt.

Insgesamt scheinen in 1,2-Position substituierte Benzole, mit Ausnahme der hydroxylierten Varianten durch FLU 100 nicht angreifbar. Das initiale Dioxygenasesystem kann diese Substrate nicht umsetzen.

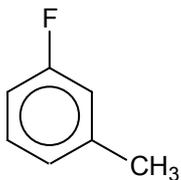
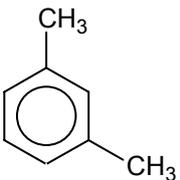
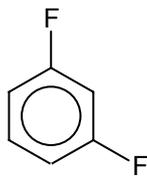
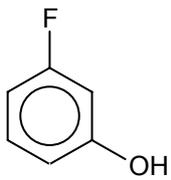
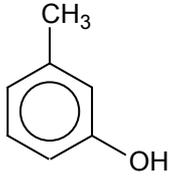
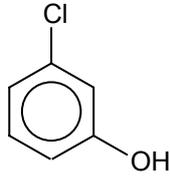
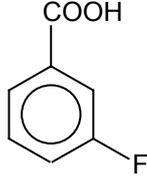
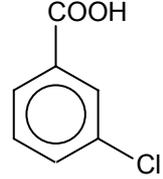
Tabelle 21: Substratpattern von FLU 100: 1,2 - Disubstituierte Benzole

Substrat	Catechol	2-Fluorphenol	2-Chlorphenol	2-Xylol
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	+	+/-	+/-	-
<b>Bemerkung</b>	Unsubstituiertes Catechol wird bei einem pH von unter 5,5 vollständig abgebaut.	Produktion eines schwarzen Metaboliten. 10 % Fluorid werden freigesetzt.	Produktion eines schwarzen Metaboliten. 13 % Chlorid werden freigesetzt.	Kein Umsatz.
Substrat	2-Fluortoluol	2-Kresol	1,2-Difluorbenzol	2-Chlortoluol
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	-	-	-	-
<b>Bemerkung</b>	Produktion eines unbekannteten Metaboliten, kein Wachstum.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.
Substrat	2-Nitrophenol	2-Fluorbenzoat	2-Chlorbenzoat	2-Fluoriodbenzol
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	-	-	-	-
<b>Bemerkung</b>	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.

### 5.2.4. Benzole, die an der 1,3 – Position substituiert sind

Die Befunde für die in 1,3–Position substituierten Benzole ähneln denen der in 1,2–Position substituierten Benzole (siehe Tabelle 22). Solche Dihalogenbenzole werden nicht umgesetzt. Ebenso 3-Xylol und in der 3–Position halogenierte Benzoate (zum Metabolismus halogener Benzoate siehe Hartmann 1979). Das 3-Fluortoluol wird zwar angegriffen, kann aber nicht weiter umgesetzt werden. FLU 100 kann auf diesem Substrat nicht wachsen. Interessanterweise werden die 3-Halogenphenole produktiv umgesetzt. Zellwachstum ist zu beobachten und äquimolare Mengen an Halogenidionen werden freigesetzt (mehr zu diesem Phänomen siehe Kapitel 5.3.8.). Zum Abbau von 1,3-Dichlorbenzol siehe de Bont 1986.

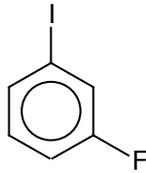
**Tabelle 22: Substratpattern von FLU 100: 1,3 - Disubstituierte Benzole**

Substrat	3-Fluortoluol	3-Xylol	1,3-Difluorbenzol	3-Fluorphenol
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	-	-	-	+
<b>Bemerkung</b>	Kein Zellwachstum. Metabolite erscheinen, davon mindestens ein Catechol	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.	Spuren von 4-Fluorcatechol werden ausgeschieden
Substrat	3-Kresol	3-Chlorphenol	3-Fluorbenzoat	3-Chlorbenzoat
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	+	+	-	-
<b>Bemerkung</b>	Wird produktiv umgesetzt. Allerdings ist das Substrat sehr toxisch	Spuren von 4-Chlorcatechol werden ausgeschieden	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.

---

**Substrat**      **3-Fluoriodbenzol**


---

**Struktur****Degradation**

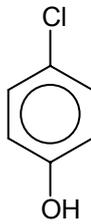
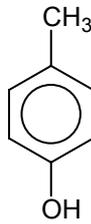
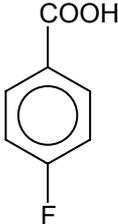
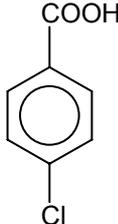
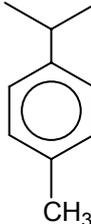
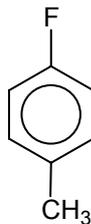
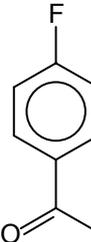
-

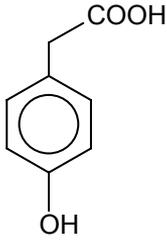
**Bemerkung**    Kein Umsatz.

### 5.2.5. Benzole, die an der 1,4 – Position substituiert sind

Die Experimente zu dieser Substratgruppe lieferten faszinierende Ergebnisse (siehe Tabelle 23). Anders als die in 1,2-Position und in 1,3-Position substituierten Benzole kann das initiale Dioxygenasesystem des Stammes FLU 100 in 1,4-Position substituierte Benzole erfolgreich angreifen und in die abgeleiteten Diendiole überführen. Diese werden anschließend zu den entsprechenden 3,6 - substituierten Catecholen dehydrogeniert. Bei vielen Substraten versagt die Cycloisomerase, die Catechole bleiben als Dead – end - Metabolite liegen. Beobachtbar ist dies bei 4-Fluortoluol, 1,4-Difluorbenzol, 4-Fluoriodbenzol, 4-Fluorbrombenzol und 4-Fluoracetophenon. 1,4-Dichlorbenzol wird angegriffen, allerdings nicht produktiv verwertet (zum Abbau von 1,4-Dichlorbenzol siehe Spain 1987, Schraa 1986, Oltmanns 1988, Spiess 1995, Sommer 1997). Hierbei entstehen mindestens drei hydrophile Metabolite (zum bakteriellen Metabolismus von halogenierten Acteopenonen siehe Havel 1993). 4-Halogenphenole werden produktiv, also unter Zellvermehrung verwertet (zum bakteriellen Abbau von Chlorphenolen siehe Knackmuss 1978, Janke 1979). Allerdings führt die Versorgung von FLU 100 mit solchen Substraten zur massiven Akkumulation der korrespondierenden 4-Halogencatecholen im Medium. Diese Substrate werden daher am besten in saurem Milieu (pH < 5,5) abgebaut. Nicht angegriffen werden 4-Kresol, vermutlich wegen seiner Toxizität, 4-Fluorbenzoat und 4-Chlorbenzoat (zum Bakteriellen Abbau von 4-Chlorbenzoesäure siehe Karasevich 1984). Sperrige Metaboliten wie das mit einem Phenylrest in 4-Position substituierte 4-Phenylfluorbenzol oder der Isopropylrest im 4-Cymol verhindern den Angriff der initialen Dioxygenase von FLU 100. In diesem Fall wird kein Metabolit gebildet. Zum Abbau von 4-Cymol siehe de Smet 1989. Zu initialen Dioxygenasesystemen, die 1,4-Fluoroaromaten angreifen siehe Koerts 1997.

Tabelle 23: Substratpattern von FLU 100: 1,4 - Disubstituierte Benzole

Substrat	4-Fluortoluol	4-Fluorphenol	4-Chlorphenol	4-Kresol
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	-	+	+	-
<b>Bemerkung</b>	Beim Umsatz 4-Fluor-6-methylcatechol und weitere Metabolite freigesetzt.	Beim Umsatz wird 4-Fluorcatechol freigesetzt.	Beim Umsatz wird 4-Chlorcatechol freigesetzt.	Kein Umsatz
Substrat	4-Fluorbenzoat	4-Chlorbenzoat	4-Cymol	4-Kresol
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	-	-	-	-
<b>Bemerkung</b>	Kein Umsatz	Kein Umsatz	Kein Umsatz	Kein Umsatz
Substrat	4-Phenyl-Fluorbenzol	1,4-Difluorbenzol	4-Fluoriodbenzol	4-Fluoracetophenon
<b>Struktur</b>				
<b>Degradation</b>	-	-	-	-
<b>Bemerkung</b>	Kein Umsatz.	Beim Umsatz wird 3,6-Difluorcatechol freigesetzt	Beim Umsatz wird 3-Iod-6-Fluorcatechol freigesetzt.	Beim Umsatz wird ein unbekanntes Catechol freigesetzt.

Substrat	1,4-Dichlorbenzol	4-Fluorbrombenzol	4-Hydroxyphenyllessigsäure
Struktur			
Degradation	-	-	-
Bemerkung	Mehrere chlorierte Metabolite werden gebildet.	3-Brom-6-Fluorcatechol wird freigesetzt.	Kein Umsatz.

### 5.2.6. Höher substituierte Benzole und mögliche Metabolite des Monohalogenaromatenabbaus

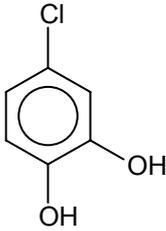
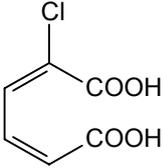
Bei dieser heterogenen Gruppe von Substraten dominieren die mutmaßlichen Metabolite der Monohalogenaromatenabbauwege von FLU 100 (siehe Tabelle 24). Es war unbekannt, ob diese Metabolite auch den entsprechenden Abbauweg induzieren. Daher wurde zur Ermittlung deren Abbaubarkeit das in Kapitel 4.4.3.2. beschriebene Verfahren verwendet. Von einigen der in Tabelle 24 aufgeführten Substanzen wurde auch die Abbaubarkeit nach dem in Kapitel 4.4.3.1 beschriebenen Verfahren ermittelt.

Der Stamm FLU 100 degradiert 3- und 4- halogensubstituierte Catechole vollständig (siehe auch Kapitel 5.3.8, zum 4-Chlorcatechol siehe Nikodem 2003). Dabei erscheinen temporär Metabolite im Medium, welche aber nach einiger Zeit wieder verschwinden. Das Halogenatom wird nahezu äquimolar als Halogenid ins Medium ausgeschieden. 3-Fluordiendiol wird ebenso wie die 2-Fluormuconsäure von FLU 100 vollständig abgebaut. Unsubstituiertes Muconolacton und Dienlacton werden ebenfalls vollständig umgesetzt.

FLU 100 überführt 2,5-Difluorphenol in 3,6-Difluorcatechol. Dieses wird nicht weiter umgesetzt, es werden keine Fluoridanionen freigesetzt. Von den getesteten halogenierten Acetaten wird nur 2-Iodacetat umgesetzt. Erwartungsgemäß wirkt 2-Fluoracetat sehr toxisch auf FLU 100.

Tabelle 24: Substratpattern von FLU 100: Höher substituierte Benzole sowie mutmaßliche Metabolite der Aromatenabbauwege

Substrat	2,5-Difluorphenol	3-Fluorcatechol	4-Fluorcatechol	2-Fluormuconat
Struktur				
Degradation	-	+	+	+
Bemerkung	Wird zum 3,6-Difluorcatechol umgesetzt.	2-Fluormuconat erscheint intermediär. Details siehe Kapitel 5.3.8.	Metabolite erscheinen intermediär. Details siehe Kapitel 5.3.8.	Vollständiger Abbau.
Substrat	Muconolacton	<i>cis,cis</i> -Dienlacton	4-Methylmuconolacton	$\omega$ -Fluoracetat
Struktur				
Degradation	+	+	-	-
Bemerkung	Vollständiger Abbau.	Vollständiger Abbau.	Kein Umsatz.	Kein Umsatz.
Substrat	$\omega$ -Chloracetat	$\omega$ -Iodacetat	3-Fluorocyclohexadiendiol	3-Chlorcatechol
Struktur				
Degradation	-	+	+	+
Bemerkung	Kein Umsatz.	Vollständiger Abbau.	Vollständiger Abbau.	Vollständiger Abbau.

Substrat	4-Chlorcatechol	2-Chlormuconat
Struktur		
Degradation	+	+
Bemerkung	Vollständiger Abbau. Metabolite erscheinen intermediär.	Vollständiger Abbau, jedoch langsam

### 5.3. Wachstumskinetiken und Umsatzversuche

Die Kenntnis von Wachstumskinetiken, Zellertrag und Umsatzraten eines Bakterienstammes auf verschiedenen Substraten stellen grundlegende mikrobiologische Parameter dar. Die Wachstumsrate gibt den Zellzuwachs, photometrisch bestimmt und als optische Dichte angegeben, in Bezug zu einem Zeitintervall ( $t_1$  und  $t_2$ ) gesetzt (siehe Gleichung 24) wieder. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Wachstumsraten wurden stets von Messwerten aus der exponentiellen Wachstumsphase der entsprechenden Bakteriensuspension bestimmt. Sämtliche Wachstumsversuche wurden bei 30 °C durchgeführt.

Gleichung 24:

$$\mu = \frac{\ln(OD_{546}^{t_2}) - \ln(OD_{546}^{t_1})}{\Delta t}$$

Die gemessenen optischen Dichten werden gegen die Zeit aufgetragen. Es zeigt sich der typische, exponentiell ansteigende Kurvenverlauf. Durch Logarithmieren der Ordinate des Diagramms wird der Kurvenverlauf linearisiert. Nur Wachstumskurven, die hier eine hinreichende Linearität aufweisen, können zur Ableitung der verschiedenen Parameter verwendet werden. Mittels einer mit der Software Microsoft Excel durchgeführten exponentielle Regression kann die Wachstumsrate abgelesen werden.

Gleichung 25:

$$OD_{546}(t) = c \cdot e^{\mu t}$$

Die Generationszeit  $g$  lässt sich nach Gleichung 26 ableiten:

Gleichung 26: 
$$g = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Der Zellausbeutekoeffizient ist ein Maß für die Ausbeute, die ein Stamm von der Masse des umgesetzten Substrates in Zellmasse umsetzen kann. Er ist von vielen Parametern abhängig. Der Zellausbeutekoeffizient wird von der Generationszeit beeinflusst. Je länger diese ist, umso mehr Energie müssen die Zellen für ihren Erhaltungsstoffwechsel aufwenden. Die durchschnittliche Oxidationszahl der Kohlenstoffatome im Substratgerüst gibt Auskunft über die erreichbare Energieausbeute im aeroben katabolen Stoffwechsel. Je geringer die Oxidationszahl ist, umso höher ist der zu erwartende Zellausbeutekoeffizient. Heteroatome wie Halogene, die im katabolen Stoffwechsel keinen Beitrag zu Konservierung von Energie liefern, vermindern den Zellausbeutekoeffizienten. Dies ist vor allem bei den Monohalogenaromaten zu beobachten. Von Fluorbenzol bis Iodbenzol sinkt die Substratausbeute ab. Für den Betrieb von Anlagen zur biologischen Abluftreinigung ist es wünschenswert, dass von den Mikroorganismen möglichst viel Substrat umgesetzt wird und dabei möglichst wenig Zellmasse produziert wird.

**Tabelle 25: Masseanteil der Halogene in den Monohalogenaromaten**

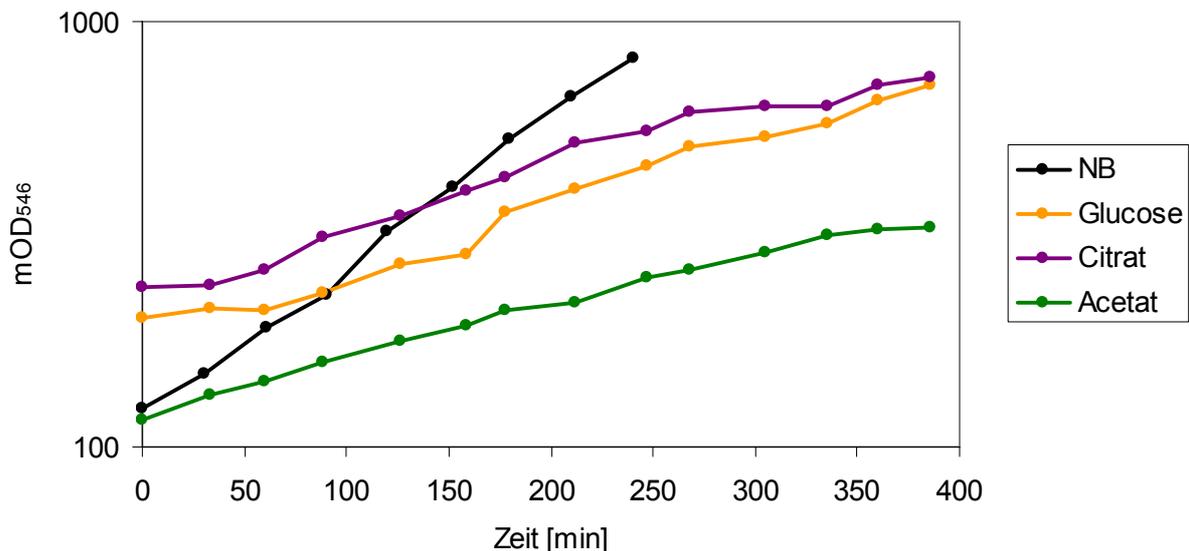
Halogenbenzol	Atommasse [g/mol]	Halogenanteil [%]
Fluorbenzol	96,11	19,8
Chlorbenzol	112,56	30,6
Brombenzol	157,02	50,9
Iodbenzol	204,01	62,2
Astatbenzol	287,10	73,1

### 5.3.1. Das Wachstum von FLU 100 auf Standardsubstraten der klassischen Mikrobiologie

Um die metabolische Leistungsfähigkeit eines Stammes einschätzen zu können, werden zunächst Wachstumskurven auf Vollmedien vorgenommen. Hier müssen die Bakterienzellen weniger anabole Synthesearbeit leisten als beim Umsatz eines Reinstoffes wie beispielsweise Glucose. Wichtige Biomonomere wie Aminosäuren, Nucleinsäurebausteine, Cofaktoren und Zucker liegen bereits im Medium vor. Folglich stellte sich die Wachstumsrate von FLU 100 auf dem Vollmedium Nutrient Broth größer dar als bei allen getesteten Reinstoffen (siehe

Tabelle 26:). Des Weiteren wurden verschiedene Standardsubstrate getestet. Die Salze der Zitronensäure, der Essigsäure und Glucose sind Substrate, die von einer Vielzahl von Bakterienstämmen umgesetzt werden können. Beim Umsatz dieser Substrate muss der Stamm keine speziellen Abbaewege induzieren. In den vielen aeroben Bakterien liegen die Enzyme des Glucoseabbaus, der Glycolyse konstitutionell vor. Citrat und Acetat können direkt in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden. Der Stamm FLU 100 wächst auf allen drei Substraten mit ähnlicher Geschwindigkeit, jedoch zweieinhalb bis drei Mal langsamer als in Nutrient Broth. In Bild 60 sind exemplarische Wachstumskurven dargestellt.

Die Substratausbeutekoeffizienten beim Wachstum von FLU 100 auf Nutrient Broth sind am größten (0,50; siehe Tabelle 26), was zu erwarten war. Beim Wachstum auf Glucose ist dieser geringer (0,40), hier muss der Stamm Energie aufwenden, um Aminosäuren, Nucleinsäurebestandteile etc. zu synthetisieren.



**Bild 60: Wachstumskurven von FLU 100 bei 30°C im Batchversuch**

Alle Substrate wurden in Anfangskonzentrationen von 3 mmol / L eingesetzt, Nutrient Broth (NB) in der vom Hersteller angegebenen Nennkonzentration (8 g / L). Die Vorkulturen wurden auf den entsprechenden Substraten angezogen. Auf Nutrient Broth weist FLU 100 die größte Wachstumsrate auf, denn in diesem Medium sind wichtige Biomonomere, wie Aminosäuren, enthalten. Die Zellen müssen diese nicht selbst synthetisieren.

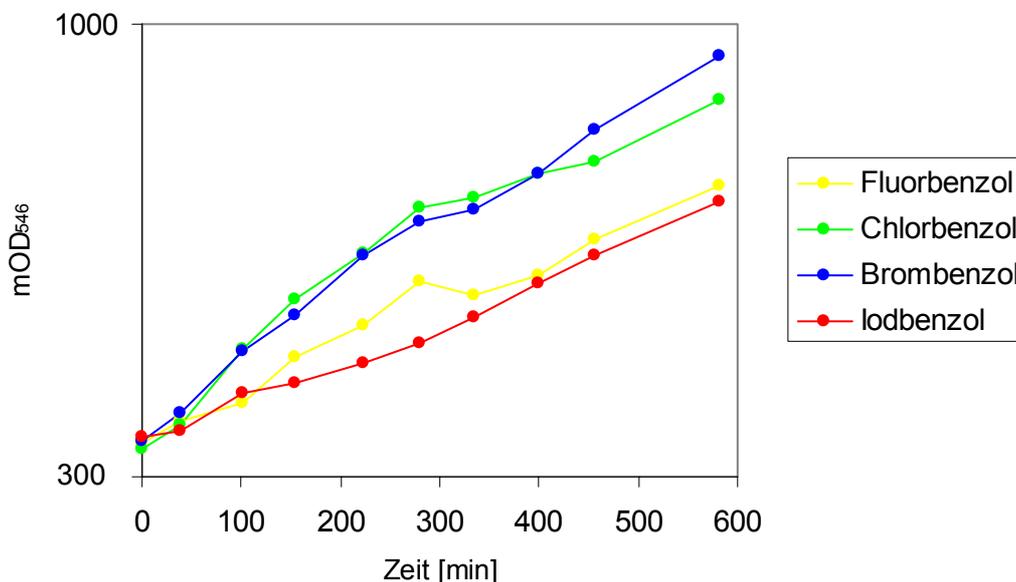
### 5.3.2. Der Umsatz von benzoiden Substraten

Der Stamm FLU 100 setzt alle vier Monohalogenbenzole um. Die Bestimmung der Wachstumsraten erwies sich als schwierig. Mit der Standardmethode, also dem im Medium vorgelegten Substrat und der zyklischen Entnahme von Proben durch Öffnen des Kulturkolbens, konnte keine brauchbare Wachstumskurve aufgestellt werden. Die

Monohalogenbenzole liegen in zu hoher Konzentration im Gasraum vor. Durch das Öffnen der Kolben entweicht zuviel davon und die Konzentrationen sinken zu stark ab. Auch durch periodisches Nachfüttern von Monohalogenbenzolen konnte dieses Problem nicht gelöst werden. Erst als die Kolben mit Septen versehen wurden und die Probenentnahme mittels einer Spritze mit Injektionsnadel erfolgte, konnten auswertbare Wachstumskurven erhalten werden (siehe Bild 61). Alle Experimente wurden mit einer Konzentration von 200 mg Substrat (Fluorbenzol) oder 300 mg Substrat (andere Monohalogenbenzole) pro Liter durchgeführt. Diese Konzentrationen lagen hinreichend hoch (siehe Kapitel 5.3.3.), um zu gewährleisten, dass die abgeleiteten Wachstumsraten im Bereich der maximalen Wachstumsraten lagen.

Erstaunlicherweise zeigt sich, dass nicht das Anreicherungssubstrat von FLU 100, Fluorbenzol, sondern Brombenzol diesen am schnellsten wachsen lässt (siehe Tabelle 26, Bild 62). Etwas langsamer wächst der Stamm auf Chlorbenzol. Die Wachstumsraten auf Fluorbenzol und Iodbenzol sind fast identisch, jedoch nur etwa halb so hoch wie bei den beiden anderen Monohalogenbenzolen. Auch die zum Vergleich bestimmte Wachstumsrate von Benzol liegt im Bereich der des Fluorbenzols.

Die Substratausbeutekoeffizienten entsprechen den Erwartungen. So erreicht FLU 100 beim Wachstum auf Fluorbenzol nur 40 % der Zellausbeute des Wachstums auf Nutrient Broth. Bei den schwereren Monohalogenbenzolen sinkt diese erwartungsgemäß aufgrund des steigenden relativen Anteils der Halogene an der Masse der Substrate (siehe Tabelle 26) weiter ab.

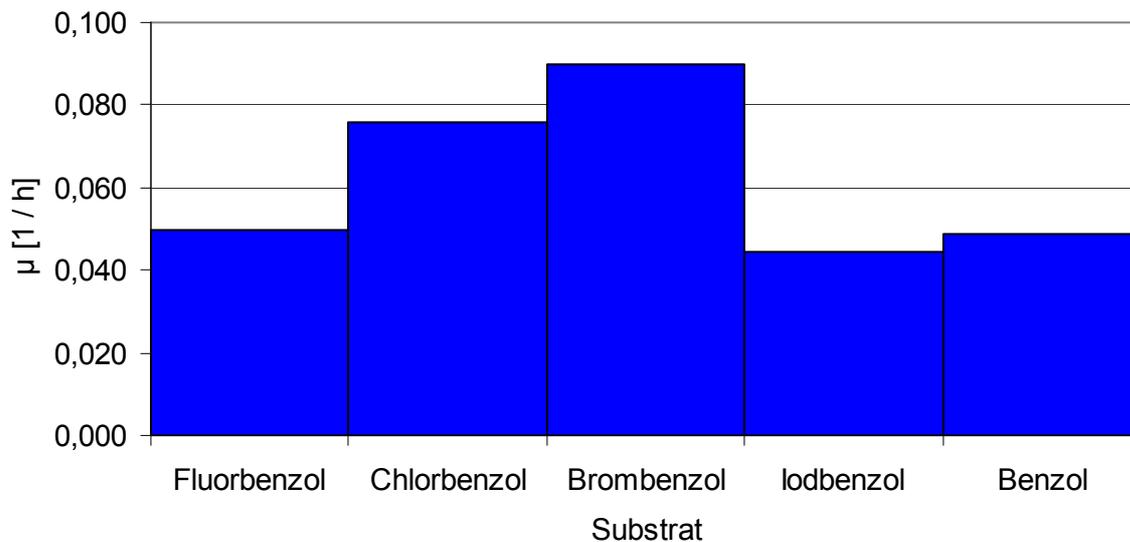


**Bild 61: Exemplarische Wachstumskurven von FLU 100 auf den Monohalogenbenzolen**

Alle Ansätze hatten nahezu die gleiche Start- $OD_{546}$ , die Vorkulturen waren auf den entsprechenden Substraten angezogen. Anhand der Steigungen der Graphen lassen sich die Wachstumsgeschwindigkeiten abschätzen, vergleiche Tabelle 26.

**Tabelle 26: Wachstumsparameter und Zellausbeutekoeffizienten von FLU 100 beim Umsatz verschiedener Substrate**

Substrat	Wachstumsrate $\mu$ [1 / h]	Generationszeit g [h]	Zellausbeute $Y_{x/s}$ [g / g]
Fluorbenzol	0,047	14,6	0,20
Chlorbenzol	0,075	9,2	0,15
Brombenzol	0,087	8,0	
Iodbenzol	0,038	18,2	0,08
Toluol	0,074	9,3	
Benzol	0,049	14,2	
Glukose	0,196	3,5	0,40
Citrat	0,177	3,9	
Acetat	0,162	4,3	
Nutrient Broth	0,475	1,5	0,50



**Bild 62: Auftragung der maximalen Wachstumsrate von FLU 100 auf den Monohalogenbenzolen und Benzol**

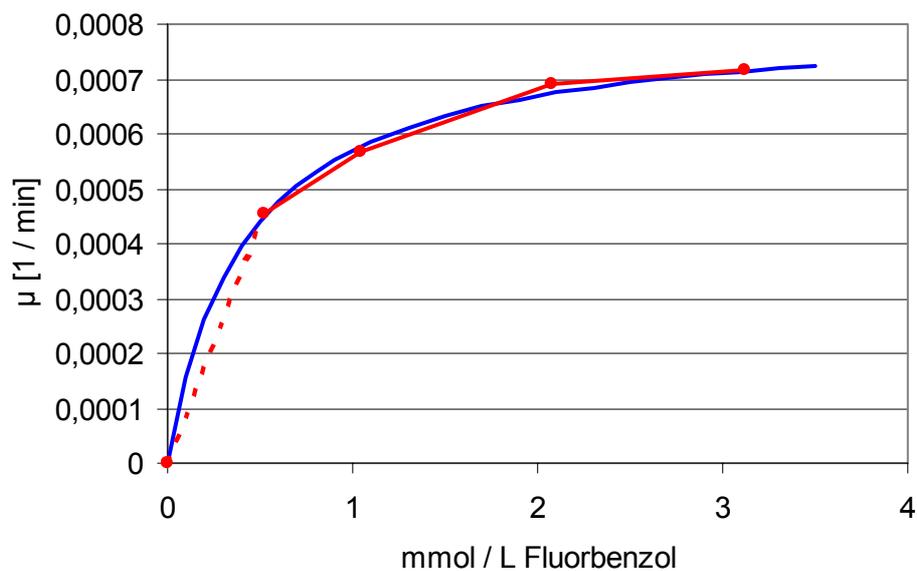
### 5.3.3. Ableitung der Monod - Kinetik von FLU 100 beim Wachstum auf Fluorbenzol

Die Wachstumsrate des Stammes FLU 100 auf Fluorbenzol wurde bei verschiedenen Startkonzentrationen aufgenommen. Diese können zur Ableitung einer Monod – Kinetik herangezogen werden. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse bei Konzentrationen an Fluorbenzol unter 50 mg / L (520 μmol / L) nicht stabil waren. Die Substratkonzentration sinkt

dann zu schnell, so dass keine exponentielle Regression der Messergebnisse bzw. der Wachstumskurve zu diesen Substratkonzentrationen durchgeführt werden kann.

Die maximale Wachstumsrate von FLU 100 lässt sich mit  $\mu_{\max} = 0,0081 \text{ min}^{-1}$ , die Monodkonstante mit  $K_M = 420 \text{ } \mu\text{mol / L}$  Fluorbenzol abschätzen. Gleichung 27 zeigt die Monod - Kinetik, angewandt auf das Wachstum von FLU 100 auf Fluorbenzol bei  $30 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Gleichung 27: 
$$\mu_{FLU,FB} = 0,0081 \cdot \frac{c_{FB}}{420 + c_{FB}} \text{ [min}^{-1}\text{]}$$



**Bild 63: Auftragung der Wachstumsraten von FLU 100 beim Wachstum auf Fluorbenzol**

Die gemessenen Werte sind rot dargestellt, die Approximation ist als blaue Kurve im Diagramm enthalten.

#### 5.3.4. Fluorbenzolumsatzrate

Aus den Wachstumskurven von FLU 100 auf Fluorbenzol, bei denen die Fluorbenzolkonzentration mitbestimmt wurde (siehe Kapitel 3.5.5. und 3.5.6.), lässt sich die maximale Umsatzrate dieses Substrats bestimmen (siehe Tabelle 27). Dabei wurden die Standardbedingungen eingesetzt.

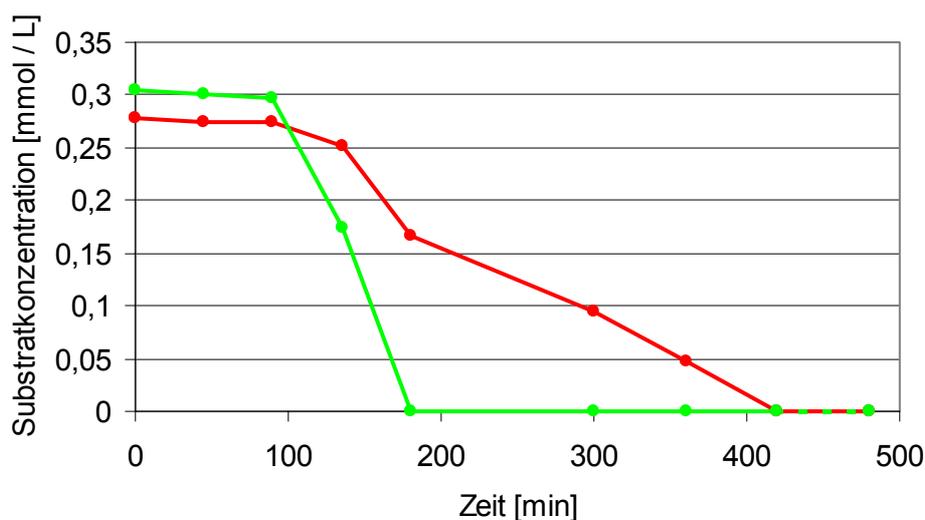
**Tabelle 27: Maximale Umsatzrate an Fluorbenzol durch den Stamm FLU 100 in Flüssigkultur**

(Minimalmedium, Schikanenkolben, Schüttlerfrequenz: 100 rpm, bei 30 °C im Dunklen)

Substrat	maximale Umsatzrate	
	mg / (OD <sub>546</sub> · L · h)	μmol / (OD <sub>546</sub> · L · h)
Fluorbenzol	63,4	660

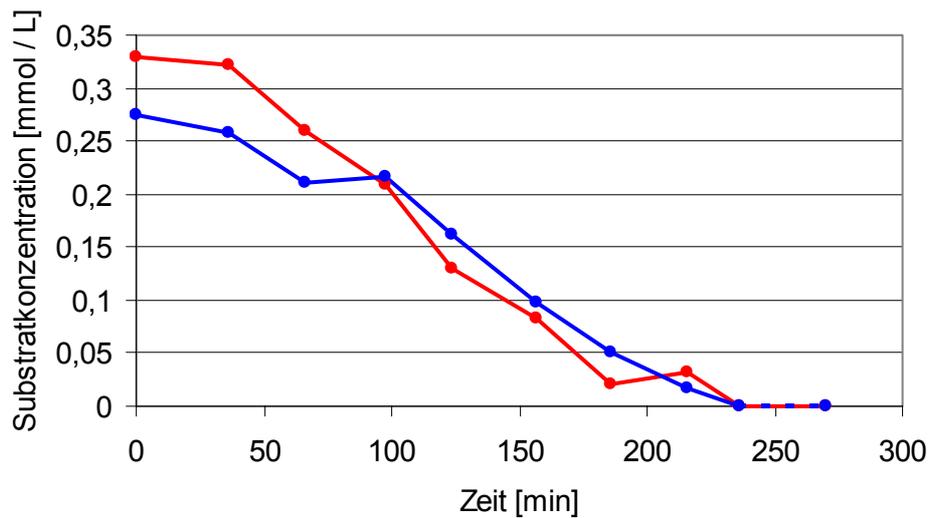
### 5.3.5. Der Metabolismus von Substratmischungen

Der Stamm FLU 100 baut alle vier Monohalogenbenzole, Benzol und Toluol in Mischungen simultan ab. Substratwechsel führen nicht zum Auftreten einer lag – Phase. Dieser Befund wurde in zahlreichen Experimenten bestätigt, Beispiele sind in Bild 64 bis Bild 68 dargestellt. Dabei ist es unerheblich, ob die Vorkultur in der stationären oder in der exponentiellen Wachstumsphase auf Fluorbenzol gewonnen wurde.



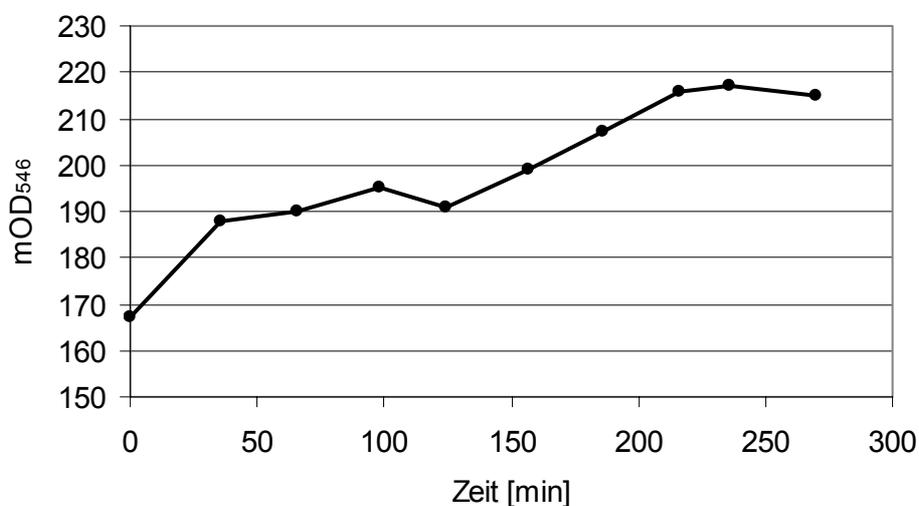
**Bild 64: Wachstum von uninduzierten Zellen von FLU 100 auf einem nahezu äquimolaren Gemisch aus Fluorbenzol (rot) und Chlorbenzol (grün)**

Dargestellt sind die Konzentrationen dieser Substrate gegen die Zeit aufgetragen. Die Vorkultur war auf dem Substratgemisch angezogen. Zu sehen ist eine mindestens 100 minütige lag – Phase. Dann beginnt die exponentielle Wachstumsphase des Stammes. Beide Substrate werden gleichzeitig degradiert, wobei allerdings das Chlorbenzol mindestens vier mal schneller abgebaut wird als das Fluorbenzol. Nach 420 Minuten war auch dieses vollständig verschwunden.

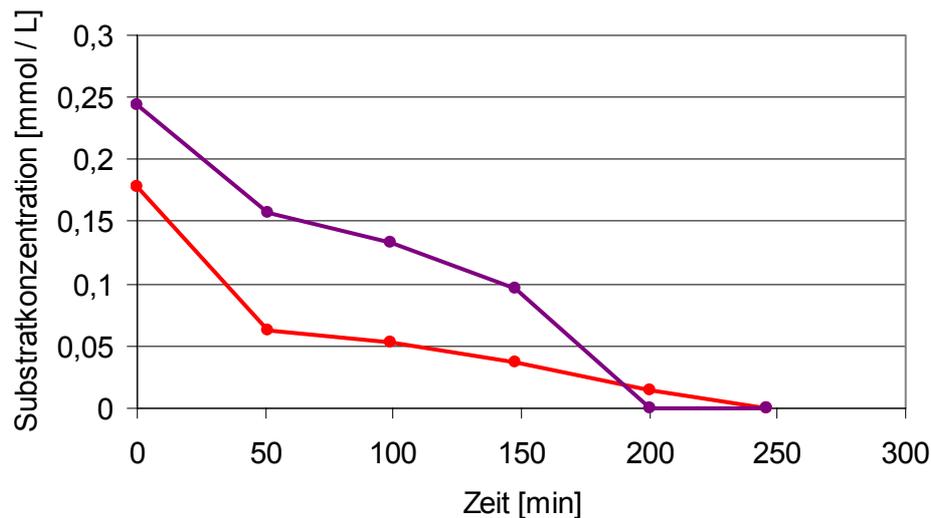


**Bild 65: Gleichzeitige Degradation von Fluorbenzol (rot) und Iodbenzol (blau) durch den Stamm FLU 100, aufgetragen sind die Substratkonzentrationen gegen die Zeit**

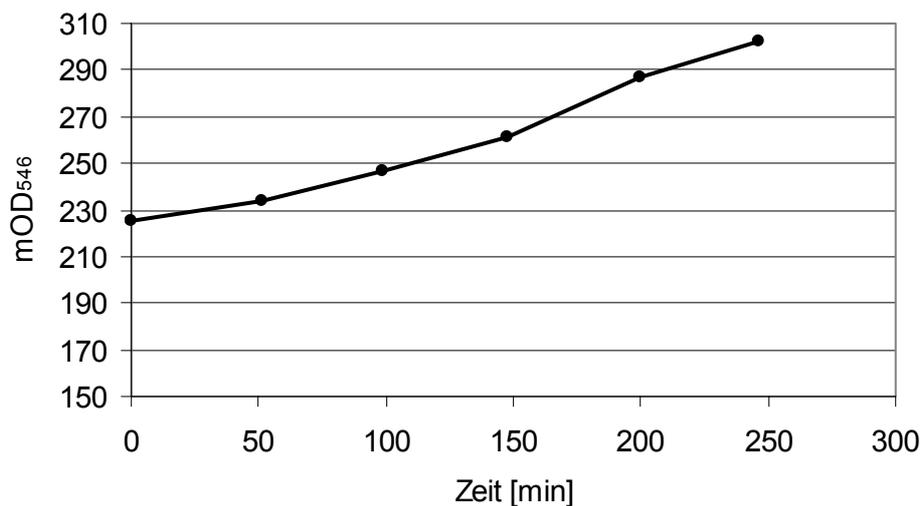
Aufgrund der ähnlichen Wachstumsraten des Stammes auf beiden Substraten, findet der Abbau simultan und mit nahezu gleicher Rate statt. Die Vorkultur war auf Fluorbenzol induziert (im Gegensatz zur derjenigen des Versuches in Bild 64), daher findet ein sofortiger Abbau und ein sofortiges Wachstum der Kultur, siehe Bild 66, statt.



**Bild 66: Gang der optischen Dichte des in Bild 65 dargestellten Ansatzes.**



**Bild 67: Simultane Degradation von Fluorbenzol (rot) und Toluol (violett) durch den Stamm FLU 100. Die Zellen wurden in einer Vorkultur auf Fluorbenzol induziert**



**Bild 68: Gang der optischen Dichte des in Bild 67 dargestellten Experiments**

Das Wachstum findet ohne lag - Phase statt.

Offensichtlich macht der Stamm FLU 100 keinen induktionstechnischen Unterschied zwischen den Substraten. Entweder werden die sechs genannten Substrate über denselben Abbauweg degradiert, oder es werden von einem wahlfreien Substrat mehrere Abbauwege induziert.

Diese Eigenschaft prädestiniert den Stamm für den Einsatz in biologischen Abluftreinigungsanlagen. Denn hier können kurzfristige Änderungen der Zusammensetzung auftreten. Auch kann der Stamm FLU 100 die eigentlich als inkompatibel geltenden Substrate Chlorbenzol und Toluol simultan abbauen. Zu weiteren Stämme, die diese Substrate simultan verwerten können, siehe Taegert 1988, Keuning 1994, Mars 1997, Kaschabek 1998 und Garcia-Valdés 2003

### 5.3.6. Halogenidbilanzen beim Monohalogenbenzolabbau

Der wichtigste Indikator für den vollständigen Abbau der Monohalogenbenzole durch den Stamm FLU 100 ist die Menge der freigesetzten Halogenidanionen. Bei einem vollständigen Abbau dieser Substrate ist eine äquimolare, stöchiometrisch freigesetzte Menge an Halogenidionen im Medium zu erwarten. Solche Messungen wurden in zahlreichen Experimenten überprüft. Einzig die Bestimmung der Iodidkonzentration war erschwert. Für eine präzise Messung wäre ein anderes Fließmittel, Natronlauge, statt der Carbonat / Bicarbonatmischung, für die Ionenchromatographieanlage nötig gewesen, welches allerdings den Ablauf vieler anderer Arbeiten an dieser Apparatur unzumutbar gestört hätte.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 dargestellt. Man erkennt, dass die Halogenidausbeute beim Abbau von Monohalogenbenzolen durch FLU 100 beim Fluorbenzol maximal, nahezu 100 % ist. Für Chlor- und Brombenzol werden ähnlich Werte gefunden, allerdings einen kleinen Prozentsatz geringer. Wegen der oben genannten Schwierigkeit muss der Wert für den Abbau von Iodbenzol als vorläufig angesehen werden.

**Tabelle 28: Halogenidbilanzen von FLU 100 beim Wachstum auf halogenhaltigen Substraten.**

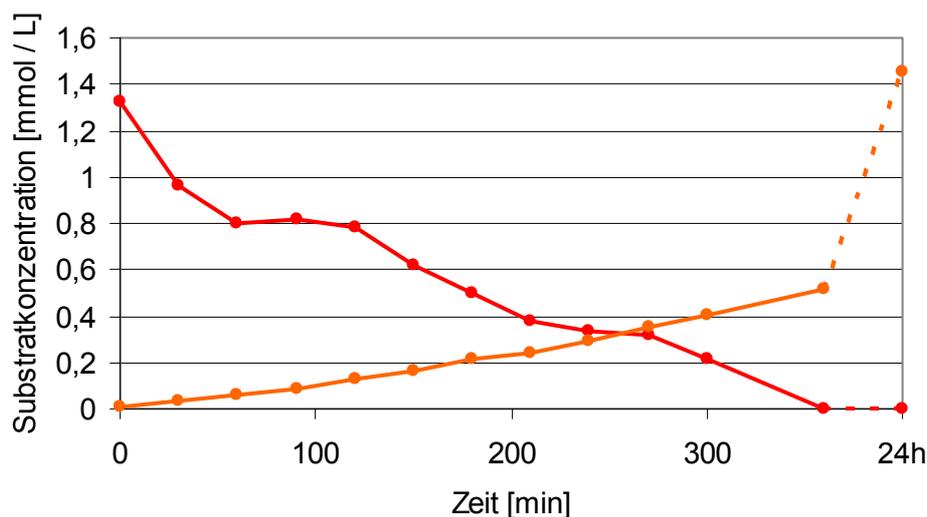
Die Ausbeute wurde nach sieben Tagen Inkubation bestimmt. Die Substratkonzentration lag bei allen Experimenten bei 1 mmol / L.

Substrat	Halogenidausbeute
Fluorbenzol	98,8 % +/- 0,2%
Chlorbenzol	96,0 % +/- 0,3%
Brombenzol	96,4 % +/- 0,3%
Iodbenzol	> 80 %
2-Fluorphenol	9 %
3-Fluorphenol	98 %
4-Fluorphenol	82 %
2-Chlorphenol	13 %
3-Chlorphenol	53 %
4-Chlorphenol	33 %
1,4-Difluorbenzol	0 %
2,5-Difluorphenol	0 %
4-Iodfluorbenzol	0 %

Von den Fluor- und Chlorphenolen wird bei der Degradation durch den Stamm FLU 100 einzig aus dem 3-Fluorphenol eine fast stöchiometrische Menge an Fluorid freigesetzt. Aus 4-Fluorphenol wird immerhin noch über vier Fünftel des im Substrat enthaltenen Halogenides

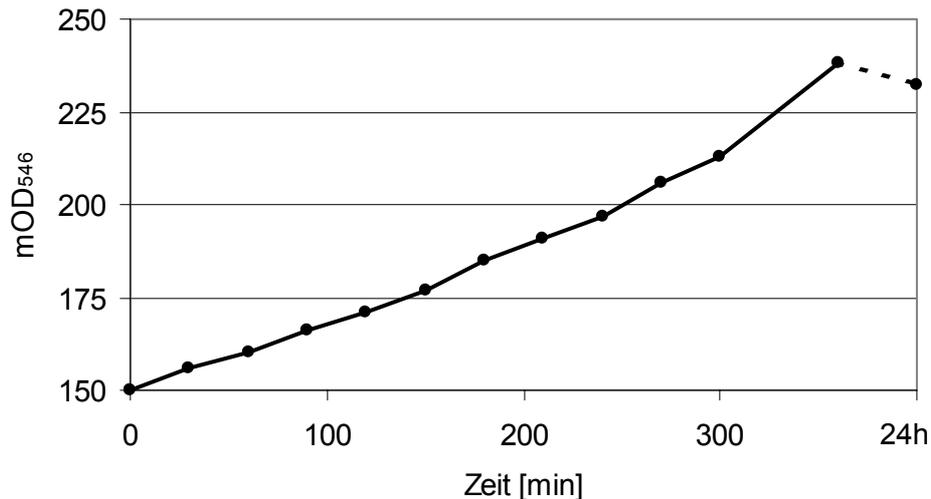
als Anion in das Medium entlassen. Hier werden halogenierte Metabolite freigesetzt. Die Dehalogenierung von Chlorphenolen verläuft unvollständig, nur allenfalls die Hälfte des vorhandenen organisch gebundenen Halogenides wird freigesetzt.

Beobachtbar ist, dass die Freisetzung des Fluorides durch den Stamm FLU 100 (siehe Bild 69) beim Wachstum auf Fluorbenzol zeitversetzt zur Abnahme der Fluorbenzolkonzentration und Zunahme der Zellkonzentration (siehe Bild 70) erfolgt. Nachdem das gesamte Fluorbenzol verschwunden ist (bei einer Startkonzentration von 1,35 mmol / L), waren nur ca. 40 % des gebildeten Fluorides im Medium nachweisbar. Dieses wurde verzögert freigesetzt, denn erst nach ca. 24 Stunden war das Fluorid äquimolar in der Lösung nachweisbar. Die Zellen speichern vermutlich das entstehende Fluorid, in welcher Form – als Ion oder als fluorierte Metabolite – harrt der Klärung. Es ist zu erwarten, dass sich Chlorid, Bromid und Iodid anders verhalten, da diese sehr viel leichter polarisierbar sind und deshalb von zelleigenen Exportersystemen schneller ausgeschleust werden können.



**Bild 69: Wachstum des Stammes FLU 100 auf Fluorbenzol bei 30 °C**

Dargestellt sind die Konzentrationen von Fluorbenzol (rot) und die der Fluorid - Anionen (orange). Während der Degradation traten keine weiteren Metabolite auf. Die Zellen von FLU 100 speichern das gebildete Fluorid. Dieses wird erst nach und nach freigegeben. Nach 360 Minuten war das gesamte Fluorbenzol umgewandelt. Erst 24 Stunden nach Beginn des Experiments war das gebildete Fluorid in das Medium abgegeben worden. Der Ansatz wurde aus einer fluorbenzolgewachsenen Vorkultur inokuliert, welche sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befand. Sie hatte also eine gewisse Menge Fluorid gespeichert, welches in dieses Experiment verschleppt wurde und zum Fluorid – Überbefund nach 24 Stunden führte.



**Bild 70: Gang der OD<sub>546</sub> bei dem in Bild 69 dargestellten Experiment**

Schön zu erkennen ist die Zunahme der Zellkonzentration im exponentiellem Wachstum von FLU 100 auf Fluorbenzol im Batchversuch.

### 5.3.7. Der Umsatz von Fluorcatecholen durch FLU 100

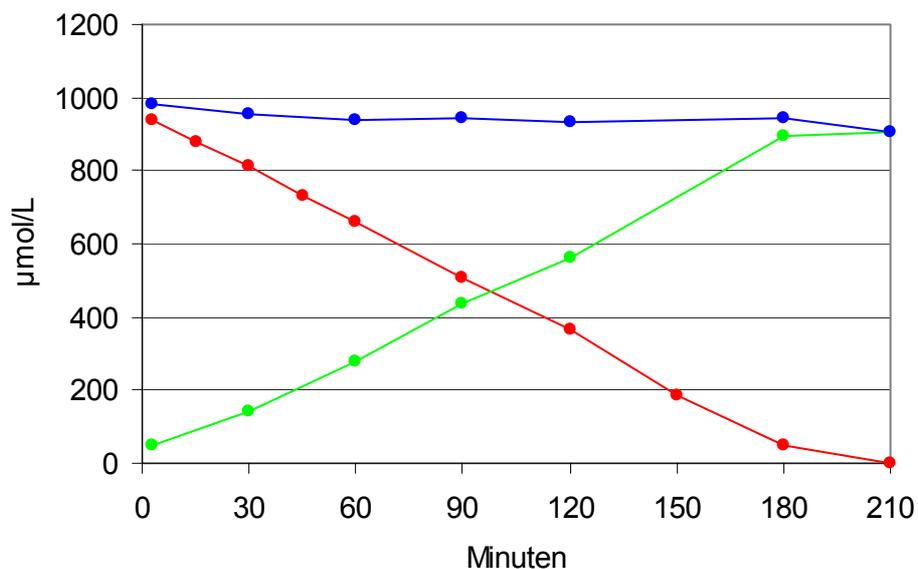
Ein wichtiges Ergebnis der Untersuchung der Transposonmutanten (siehe Kapitel 5.6.) ist, dass 3-Fluorcatechol ein Hauptmetabolit des Fluorbenzolabbaus darstellt. 4-Fluorcatechol dagegen tritt nur in Spuren auf (siehe Tabelle 40). 3-Fluorcatechol polymerisiert, wie die anderen Catechole auch schon im schwach alkalischen Milieu zu einem schwarzen Produkt (zum Abbau des Polymerisates siehe Wunderwald 2000).

Bild 71 zeigt, dass der Stamm FLU 100, wenn fluorbenzolinduziert, 3-Fluorcatechol vollständig umsetzt. Dagegen kann das 3-Fluorcatechol den Abbauweg selbst nicht induzieren, wird also von glucoseinduzierten Zellen, dies zeigen Vorversuche zu den Umsatzexperimenten, auch nach längerer Inkubationszeit nicht angegriffen.

Im Fall des fluorbenzolinduzierten FLU 100 sind Abbaugeschwindigkeit und das Auftreten eines Metaboliten – des 2-Fluormuconates - pH - abhängig. Bei pH 5 wird das 3-Fluorcatechol vollständig abgebaut, es treten keine Metabolite auf (siehe Bild 71). Bei pH 7 wird das 3-Fluorcatechol sehr rasch abgebaut (siehe Bild 72), temporär wird jedoch 2-Fluormuconat ins Medium ausgeschleust. Die maximale Konzentration dieses Metaboliten entspricht in etwa der halben initialen 3-Fluorcatecholkonzentration. Nach einiger Zeit ist auch das 2-Fluormuconat vollständig verschwunden.

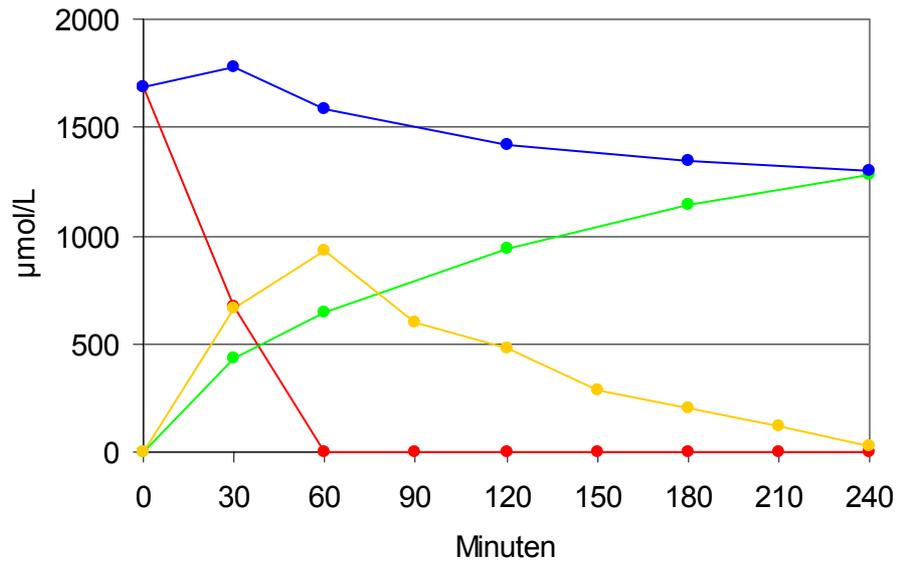
Anders stellt sich der Abbau des 4-Fluorcatechols dar, siehe Bild 73. Dieser erfolgt langsamer und stets unter temporärer Emission von mindestens drei fluorierten Metaboliten. Einer dieser Metabolite konnte als 3-Fluormuconat identifiziert werden. Bei den zwei weiteren Metaboliten handelt es sich höchstwahrscheinlich um 3- und 4-Fluormuconolacton, dafür sprechen ihre

Retentionsvolumina in der HPLC (siehe Bild 75) und ihre Absorptionsspektren zwischen 200 und 350 nm (siehe Bild 76). Ein weiterer Beleg für diese Identifizierung geht aus dem Vergleich der UV – Absorptionsspektren mit denen der Referenzsubstanzen Muconolacton und 5-Fluormuconolacton hervor. Im Gegensatz zu der 2-Fluormuconsäure, die bei der Degradation von 3-Fluorcatechol auftritt, werden die drei temporär auftretenden Metabolite des 4-Fluorcatecholabbaus nur sehr langsam abgebaut. Erst nach 24 Stunden sind die Metabolite nahezu verschwunden und 92,5 % des ursprünglich im 4-Fluorcatechol enthaltenen Fluorides als Fluorid im Medium zu finden.



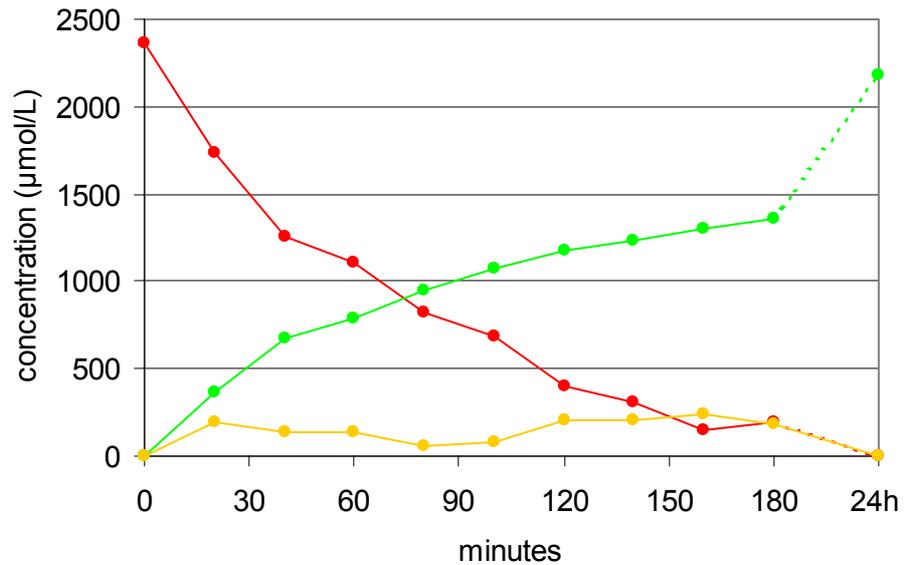
**Bild 71: Umsatz von 3-Fluorcatechol durch den Stamm FLU 100 (fluorbenzolinduziert) in Minimalmedium bei pH 5**

Dargestellt sind die Konzentrationen von 3-Fluorcatechol (rote Kurve) und freiem Fluorid (grüne Kurve) sowie die Summe beider, der Fluorbilanz (blaue Kurve). Die optische Dichte lag bei 4,2, die Startkonzentration an 3-Fluorcatechol lag bei 1 mmol/L. Während des Experiments traten als Metabolit nur Spuren von 5-Fluormuconat auf. Als das gesamte 3-Fluorcatechol degradiert war, lagen 97 % des enthaltenen Fluors als Fluorid im Medium vor.



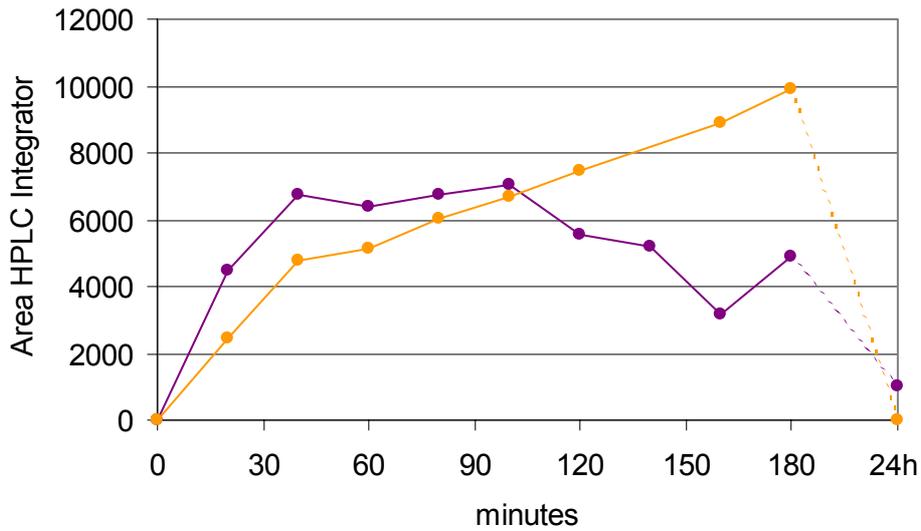
**Bild 72: Umsatz von 3-Fluorocatechol durch den Stamm FLU 100 (fluorbenzolinduziert) in Minimalmedium bei pH 7**

Dargestellt sind die Konzentrationen von 3-Fluorocatechol (rote Kurve), 2-Fluormuconat und freiem Fluorid (grüne Kurve) sowie die Summe beider, der Fluorbilanz (blaue Kurve). Dieser Versuch wurde mit einer optischen Dichte von 4,0 durchgeführt. Bei diesem pH – Wert verläuft der Abbau unter temporärer Akkumulation von 2-Fluormuconat (gelbe Kurve). Dieses verschwindet bis zum Ende des Experiments wieder vollständig.



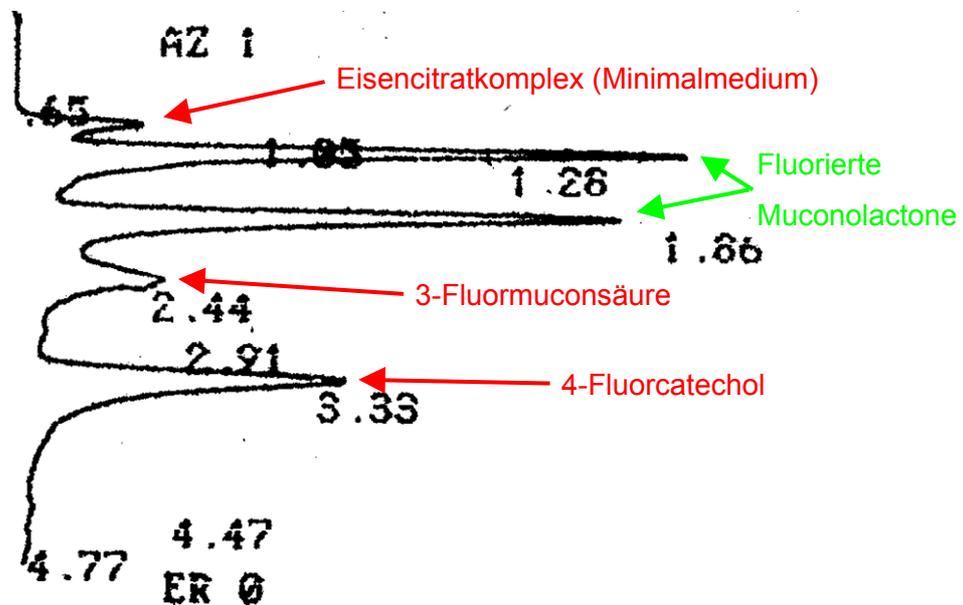
**Bild 73: Umsatz von 4-Fluorocatechol durch den Stamm FLU 100 (fluorbenzolinduziert) in Minimalmedium bei pH 7**

Dargestellt sind die Konzentrationen von 4-Fluorocatechol (rote Kurve), 3-Fluormuconat und freiem Fluorid (grüne Kurve). Der Ansatz wurde aus der identischen Vorkultur wie das in Bild 72 dargestellte Experiment präpariert. Anders als im Falle des 3-Fluorocatechols ist das Substrat nicht nach 4 Stunden degradiert. Es werden temporär 3-Fluormuconat (gelbe Kurve) sowie zwei weitere Metabolite (siehe Bild 74) ausgeschleust. Erst nach 24 Stunden sind alle Metabolite nahezu verschwunden und die Fluoridkonzentration im Medium nähert sich der Ausgangskonzentration des 4-Fluorocatechols.



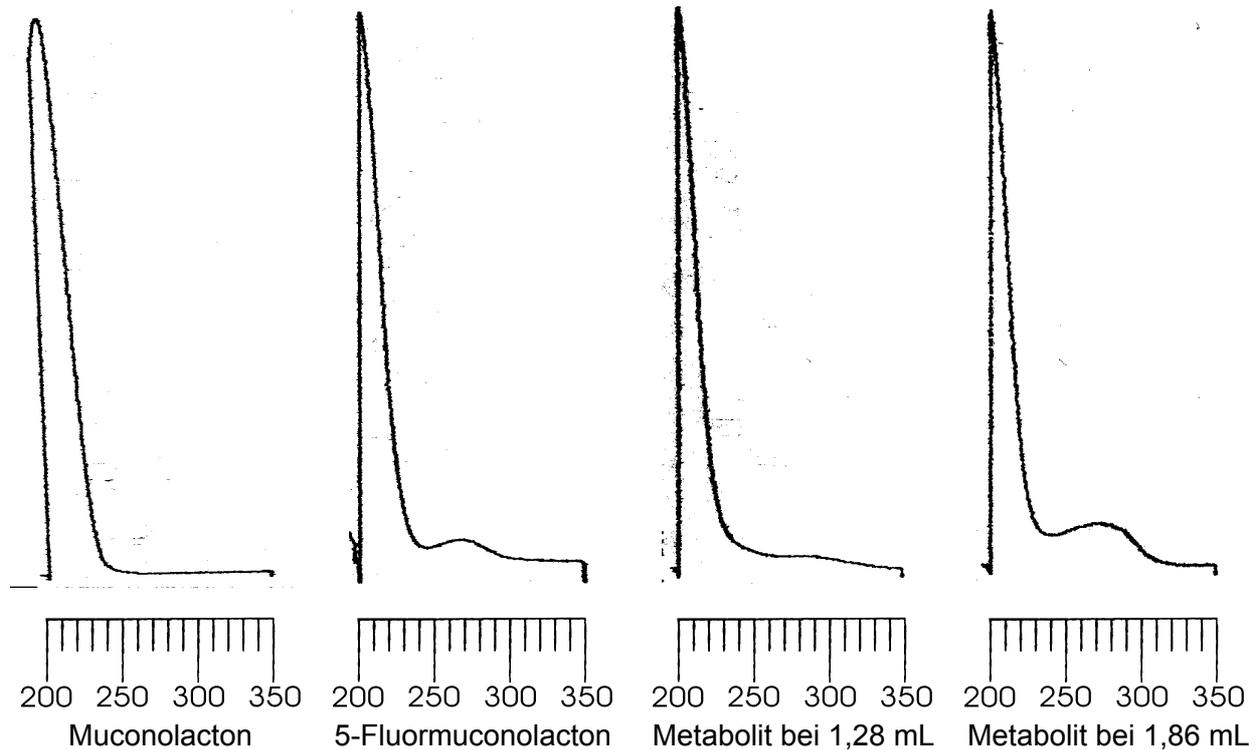
**Bild 74:** Dargestellt sind zwei weitere Metabolite, welche in dem in Bild 73 dargestellten Experiment zusätzlich auftraten

Hierbei handelt es sich um fluorierte Muconolactone, höchstwahrscheinlich 3- und 4-Fluormuconolacton, die den beiden Kurven jedoch nicht näher zugeordnet werden konnten. Darauf konnte aufgrund der Absorptionsspektren und den Retentionszeiten, bzw. Retentionsvolumina beider Metabolite geschlossen werden. Da keine Standards vorlagen, können keine absoluten Konzentrationen angegeben werden.



**Bild 75:** HPLC – Spektrum unter Standardbedingungen bei 100 Minuten des in Bild 73 dargestellten Experiments

Die einzelnen Komponenten sind bezeichnet. Die Retentionsvolumina der vermuteten fluorierten Muconolactone liegen im Bereich von unsubstituiertem Muconolacton (1,45 mL) und 5-Fluormuconolacton (1,59 mL). Gezeigt ist eine Kopie des Originalausdrucks.

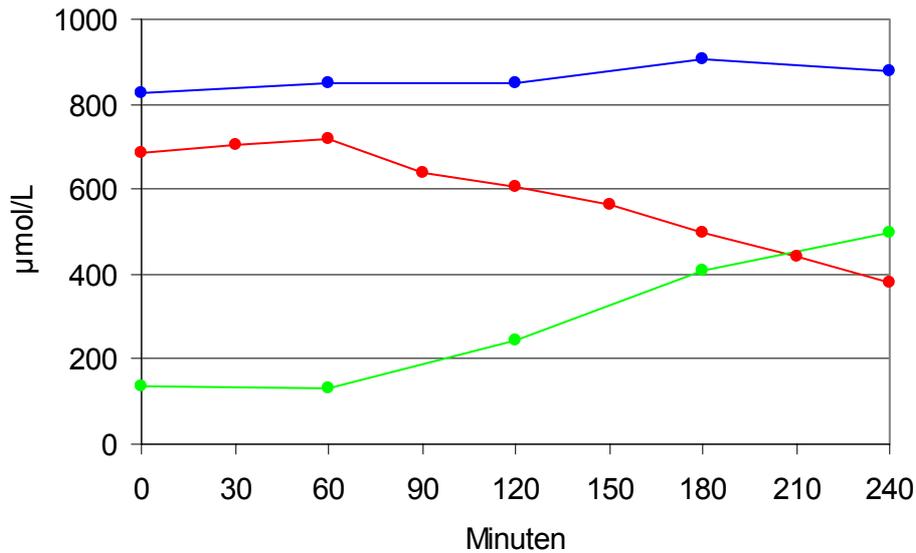


**Bild 76: UV - Absorptionsspektren von Muconolacton, 5-Fluormuconolacton und der beiden hydrophilen Metabolite zwischen 200 und 350 nm, höhennormiert**

Deutlich erkennbar sind die Ähnlichkeiten der Spektren.

### 5.3.8. Der Umsatz von 3-Fluorphenol durch FLU 100

Der Stamm FLU 100 setzt 3-Fluorphenol vollständig um (siehe Bild 77). Dabei wird ein eigener Abbauweg, wahrscheinlich eine Phenolmonooxygenase enthaltend, induziert. Die lag - Phase beim Substratwechsel von Fluorbenzol hin zum 3-Fluorphenol dauert ca. 60 Minuten, welches dann vollständig unter nahezu äquimolarer Fluoridfreisetzung degradiert werden kann (siehe Kapitel 5.3.4).

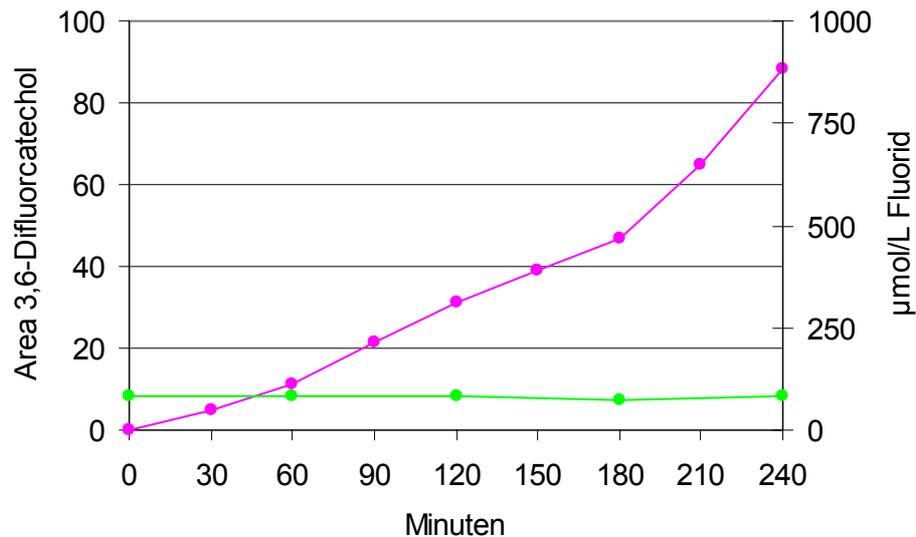


**Bild 77: Der Umsatz von 3-Fluorphenol durch den Stamm FLU 100**

Die Vorkultur war fluorbenzolinduziert. Dargestellt sind die Konzentrationen von 3-Fluorphenol (rote Kurve), freiem Fluorid (grüne Kurve) und die Summe beider, der Fluorbilanz (blaue Kurve). Nach einer ca. 60 - minütigen lag - Phase beginnen die Zellen mit dem Abbau des Substrates. Parallel dazu werden Fluoridionen freigesetzt, so dass die Bilanz geschlossen bleibt.

### 5.3.9. Der Umsatz von 1,4-Difluorbenzol durch FLU 100

Der Stamm FLU 100 kann 1,4-Difluorbenzol nicht produktiv verwerten. Fluorbenzolinduzierte Zellen produzieren aus diesem Substrat 3,6-Difluorcatechol. Es wird kein Fluorid freigesetzt, siehe Bild 78.



**Bild 78: Der Angriff auf 1,4-Difluorbenzol durch fluorbenzolinduzierte Zellen des Stammes FLU 100**

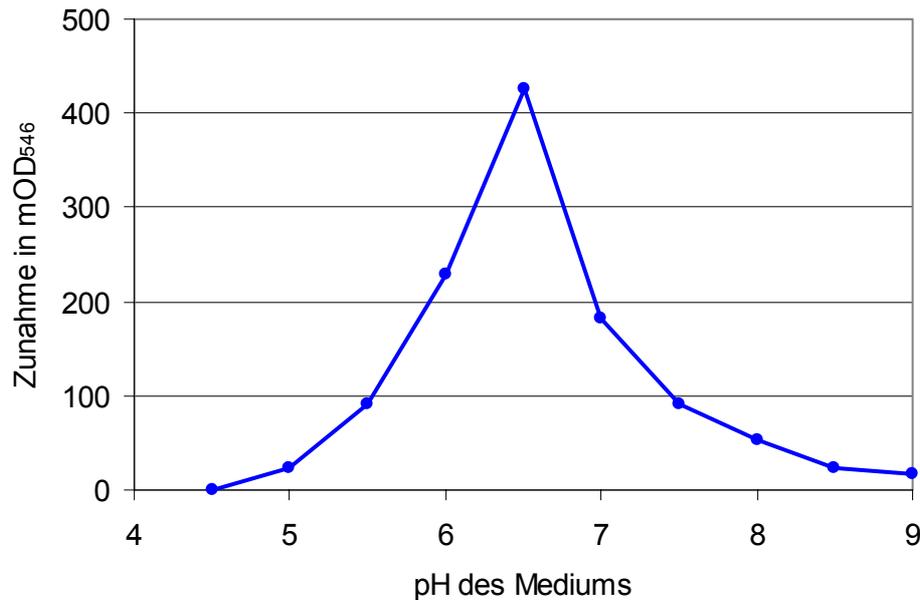
Dargestellt ist der Konzentrationsverlauf von freiem Fluorid (grüne Kurve) und der relative Anteil von 3,6-Difluorocatechol (pinkfarbene Kurve). Für das 3,6-Difluorocatechol können mangels Standard keine absoluten Konzentration angegeben werden.

#### 5.4. Toxische Effekte

Die Ermittlung von potentiell toxischen Effekten verschiedener Substanzen auf den Stamm FLU 100 dient als Basis für verschiedene weitere Versuche, wie beispielsweise die Transposonmutagenese oder der Betrieb der Reaktoren im Technikumsmaßstab.

##### 5.4.1. Einfluss des pH – Wertes auf das Wachstum von FLU 100

Zur Ermittlung des besten pH - Wertes für das optimalen Wachstum wurde der Zellertrag von FLU 100 auf Glucose in Minimalmedium bestimmt. Der pH des Mediums wurde durch Pufferung des Systems mit einer Phosphat / Hydrogenphosphat / Dihydrogenphosphat – Mischung (pH 5,0 – 9,0) gewährleistet, Bild 79 zeigt das Ergebnis. Es gibt ein deutlich sichtbares Optimum bei pH 6,5. Beiderseits dieses Wertes finden sich steile Flanken, was darauf hinweist, dass FLU 100 sehr empfindlich auf Schwankungen des pH – Wertes seines Mediums reagiert. Schon Abweichungen von pH 0,5 in Richtung alkalischen oder sauren Milieus lässt den Zellertrag auf die Hälfte sinken. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die pH - Werte der Ansätze während des Experiments versauerten, mit Ausnahme des Ansatzes pH 9,0, der um pH 0,3 alkalischer wurde (siehe Tabelle 29).



**Bild 79: Zellertrag von FLU 100 in Abhängigkeit des pH – Wertes des Mediums**

Wachstum auf Glucose in Minimalmedien innerhalb von drei Tagen bei unterschiedlichen pH – Werten. Dargestellt sind die Start pH – Werte der Ansätze. Der Stamm FLU 100 weist ein deutliches Optimum des Zellertrages bei pH 6,5 auf.

**Tabelle 29: Verschiebungen der pH – Werte während des Experiments**

Bis auf den Ansatz mit einem Start – pH von 9,0 versauern alle Ansätze.

Start - pH	End - pH	Verschiebung
5,00	4,00	-1,00
5,50	5,00	-0,50
6,00	5,80	-0,20
6,50	6,00	-0,50
7,00	6,60	-0,40
7,50	7,30	-0,20
8,00	7,50	-0,50
8,50	8,20	-0,30
9,00	9,30	+0,30

#### 5.4.2. Antibiotikasppektrum

Der Disktest lieferte das in Tabelle 30 dargestellte Antibiotikaresistenz - Muster für den Stamm FLU 100. Anzumerken ist, dass dieser Test nur eine qualitative Aussage erlaubt, da die Diffusionsgeschwindigkeiten der Antibiotika im Agar unterschiedlich sind. Daher kann aus der Größe der gebildeten Hemmhöfe keine Aussage über die Toleranzschwelle gemacht werden.

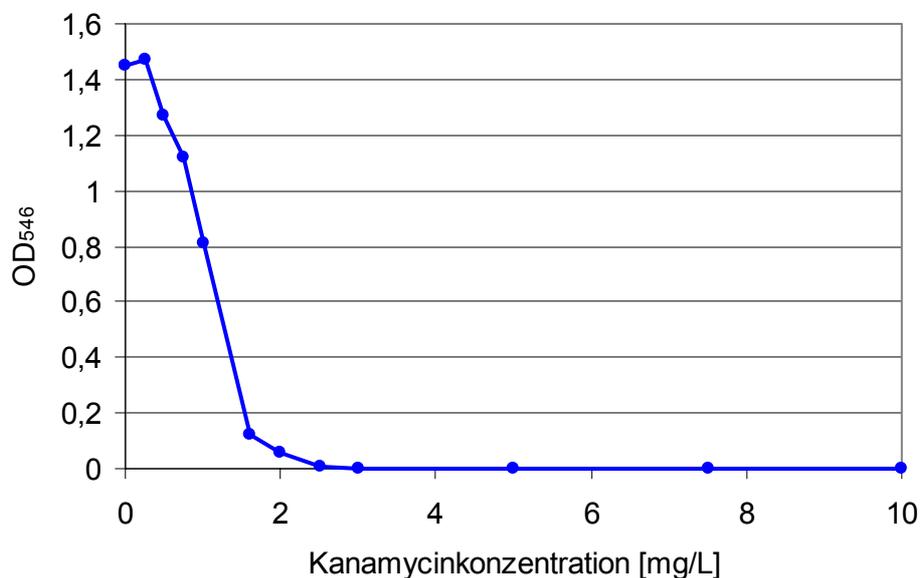
Glücklicherweise weist der Stamm FLU 100 keine ausgeprägte Resistenz gegenüber Kanamycin auf, er konnte also mit den vorgesehenen Transposonvarianten mutiert werden. Im Hinblick hierauf wurde die Toleranzschwelle für Kanamycin genau bestimmt (siehe folgendes Kapitel).

**Tabelle 30: Ergebnisse des Disktests.**

Antibiotikum	Resistenz	Bemerkung
Ampicillin	+	In hohen Konzentrationen toxisch
Chloramphenicol	-	
Kanamycin	-	
Penicillin	+	In hohen Konzentrationen toxisch
Streptomycin	-	
Tetracyclin	-	

#### 5.4.3. Qualitative Bestimmung der Kanamycintoleranzschwelle

Der Stamm FLU 100 zeigte sich im Disktest als kanamycinsensibel. Um die Toleranzschwelle zu bestimmen wurde der Wachstumstest nach Kapitel 4.4.10.2 durchgeführt (siehe Bild 80).



**Bild 80: Kanamycinresistenztest von FLU 100**

Dargestellt sind die optischen Dichten bei 546 nm am Ende des Experiments.

Die Toleranzschwelle von FLU 100 gegenüber Kanamycin liegt bei etwa 2,5 mg/L.

Kanamycin reduziert die Wachstumsrate von FLU 100 oberhalb einer Konzentration von 250 µg / L.. Steigt die Kanamycinkonzentration auf über 2,5 mg /L so ist die Toleranzschwelle erreicht. Es findet kein Wachstum mehr statt.

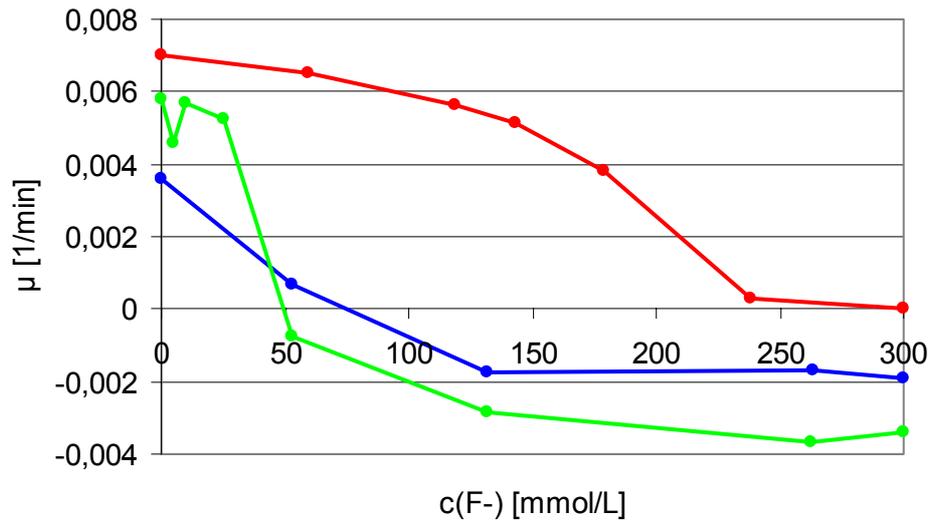
#### 5.4.4. Der Einfluss von freiem Fluorid auf die Wachstumsrate von FLU 100

Zur Bestimmung der Toleranz von FLU 100 gegenüber freien Halogenidionen wurden zwei unterschiedliche Experimentreihen durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, dass sich die Halogenidkonzentration im Medium während des Experiments nicht signifikant ändert.

Nutrient Broth als Flüssigmedium stellt diese Bedingung sicher, weil es nur Spuren an Fluoridionen enthält. Neben dem Stamm FLU 100 wurden als Referenz und zum Vergleich die Stämme *Pseudomonas putida* DSM 549 und *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190 getestet. Beide Stämme können Fluorbenzol nicht als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen.

Die getesteten Stämme lieferten ein heterogenes Ergebnis, siehe Bild 81. Der Stamm FLU 100 zeigt im Vergleich zu den getesteten Pseudomonaden eine wesentlich höhere Toleranz gegenüber freien Fluoridionen im Medium. Außerdem trat bei FLU 100 im getesteten Konzentrationsbereich keine negative Wachstumsrate auf. Es bleibt allerdings offen, ob die Lebendzellzahl bei 300 mg / L Fluorid im Medium wirklich konstant geblieben ist, oder ob diese wegen einer Lichtabsorption durch tote Zellen nur vorgetäuscht wurde. Analytisch (siehe Bild 82) konnte eine Abschnürkonzentration, also die Konzentration an Fluoridionen, ab der kein Wachstum mehr stattfindet, von 242 mg / L Fluorid für FLU 100 bestimmt werden.

Bei beiden getesteten *Pseudomonaden* wurden Sterbeterme beobachtet. *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190 weist eine Abschnürkonzentration (diejenige Konzentration, bei der die Wachstumsrate auf null fällt) von unter 50 mg / L auf. Dies ist um den Faktor fünf geringer als bei FLU 100. Der Stamm *Pseudomonas putida* DSM 549 zeigt eine geringfügig höhere Abschnürkonzentration. Dabei muss festgestellt werden, dass der in Bild 81 dargestellte Kurvenverlauf für diesen Stamm nur eine grobe Darstellung ist. Die Abschnürkonzentration liegt sicherlich knapp über 50 mg / L, wenn man einen ähnlich qualitativen Kurvenverlauf wie bei FLU 100 annimmt.



**Bild 81: Der Einfluss von freiem Fluorid auf die Wachstumsraten verschiedener Stämme**

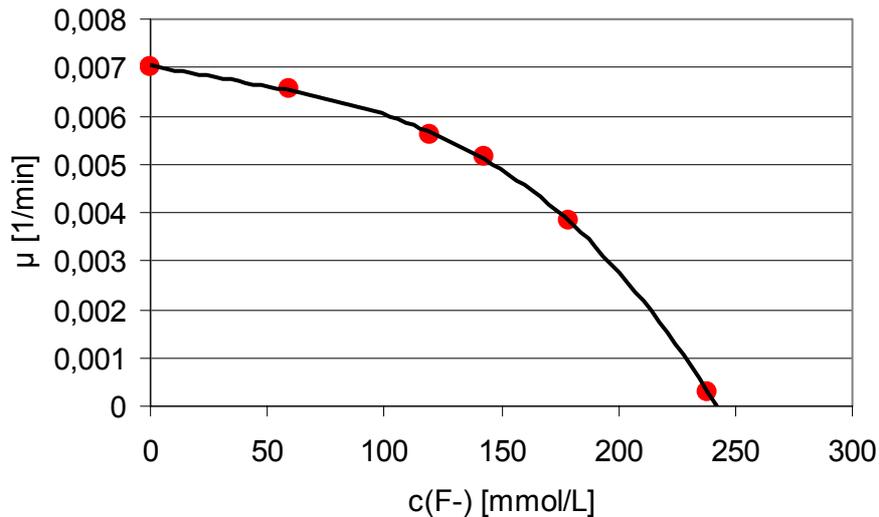
Dargestellt ist die Auftragung der Wachstumsraten  $\mu$  von FLU 100 (rot), *Pseudomonas putida* DSM 549 (blau) und *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190 (grün) in Abhängigkeit verschiedener Natriumfluoridkonzentrationen in Nutrient Broth Flüssigmedium. Negative Wachstumsraten entsprechen Sterbetermen. Jeder gemessene Punkt repräsentiert eine mehrfach bestimmte Wachstumskurve. Der Stamm FLU 100 erträgt eine deutlich höhere Konzentration von Fluoridionen als die Referenzstämme (siehe Bild 83 und Tabelle 31).

Analytische Ableitung:

Zur Quantifizierung der Abschnürkonzentration von FLU 100 in Nutrient Broth in Gegenwart von Natriumfluorid wurden die gemessenen Daten (siehe Bild 81) im Bereich von 0 bis 240 mg / L Fluorid mit Hilfe eines Microsoft Excel Spreadsheets durch folgende kubische Gleichung mathematisch approximiert:

Gleichung 28: 
$$\mu = - 5,29 \cdot 10^{-10} \cdot c^3 + 4,72 \cdot 10^{-8} \cdot c^2 - 9,50 \cdot 10^{-6} \cdot c + 0,0070$$

Aus dieser Beziehung ergibt sich, dass sich die *Wachstumsrate* bei einem Fluoridgehalt von 183 mmol / L halbiert. Eine Extrapolation der Kurve zu 0 ergibt die *Abschnürkonzentration* bei 242 mmol / L.

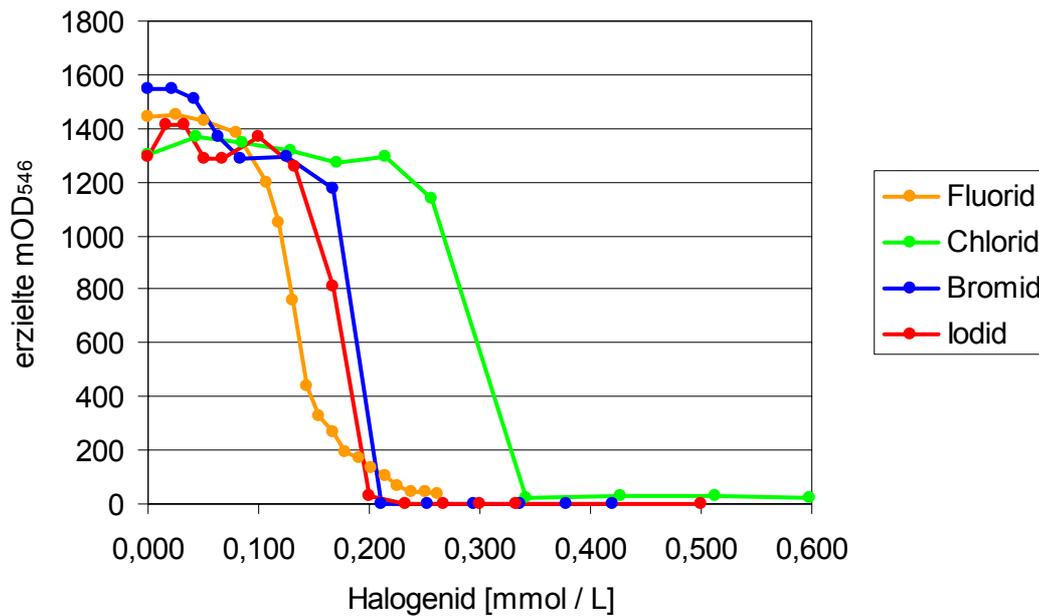


**Bild 82: Mathematische Approximation der Wachstumsraten von FLU 100 in Nutrient Broth unter Fluorideinfluss, nach Gleichung 28**

Zu den gemessenen Wachstumsraten (rote Punkte) ist die mathematische Approximation des Kurvenverlaufs nach Gleichung 28 einbeschrieben. Bei einer Konzentration von 242 mmol / L sinkt die Wachstumsrate auf null (Abschnürkonzentration).

#### 5.4.5. Der Einfluss von freien Halogenidionen auf den Zellertrag von FLU 100

Halogenidionen im Medium erhöhen den osmotischen Druck auf die enthaltenen Bakterienzellen. Des Weiteren können sie auch toxische Wirkungen, wie beim Fluorid gesehen (siehe Kapitel 5.4.4.), auf die Zellen haben. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, liegen allen in diesem Kapitel besprochenen Experimenten Natriumsalze zu Grunde. Wie zu erwarten zeigt der Stamm FLU 100 gegenüber dem Chlorid die größte Resistenz (siehe Bild 83 und die Zusammenstellung der ermittelten Abschnürkonzentrationen in Tabelle 31). Die Resistenzen von FLU 100 gegenüber Bromid und Iodid bewegen sich auf etwa halbem Chloridniveau. Dieses Ergebnis ist überraschend, da Bromid und Iodid in den nicht maritimen natürlichen Kompartimenten nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, es eigentlich also keinen Anlass für die Entwicklung entsprechender Resistenzen gibt. In der Konsequenz scheint es keine ausgeprägten Toxizitäten dieser Ionen zu geben. Ihre Wirkung beruht wohl im Wesentlichen auf ihrer Ionenstärke. Anders im Falle des Fluorides. Der Stamm FLU 100 wurde sieben Jahre lang ausschließlich auf Fluorbenzol kultiviert. Daher hatte er hunderte von Generationen Zeit, sich an höhere Fluoridkonzentrationen im Medium anzupassen. Hieraus resultiert die außergewöhnlich große Fluoridresistenz des Stammes.



**Bild 83: Zellertrag von FLU 100 in Nutrient Broth in Gegenwart von Halogenidionen innerhalb von 48 Stunden**

Hier zeigen sich die schon öfters beobachteten typisch sigmoidalen Kurven, vor allem im Falle des Fluorides. In allen Experimenten fungierte Natrium als Gegenion zu den Halogeniden.

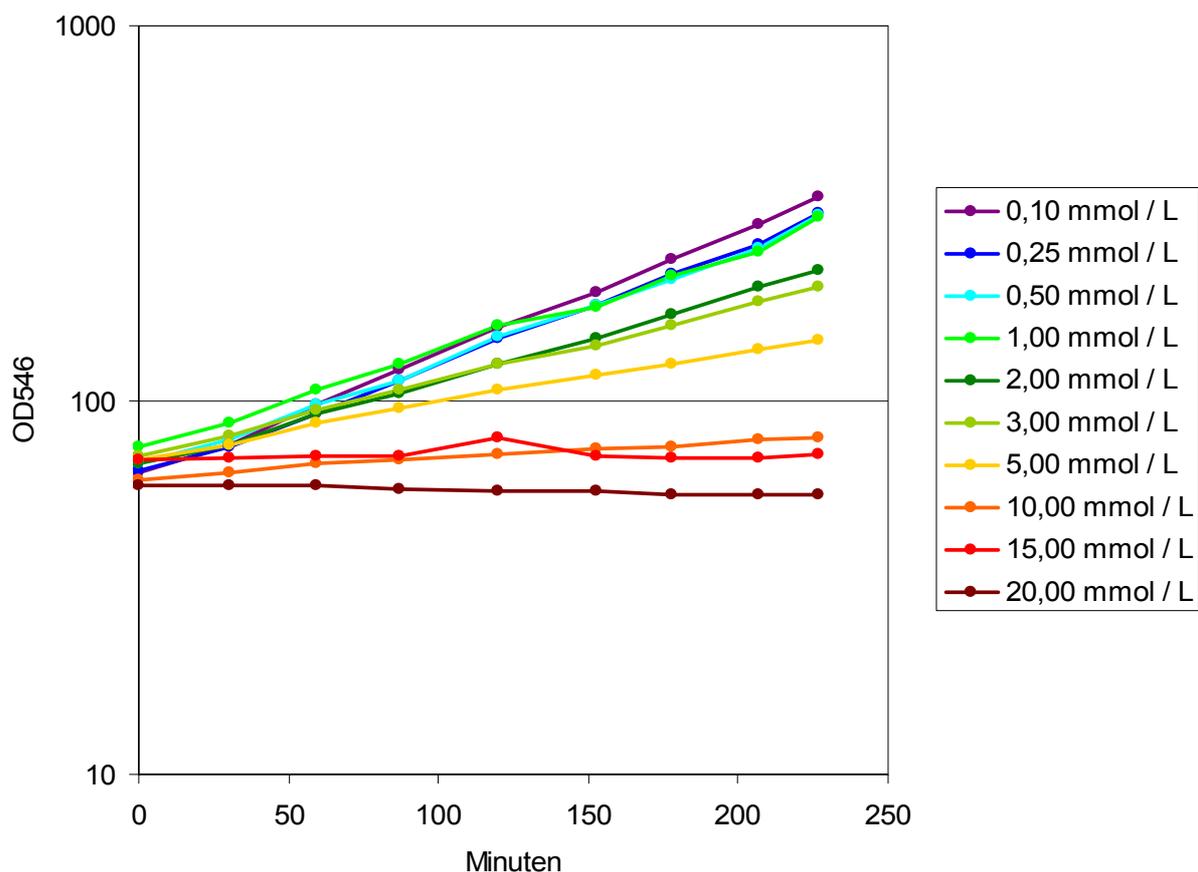
**Tabelle 31: Abgeleitete Abschnürkonzentrationen von Halogenidanionen des Stammes FLU 100**

Abschnürkonzentrationen von FLU 100 beim Wachstum auf NB in Gegenwart von Natriumhalogenid, abgeleitet aus den Zellertragsexperimenten und der Bestimmung der Wachstumsrate von FLU 100 unter Fluorideinfluss. FLU 100 verfügt als Bodenbakterium über die höchste Toleranz gegenüber Chlorid. Gegenüber Fluorid zeigt der Stamm, wie schon im vorangegangenen Kapitel dargestellt, eine ungewöhnlich große Resistenz. Die Toleranzgrenzen von Bromid und Iodid liegen etwa im Rahmen der Fluoridtoleranz und sind damit halb so groß wie die Chloridtoleranz.

Halogenid	Abschnürkonzentration	
	mmol / L	g / L
Natriumfluorid	242	>4,75
Natriumchlorid	>435	>15,43
Natriumbromid	>210	>16,78
Natriumiodid	>234	>29,70

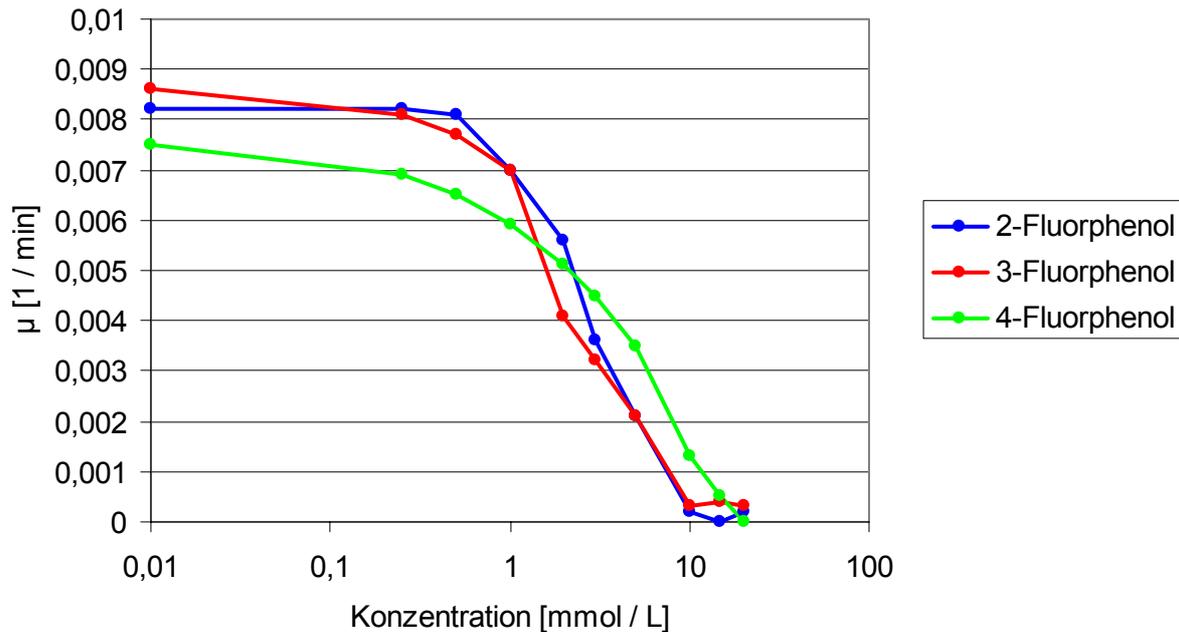
#### 5.4.6. Der Einfluss von Fluorphenolen auf das Wachstum von FLU 100

Phenole wirken in der Regel toxisch bis sehr toxisch auf Bakterien (Phenol wurde früher als Desinfektionsmittel eingesetzt). Da Fluorphenole auch als Substrate für den Stamm FLU 100 dienen können, ist es wichtig, ihre toxische Wirkung auf ihn zu kennen. Dies wurde durch drei Serien von Wachstumsversuchen in Nutrient Broth Flüssigmedium ermittelt. In keinem Fall griffen die Zellen die Fluorphenole an. Es wurden keine Fluoridionen ins Medium abgegeben. Von der Toxizität her wirken alle drei Fluorphenole größenordnungsmäßig gleich hemmend auf die Wachstumsrate von FLU 100, Bild 84 zeigt beispielhaft einen Satz gemessener Wachstumskurven im Falle des 2-Fluorphenols. Bei Konzentrationen von 1 mmol / L zeigt der Stamm einen deutlich erkennbaren Hemmeffekt (siehe Bild 85). Für 2- und 3-Fluorphenol scheint bei ca. 10 mmol / L die Abschnürkonzentration erreicht zu sein. 4-Fluorphenol ist generell etwas weniger toxisch als die anderen Fluorphenole. Hier liegt die Abschnürkonzentration bei ca. 20 mmol / L.



**Bild 84: Wachstumskurven von FLU 100 in Nutrient Broth in Anwesenheit von 2-Fluorphenol für verschiedene Konzentrationen**

Dargestellt sind die Wachstumskurven verschiedener Ansätze mit 2-Fluorphenol Zugaben zwischen 0,1 und 20 mmol / L. Das exponentielle Wachstum ist in dieser logarithmischen Darstellung durch Geraden belegt.



**Bild 85: Wachstumsraten von FLU 100 in Nutrient Broth bei Anwesenheit verschiedener Fluorphenole**

Aufgetragen sind die jeweiligen Wachstumsraten  $\mu$  in Abhängigkeit der Fluorphenolkonzentrationen. 4-Fluorphenol ist halb so toxisch wie die anderen beiden Fluorphenole. Zur besseren Darstellung sind die Konzentrationen auf einer logarithmischen Skala aufgetragen.

#### 5.4.7. Sauerstoffzehrung

Die Sauerstoffzehrungsmessungen geben einen Hinweis auf weitere Substrate, welche im gleichen Induktionszustand abgebaut werden können bzw. von den Sauerstoff verwertenden induzierten Enzymen umgesetzt werden, siehe Tabelle 32.

Zellen von FLU 100 wurden auf Fluorbenzol induziert und auf ihre Sauerstoffzehrung bei Versorgung mit verschiedenen Substraten untersucht. Wie zu erwarten, erzeugen die anderen Monohalogenbenzole, Benzol und Toluol eine Sauerstoffzehrung, welche in der Größenordnung von der des Fluorbenzols liegen. Bei genauer Betrachtung ist festzustellen, dass diese Sauerstoffzehrungen qualitativ den maximalen Wachstumsraten des Stammes FLU 100 auf den entsprechenden Substraten folgen (siehe Tabelle 33).

3-Fluorphenol als Substrat wird von fluorbenzolinduzierten Zellen von FLU 100 nicht direkt umgesetzt. Es tritt eine ca. 60 minütige lag – Phase auf (siehe Kapitel 5.4.6). Dieses Substrat erzeugt jedoch im Rahmen dieses Versuchs eine Sauerstoffzehrung von 21,8 % von der des Fluorbenzols. Ähnliches gilt für 3-Chlorphenol und 3-Kresol. Die an der 4-Position substituierten Phenole erzeugen eine geringere Sauerstoffzehrung, welche bei den 2-substituierten Phenolen noch geringer ist.

Benzoat, Monohalogenbenzoate und 2-Chlortoluol werden nicht durch fluorbenzolinduzierte Zellen umgesetzt, ebenso wie Xylole und das 4-Cymol. Styrol und Cumol ergeben eine vergleichsweise hohe Sauerstoffzehrungsrate, obwohl der Stamm FLU 100 diese Substrate nicht produktiv verwerten kann. Möglicherweise werden sie durch die initiale Enzymatik angegriffen, nicht jedoch vollständig abgebaut.

**Tabelle 32: Relative Atmungsraten des Stammes FLU 100 nach der Anzucht auf Fluorbenzol**

Alle Ergebnisse sind relativ zu Fluorbenzol angegeben. Auch die anderen Monohalogenbenzole sowie Toluol und Benzol erzeugen eine Atmungsrate, die mit derjenigen des Fluorbenzols vergleichbar ist (Zahlen von Daniel Dobslaw).

Substrat	Atmungsrate	Substrat	Atmungsrate
<b>Halogenbenzole und Benzol</b>		<b>Phenole</b>	
Fluorbenzol	100 %	Phenol	18 %
Chorbenzol	147 %	2-Kresol	9 %
Brombenzol	150 %	3-Kresol	29 %
Iodbenzol	94 %	4-Kresol	10 %
Benzol	95 %	2-Fluorphenol	8 %
<b>Alkylbenzole</b>		3-Fluorphenol	22 %
Toluol	160 %	4-Fluorphenol	15 %
Benzol	95 %	2-Chlorphenol	1 %
Styrol	43 %	3-Chlorphenol	25 %
Cumol	35 %	4-Chlorphenol	23 %
4-Cymol	-6 %	<b>Benzoessäurederivate</b>	
2-Xylol	-4 %	Benzoat	2 %
3-Xylol	-2 %	2-Methylbenzoat	3 %
4-Xylol	3 %	3-Methylbenzoat	-0,2%
		4-Methylbenzoat	5 %
		<b>Sonstige</b>	
		2-Chlortoluol	-2 %
		Glukose	21 %

**Tabelle 33: Vergleich der maximalen substratspezifischen Wachstumsraten mit den Atmungsraten von FLU 100 bei Induktion mit Fluorbenzol**

Eingesetzt wurden verschiedene aromatische Substrate. Bestimmt wurden die Atmungsraten von FLU 100 nach Induktion auf Fluorbenzol und Konfrontation mit dem entsprechenden Substrat.

<b>Substrat</b>	<b>Maximale Wachstumsrate auf dem jeweiligem Substrat</b>	<b>Atmungsrate bei Induktion von Fluorbenzol</b>
Fluorbenzol	100 %	100 %
Chlorbenzol	160 %	147 %
Brombenzol	185 %	150 %
Iodbenzol	81 %	94 %
Toluol	156 %	95 %
Benzol	104 %	160 %

## 5.5. Enzymreaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige Enzyme des Fluorbenzolabbauweges hinsichtlich ihrer Substratspezifitäten und ihrer Aktivitäten untersucht werden. Diese Untersuchungen begannen mit der Aufklärung des Ringspaltungstyps, wodurch der weitere Abbauweg, Ortho- oder Metaweg festgelegt wird (siehe Bild 12).

### 5.5.1. Typ der Ringspaltung

Die zugehörigen Tests bedienen sich des Rohextraktes des zu testenden Bakterienstammes. Dabei muss dieser auf einem aromatischen Substrat gewachsen sein und sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Catecholdioxygenasen gelten als hinreichend stabil, sie überstehen die Prozedur des Zellaufschlusses. Der Zellrohextrakt wird mit unsubstituiertem Catechol konfrontiert, belüftet und inkubiert. Danach wurde das optische Spektrum zwischen 200 und 500 nm mittels des Photometers aufgenommen. Die Ringspaltungsprodukte zeigen charakteristische Absorptionsmaxima. Zum Vergleich wurden drei Referenzstämme benutzt: *Pseudomonas pudita* mt2 auf Natriumbenzoat angezogen, zeigt eine große Metaspaltungsaktivität (Bartels 1984), *Pseudomonas* sp. B13 spaltet Benzoat vornehmlich in Orthoposition, wobei auch eine kleine Menge Metaspaltungsprodukt entsteht (Engesser 1980), *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 spaltet Benzoat stets in Orthoposition (Pieper 1985). Zur Bestimmung wurde FLU 100 auf den Substraten Fluorbenzol, Chlorbenzol, Toluol und Glucose angezogen und getestet.

*Test auf Metaspaltung:*

Metaspaltungsprodukte verschiedener Catechole, "Semialdehyde" (siehe Bild 12) zeigen eine starke Absorption bei 375 nm, jedoch keine bedeutende Absorption bei 260 nm.

*Test auf Orthospaltung:*

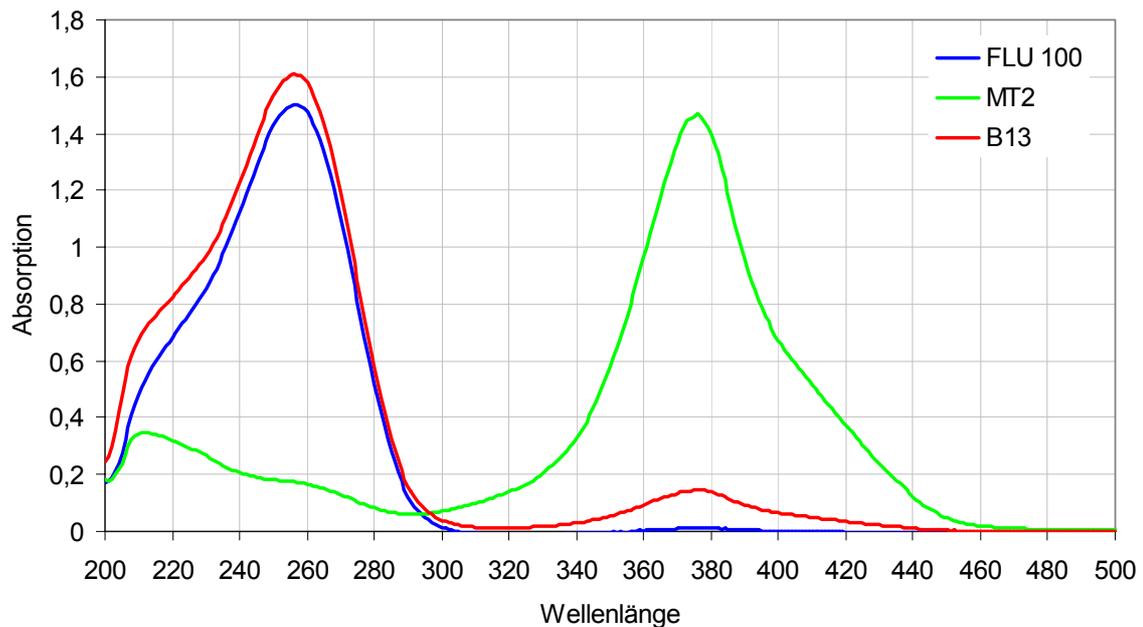
Orthospaltungsprodukte verschiedener Catechole sind Muconsäuren (siehe Bild 12). Diese zeigen aufgrund ihrer konjugierten Doppelbindungen, je nach Substitution ein Absorptionsmaximum bei 260 bis 280 nm, dagegen im Wellenlängenbereich des Absorptionsmaximums der Metaspaltungsprodukte keine besondere Absorptionsaktivität, siehe Bild 86.

Der Rohextrakt des Stamms FLU 100 produzierte in keinem der durchgeführten Experimente Metaspaltungsprodukte aus dem eingesetzten Catechol, siehe Tabelle 34. Es wurden stets Orthospaltungsprodukte beobachtet. FLU 100, auf Glucose gewachsen, zeigte keine Ringspaltungsaktivität. Die Referenzstämme verhielten sich wie in der Literatur beschrieben, *Pseudomonas pudita* mt2 bevorzugt die Metaspaltung, *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 spaltet in Orthoposition.

**Tabelle 34: Ergebnisse der Untersuchung zur Typus der Ringspaltung**

Der Rohextrakt des Stamms FLU 100 produziert stets Muconsäure aus Catechol. Es wurden zu keiner Zeit Metaspaltungsprodukte beobachtet. Die Referenzen verhielten sich wie erwartet (siehe Text).

<b>Stamm</b>	<b>Substrat</b>	<b>Orthoaktivität</b>	<b>Metaaktivität</b>
<i>Pseudomonas pudita</i> mt2	Benzoat	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. B13	Benzoat	+	+/-
<i>Alcaligenes eutrophus</i> JMP 134	Benzoat	+	-
FLU 100	Fluorbenzol	+	-
FLU 100	Chlorbenzol	+	-
FLU 100	Toluol	+	-
FLU 100	Glucose	-	-



**Bild 86** Diese Abbildung zeigt exemplarische Ergebnisse der Catechospaltungstests

Die Blindwerte wurden von den Messwerten subtrahiert. Das Absorptionsmaximum bei 375 nm ist ein Hinweis auf die Bildung eines "Semialdehyds" und damit auf eine exprimierte Metaspaltungsaktivität. Sie ist beim Stamm *Pseudomonas putida* mt2 (benzoatgewachsen) zu beobachten. Muconsäure, das Produkt der Orthospaltung hingegen, besitzt ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Stämme *Pseudomonas sp.* B13 (benzoatgewachsen) und FLU 100 (fluorbenzolgewachsen) zeigen hier exprimierte Aktivitäten.

### 5.5.2. Catechol-1,2-dioxygenase

Die Kinetik der Catechol-1,2-dioxygenase(n) wurde mit einem prinzipiell gleichen Ansatz wie bei der Orthospaltung durchgeführt (siehe vorheriges Kapitel). Allerdings wurden die Ansätze nicht inkubiert, sondern die Produktbildung wurde photometrisch bestimmt. Es wurden verschiedene substituierte Catechole eingesetzt. Die Zunahme der Absorption pro Zeiteinheit ist ein Maß für die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms oder der Enzyme, wenn Isoenzyme exprimiert werden. Alle gemessenen Umsatzraten werden zu derjenigen des unsubstituierten Catechols (= 100 %) in Beziehung gesetzt, die Ergebnisse sind in Tabelle 35 zusammengestellt.

An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass die Bestimmung der Kinetiken der Catechol-1,2-Dioxygenase(n) den Hinweis lieferte, dass beim Wachstum auf Toluol sowie auf Fluorbenzol und Chlorbenzol die identische oder zumindest eine sehr ähnliche Enzymatik exprimiert ist. Dies wird durch die in Kapitel 5.3.2. dargestellten Ergebnisse – Das Weiterwachstum von FLU 100 ohne lag-Phase bei Substratwechseln nahe gelegt. Alle diese Enzymkinetiken ähneln den von Dorn beschriebenen Typ II Catechol-1,2-dioxygenasen (Dorn 1978A, B) aus *Pseudomonas sp.* B13. Das aus Benzoat hervorgegangene Catechol hingegen wird durch ein

klassisches Typ I Enzym gespalten (zur Catechol-1,2-dioxygenase siehe auch Que 1987, Ngai 1988, Nakai 1988, Miguez 1993, Ridder 1998, Potrawfke 2001, Pérez-Pantoja 2003)

**Tabelle 35: Aktivitätsmuster der Catechol-1,2-dioxygenase(n) von FLU 100 beim Wachstum auf verschiedenen aromatischen Substraten**

Als Vergleich sind die von Dorn im Jahre 1978 publizierten Aktivitätsmuster aus *Pseudomonas sp.* B13 angegeben. Beim Wachstum auf Fluorbenzol, Chlorbenzol und Toluol wird durch den Stamm FLU 100 eine ringspaltende Enzymatik exprimiert, die dem Typ II ähnelt. Nur beim Wachstum auf Natriumbenzoat wird eine Typ I Enzymatik exprimiert. (Siehe hierzu Diskussion Kapitel 6.5.1.)

Stamm Substrat	FLU 100 Fluor- benzol	FLU 100 Chlor- benzol	FLU 100 Toluol	FLU 100 Natrium- benzoat <sup>1</sup>	B13 Typ I Referenz Dorn 1978	B13 Typ II Referenz Dorn 1978
Catechol	100	100	100	100	100	100
3-Chlorcatechol	89	116	200	< 1	< 1	105
4-Chlorcatechol	59	67	93	10	11	96
3-Fluorcatechol	22	32	28	< 1	< 1	27
4-Fluorcatechol	72	83	133	51	30	148
3-Methylcatechol	167	187	215	11	11	337
4-Methylcatechol	220	189	216	53	92	316

<sup>1</sup> Ergebnisse aus dem Jahr 2000. FLU 100 wächst mittlerweile nicht mehr auf Natriumbenzoat.

Die Arbeitsgruppe von Dr. D. Pieper am HZI in Braunschweig erzielte die in Tabelle 36: angegebenen absoluten Umsatzraten der Catechol-1,2-dioxygenase(n) nach Wachstum auf Fluorbenzol. Diese Werte entsprechen weitestgehend unseren in Tabelle 35 dargestellten Ergebnissen.

**Tabelle 36: Absolute Umsatzzahlen der Ringspaltenden Enzymatik**

Das Muster entspricht weitestgehend dem in Tabelle 35 beschriebenen Muster. Die Umsatzraten sind in "enzyme unit" [U], d.h.  $10^{-6}$  mol Umsatz pro Minute und Gramm Gesamtprotein angegeben.

Substrat	Aktivität (U / g)
Catechol	360 ± 40
3-Chlorcatechol	330 ± 30
4-Chlorcatechol	180 ± 20
3-Fluorcatechol	75 ± 10
4-Fluorcatechol	380 ± 40

### 5.5.3. Muconatcycloisomerase und Dienlactonhydrolase

Die Arbeitsgruppe von Dr. D. Pieper am HZI in Braunschweig ermittelte die in Tabelle 37 angegebenen Umsatzraten für die Muconatcycloisomerase und die Dienlactonhydrolase.

Die Muconatcycloisomerase von FLU 100, welche durch die Anwesenheit von Fluorbenzol induziert wird, setzt 2-Chlormuconat und 3-Fluormuconat gut um. Unsubstituiertes Muconat sowie 3-Chlormuconat werden nur mäßig gut umgesetzt. Interessanterweise wird 2-Fluormuconat nur äußerst zögerlich metabolisiert, siehe Diskussion (Schmidt 1980 und 1984, Schlömann 1993, Kaulmann 2001, Moiseeva 2002, Skiba 2002, Solyanikova 1995 und 2003, Laemli 2002 und 2004, Pollmann 2005, Kapitel 6.5.).

Erwartungsgemäß kann die von dem Stamm FLU 100 beim Fluorbenzolabbau exprimierte Dienlactonhydrolase nur das *cis*-Dienlacton umsetzen. Das fluoriierte *trans*-Isomer kommt im bakteriellen Kontext selten vor (Schmidt 1990, Maltseva 1994).

**Tabelle 37: Umsatzraten der Muconatcycloisomerase und der Dienlactonhydrolase für verschiedene Substrate**

Enzym	Substrat	Aktivität (U / g)
Muconatcycloisomerase	Muconat	12 ± 5
Muconatcycloisomerase	2-Chlormuconat	15 ± 20
Muconatcycloisomerase	3-Chlormuconat	20 ± 5
Muconatcycloisomerase	2-Fluormuconat	>0.5
Muconatcycloisomerase	3-Fluormuconat	105 ± 15
Dienlactonhydrolase	<i>cis</i> -Dienlacton	5 ± 10
Dienlactonhydrolase	<i>trans</i> -Dienlacton	0 ± 10

## 5.6. Genetik

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der genetischen Experimente zusammengefasst. Dabei handelt es sich vor allem um die Gewinnung und Untersuchung von Transposonmutanten zur Aufklärung des Aromatenabbauweges von Fluorbenzol in dem Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100.

### 5.6.1. Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese dient der Gewinnung von knock – out - Mutanten des Stammes FLU 100. Zellen des Wildtypes dieses Stammes werden mit geeigneten Donorzellen (siehe Kapitel 3.9.2.) gekreuzt, das Transposon wird übertragen und in das Genom an einer nahezu

wahlfreien Stelle inseriert. Ist dabei ein Enzym des Fluorbenzolabbauweges getroffen, dann produzieren diese Mutanten bei der Konfrontation mit Fluorbenzol entsprechende Metabolite, deren Struktur dann analysiert werden kann.

Als Transformanten werden Zellen von FLU 100 bezeichnet, die durch die Transposonmutagenese die Kanamycinresistenz erworben haben. Mutanten sind solche Zellen, bei denen der Abbauweg von Fluorbenzol unterbrochen worden ist, die also nicht mehr produktiv auf diesem Substrat wachsen können.

Die Transposonmutagenese wurde mittels verschiedener Tn5 Varianten durchgeführt. Als Donorsträmme dienten *Escherichia coli* S17.1 dyT miniTn5-Km und *Escherichia coli* pCro2a / miniTn5495.

Die Transposonmutagenese besteht aus drei Schritten. Zuerst werden Zellen von FLU 100 mit dem Donorstamm auf einem geeigneten Träger, in der Regel eine Nitrocellulosemembran, in Kontakt gebracht (Mating). Nach 24 Stunden werden die Zellen resuspendiert und auf das Selektionsmedium ausgebracht. Dieses enthält Kanamycin, jedoch ausschließlich Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Hier können einzig transformierte FLU 100 Zellen wachsen, nicht jedoch der Wildtyp von FLU 100 oder die Zellen des Donorstammes. Die Transformanten werden in einem weiteren Schritt überimpft und auf ihre Fähigkeit überprüft, Fluorbenzol zu verwerten. Nur fluorbenzolnegative Zellen werden überimpft.

### 5.6.2. Korrelation zwischen optischer Dichte und der Zellkonzentration

Für die eigentliche Durchführung der Transposonmutagenese war es wichtig, die Zellkonzentrationen in verschiedenen Suspensionen abschätzen zu können, damit für die Transposonmutageneseansätze Zellmischungen mit der gleichen Anzahl aus Donor- und Rezipientenzellen hergestellt werden konnten. Es wurden die in Tabelle 38 dargestellten Beziehungen zwischen Zellkonzentration und optischer Dichte nach der in Kapitel 4.4.6. beschriebenen Methode bestimmt und verwendet. Alle bestimmten Beziehungen beziehen sich auf die exponentielle Wachstumsphase der entsprechenden Stämme.

**Tabelle 38: Faktoren zur Umrechnung der optischen Dichte bei 546 nm auf Zellkonzentrationen**

Stamm	Substrat	Beziehung
FLU 100	Fluorbenzol	$c = 7,1 \cdot 10^8 \cdot OD_{546}$ <sup>1</sup>
<i>Escherichia coli</i> S17.1 dyT miniTn5-Km	LB – Medium	$c = 2,0 \cdot 10^8 \cdot OD_{546}$ <sup>1</sup>
<i>Escherichia coli</i> pCro2a / miniTn5495	LB – Medium	$c = 2,4 \cdot 10^8 \cdot OD_{546}$

<sup>1</sup> Von Daniel Dobslaw bestimmt

### 5.6.3. Durchführung der Transposonmutagenese

Donor: *Escherichia coli* S17.1 dyT miniTn5-Km

Mit diesem Donor konnten in über 20 Versuchen keine Mutanten von FLU 100 gewonnen werden. Daher wurden die Versuche eingestellt. Ersatzweise wurde auf Mutanten zurückgegriffen, die von D. Dobslaw im Jahre 2003 gewonnen worden waren (Dobslaw 2003).

Donor: *Escherichia coli* pCro2a / miniTn5495

Versuche, Transformanten und fluorbenzolnegative Mutanten mittels dieses Donors zu gewinnen, verliefen von Anfang an erfolgreich. Die Matingansätze wurden stets im Verhältnis von 1 : 1 von Donor- und Rezipientenzellen durchgeführt.

Pro Matingansatz (siehe Kapitel 4.6.2.) konnten etwa 20 Platten mit 10 bis 200 Transformanten in Form von Kolonien mit 1 bis 2 mm Durchmesser erzielt werden. Jede dieser Kolonien wurde zeitnah auf Minimalmedium mit Kanamycin und auf Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin überimpft oder bei 6 °C gelagert. Diese Platten waren mit einem Raster versehen, so dass jede Transformante eindeutig zugeordnet werden konnte.

Insgesamt wurden ca. 16800 Transformanten gescreent. Die auf reinem Minimalmedium mit Kanamycin ausplattierten Transformanten wurden in einer fluorbenzolhaltigen Atmosphäre inkubiert.

Bei zu langer Lagerung der Agarplatten sinkt die Kanamycinkonzentration aufgrund des Resistenzmechanismus. Dieser beruht, anders als beispielsweise der Tetracyclinresistenzmechanismus, auf dem Abbau des Antibiotikums und nicht auf dessen Ausschleusung aus der betroffenen Zelle. Wird lokal die Konzentration von 2 mmol / L unterschritten, so können noch vorhandene Zellen des Wildtypes von FLU 100 beginnen aufzuwachsen. Wie sich gezeigt hat, steigt die Gefahr der Kontamination der Transformanten.

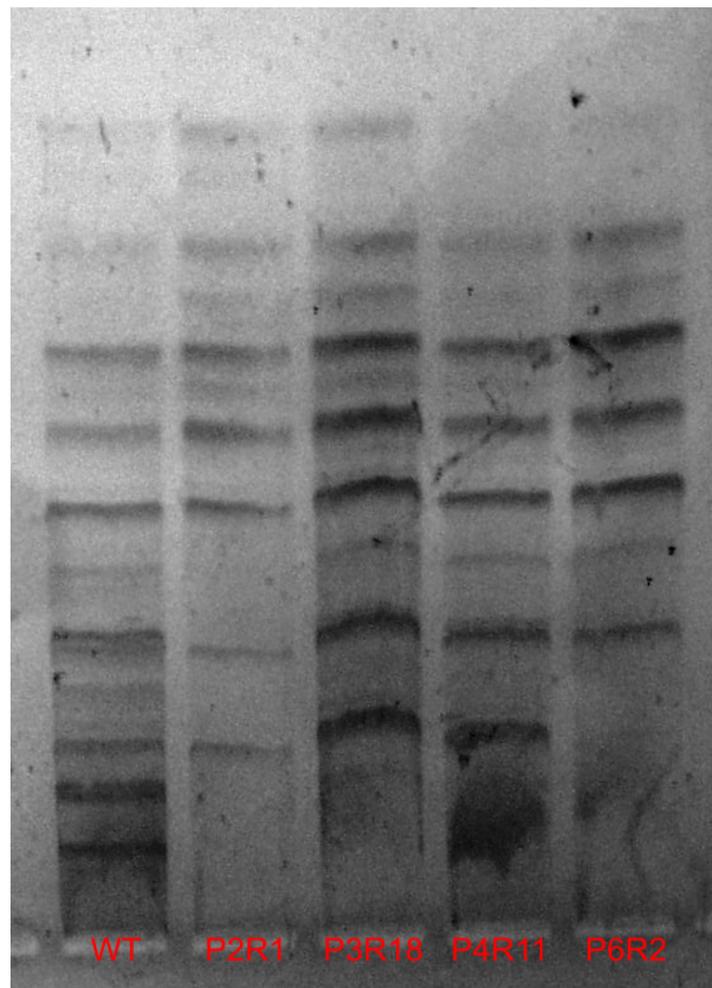
### 5.6.4. Screening der Transformanten

Das Screening der Mutanten erfolgte wie in Kapitel 4.6.2.4. beschrieben. Nach der Inkubation wurden die in fluorbenzolhaltiger Atmosphäre inkubierten Platten untersucht. Wenn hier nichts aufgewachsen war, konnte diese Transformante als Kandidat einer Mutante gelten, wenn im entsprechendem Raster auf dem Minimalmedium mit Glucose und Kanamycin Aufwuchs erhalten wurde. Diese Kandidaten wurden erneut auf Plattenpaare überimpft. Das Selektionsverfahren wurde viermal hintereinander durchgeführt, da manchmal nach dem Überimpfen auf den Fluorbenzolplatten doch Aufwuchs zu beobachten war. Insgesamt wurden ca. 120 knock – out - Mutanten als Kandidaten erhalten.

### 5.6.5. Untersuchung der Mutanten, Einsatz von genetischen Identifikationssystemen

Die Untersuchung der Transposonmutanten fand wie in Kapitel 4.6.2.5. beschrieben statt. Die erhaltenen Metabolite wurden mittels der HPLC (siehe Kapitel 4.8.2.2. und Kapitel 5.7.1) analysiert. Einzelne Mutanten wurden mit einer großen Anzahl von Substraten konfrontiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden dargestellt.

Die Identität aller getesteten Mutanten wurde mittels BOX- und ERIC – PCR überprüft. Es konnte keine Kontamination durch Fremdstämme festgestellt werden.



**Bild 87: Beispiel einer BOX – PCR zur Überprüfung der Identität von Mutanten**

Durch den Vergleich der Bandenmuster ist sichergestellt, dass alle getesteten Mutanten der Spezies *Burkholderia fungorum* FLU 100 angehören.

### 5.6.6. Untersuchung der von den Mutanten gebildeten Metabolite

Alle Transposonmutanten von FLU 100, welche kein Fluorbenzol mehr verwerten konnten, wurden mittels des in Kapitel 4.6.2.5. dargestellten Verfahrens auf Metabolitproduktion nach dem Umsatz von Fluorbenzol untersucht. Mutanten, die Metabolite aus Fluorbenzol produzieren, wurden danach auch mit anderen Substraten konfrontiert. Es zeigte sich, dass bestimmte Metabolitengruppen auftraten, die im folgenden dargestellt sind.

#### 5.6.6.1. Metabolitengruppe Diendiole (Mutante FLU 100 P2R5)

Bei FLU 100 P2R5 handelt es sich um eine Mutante des Stammes FLU 100, bei der offenbar die Diendioldehydrogenase deaktiviert ist. Beim Umsatz von Aromaten, die vom Wildtyp vollständig abgebaut werden, setzt die Mutante in Gegenwart von Glucose als Stützsubstrat die entsprechenden Diendiole frei (Tabelle 39). Es wurden zahlreiche Substrate mit dieser Mutante umgesetzt und die erhaltenen Metabolite auf verschiedene Weisen analysiert. Die Retentionsvolumina und Spektren (HPLC), gaben Hinweise auf die Identität der Metabolite. Durch Kochen bei pH 1 werden Diendiole in Phenole überführt (Kapitel 5.7.1.1.). Diese können durch Retentionsvolumen- und Spektrenvergleich mit Standards sowie durch Aufstocken ("spiken") identifiziert werden. Außerdem konnten die Strukturen der Metabolite durch  $^1\text{H}$  – NMR Messungen direkt aufgeklärt werden (Kapitel 5.7.1.1.).

**Tabelle 39: Metabolitbildung (Diendiole) durch die Mutante FLU 100 P2R5**

Gewonnen wurden die Diendiole durch Konfrontation der Zellen während des Wachstums in Minimalmedium mit Kanamycin und Glucose mit dem entsprechenden Substrat.

Substrat	Hauptmetabolit	Identifikation
Fluorbenzol	3-Fluordiendiol	HPLC, Spektrenvergleich, NMR
Chlorbenzol	3-Chlordiendiol	HPLC, Spektrenvergleich, NMR
Brombenzol	3-Bromdiendiol	HPLC, NMR
Iodbenzol	3-Ioddiendiol	HPLC, NMR
Benzol	Diendiol	HPLC, Spektrenvergleich, NMR
Toluol	3-Methyldiendiol	HPLC, Spektrenvergleich, NMR
1,4-Difluorbenzol	3,6-Difluordiendiol	HPLC, Spektrenvergleich, NMR
4-Fluortoluol	3-Fluor-6-methyldiendiol	HPLC, Spektrenvergleich, NMR
4-Fluoriodbenzol	3-Iod-6-fluordiendiol	HPLC
4-Fluorbrombenzol	3-Brom-6-fluordiendiol	HPLC
3-Fluorphenol	<i>keine Metabolite</i>	-
4-Fluorphenol	<i>keine Metabolite</i>	-

Es zeigte sich, dass monosubstituierte Benzole durch FLU 100 P2R5 in an der 3-Position substituierte Diendiole überführt werden. 1,4-disubstituierte Benzole werden zu 3,6-substituierten Diendiolen oxydiert. Es gab auch Hinweise auf weitere Diendiole, mutmaßlich an der 4-Position substituiert, die parallel zu den 3-substituierten Diendiolen gebildet werden. Diese konnten jedoch aufgrund ihrer geringen Konzentrationen nicht bestimmt werden (zur Diendioldehydrogenase siehe auch: Reinecke 1978, Simpson 1987, Boyd 1991, 1997 und 1998, Spiess 1996, Raschke 1999 und 2001).

#### 5.6.6.2. Metabolitengruppe Catechole

##### (Mutanten FLU 100 P14R22, FLU100 P15R11 und FLU 100 T6)

Bei diesen Mutanten des Stammes FLU 100 ist offenbar die Catechol-1,2-dioxygenase deaktiviert (zur Genetik der Catechol-1,2-Dioxygenase siehe Eulberg 1997 und 1998). Beim Umsatz von Aromaten, die vom Wildtyp vollständig abgebaut werden, setzt die Mutante in Gegenwart von Glucose als Stützsubstrat die entsprechenden Catechole frei (siehe Tabelle 40 und Tabelle 41). Es wurden zahlreiche Substrate mit diesen Mutanten umgesetzt und die erhaltenen Metabolite auf verschiedene Weisen analysiert (siehe Kapitel 5.7.1.2.).

Diese catecholproduzierenden Mutanten wurden verwendet, um die jeweiligen Anteile von 3- und 4-substituierten Produkten durch das initiale Dioxygenasesystem von FLU 100 zu bestimmen (siehe Tabelle 40).

**Tabelle 40: Metabolitbildung (Catechole) durch die Mutanten FLU 100 P14R22, FLU 100 P15R11 und FLU 100T6**

Gewonnen wurden die Catechole durch Konfrontation der Zellen während des Wachstums in Minimalmedium mit Kanamycin und Glucose mit dem entsprechenden Substrat. Dargestellt sind die relativen Anteile der jeweiligen 3- und 4- substituierten Catechole.

Substrat	%	3- subst. Catechol	%	4- subst. Catechol
Fluorbenzol	98,8	3-Fluorcatechol <sup>1</sup>	1,2	4-Fluorcatechol <sup>1</sup>
Chlorbenzol	97,0	3-Chlorcatechol <sup>1</sup>	3,0	4-Chlorcatechol <sup>1</sup>
Brombenzol	> 95,0	3-Bromcatechol	< 5,0	4-Bromcatechol
Iodbenzol	> 95,0	3-Iodcatechol	< 5,0	4-Iodcatechol
2-Fluorphenol	100,0	3-Fluorcatechol <sup>1</sup>	0,0	4-Fluorcatechol <sup>1</sup>
3-Fluorphenol	83,5	3-Fluorcatechol <sup>1</sup>	16,5	4-Fluorcatechol <sup>1</sup>
4-Fluorphenol	0,0	3-Fluorcatechol <sup>1</sup>	100,0	4-Fluorcatechol <sup>1</sup>
Toluol	93,1	3-Methylcatechol <sup>1</sup>	6,9	4-Methylcatechol <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Standards lagen vor

**Tabelle 41: Metabolitbildung durch die Mutanten FLU 100 P14R22 und FLU 100T6**

(Substrate, die nur zu einem Catechol umgesetzt werden)

Substrat	%	Catechol
Benzol	100,0	Catechol <sup>1</sup>
1,4-Difluorbenzol	100,0	3,6-Difluorcatechol
4-Fluortoluol	100,0	3-Fluor-6-methylcatechol
4-Fluoriodbenzol	100,0	3-Iod-6-fluorcatechol
4-Fluorbrombenzol	100,0	3-Brom-6-fluorcatechol

<sup>1</sup> Standard lag vor**5.6.6.3. Metabolitengruppe Muconate (Mutanten FLU 100 P11R7 und FLU 100 P14R4)**

Bei diesen Mutanten des Stammes FLU 100 ist offenbar die Cycloisomerase deaktiviert. Beim Umsatz von Aromaten, die vom Wildtyp vollständig abgebaut werden, setzt die Mutante in Gegenwart von Glucose als Stützsubstrat die entsprechenden Muconate frei, teilweise auch in Kombination mit Catecholen (siehe Tabelle 42). Es wurden zahlreiche Substrate mit diesen Mutanten umgesetzt und die erhaltenen Metabolite auf verschiedene Weisen analysiert (siehe Kapitel 5.7.1.3). Keine der Mutanten vermochte es, 1,4-Difluorbenzol in eine Muconsäure zu überführen, es wurde stets 3,6-Difluorcatechol gebildet.

**Tabelle 42: Metabolitbildung (Muconsäuren) durch die Mutanten FLU 100 P11R7 und FLU 100 P14R4**

Gewonnen wurden die Muconate durch Konfrontation der Zellen während des Wachstums in Minimalmedium mit Kanamycin und Glucose mit dem entsprechenden Substrat. Ausnahme ist der Umsatz von 1,4-Difluorbenzol, welches nur zu 3,6-Difluorcatechol, einem Dead-End Metaboliten umgesetzt wird.

Substrat	Hauptmetabolit	Identifikation
Fluorbenzol	2-Fluormuconsäure	HPLC, Spektrenvergleich, Standard <sup>1</sup>
Chlorbenzol	2-Chlormuconsäure	HPLC, Spektrenvergleich, Standard <sup>1</sup>
Brombenzol	3-Brommuconsäure	HPLC, Spektrenvergleich
Iodbenzol	3-Iodmuconsäure	HPLC, Spektrenvergleich
Benzol	Muconsäure	HPLC, Spektrenvergleich, Standard <sup>1</sup>
Toluol	2-Methylmuconsäure	HPLC, Spektrenvergleich, Standard <sup>1</sup>
1,4-Difluorbenzol	<i>3,6-Difluorcatechol</i>	HPLC, Spektrenvergleich
4-Fluormethylbenzol	2-Fluor-4-methylmuconsäure	
4-Fluortoluol	3-Fluor-6-methylmuconsäure	HPLC, Spektrenvergleich

<sup>1</sup> Durch *Escherichia coli* Klon4 erzeugte Referenzsubstanz (siehe Kapitel 4.6.4.).

#### 5.6.6.4. Metabolitengruppe Muconolactone (Mutanten FLU 100 P2R3 und FLU 100 P13R15 sowie unter gewissen Bedingungen FLU 100 Wildtyp)

Diese Mutanten emittieren substituierte Muconolactone. Leider ist die Produktion dieser Metaboliten nicht vollständig reproduzierbar. So konnten nur wenige Muconolactone gefunden werden. Diese erwiesen sich als schlecht extrahier- und analysierbar. Beim Umsatz von 4-Fluorcatechol produziert der Wildtyp von FLU 100 zwei fluorierte Muconolactone (siehe Kapitel 5.3. und Kapitel 6.8.). Muconolactone werden von zahlreichen Mutanten produziert, oft neben anderen Metaboliten. Ihr Auftreten ist aber schlecht reproduzierbar. Zur Produktion und Analytik von Muconolactonen siehe auch: Cha, 2001.

#### Tabelle 43: Metabolitbildung (Muconolactone) durch die Mutanten FLU 100 P2R3 und FLU 100 P13R15 sowie FLU 100 WT

Gewonnen wurden die Muconolactone durch Konfrontation der Zellen während des Wachstums in Minimalmedium mit Kanamycin und Glucose mit dem entsprechenden Substrat.

Substrat	Metabolite	Identifikation
Fluorbenzol	Ein fluoriertes Muconolacton, wahrscheinlich 5-Fluoromuconolacton	HPLC, Spektrenvergleich
4-Fluorcatechol <sup>1</sup>	Zwei fluorierte Muconolactone, aufgrund sterischer Betrachtungen: 3-Fluoromuconolacton, 4-Fluoromuconolacton	HPLC, Spektrenvergleich
Toluol	5-Methylmuconolacton	HPLC, Standard
Benzol	Muconolacton	HPLC, Standard

<sup>1</sup> Umsatz durch den Wildtyp von FLU 100

#### 5.6.6.5. Gesamtergebnis der Mutantenuntersuchung

Neben den oben diskutierten Mutanten wurden noch weitere gefunden, die aus Benzol, Toluol oder Fluorbenzol Metabolite produzierten. Allerdings wurden für die genauere Untersuchung Mutanten ausgewählt, die alle drei Substrate in Metabolite überführen können.

Daneben tauchten bei den Analysen auch einige unbekannte Metabolite auf, welche zumeist einen sehr hydrophilen Charakter hatten. Diese konnten weder aufgrund ihres Retentionsvolumens noch ihres Absorptionsspektrums einem Standard zugeordnet werden.

**Tabelle 44: Liste aller Mutanten, die Metabolite produzieren**

Gestetet wurden die Substrate Fluorbenzol, Benzol und Toluol. Die Metabolite werden in die Klassen Diendiole (Die), Catechole (Cat), Muconate (Muc), Lactone (Lac) eingeteilt. Einige Mutanten produzieren mehr als einen Metaboliten. Unbekannte, durchweg sehr hydrophile Metabolite, sind gesondert gekennzeichnet. In der Tabelle steht das Symbol ++ für eine starke Metabolitproduktion (> ca. 500 µmol / L) bzw. das Symbol + für eine schwache Metabolitproduktion (< ca. 500 µmol / L).

**Farbcodierung**

unbekannt	Diendiole	Catechole	Muconate	Lactone	Dienlacton
-----------	-----------	-----------	----------	---------	------------

Name	Benzol	Toluol	Fluorbenzol
P1R4	-	-	+ Lac
P1R7	-	++ Cat + Lac + Muc	++ Cat
P2R3	-	-	+ Lac
P2R5	++ Die	++ Die	++ Die
P2R12	-	+ ?	-
P2R13	+ ?	-	-
P2R16	-	+ Cat	-
P3R4	++ Lac + ?	+ Cat	++ Cat ++ Muc
P3R10	+ Lac	-	+ Lac
P3R13	-	-	+ Die
P4R22	-	-	+ Cat
P5R6	-	++ Lac	+ Lac
P5R9	-	+ Cat + Muc	-
P6R5	-	+ Cat	-
P8R16	+ ?	++ ?	+ ?
P8R26	+ ?	+ ?	-
P9R4	-	+ Lac	+ Lac
P9R16	+ Lac	+ Lac	-
P11R7	-	+ Muc	+ Muc
P11R10	++ Cat	-	-
P12R11	-	++ Cat	-
P13R14	+ Lac	-	-
P13R15	++ Lac	++ Lac	-
P14R4	++ Cat ++ Muc	++ Cat	++ Cat + Muc
P14R22	++ Cat	++ Cat	++ Cat
P15R2	-	++ Cat + Muc	-
P15R9	-	+ Cat	++ Cat
P15R11	+ Cat	++ Cat	++ Cat
P15R20	++ Cat	+ Cat	+ Cat

Von 16800 gescreenten Transformanten konnten 120 knock – out – Mutanten gewonnen werden, dies entspricht 0,7 %. Nur 29 davon konnten reproduzierbar Metabolite aus den verschiedenen aromatischen Substraten produzieren.

Am häufigsten wurden Catechole produziert, während nur eine Mutante Diendiole ausschleust. Lactone werden nur selten reproduzierbar produziert.

#### **5.6.7. Identifikation des initialen Dioxygenasesystems**

Der Arbeitsgruppe von Dr. Dietmar Pieper (HZI Braunschweig) ist es gelungen, mittels Sondentechnik das initiale Dioxygenasesystem der Monohalogenbenzole zu identifizieren. Dieses System zeigt Ähnlichkeiten zu der Isopropyldioxygenase von *Pseudomonas* sp. JR1 (siehe Anhang 7.4.2, Irie 1987, Pflugmacher 1996). Weitere ähnliche Enzyme können durch den Sequenzvergleich ermittelt werden. So weist *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, plasmid pPNAP01, 81 % Übereinstimmung auf. *Burkholderia xenovorans* LB400 besitzt auf seinem Chromosom Nr. 3 eine zu 79 % übereinstimmende Sequenz (unveröffentlicht, US DOE Joint Genome Institute).

### **5.7. Analytische Methoden zur Identifikation von Metaboliten des Aromatenabbaus durch FLU 100**

#### **5.7.1. HPLC – Analysen**

Die verwendete HPLC – Anlage (siehe Kapitel 4.8.2.1.) hat sich als integrales Analysengerät für diese Arbeit erwiesen. Es konnten zahlreiche Metabolite des Aromatenabbaus durch den Stamm FLU 100 nachgewiesen werden. Tabelle 45 gibt die im Rahmen dieser Arbeit mittels der HPLC qualitativ und quantitativ analysierten Substrate sowie deren Metabolite dar. Eine Auflistung der optischen Spektren zwischen 200 und 350 nm sowie deren Absorptionsmaxima und –minima findet sich in Anhang 7.3.5. Die Identität der gefundenen Peaks wurde bei den dargestellten Verbindungen durch den Vergleich von Retentionszeiten, optischen Spektren (siehe Bild 92) und durch Aufstockung mittels käuflicher Standards bestätigt, die Diendiole konnten zudem durch NMR – Analysen und zusätzlich durch Derivatisierung identifiziert werden. Metabolite, für die keine Standards vorlagen, wurden durch Analogiebetrachtung hinsichtlich der jeweils produzierenden Mutanten sowie durch die charakteristischen Verläufe der UV - Absorptionsspektren und der Retentionsvolumina identifiziert.

Detaillierte Daten und Spektren können beim Autor angefordert werden.

**Tabelle 45: Retentionsvolumen und Bemerkungen zu den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Substrate und Metabolite von FLU 100, sortiert nach Retentionsvolumen**

Alle Daten beziehen sich auf das in Kapitel 4.8.2.1. beschriebene Fließmittelgemisch. Gemessen wurde mit dem UV/VIS – Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm. Angegeben sind die Retentionsvolumina  $R_V$  sowie erläuternde Bemerkungen und das eventuelle Vorhandensein von Referenzsubstanzen.

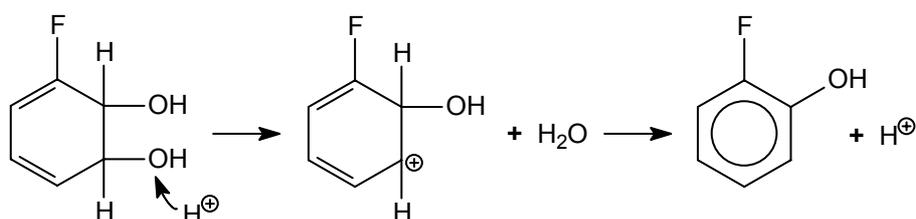
Substrate			Metabolite der Abbaukette				
Phenole	Benzoate	Benzole	Diendiole	Catechole	Muconate	Lactone	Dienlacton
Standards	$R_V$ [mL]		Bemerkungen				
Muconolacton	1,45		Standard vorhanden				
5-Fluormuconolacton	1,59		durch Spektrum und Analogiebetrachtung bestätigt				
3,6-Difluordiendiol	1,71		wird bei pH 1 nach 8,0 (2,5-Difluorphenol) verschoben				
Diendiol	1,74		wird bei pH 1 nach 4,8 (Phenol) verschoben				
3-Fluordiendiol	1,81		wird bei pH 1 nach 6,1 (2-Fluorphenol) verschoben				
3-Methylmuconolacton	1,90		Standard vorhanden				
5-Methylmuconolacton	2,20		Standard vorhanden				
3-Chlordiendiol	2,54		wird bei pH 1 nach 13 (2-Chlorphenol) verschoben				
3-Methyldiendiol	2,66		wird bei pH 1 nach 10,61 (2-Kresol) verschoben				
Catechol	2,68		Standard vorhanden				
Muconat	2,74		Standard vorhanden				
3-Methyldiendiol	2,62		wird bei pH 1 nach 10,6 (2-Kresol) verschoben				
3-Fluormuconat	2,77		Standard vorhanden (Klon4)				
3-Fluor-6-methyldiendiol	2,81		wird durch Säurekochen zu einem Phenolgemisch				
<i>cis, cis</i> -Dienlacton	2,85		weitere Peaks bei 1,50 (Lacton) und 1,87 ( <i>trans</i> -Isomer)				
2-Fluormuconat	3,05		Standard vorhanden (Klon4)				
3-Bromdiendiol	3,06		wird bei pH 1 nach 16,5 (2-Bromphenol) verschoben				
3-Fluorcatechol	3,43		Standard vorhanden				
3-Methylmuconat	3,52		Standard vorhanden (Klon4)				
3-Ioddiendiol	3,84		wird bei pH 1 zerstört (Iodfreisetzung)				
4-Fluorcatechol	3,95		Standard vorhanden				
3,6-Difluorcatechol	4,27		Identität durch HPLC – MS bestätigt				
2-Chlormuconat	4,38		Standard vorhanden (Klon4)				
3-Methylmuconat	4,45		Standard vorhanden (Klon4)				
2-Brommuconat	4,61		durch Spektrum und Analogiebetrachtung bestätigt				
4-Methylcatechol	4,70		Standard vorhanden				

Standards	R <sub>v</sub> [mL]	Bemerkungen
Benzylalkohol	4,79	Standard vorhanden
Phenol	4,81	Standard vorhanden
2-Methylmuconat	4,82	durch Spektrum und Analogiebetrachtung bestätigt
2-Fluor-5-methylmuconat	5,65	durch Spektrum und Analogiebetrachtung bestätigt
3-Methylcatechol	5,75	Standard vorhanden
2-Iodmuconat	5,99	durch Spektrum und Analogiebetrachtung bestätigt
2-Fluorphenol	6,18	Standard vorhanden
4-Fluorphenol	6,69	Standard vorhanden
2-Fluorbenzoat	7,07	Standard vorhanden
3-Chlorcatechol	7,57	Standard vorhanden
2,5-Difluorphenol	8,04	Standard vorhanden
3-Fluorphenol	8,26	Standard vorhanden
3-Bromcatechol	8,92	durch Spektrum und Analogiebetrachtung bestätigt
Benzaldehyd	9,17	Standard vorhanden
4-Chlorcatechol	9,75	Standard vorhanden
2-Kresol	10,61	Standard vorhanden
Benzoat	11,03	Standard vorhanden
4-Kresol	11,48	Standard vorhanden
3-Kresol	11,51	Standard vorhanden
2-Chlorphenol	13,07	Standard vorhanden
2-Fluor-5-methylphenol	13,29	Standard vorhanden
4-Fluorbenzoat	13,34	Standard vorhanden
3-Fluorbenzoat	13,85	Standard vorhanden
3-Iodcatecol	14,21	Standard vorhanden
2-Bromphenol	16,37	Standard vorhanden
4-Chlorphenol	18,00	Standard vorhanden
Fluorbenzol	22,15	Standard vorhanden
Chlorbenzol	58,74	Standard vorhanden
Brombenzol	> 60,00	Standard vorhanden
Iodbenzol	> 90,00	Standard vorhanden

### 5.7.1.1. Identifikation der Diendiole

Mittels der Mutante P2R5 wurden zahlreiche unterschiedlich substituierte Diendiole erzeugt (siehe Tabelle 39). Diese Metabolite sind hydrophiler als die meisten anderen Metabolite und eluieren daher, unter den Standardbedingungen dieser Arbeit (siehe Kapitel 4.8.2.1.) vor diesen in der HPLC.

Diendiole sind nur in neutralem und alkalischem Milieu stabil. Im Säuren gehen sie unter Wasserabspaltung in Phenole über. Dabei hat sich gezeigt, dass stets die dem Substituenten nahe stehende Hydroxylgruppe am Ring erhalten bleibt (siehe Bild 88).

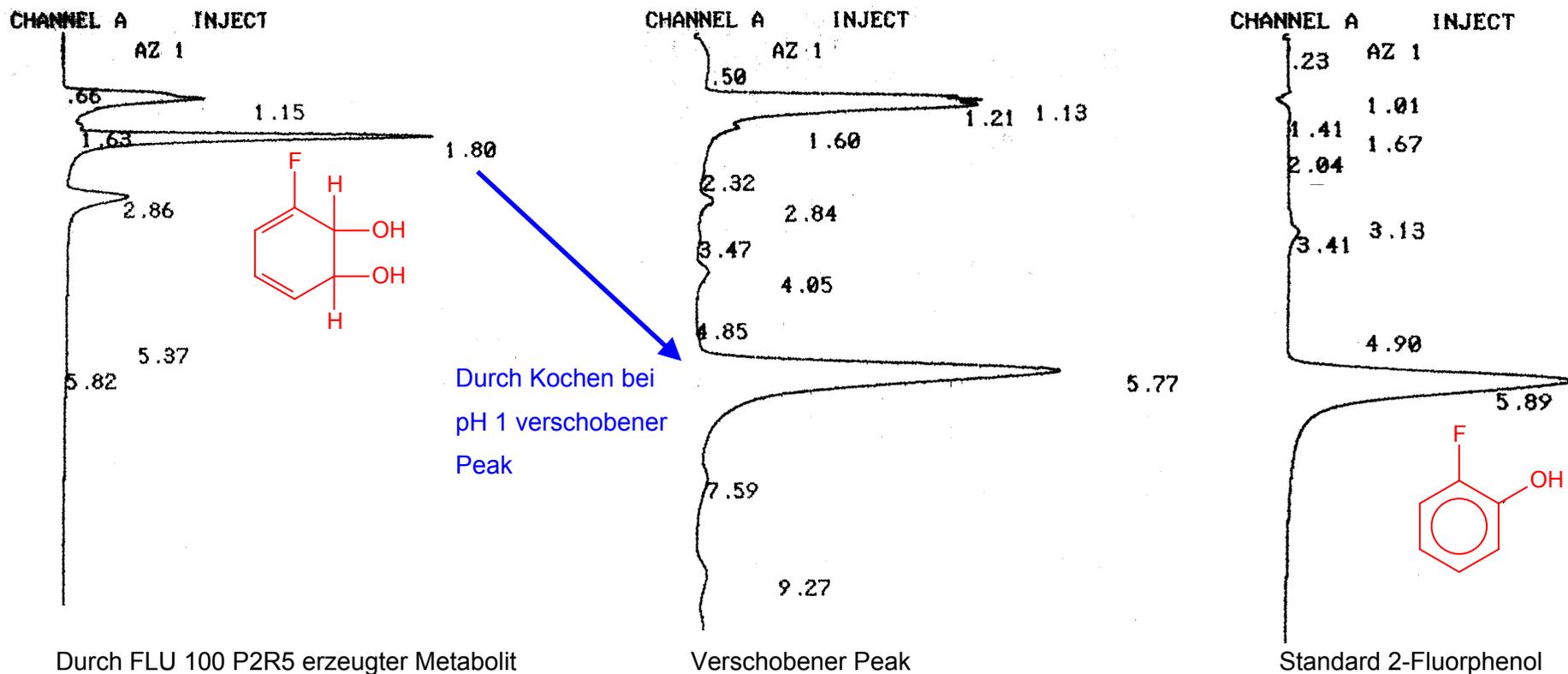


**Bild 88: Umwandlung von 3-Fluordiendiol im sauren Milieu in 2-Fluorphenol**

Dieses Verhalten kann zur Identifikation von Diendiolen herangezogen werden. Das hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu Diendiolen verschiedenste Phenole als Standards im Handel beziehbar sind.

Die Diendole konnten in dieser Arbeit ausführlich untersucht werden. Als Beispiel ist die Identifikation von 3-Fluordiendiol ausgeführt. Die Mutante FLU 100 P2R5 produziert beim Wachstum auf Glucose und mit Fluorbenzol konfrontiert einen hydrophilen Metaboliten (Bild 89, links). Dieser Ansatz wird mit einem Zehntel Volumen *ortho*-Phosphorsäure versetzt und 5 Minuten gekocht. Dadurch verschwindet der hydrophile Peak und es erscheint ein neuer, deutlich weniger hydrophiler Peak (Bild 89, Mitte). Dieser hat ein sehr ähnliches Retentionsvolumen wie 2-Fluorphenol (Bild 89, rechts). Die optischen Spektren der durch Säurekochen erhaltenen Substanz können sogar mit dem von 2-Fluorphenol zu Deckung gebracht werden (siehe Bild 90). Die Ausgangssubstanz, das 3-Fluordiendiol, weicht mit seinem Spektrum deutlich ab. Es zeigt die Charakteristika eines konjugierten Systems, nicht die eines Aromaten.

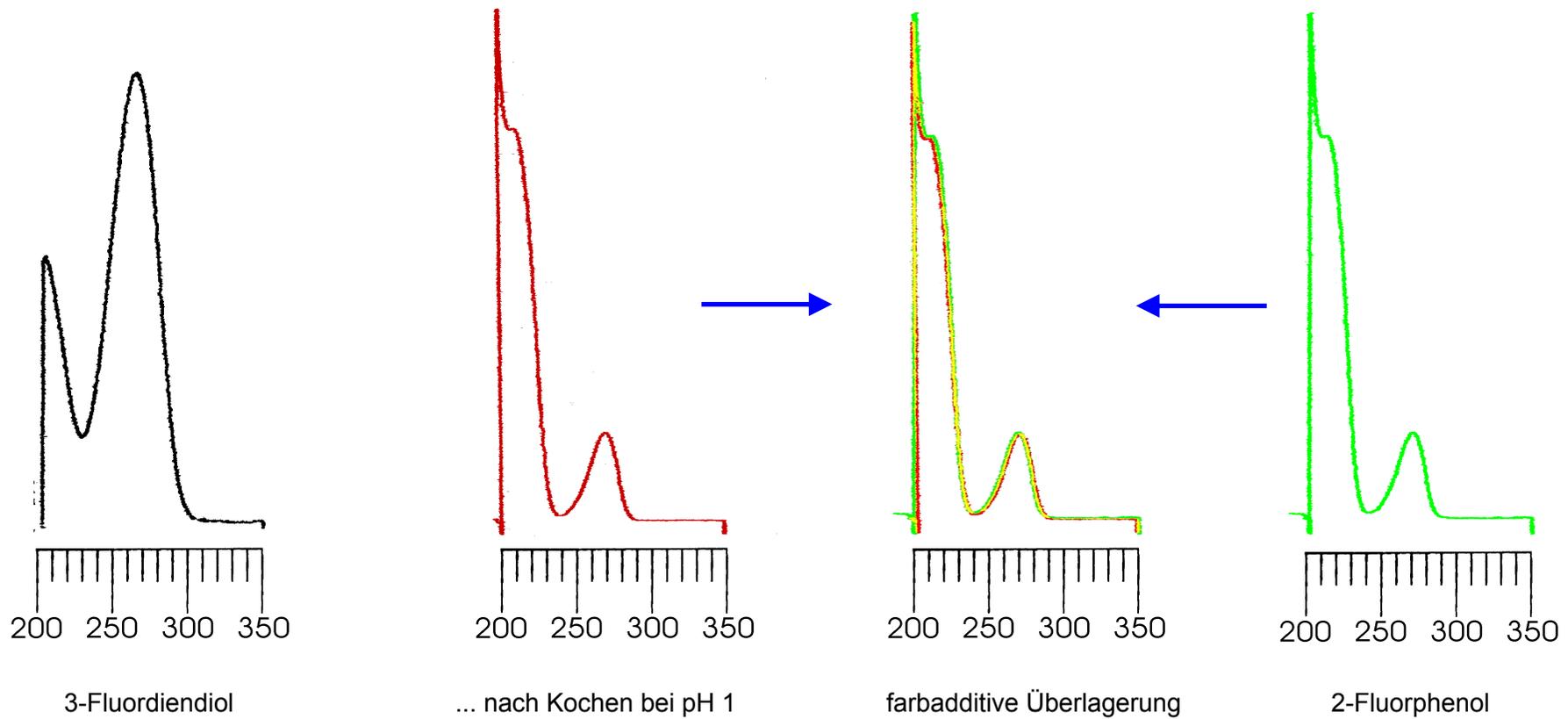
Von den verschiedenen von der Mutante P2R5 erzeugten Diendiolen konnten  $^1\text{H}$ -NMR Spektren angefertigt werden, ein Beispiel ist in Bild 91 dargestellt. Diese belegen die vorgeschlagenen Strukturen (siehe Tabelle 39).



**Bild 89: Produktion von 2-Fluordiendiol durch die Mutante FLU 100 P2R5. Diese wurde in Kanamycin - Minimalmedium mit 10 mmol / L Glucose und in Gegenwart von Fluorbenzol angezogen**

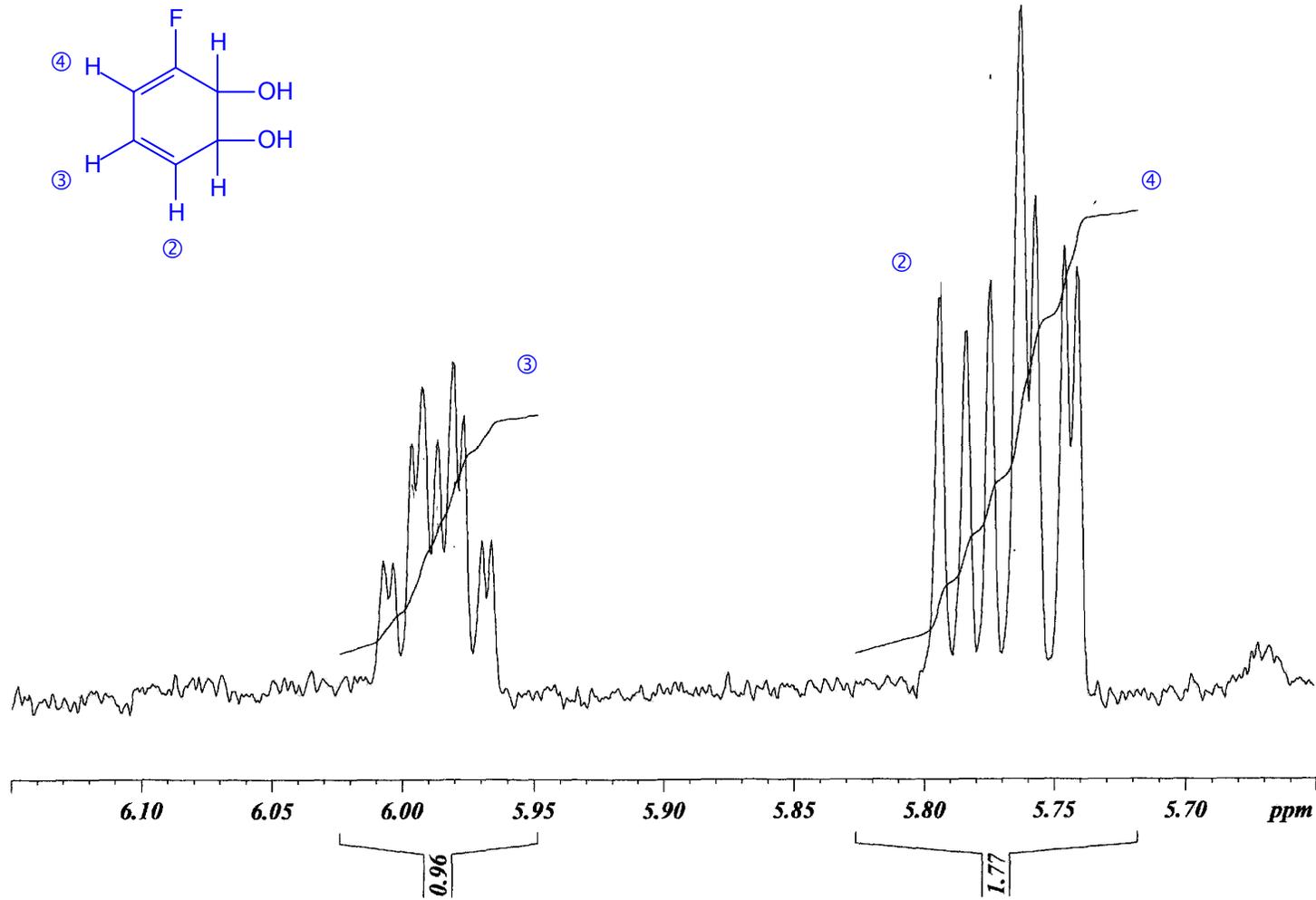
Links dargestellt ist das HPLC Spektrum bei 25 % Methanol, 1‰ *ortho* – Phosphorsäure im wässrigen Eluenten, 100 mm RP18 Säule. Bei einem Retentionsvolumen von 1,15 mL führen die anorganischen Ionen zu einem Peak. Bei 1,80 mL erscheint das gesuchte 3-Fluordiendiol. Der Peak bei 2,86 mL wird von Kanamycin hervorgerufen.

Für das in der Mitte wiedergegebene HPLC – Spektrum wurde der Ansatz im Verhältnis 1 : 10 mit 85 % *ortho* – Phosphorsäure gemischt und für 5 Minuten bei 105 °C gekocht. Dadurch verschwindet der Peak des 3-Fluordiendiols und es tritt ein neuer Peak bei einem Retentionsvolumen von 5,77 mL auf. Rechts ist das Spektrum von 2-Fluorphenol als Standard dargestellt. Das Retentionsvolumen von 2-Fluorphenol stimmt gut mit demjenigen der durch Kochen erzeugten Substanz überein. Gezeigt sind Kopien der Original - Ausdrucke.



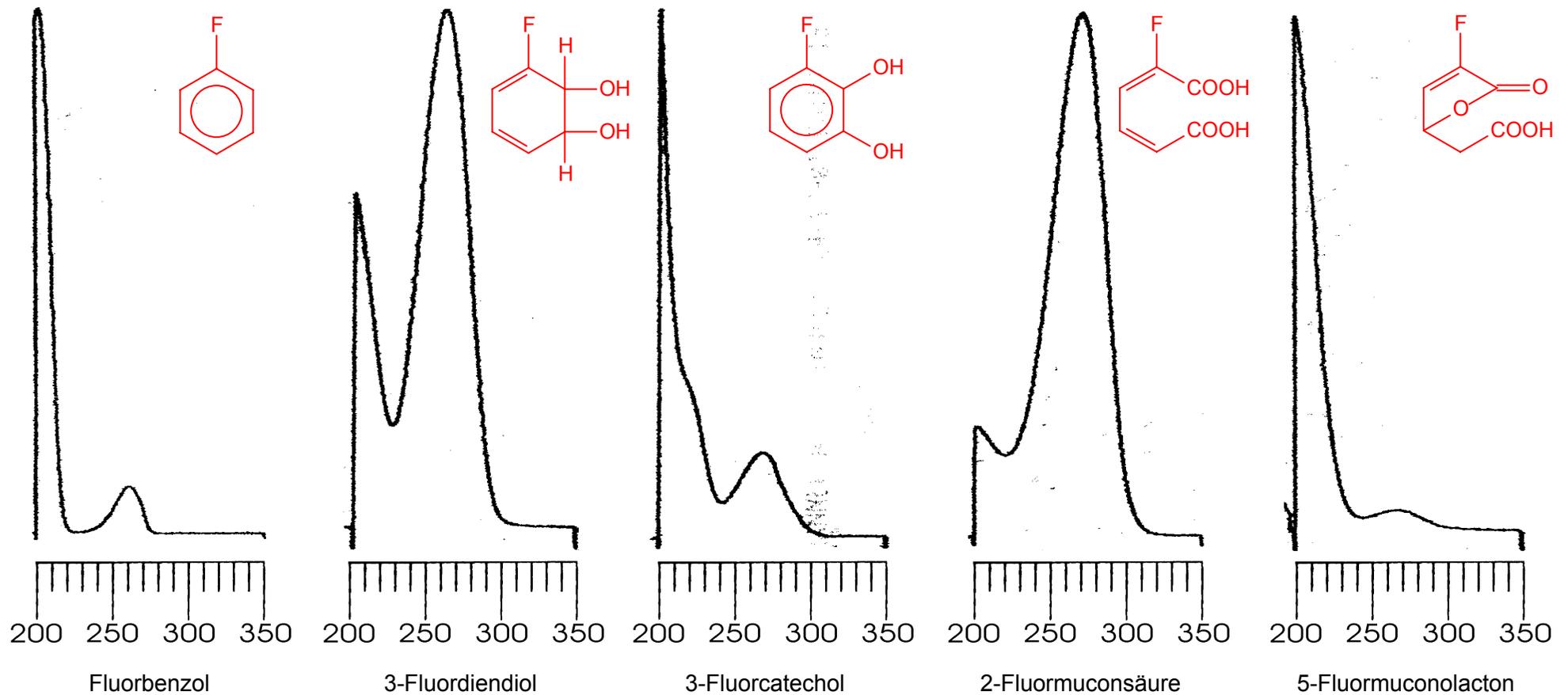
**Bild 90: Absorptionsspektren zwischen 200 und 350 nm Wellenlänge**

Schwarz dargestellt ist das Spektrum des durch die Mutante FLU 100 P2R5 aus Fluorbenzol produzierten 3-Fluordiendiols (siehe Bild 89, rechtes Spektrum, Peak bei 1,80 Minuten). Dieses geht durch Kochen bei pH 1 in eine Substanz über, deren Spektrum rot dargestellt ist. In grün sieht man das Absorptionsspektrum von reinem 2-Fluorphenol. Dessen Spektrum deckt sich nahezu vollständig mit dem Spektrum des in rot dargestellten Produktes (additive Farbmischung).



**Bild 91:** <sup>1</sup>H - NMR – Spektrum von 3-Fluordioldiol, produziert von der Mutante P2R5 beim Wachstum auf Fluorbenzol und Glucose

Die Resonanz bei einer chemischen Verschiebung von 5,96 bis 6,01 (Abszisse) wird vom Proton an der 3-Position, diejenigen zwischen 5,73 bis 5,80 von den Protonen an der 3- und 4-Position hervorgerufen. Nicht sichtbar sind die Hydroxylprotonen. (Kopie des Originalausdrucks)



**Bild 92: Absorptionsspektren von Fluorbenzol und seiner mit Hilfe der Transposonmutanten gewonnenen Hauptmetabolite**

Anhand der charakteristischen Verläufe können diese Substanzklassen mittels der HPLC identifiziert werden. Fluorbenzol (Gilbert 1971) 3-Fluordiendiol und 2-Fluormuconsäure verfügen über jeweils zwei konjugierte Doppelbindungen, die für die starke Absorptionsbande zwischen 260 und 280 nm verantwortlich sind. Fluorbenzol und 3-Fluorcatechol zeigen das charakteristische Spektrum benzoider Systeme.

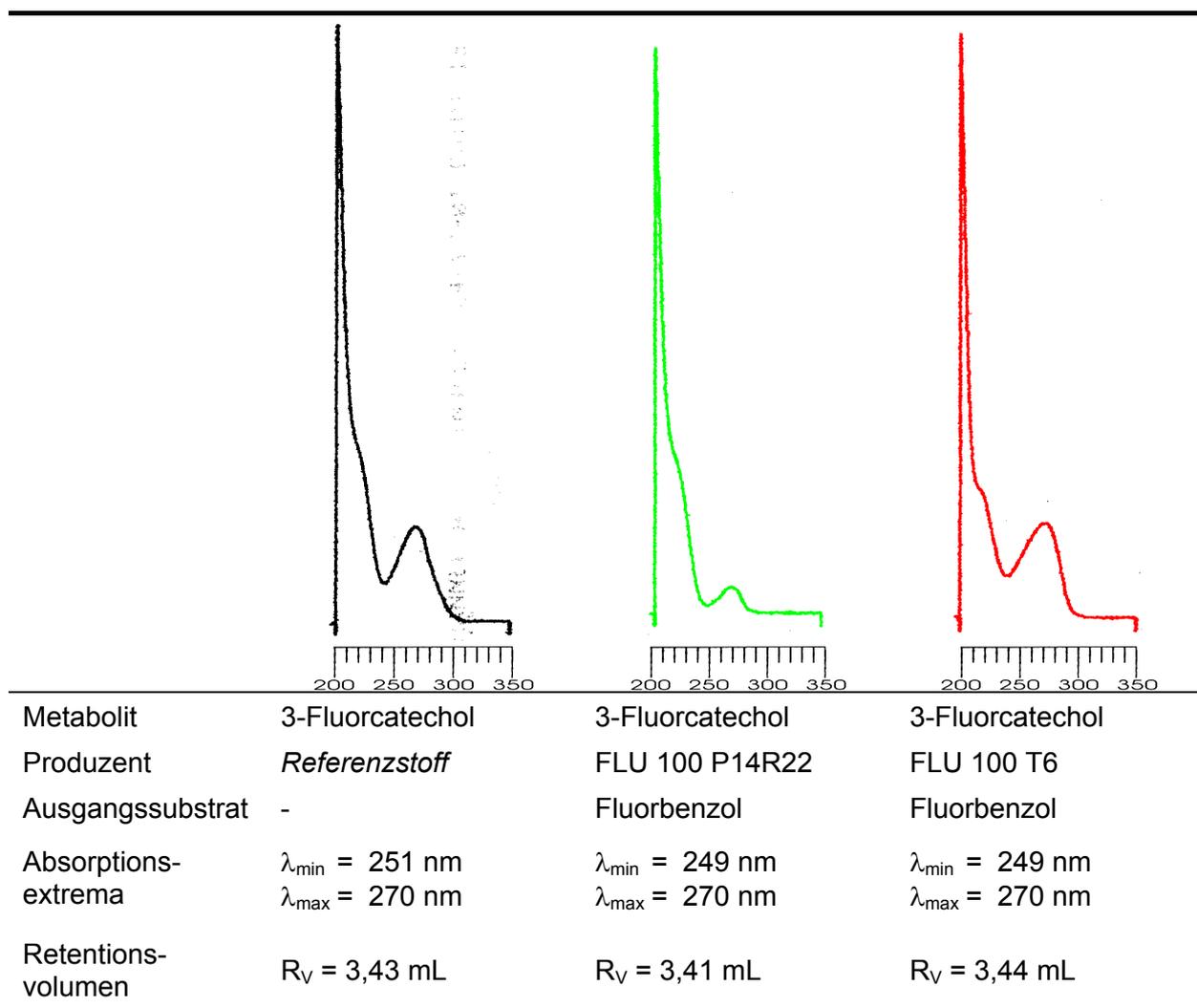
### 5.7.1.2. Identifikation der Catechole

Catechol, 3-Fluorcatechol, 4-Fluorcatechol, 3-Chlorcatechol, 4-Chlorcatechol, 3-Methylcatechol und 4-Methylcatechol lagen als Standards vor. Die Identität von 3-Bromcatechol, 3-Iodcatechol und 3,6-Difluorcatechol konnte durch ihre Herkunft (siehe Kapitel 5.7.2.), also durch die jeweils verwendete Mutante, ihre optischen Spektren und ihre Retentionsvolumen aufgedeckt werden (siehe Tabelle 46).

Zusätzlich konnte die molekulare Masse des vermuteten 3,6-Difluorcatechol durch eine HPLC – MS – Bestimmung bestätigt werden (siehe Kapitel 5.7.2).

**Tabelle 46: Beispiel zur Identifikation des Metaboliten 3-Fluorcatechol**

Dargestellt ist die Referenz für diesen Metaboliten, eine käufliche Chemikalie. Daneben sind die durch die Mutanten FLU 100 P14R22 und FLU 100 P14R6 produzierten Metabolite mit ihren spektroskopischen Daten und Retentionsvolumina angegeben. (Die gemessenen Spektren sind auf dieselbe Höhe normiert). Die gemessenen Daten legen es nahe, dass es sich bei allen drei Proben um die selbe Substanz handelt.

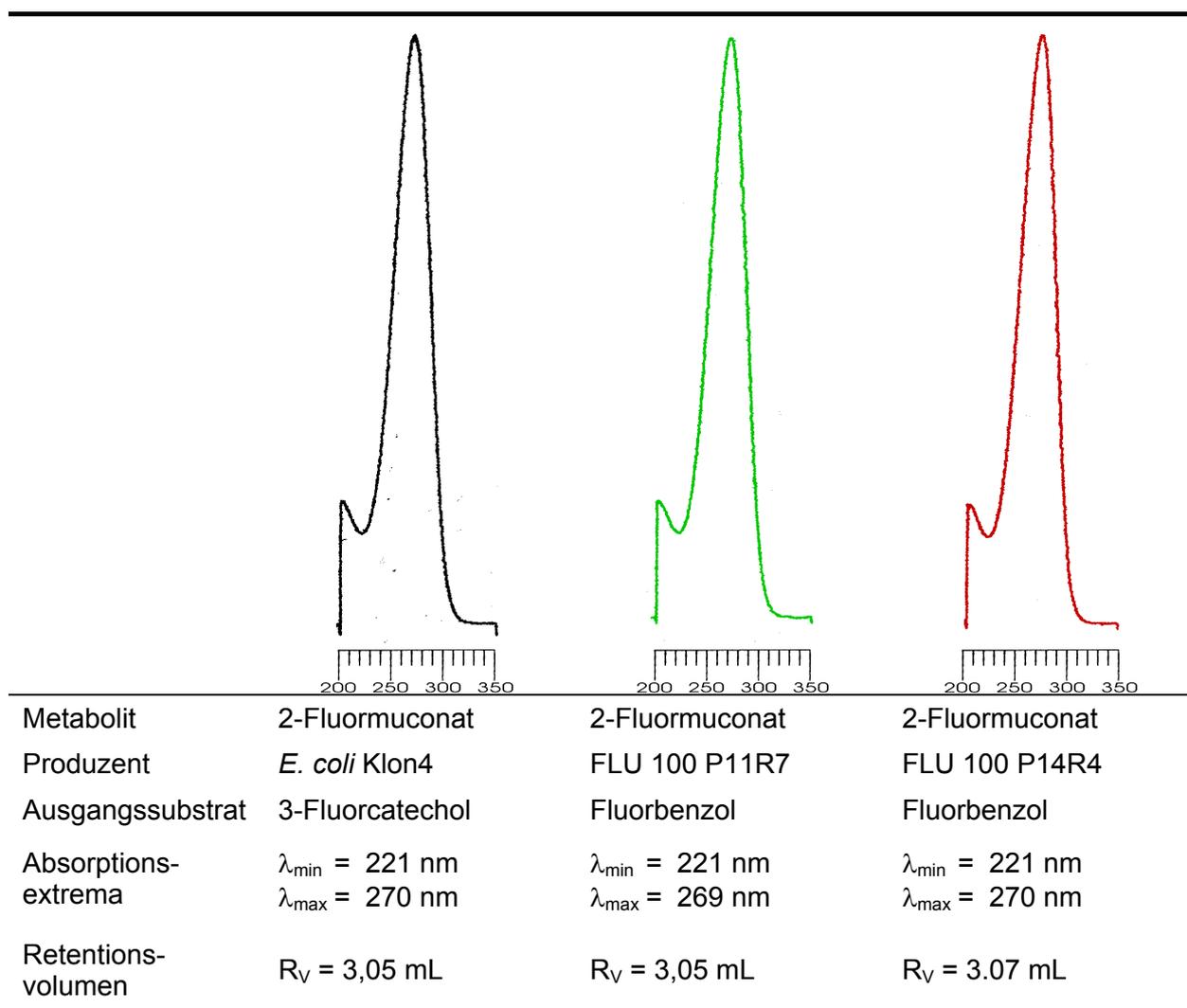


### 5.7.1.3. Identifikation der Muconate

Für Muconsäurederivate lagen bis auf die unsubstituierte Variante keine Standards vor. Einige Muconate konnten jedoch durch den Einsatz von *Escherichia coli* Klon 4 erzeugt werden (siehe Tabelle 42). In Tabelle 47 ist beispielhaft die Identifikation der 2-Fluormuconsäure angegeben. Analog wurden auch 3-Fluormuconsäure, 2-Chlormuconsäure und 2-Methylmuconsäure identifiziert. Die weiteren Muconate verfügen aufgrund ihrer konjugierten Doppelbindungen über eine charakteristische Absorptionsbande im Bereich von, je nach Substitution, 260 bis 280 nm (vergleiche Bild 92 und Anhang 7.3.6.) und können anhand ihres UV – Spektrums identifiziert werden.

#### Tabelle 47: Beispiel zur Identifikation des Metaboliten 2-Fluormuconat

Dargestellt sind die Referenz für diesen Metaboliten, das durch *E. coli* Klon4 aus 3-Fluorcatechol produzierte 2-Fluormuconat. Daneben sind die durch die Mutanten FLU 100 P11R7 und FLU 100 P14R4 produzierten Metabolite mit ihren spektroskopischen Daten und Retentionsvolumina angegeben.



#### 5.7.1.4. Identifikation der Muconolactone

Die Zuordnung von Muconolactonen erwies sich als schwer, da hier geeignete Standards fehlten. Die Konformation von substituierten Muconolactonen konnte nicht in allen Fällen aufgedeckt werden. Unsubstituiertes Muconolacton und 2-Methylmuconolacton lagen als Standards vor. So konnte der von der Mutante FLU 100 P13R15 aus Benzol produzierte Metabolit als Muconolacton und der aus Toluol produzierte Metabolit als 2-Methylmuconolacton identifiziert werden. Diese Mutante setzt Fluorbenzol zu einem Metabolit um, dessen Retentionsvolumen und UV – Absorptionsspektrum denen der anderen Muconolactone ähnelt und daher als 5-Fluormuconolacton angesehen wird (Spektren und weitere Daten siehe Anhang 7.3.6.).

#### 5.7.2. HPLC – MS – Analysen

HPLC – MS – Analysen wurden von fünf Ansätzen vorgenommen, Tabelle 48 gibt die Ansätze wieder.

**Tabelle 48: Liste der Ansätze, mit denen versucht wurde, die gebildeten Metabolite mittels HPLC - MS - Analysen zu identifizieren**

Nr.	Stamm	Medium	Substrat
1	FLU 100 P2R5	MM + Kanamycin pH 7	Glucose, Fluorbenzol
2	FLU 100 T6	MM + Kanamycin pH 5	Glucose, Fluorbenzol
3	FLU 100 WT	MM pH 7	1,4-Difluorbenzol
4	FLU 100 WT	MM pH 7	4-Fluortoluol
5	FLU 100 WT	MM pH 5	4-Fluorcatechol

##### 5.7.2.1. Ansatz Nr.: 1

*Erwartete Metabolite und eigene HPLC – Analyse:*

Die Mutante P2R5 bildet aus Halogenaromaten an der 3–Position substituierte Diendiole. Daher war die Bildung von 3-Fluordiendiol (M = 130 U) zu erwarten.

3-Fluordiendiol konnte anhand seines Retentionsvolumens und Absorptionsspektrum eindeutig identifiziert werden.

*HPCL – MS - Analyse:*

Keine signifikante Identifikation, Das Diendiol ist nicht ausreichend ionisierbar.

**5.7.2.2. Ansatz Nr.: 2***Erwartete Metabolite und eigene HPLC – Analyse:*

Die Mutante T6 bildet aus Halogenaromaten an der 3-Position substituierte Catechole. Daher war die Bildung von 3-Fluorcatechol (M = 128 U) zu erwarten.

Die Probe enthielt 1,2 mmol / L 3-Fluorcatechol.

*Gefundene Substanzen:*

Der HPLC – Peak, welcher 3-Fluorcatechol repräsentierte, konnte zweifelsfrei mit einer Molekularmasse des Analyten von 128 U nachgewiesen werden.

**5.7.2.3. Ansatz Nr.: 3***Erwartete Metabolite und eigene HPLC – Analyse:*

Der Wildtyp von FLU 100 baut 1,4-Difluorbenzol nur bis zur Catecholstufe ab.

Die Probe enthielt ein unbekanntes Catechol, welches deutlich später eluiert als die Monofluorcatechole.

*Gefundene Substanzen:*

Das Catechol besitzt eine Molekularmasse von 146 U. Damit ist zweifelsfrei erwiesen, dass es sich um 3,6-Difluorcatechol handelt.

**5.7.2.4. Ansatz Nr.: 4***Erwartete Metabolite und eigene HPLC – Analyse:*

Der Wildtyp von FLU 100 baut 4-Fluormethylbenzol nicht produktiv ab. Die Probe enthielt neben weiteren Metaboliten ein unbekanntes Catechol.

*Gefundene Substanzen:*

Das Catechol besitzt ein Molekularmasse von 1742 U. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um 3-Fluor-6-methylcatechol. Daneben wurde noch ein Metabolit mit der Molekularmasse von 174 U identifiziert. Von diesem konnte ein Zerfallsspektrum aufgenommen werden, der Metabolit eliminiert  $\text{CO}_2$  und HF. Aufgrund seines optischen Spektrums könnte es sich um eine Muconsäure handeln. Daher steht zu vermuten, dass es sich bei diesem Metaboliten um 2-Fluor-5-methylmuconsäure handelt.

**5.7.2.5. Ansatz Nr.: 5***Erwartete Metabolite und eigene HPLC – Analyse:*

Beim Umsatz von 4-Fluorcatechol produziert der Wildtyp von FLU 100 temporär zwei Muconolactone unbekannter Konstitution. In diesem Experiment sollten Hinweise gewonnen werden, an welcher Stelle die Fluoratome am Kohlenstoffgerüst der Muconolactone gebunden sind.

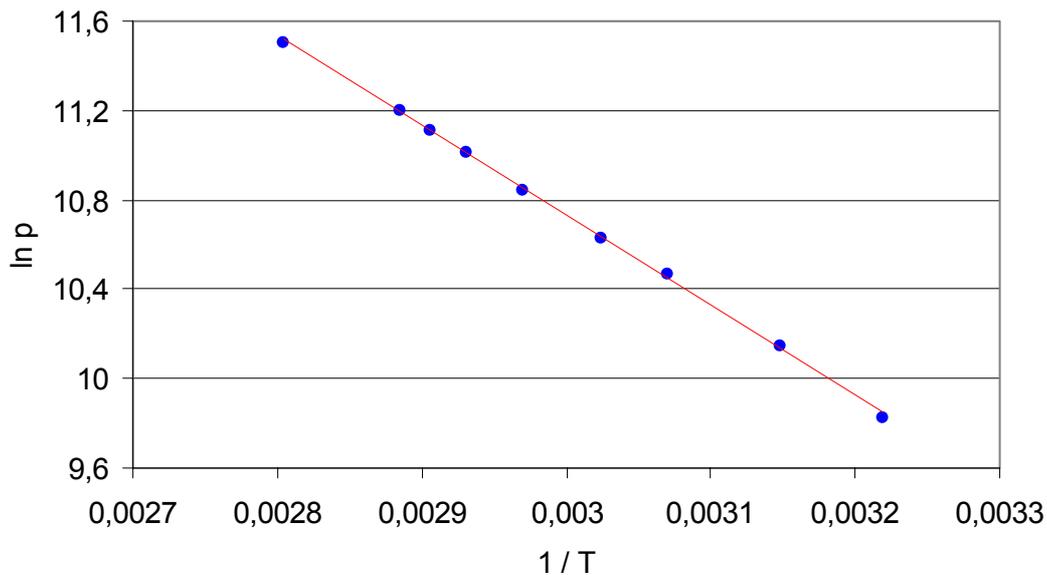
Die Probe enthielt neben nichtumgesetztem 4-Fluorcatechol zwei Metabolite, die von den Retentionsvolumen und ihrer Absorptionsspektren den Muconolactonen zuzuordnen sind.

*Gefundene Substanzen:*

Die Anwesenheit von 4-Fluorcatechol (128 U) konnte bestätigt werden. Das hydrophilere der beiden vermuteten Fluormuconolactone konnte bestätigt werden. Die gefundene Molekularmasse von 160 U stimmt mit der Theorie überein. Die Verbindung eliminiert im Zerfallsspektrum  $\text{CO}_2$  und HF. Dies ist für ein Muconolacton zu erwarten (Verlust der Carboxylgruppe).

**5.7.3. Bestimmung der Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol**

Entsprechend Kapitel 4.1.8.4 wurden die gemessenen Wertepaare aus reziproken Siedepunkten und dazugehörigen logarithmierten Drücken in ein Diagramm eingetragen. Eine lineare Regression liefert die Steigung der Geraden zu  $-4022 [\ln(p)T]$  und damit – nach Gleichung 8 – die Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol zu 33,44 KJ/mol. Zum Vergleich sind Literaturangaben in Tabelle 49 angegeben.



**Bild 93:** Die gemessenen logarithmierten Siededampfdrücke von Fluorbenzol, aufgetragen gegen die reziproke Temperatur

Die Verdampfungsenthalpie kann durch Ermittlung der Steigung der Geraden analytisch bestimmt werden.

**Tabelle 49:** Literaturangaben zur Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol

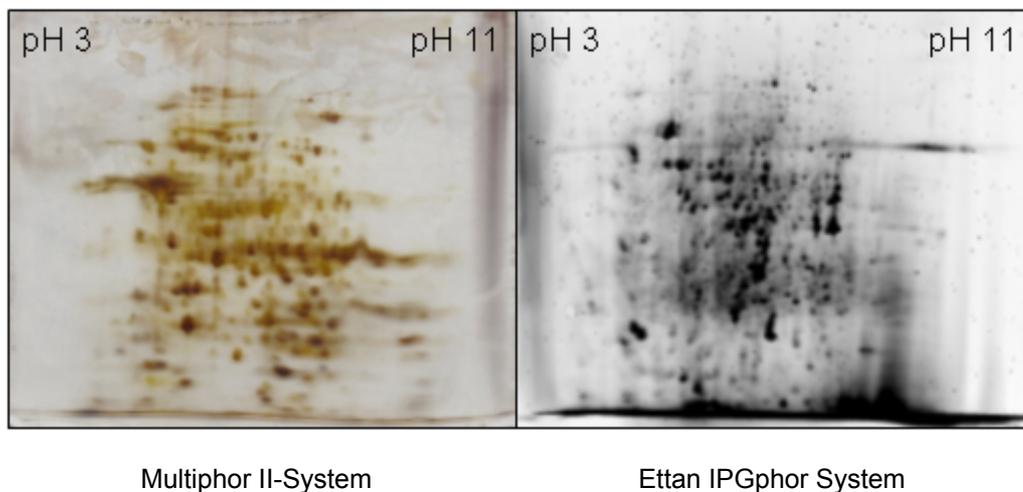
$\Delta_{\text{vap}}H^\circ$	Beschrieben von:
34.68 kJ / mol	Majer 1985
34.53 kJ / mol	Findlay 1969
34.60 kJ / mol	Scott 1956
33.44 kJ / mol	diese Arbeit

## 5.8. Proteomik

Es wurden zwei Experimente zur Proteomik durchgeführt. Zum einen wurde FLU 100 auf verschiedenen Substraten kultiviert, das Proteinmuster dieser Zellen wurde dann analysiert. Ziel dieses Experiments war es zu ergründen, ob prominente, substratabhängige Proteinspots im Gel zu entdecken sind. Zum anderen wurden Glucose - induzierte Zellen mit Fluorbenzol konfrontiert. Drei Tage lang wurde alle acht Stunden eine Probe genommen. Diese Proben wurden nach dem im Kapitel 4.5.7 beschriebenen Protokoll aufgearbeitet und deren Proteinmuster zuerst mittels der IEF und SDS-PAGE zweidimensional aufgetrennt. Hierbei sollten die durch die Anwesenheit von Fluorbenzol induzierten Proteine identifiziert werden. Die Experimente und Auswertungen, welche in diesem Kapitel dargestellt werden, wurden im Rahmen der vom Autor betreuten Studienarbeit von Dipl. biol. t.o. F. Pohl erzielt (Pohl 2005).

### 5.8.1. Zur Leistungsfähigkeit der Proteomanalyse

Die Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit der 2D-Gelelektrophorese sind stark von äußeren Bedingungen abhängig. Schon kleine Unterschiede in der Methode können zu deutlichen Auswirkungen im Ergebnis führen. Zum Vergleich der Spotmuster wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Bei Verwendung des Multiphor II Systems wurde eine Silberfärbung, bei Verwendung des Ettan IPGphor Systems eine Sypro - Ruby - Färbung durchgeführt.



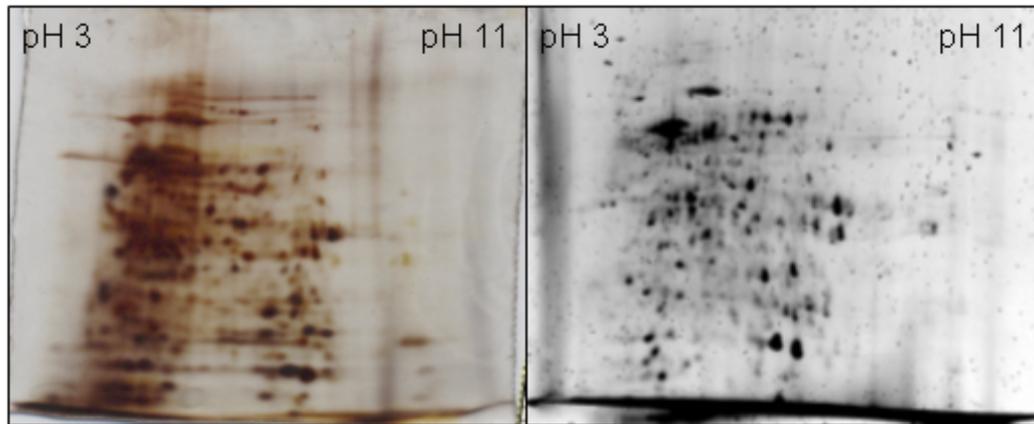
**Bild 94: Gegenüberstellung des Proteinspotmusters nach Wachstum von FLU 100 auf Fluorbenzol**

Auf die 7 cm IPG-Streifen wurde eine Gesamtproteinmenge von 50 µg aufgetragen.

Links: Verwendung des Multiphor II-Systems mit kombinierter TCA / Acetonfällung und anschließender Silberfärbung.

Rechts: Verwendung des Ettan IPGphor Systems mit Acetonfällung und anschließende Sypro - Ruby - Färbung. Zu erkennen ist vor allem die deutlich bessere Auflösung der Proteinspots bei dieser Methode.

Die Anwendung des Ettan IPGphor Systems erzeugt eine wesentlich bessere Auflösung des Proteinspotmusters als das Multiphor II System, siehe Bild 84. Besonders im sauren Bereich kommt es bei Verwendung des Multiphor II Systems zu Proteinpräzipitationen. Dieser Effekt führt zur Unschärfe des Musters. Die Gegenüberstellung in Bild 95 zeigt deutlich die Vorteile der Sypro - Ruby Färbung gegenüber der Silberfärbung. Wie in Kapitel 4.7.12. beschrieben, können durch den weitaus höheren linearen Bereich auch Proteine detektiert werden, die mit der schlecht steuerbaren Silberfärbung mit ihrem eingeschränkten Linearitätsbereich nicht erkannt werden können.



Multiphor II-System

Ettan IPGphor System

**Bild 95: Gegenüberstellung des Proteinspotmusters nach Wachstum auf Benzol**

Besonders im sauren Bereich zeigen sich bei Verwendung des Multiphor II Systems (links) eine starke Proteinpräzipitation sowie zahlreiche horizontale Streifen ("horizontal streaking"). Diese sind auf Löslichkeitsprobleme oder auf mangelhafte Alkylierung während der Proteinaufarbeitung zurückzuführen. Die Auftrennung der Proteine durch das Ettan IPGphor System erfolgt wesentlich präziser.

Vor allem beim Einsatz des Multiphor II Systems treten horizontale Streifen im Gel auf (horizontal streaking). Diese erstrecken sich über weite pH - Bereiche und stellen ein Problem in der Auftrennung der ersten Dimension (IEF) dar. Als Ursachen kommen hierfür verschiedene Effekte in Frage:

Beispielsweise lösen sich manche Proteine nicht vollständig im Probenaufnahmepuffer. Es bilden sich dann kleinere Aggregate, welche die Poren des Gels verstopfen können. Nachfolgende Proteine akkumulieren in diesem Bereich. Auch eine unvollständige Alkylierung bei der zweiten Equilibrierung führt zu diesem Effekt. Spuren von DTT werden dafür ebenfalls verantwortlich gemacht (Görg 1999B).

Eine weitere Fehlerquelle stellt die verwendete Acrylamid / Bisacrylamid - Fertiglösung dar. Diese kann noch reduktive Kontaminationen enthalten, die zu Artefakten auf dem Gel führen. Aus diesem Grund sollte nur Acrylamid / Bisacrylamid - Fertiglösung von höchster Qualität verwendet werden, die zuvor über einen Ionenaustauscher von diesen Kontaminationen befreit worden ist.

### 5.8.2. Vergleich der Proteinspotmuster von FLU 100 nach Wachstum auf verschiedenen Substraten

In diesem Experiment sollte untersucht werden, in wie weit sich die Spotmuster von FLU 100 nach dem Wachstum auf verschiedenen Substraten unterscheiden. Eingesetzt wurden die Aromaten Fluorbenzol, Benzol, 3-Fluorphenol und Toluol. Als Ergänzung wurden noch die Spotmuster nach Wachstum auf dem Vollmedium Nutrient Broth und auf Glucose untersucht. Zellen, die auf dem Vollmedium gewachsen waren, sollten ein verarmtes Spotmuster zeigen, da dieses zahlreiche lebensnotwendige Biomoleküle bereithält und diese von den Zellen nicht erst synthetisiert werden müssen. Von Interesse waren vor allem Spots, die bei Wachstum auf den aromatischen Substraten im Vergleich zu denen des Glucosewachstums neu auftreten, denn hinter diesen wurden Enzyme der Aromatenabbauwege vermutet.

Die präparierten Proteinfractionen wurden auf den 7 cm Strips (pH 3 bis 11) der beiden Systeme Multiphor II und Ettan IPGphor aufgetrennt. Allerdings zeigten die silbergefärbten Gele des Multiphor II Systems ein starkes "horizontal streaking", wie oben beschrieben, und waren für einen qualitativen Vergleich der erzeugten Muster unzureichend fokussiert (Bild 95). Dagegen lieferte der Einsatz des Ettan IPGphor Systems in Kombination mit der Sypro - Ruby Färbung scharfe Spots der eingesetzten Proben (Bild 96).

Die erzielten Spotmuster unterscheiden sich dramatisch. Alle Ansätze zeigten im Bereich unterhalb von pH 4 – 5 nur sehr wenige Spots. Dies ist auf einen systematischen Fehler zurückzuführen, wahrscheinlich aufgrund von Präzipitation und ungenügender Lösung der betroffenen Proteinfraction.

Die erhoffte, kleine Spotzahl beim Wachstum auf NB stellte sich nicht ein. Es wird eine große Anzahl von Spots aufgezeigt, von denen viele auch auf den Gelen der anderen Ansätze zu finden sind, zum Beispiel die Spots in der gelben Umrandung in Bild 96. Hierbei könnte es sich um sogenannte "house keeping enzymes" handeln. Diese werden unabhängig von der Substratversorgung der FLU 100 Zellen synthetisiert und erfüllen grundlegende metabolische Funktionen. Die zugehörigen Proteine werden oft konstitutiv exprimiert, allerdings kann die Produktionsrate dieser Enzyme von äußeren Faktoren wie der aktuellen Wachstumsrate abhängen.

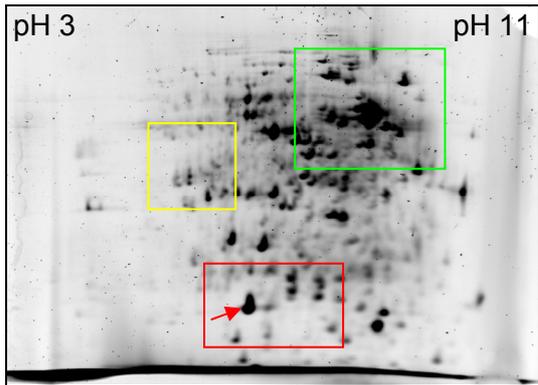
Vor allem im sauren Bereich zeigt sich im oberen Drittel der Gele (Molekulargewicht von 50 bis 70 kDa) eine starke Spotgruppe, siehe Bild 96 - grün markierte Bereiche. Dieses Phänomen ist auf dem Gel der an Fluorbenzol adaptierten Zellen nur schwach zu erkennen. Da diese Spotgruppe jedoch, sowohl beim Wachstum auf dem Vollmedium, wie auch beim Wachstum auf Glucose auftritt, ist hier nicht mit relevanten Proteinen für den Aromatenabbau zu rechnen. Potentielle Abbauenzyme für aromatische Verbindungen könnten sich im neutralen pH - Bereich bei einem Molekulargewicht von 30 – 50 kDa finden, siehe Bild 96 - rot markierte Bereiche. Bei Wachstum von FLU 100 auf Glucose finden sich in dem rot markierten Gebiet auf

dem Gel keine relevanten Spots. Beim Wachstum auf Nutrient Broth hingegen ist hier ein prominenter Spot, der von zwei schwächeren begleitet wird, zu finden. Bei allen anderen Substraten zeigen sich in diesem Bereich zahlreiche starke Spots. Diese könnten mit dem Aromatenabbau verbunden sein.

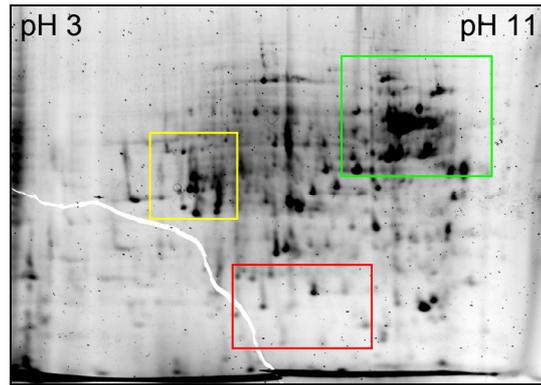
Auch Nutirent Broth enthält aromatische Komponenten. Allerdings muss beachtet werden, dass viele Enzyme des Aromatenabbaus Multienzymkomplexe sind, die aus vielen Untereinheiten bestehen. Die in diesem Bereich bei Fluorbenzol, Toluol und 3-Fluorphenol erscheinenden Proteinspots sind also gegebenenfalls nur einzelne Untereinheiten dieser Enzyme.

Dieses Experiment lieferte einen guten Einblick in die zu erwartende Spotvielfalt des Stammes FLU 100. Es hat sich gezeigt, dass das Auflösungsvermögen der 7 cm Strips bzw. Gele nicht ausreichend war. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass als nichtaromatisches Referenzsubstrat nur Glucose in Betracht kommen konnte, denn nur hier sind wirklich keine aromatendegradierenden Proteine induziert.

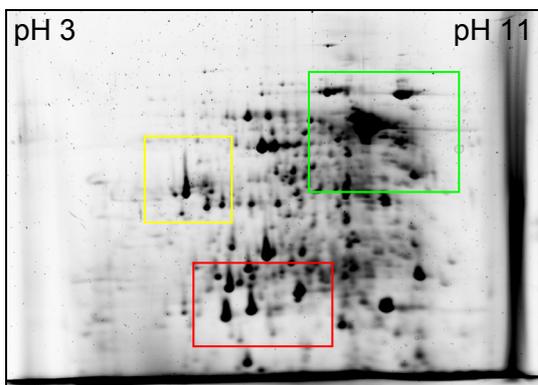
Um die Spots von Proteinen der Aromatenabbauwege von FLU 100 identifizieren zu können, erwies sich das hier beschriebene Experiment als nicht ausreichend auswertungsfähig. Im folgenden Kapitel wird ein neuer Ansatz behandelt.



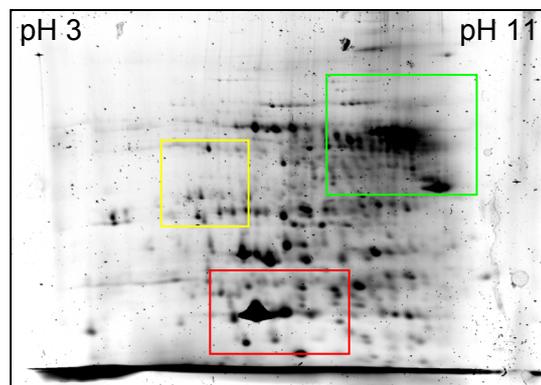
Substrat: Nutrient Broth



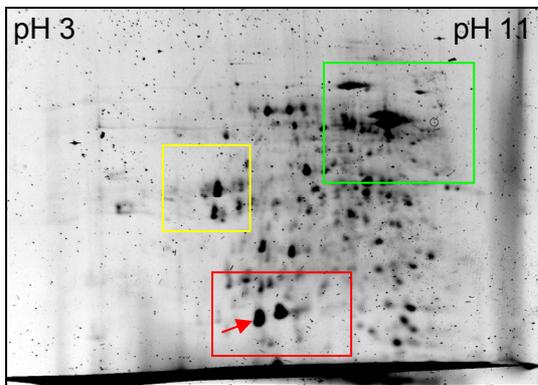
Substrat: Glucose



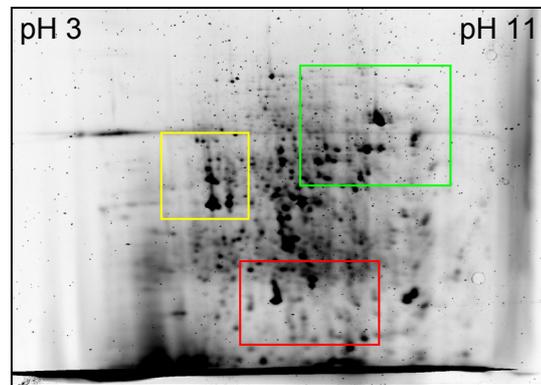
Substrat: Benzol



Substrat: 3-Fluorphenol



Substrat: Toluol



Substrat: Fluorbenzol

**Bild 96: Vergleich der Sypro - Ruby gefärbten Gele bei Wachstum auf unterschiedlichen Substraten im 7 cm Maßstab**  
(Nähere Erklärung siehe Text)

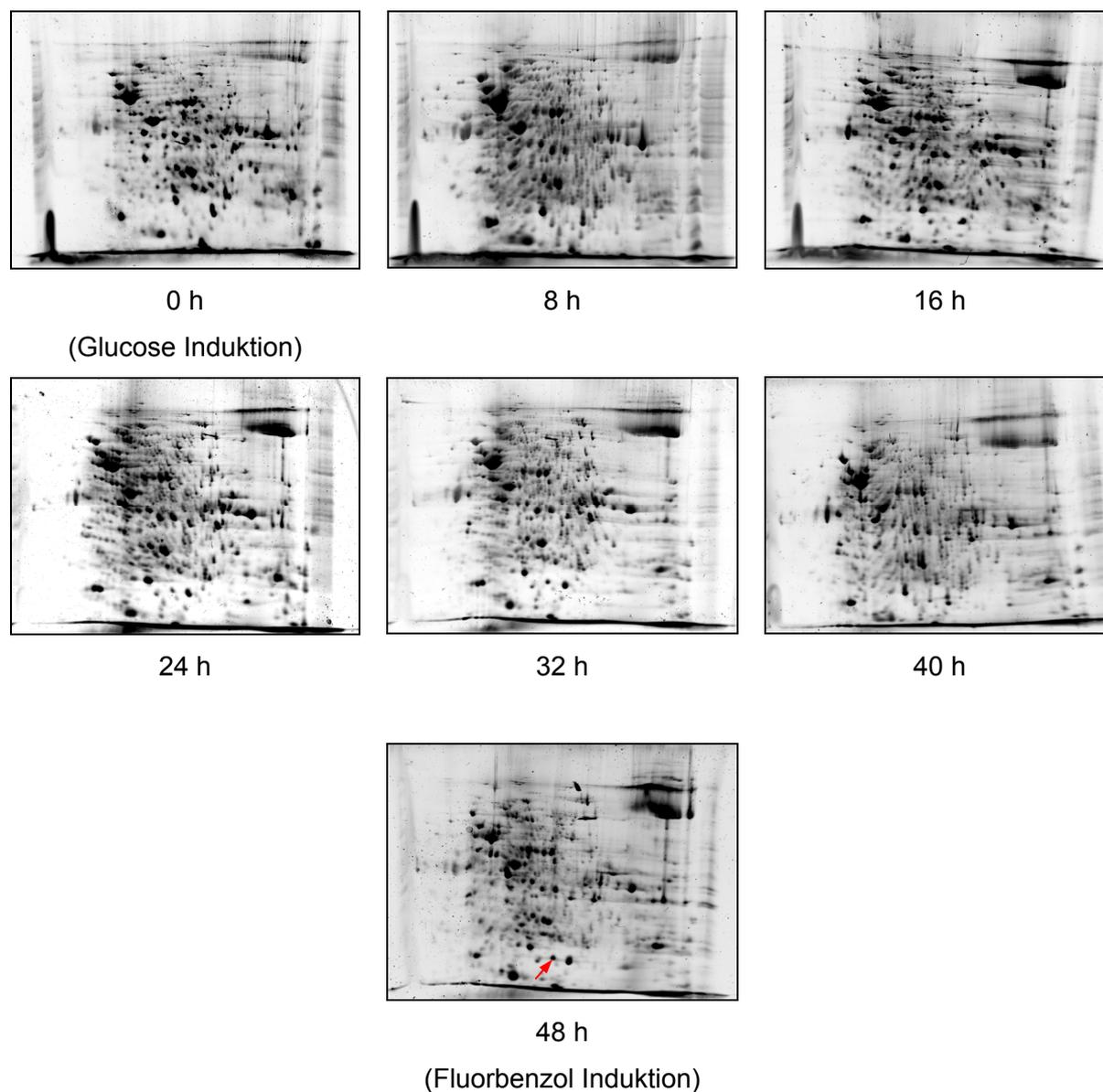
### 5.8.3. Vergleich der Spotmuster während der Induktion mit Fluorbenzol

Ein neuer Ansatz, die zu den Aromatenabbauwegen zugehörigen Spots zu finden, besteht darin, das Proteom von FLU 100 während der Induktion vom Substrat Glucose zum Substrat Fluorbenzol zu beobachten. Glucosegewachsene Zellen wurden mit Fluorbenzol konfrontiert, alle acht Stunden wurde eine Probe genommen und die daraus resultierenden Spotmuster wurden verglichen, indem sie anhand der Zeitskala angeordnet wurden. Ziel war es, auf hochauflösenden Gelen Proteine zu identifizieren, die für den Fluorbenzolabbau in FLU 100 verantwortlich sind. Einige dieser Spots wurden aus dem Gel ausgestochen und sequenziert.

Zuerst wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dieser hatte das Ziel, die gewählte Methode auf ihre Eignung zu prüfen. Auch hier wurden die bereits im oben beschriebenen Versuch verwendeten 7 cm IPG - Streifen benutzt. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 100 µg eingesetzt, die Gele wurden mit Sypro - Ruby gefärbt.

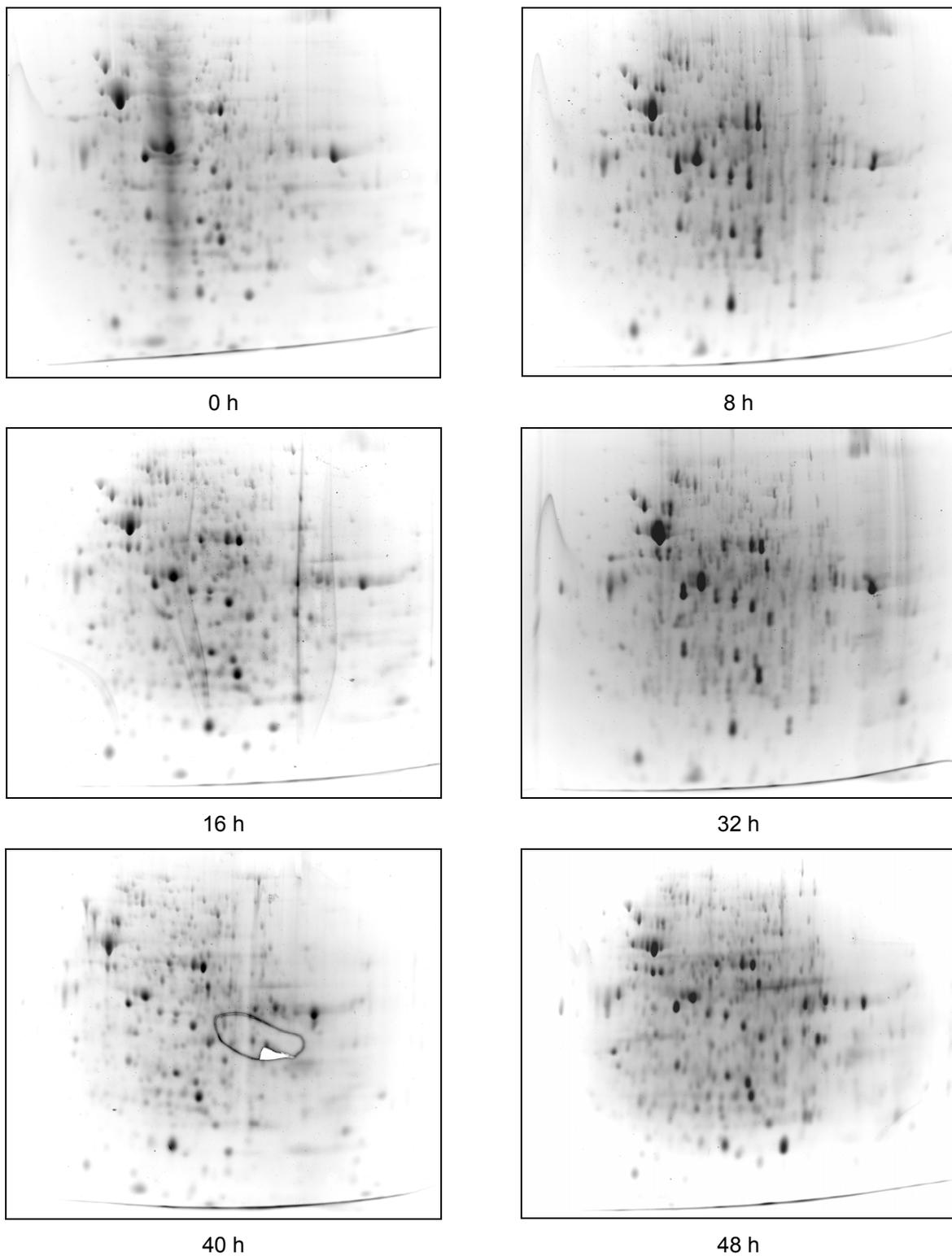
Das Ergebnis des Experiments waren die in Bild 97 dargestellten Gele. Schon in den ersten Ansätzen waren zahlreiche Spots erkennbar. Mindestens ein Spot, der neu erschienen war (Bild 97, 48 h, roter Pfeil) ist damit als Fluorbenzol induziert erkannt. Dies bedeutete, dass die Methode für das gestellte Ziel geeignet ist.

Im Hauptexperiment wurden 18 cm IPG-Streifen eingesetzt, welche eine bessere Auflösung erzielen. Es wurden die gleichen Proben wie im Vorversuch eingesetzt. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 500 µg eingesetzt (Bild 98, Bild 99). Zur Absicherung gegen zufällige Fehler wurde die 2D – Elektrophorese wiederholt. Beim zweiten Durchgang des Hauptversuches zeigten sich weitgehend identische Spotmuster (Bild 100), vier der fünf interessierenden Spots konnten wieder gefunden werden, darunter alle diejenigen, die zur Sequenzierung herangezogen wurden. Von diesen fünf konnten drei aus dem Gel ausgestochen werden (Bild 99, grüne Pfeile) und zur Sequenzierung herangezogen werden (siehe nächstes Kapitel).



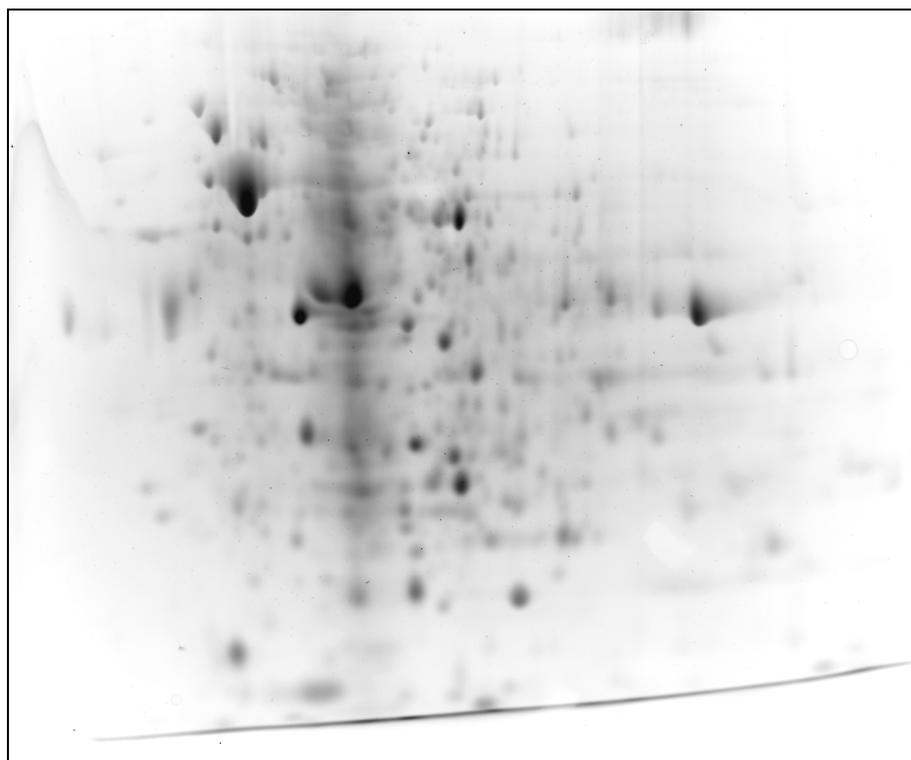
**Bild 97: Induktion von glucosegewachsenen Zellen von *Burkholderia fungorum* FLU 100 durch Fluorbenzol**

Alle acht Stunden wurde eine Probe entnommen. Es wurde jeweils eine Gesamtproteinmenge von 100 µg auf 7 cm IPG - Streifen (pH 3 bis pH 11) aufgetragen. Fokussiert wurde für 20 kWh. In der sich anschließenden SDS - PAGE (T = 10 %) wurden die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt und abschließend mit Sypro - Ruby gefärbt. Zu erkennen sind cytosolische Proteine. Der mit dem roten Pfeil bei 48 h markierte Spot ist fluorbenzolinduziert.

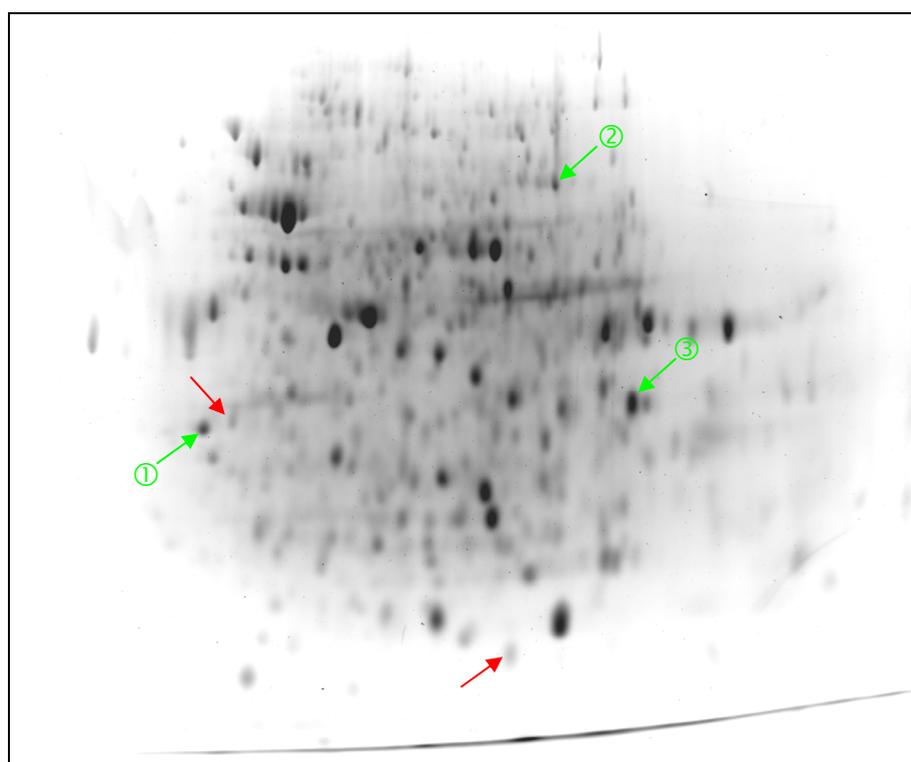


**Bild 98: Vergleich der Sypro - Ruby gefärbten Gele bei Induktion durch Fluorbenzol auf 18 cm IPG - Streifen, erster Durchgang**

Auf die IPG-Streifen wurde eine Gesamtproteinmenge von 500 µg aufgetragen. Fokussiert wurde für ca 60 kWh. In der sich anschließenden SDS-PAGE (T = 10 %) wurden die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend mit Sypro - Ruby gefärbt. (Die ovale Struktur ist eine unkritische mechanische Beschädigung des Gels)



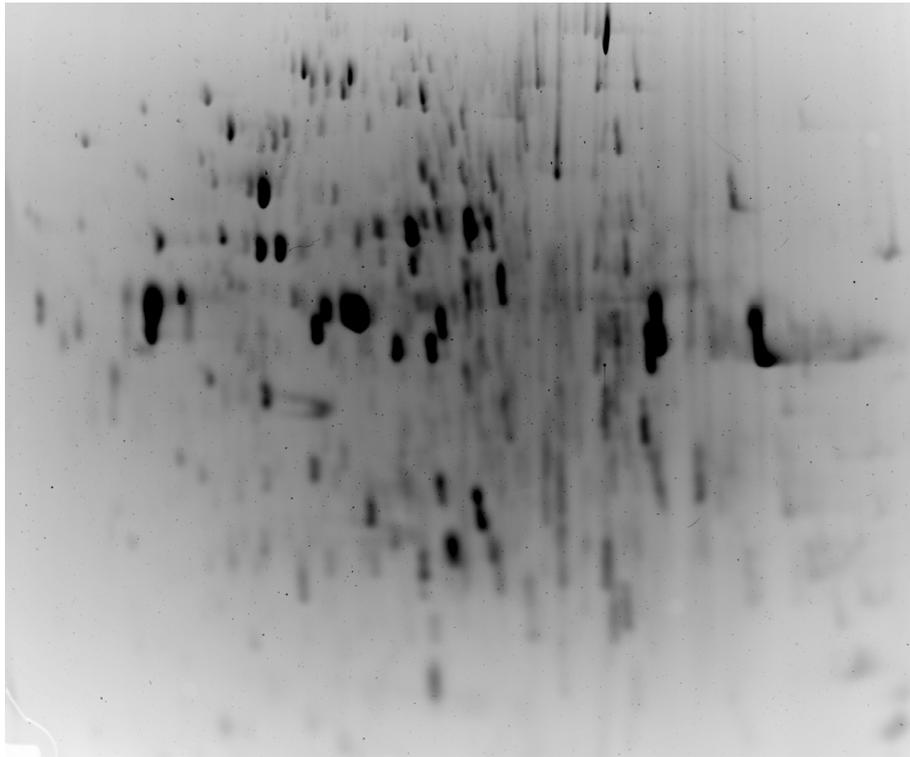
Erster Durchgang zu Beginn (0 Stunden) des InduktionsExperiments mit 18 cm IPG - Streifen



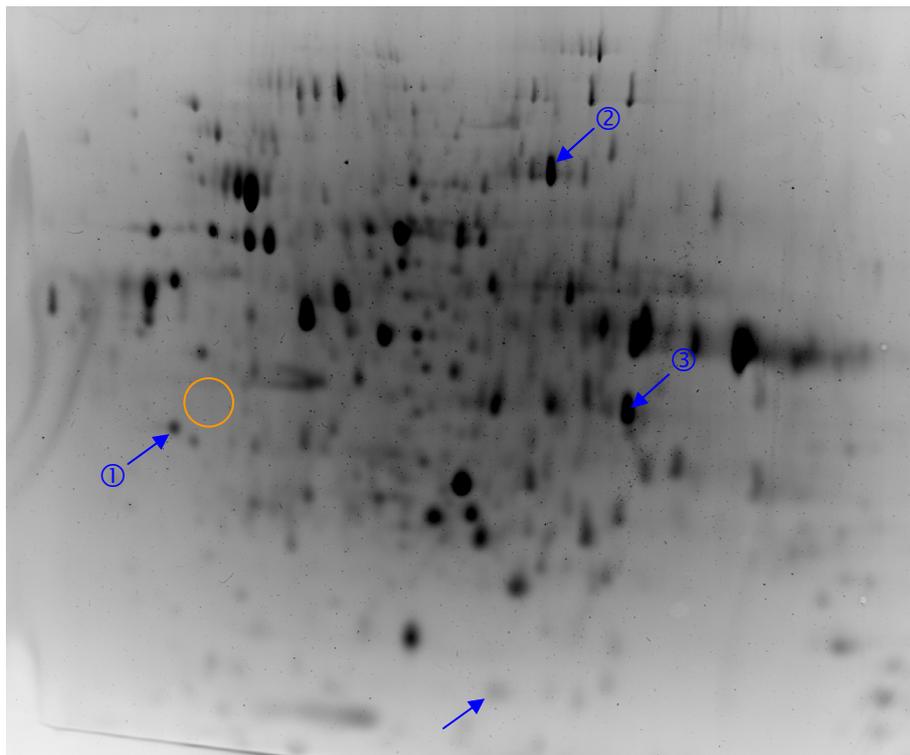
Erster Durchgang, nach 48 Stunden des Induktionsexperiments mit 18 cm IPG - Streifen

**Bild 99: Erster 18 cm Durchgang des Induktionsexperimentents**

Direkter Vergleich des Ausgangspotmusters mit dem Endspotmuster von FLU 100 nach Induktion mit Fluorbenzol. Identifizierte Proteinspots wurden mit Pfeilen markiert. Von diesen konnten drei zur Sequenzierung herangezogen werden (grüne Pfeile, durchnummeriert).



Zweiter Durchgang zu Beginn (0 Stunden) des Induktion Experiments mit 18 cm IPG – Streifen



Zweiter Durchgang, nach 48 Stunden des Induktionsexperiments mit 18 cm IPG - Streifen

**Bild 100: Zweiter 18 cm Durchgang des Induktionsexperimentents**

Die Spotmuster des ersten Durchganges konnten verifiziert werden. Vier der fünf identifizierten Spots konnten wiedergefunden werden (blaue Pfeile). Ein erwarteter Spot fehlte (gelbe Markierung)

#### 5.8.4. Sequenzierung der identifizierten Spots

Die Sequenzierung der im vorausgehenden beschriebenen Proteinspots erfolgte dankenswerterweise durch Dr. Dietmar Pieper (HZI Braunschweig). Das experimentelle Vorgehen ist in Kapitel 4.7.11. beschrieben. Diese Methode ermöglicht Peptidfragmente mit einer Länge von bis zu 30 Aminosäuren zu sequenzieren. Zur Identifikation der Fragmente wurden diese nach bekannten Mustern durchsucht. Die Vergleichssequenzen wurden mittels der NCBI – Proteindatenbank gefunden.

##### 5.8.4.1. Spot 1

Aus dem in Bild 99 mit der Nummer 1 gekennzeichneten Spot konnten drei Peptidfragmente sequenziert werden. Es handelt sich um ein relativ leichtes Protein, welches seinen isoelektrischen Punkt bei ca. pH 4,6 hat.

Fragment 1:

**Tabelle 50: Sequenz des Fragmentes 1 (Spot 1) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt**

Stamm	Protein	Sequenz
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		TLEGPLYVAGAPESVGFAR
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGFAR
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGFAR
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGFAR
<i>Burkholderia cepacia</i> AMMD	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGHAR
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 305	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGHAR
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGHAR
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVAGAPESVGHAR
<i>Pseudomonas</i> sp. MT1	Catechol-1,2-dioxygenase	TIEGPLYVANAPLSEGFAR

Das Fragment war mit 19 Aminosäuren das längste gefundene Fragment in diesem Experiment. Die Sequenzanalyse lieferte eine fast vollständige Übereinstimmung (18 von 19 Positionen) zu einer Catechol-1,2-dioxygenase aus *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter radioresistens* und *Paracoccus denitrificans* PD1222. In allen drei Fällen unterscheidet sich die Sequenz der Catechol-1,2-dioxygenase der genannten Stämme nur in Position 2 des Fragmentes, dort befindet sich in FLU 100 Leucin statt Isoleucin. Des Weiteren zeigt die Sequenz von Fragment 1 große Ähnlichkeit zu der von Catechol-1,2-dioxygenasen aus

verschiedenen *Burkholderia* Spezies. Nicht so groß ist die Ähnlichkeit des FLU 100 Proteinfragmentes zu entsprechenden Sequenzen in *Pseudomonas* Spezies.

#### Fragment 2:

**Tabelle 51: Sequenz des Fragmentes 2 (Spot 1) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt**

Stamm	Protein	Sequenz
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		QQLDALVK
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Peptidsynthetase	QQLDALVK
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	ATPase and permease	QQLDALIK
<i>Oryza sativa</i>	hypothetical protein	QQLEALVK

Bei diesem nur acht Aminosäuren langen Fragment fiel es schwer, eine Aussage durch Sequenzvergleiche zu finden. Das kurze Fragment zeigt eine vollständige Homologie zu einer Peptidsynthetase aus *Aureobasidium pullulans*. Geringere Ähnlichkeiten sind zu einem ATPase - Fragment aus *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 zu finden und zu einer hypothetischen Proteinsequenz aus *Oryza sativa*.

#### Fragment 3:

**Tabelle 52: Sequenz des Fragmentes 3 (Spots 1) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt.**

Stamm	Protein	Sequenz
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		NELNTLAAAQK
<i>Pseudomonas syringae</i> 1448A	Flavoprotein	NELNTLAAAQK
<i>Mycobacterium avium</i> 104	Rekombinase	AELNTLTAAQA
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c	Flavoprotein	VTLNNTLAAAQQ

Auch zum dritten, 11 Aminosäuren langen Fragment des Spots 1 findet sich bei der Sequenzvergleichsanalyse keine klare Zuordnung. Die Sequenz ist in der eines Elektronentransferflavoproteins aus dem Stamm *Pseudomonas syringae* 1448A vollständig enthalten. Auch weitere Elektronentransferflavoproteine aus anderen Stämmen wie *Pseudoalteromonas atlantica* T6c zeigen Ähnlichkeiten. Es gibt aber auch Treffer in den Sequenzen von Nichtflavoproteinen, z.B einer site - spezifischen Rekombinase aus *Mycobacterium avium* 104.

*Zusammenfassung Spot 1:*

Von den drei Peptidfragmenten des Spots 1 lässt sich nur die Sequenz des ersten und längsten Fragments zweifelsfrei einem Enzym, einer Catechol-1,2-dioxygenase zuordnen. Die beiden anderen Fragmente können diesem oder einem anderem Enzym nicht zugeordnet werden.

**5.8.4.2. Spot 2**

Aus dem in Bild 100 mit der Nummer 2 gekennzeichnetem Spot konnten zwei Peptidfragmente sequenziert werden. Es handelt sich um ein schweres Protein ( $M > 70$  KDa), welches seinen isoelektrischen Punkt bei ca. pH 7,7 also in nahezu neutralem Bereich hat.

*Fragment 1:*

**Tabelle 53: Sequenz des Fragmentes 1 (Spot 2) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt.**

<b>Stamm</b>	<b>Protein</b>	<b>Sequenz</b>
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		LDNVAGAQC <small>PAR</small>
<i>Salmonella enterica</i> subsp.	Propanol Metabolismus (?)	<b>G</b> DNV <b>AV</b> AQC <small>PAS</small>
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	Propanol Metabolismus (?)	<b>G</b> DNV <b>AV</b> AQC <small>PAS</small>

Das 12 Aminosäuren lange erste Peptidfragment des zweiten Proteinspots zeigt nur geringe Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Hierbei sind vor allem Proteine aus *Salmonella* Spezies zu nennen. Diese sind dort dem Propanol - Metabolismus zugeordnet.

*Fragment 2:***Tabelle 54: Sequenz des Fragmentes 2 (Spot 2) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt**

Stamm	Protein	Sequenz
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		AEQQLTYTNSLFQVR
<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	Porin der Aussenmembran	AGAQV <b>V</b> TYTNSLFQVR
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	Porin der Aussenmembran	AGAQV <b>V</b> TYTNSLFQVR
<i>Burkholderia cepacia</i> AMMD	Porin der Aussenmembran	AGAQV <b>V</b> TYTNSLFQVR
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	Porin der Aussenmembran	AGAQV <b>V</b> TYTNSLFQ <b>I</b> R
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a	Porin der Aussenmembran	AGL <b>L</b> TYT <b>T</b> SLFQ <b>I</b> R

Das zweite Peptidfragment, das aus dem Spot Nr. 2 gewonnen werden konnte, ist 15 Aminosäuren lang. Seine Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zu Porinpeptiden aus der äußeren Membran verschiedener *Burkholderia* Spezies.

*Zusammenfassung Spot 2:*

Die Sequenzen des ersten, kurzen Peptidfragmentes zeigen Ähnlichkeiten zu Proteinen des Propanolmetabolismus von verschiedenen *Salmonella* Spezies. Die Analyse der Sequenz des zweiten Fragmentes hingegen liefert viele Treffer bei *Burkholderia* Spezies, darunter ausschließlich Sequenzen aussenmembranständiger Porine. Da *Salmonella* als Enterobakterium phylogenetisch weit von *Burkholderia fungorum* FLU 100 entfernt ist, gewinnt die Identifizierung als Porin der Aussenmembran großes Gewicht.

**5.8.4.3. Spot 3**

Aus dem in Bild 100 mit der Nummer 3 gekennzeichnetem Spot konnten zwei Peptidfragmente sequenziert werden. Es handelt sich um ein mittelschweres Protein, welches seinen isoelektrischen Punkt bei ca. pH 8.5, also im alkalischen Bereich hat.

## Fragment 1:

Tabelle 55: Sequenz des Fragmentes 1 (Spot 3) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt

Stamm	Protein	Sequenz
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		TSSGEYSQTVAADLR
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	Succinatdehydrogenase	TSSGEYTQDVANDIR
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	Succinatdehydrogenase	SSSGEYAQSVANDIR
<i>Burkholderia fungorum</i> LB400	Succinatdehydrogenase	SSSGEYAQSVANDIR
<i>Burkholderia phymatum</i> STM815	Succinatdehydrogenase	SSSGEYAQVANDIR
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	Succinatdehydrogenase	TTSGEYTQDVANDIR

Dieses Fragment aus Spot 3 zeigt in seiner 15 Aminosäuren langen Sequenz Ähnlichkeiten zur Flavoproteinuntereinheit der Succinatdehydrogenasen von *Burkholderia* und *Ralstonia* Species.

## Fragment 2:

Tabelle 56: Sequenz des Fragmentes 2 (Spot 3) mit Vergleichssequenzen, Differenzen sind rot dargestellt

Stamm	Protein	Sequenz
<i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100		TSFQAHAGVFR
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	Succinatdehydrogenase	RNMQAHAGVFR
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	Succinatdehydrogenase	TAMQTHAGVFR
<i>Comamonas testosteroni</i> KF-1	Succinatdehydrogenase	QSMQTHAGVFR
<i>Ralstonia pickettii</i> 12J	Succinatdehydrogenase	RNMQSHAGVFR
<i>Burkholderia dolosa</i> AUO158	Succinatdehydrogenase	ATMQKHAGVFR

Auch dieses zweite, 10 Aminosäuren umfassende Peptidfragment des dritten Spots zeigt Ähnlichkeiten zur Flavoproteinuntereinheit verschiedener Succinatdehydrogenasen. Allerdings ist die Breite der gefundenenen Spezies, die über ähnliche Proteinsequenzen verfügen deutlich größer als beim ersten Fragment. Auch hier wird *Ralstonia* und *Burkholderia* gefunden.

### *Zusammenfassung Spot 3:*

Als einziger der untersuchten Proteinspots liefert Spot 3 Peptidfragmente, die Ähnlichkeiten zu einem gleichen Sequenztyp aufweisen. Die Analyse der Sequenzen beider Fragmente führen zu Flavoproteinuntereinheiten von Succinatdehydrogenasen verschiedener Spezies. Dieses Enzym gehört dem Tricarbonsäurecyclus an. Es beliefert als peripheres Membranprotein (Komplex II), aber auch die Atmungskette, mit Elektronen.

## **5.9. Betrieb der Biotricklingfilter im Technikumsmaßstab**

### **5.9.1. Umbau der vorhandenen Anlagen und Beobachtungen beim Betrieb, frühe Phase**

Die Reaktoren im Technikum wurden Ende des Jahres 2004 bis Anfang des Jahres 2005 gereinigt, reaktiviert, repariert und auf die Bedürfnisse der Aufgabenstellung durch Umbaumaßnahmen angepasst. Leider stand zu diesem Zeitpunkt noch keine umfassende Messtechnik zur Verfügung. Daher wurden die Reaktoren nur provisorisch in Betrieb genommen, vor allem um systematische und akute Fehler aufspüren zu können.

#### *Luftführung:*

In den Reingasrohren kondensierte ständig Wasser. Dieses sammelte sich am tiefsten Punkt des Gasauslasssystems, was zu einem ständig ansteigenden Druckverlust führte. Maßnahmen, die darauf anzielten, das Kondenswasser durch den Luftauslaß ausfließen zu lassen, scheiterten. Aufgrund der geometrischen Verhältnisse konnte kein ausreichendes Gefälle erreicht werden. Schließlich wurde ein längerer Schlauch am tiefsten Punkt der Rohgasleitungen angebracht und mit einem Ventil versehen, so dass alle zwei bis drei Tage das kondensierte Wasser abgelassen werden konnte.

Das in den Luftstrom zudosierte Fluorbenzol verdampfte nicht vollständig und sammelte sich im Zuleitungsrohr an. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem Turbulenzkörper in den Luftstrom vor der Zudosierstelle eingebracht wurden.

#### *Kreislauf der Tricklinglösung:*

Ursprünglich war geplant, die Biotricklingfilter kontinuierlich zu befeuchten. Dies schien angebracht, da die Flüssigkeit im Gleichstrom mit der Gasphase bewegt wird. Vorversuche zeigten jedoch, dass der Druckverlust der Tricklinglösung an den verwendeten Vollkegeldüsen sehr hoch ist. Die Tricklinglösung erwärmte sich im Dauerbetrieb aufgrund der isochoren

Kompression in der Zuleitung zwischen Pumpe und Düse auf ca. 60 °C. Daher wurde die Befeuchtung getaktet ausgeführt. Über den gesamten Betriebszeitraum hinweg wurde stets 1 Minute gepumpt, gefolgt von 4 Minuten Inaktivität. Dadurch erreichte die Tricklinglösung maximal 28 °C im Dauerbetrieb.

Bedingt durch den hohen Druckverlust über die in den Reaktordeckeln eingebauten Vollkegeldüsen baute sich ein recht hoher Staudruck auf. Das verwendete Schlauchmaterial erwies sich schon nach kurzer Zeit als nicht geeignet. Die auftretenden Druckstöße beim Aktivieren der Pumpen führten schon nach kurzer Zeit zu Rissen in den Schläuchen (Technikumsfund). Durch den Austausch gegen druckstabiles Material (OBI Gartenschlauch) konnte dieser Mangel behoben werden. Des Weiteren zeigten sich die Schlauchanschlüsse (Gardena System) als weitere Schwachstelle im System. Hier traten häufig Undichtigkeiten auf. Erst das Umstellen auf 1 ¼ Zoll Schraubverbindungen, gehaft oder mit Teflonband abgedichtet, konnten dem Druck standhalten.

Nach einiger Zeit zeigte sich, dass das Packungsmaterial trotz der intensiven Vorreinigung größere Mengen an sandartigen Fragmenten emittierte. Diese sedimentierten größtenteils im Reaktorsumpf. Ein kleiner Teil verblieb jedoch in Suspension. Nach einiger Zeit führte dies zu Abrasionen im Pumpenkopf von Reaktor 1. Deshalb wurden beide Tricklinglösungspumpen ausgetauscht. Die neuen Pumpen enthielten Vorfilter, die alle drei Wochen gereinigt wurden. Die Vollkegeldüsen, welche die Tricklinglösung über die Packung verteilten, wurden etwa alle acht Wochen ausgebaut und mittels Druckluft gereinigt. Dies war nötig, da hier Ablagerungen den Druckverlust der Düsen erhöhten.

### **5.9.2. Regelbetrieb der Reaktoren: Fluorbenzol als Reinsubstrat**

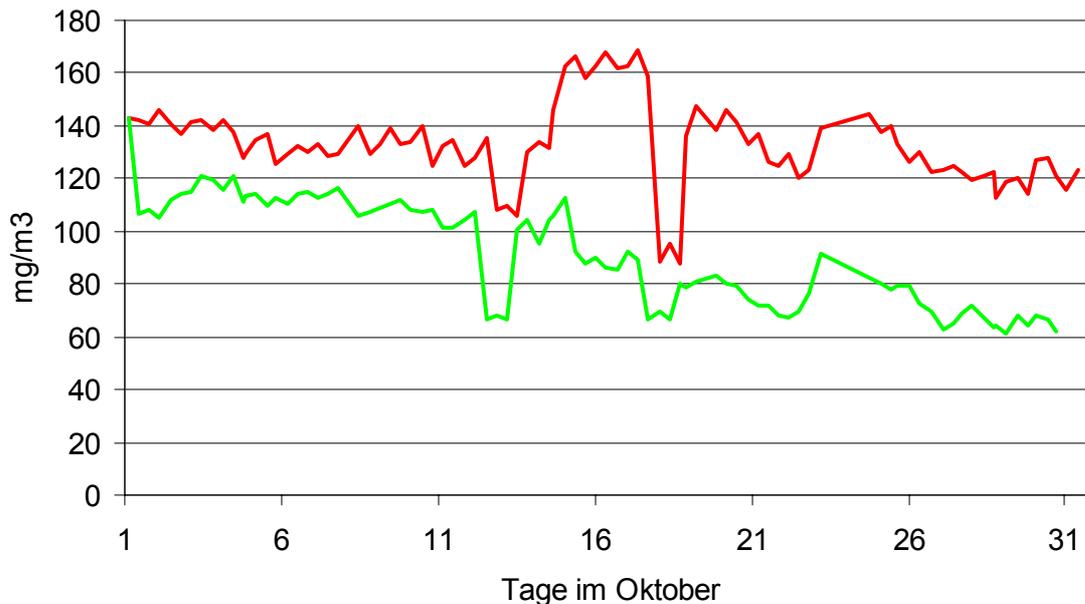
Der Regelbetrieb von Reaktor 2 erstreckte sich von Mitte August 2005 bis Mitte Mai 2006. Der Reaktor wurde bis September 2006 weiterbetrieben, allerdings nur, um die Temperaturen in Roh- und Reingas aufzuzeichnen. Hier sollte ein kompletter Jahresgang ermittelt werden.

#### **5.9.2.1. Gang der Konzentrationen in Roh- und Reingas**

Der Regelbetrieb des Reaktors begann mit der Aktivierung der kontinuierlichen FID - Aufzeichnung (siehe Bild 110). Anfangs arbeitete der Reaktor zufriedenstellend, nach ca. 25 Tagen brach der Wirkungsgrad ein (siehe Bild 111). Dieser war nach 45 Tagen auf unter 15 % gesunken. Durch den vollständigen Austausch des Sumpfs und einer Reinigung der Packung durch Übersprühen von ca. 3 Sumpfvolumen Wassers konnte dieser behoben werden. Danach erfolgte eine Neuinokulation mit FLU 100 am 1. Oktober 2005, wo mit die Abbauleistung des Reaktors wieder erhöht werden konnte. In Bild 101 und Bild 102 ist die erneute Anfahrphase dargestellt. Der Wirkungsgrad des Reaktors stieg innerhalb von zwei

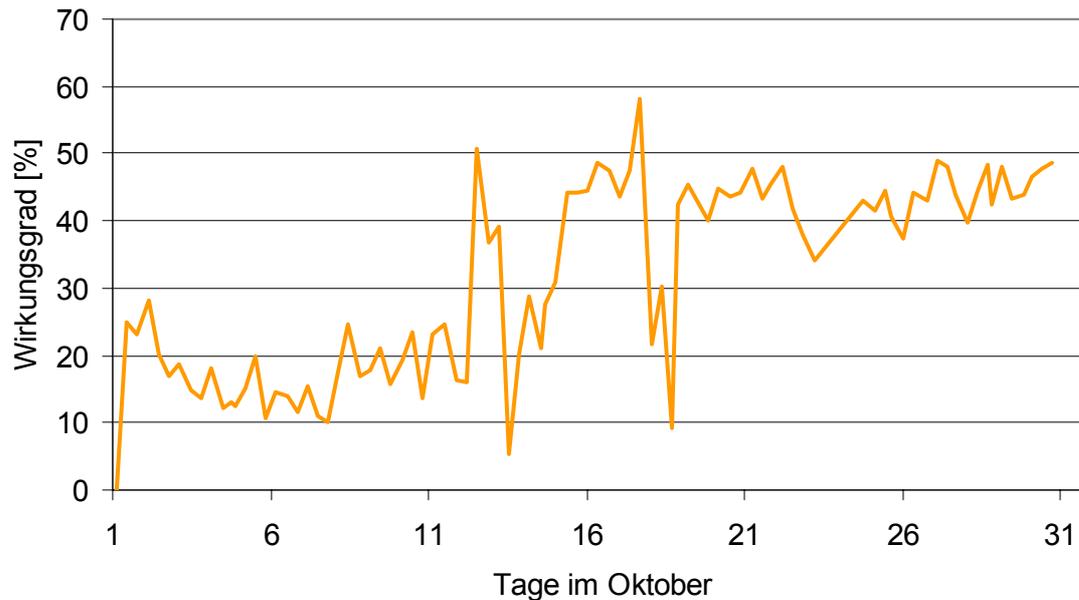
Wochen nach den beschriebenen Maßnahmen wieder auf 45 % an (Bild 111). Die Eliminationsleistung lag dabei durchschnittlich bei  $5 \text{ g} / \text{m}^3 \text{ h}$  (Bild 112).

Nach 185 Betriebstagen brach der Wirkungsgrad erneut ein (Bild 111). Es gelang daraufhin nicht mehr, den Reaktor wieder zufriedenstellend in Betrieb zu nehmen und unter den gewählten Bedingungen zu betreiben. Die Abbauleistung der Biozönose war nicht ausreichend für den geforderten Regelbetrieb.



**Bild 101: Beispiel für die erneute Anfahrphase von Reaktor 2 im Oktober 2005 beim Abbau von Fluorbenzol**

Dargestellt ist die Konzentration von Fluorbenzol im Roh- (rot) und Reingas (grün). Die Inokulation fand am 1. Oktober statt. Mit zunehmender Betriebszeit ist eine Aufspreizung der Roh- und Reingaskurve zu beobachten.



**Bild 102: Beispiel für die erneute Anfahrphase von Reaktor 2 im Oktober 2005 beim Abbau von Fluorbenzol**

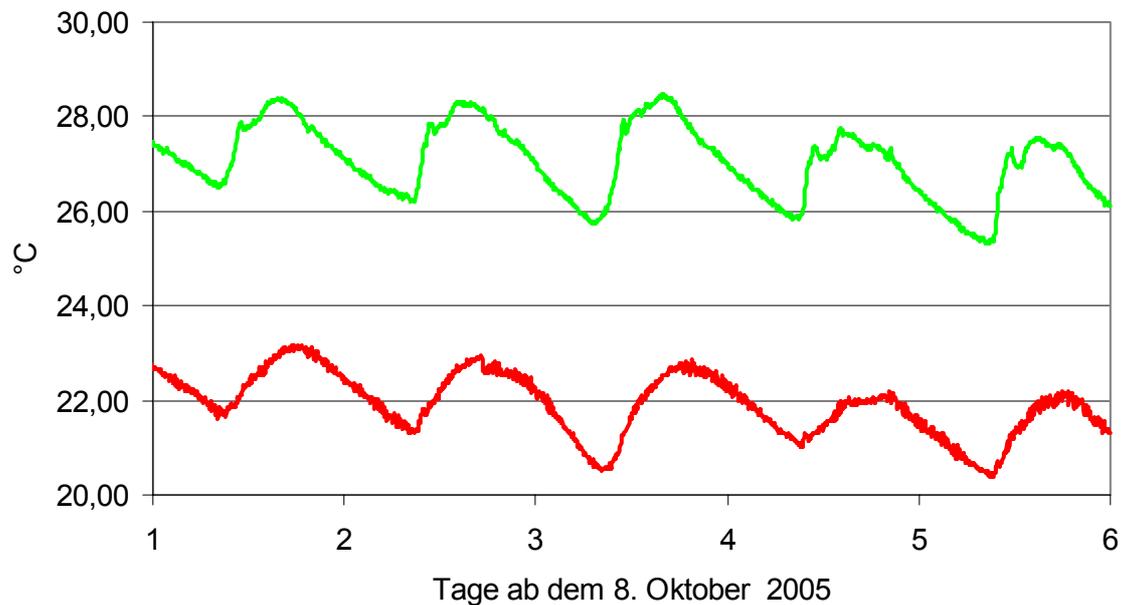
Dargestellt ist der Gang des Wirkungsgrads. Dieser beginnt etwa zwei Wochen nach der Inokulation kontinuierlich anzusteigen und verweilt dann bei durchschnittlich 45 %.

### 5.9.2.2. Gang der Temperaturen und der Spannungsreferenz

Der Gang der Temperaturen im Roh- und Reingas von Reaktor 2 ist in Bild 113 dargestellt. Dabei ist die Temperatur des Reingases gegenüber der Umgebungsluft aufgrund der Kompressionswärme leicht erhöht (siehe Bild 122). Innerhalb des Reaktors verdampft ständig Wasser. Die Energie hierfür wird durch Abkühlung der Rohluft gewonnen, welche den Reaktor wasserdampfgesättigt verlässt. Im Durchschnitt beträgt die Abkühlung 6 °C. Das System kann aufgrund der Wärmekapazität der Reaktorpackung und des Reaktorsumpfs Temperaturspitzen im Rohgas abpuffern (siehe Bild 103).

Die "Welligkeit" der Kurven rührt von Tag- und Nachtzyklen her. Um dies zu verdeutlichen, sind in Bild 103 sechs Tage der Messungen aus dem Oktober 2005 herausgegriffen. Dort sind sehr schön die Heizzyklen im Technikum zu beobachten. Morgens um 9 Uhr beginnt die Temperatur rasch um 1,5 bis 2,5 °C zu steigen. Sie erreicht um 17 Uhr ihren Höhepunkt und sinkt dann kontinuierlich wieder ab, bis zum erneuten Beginn der Heizphase. Der Gang der Temperatur des Reingases folgt ohne erkennbare Verzögerung dem des Rohgases. Allerdings sind Temperaturspitzen hier etwas "abgeschliffen". Die Temperaturen wurden über mehr als 400 Tage aufgezeichnet, obwohl das eigentliche Experiment 250 Tage dauerte. Der Reaktor wurde nach Ende der Regelbetriebszeit weiterbetrieben, um einen kompletten Jahresgang der

Temperaturen zu erhalten (siehe Bild 113). Sehr schön sind die jahreszeitlichen Temperaturschwankungen im Technikum zu erkennen. Diese liegen zwischen 18 und 28 °C.



**Bild 103: Beispiel für die Tagesgänge der Temperaturen von Rohgas (grün) und Reingas (rot)**

Durch das damals aktuelle Wettergeschehen sank die Durchschnittstemperatur im betrachteten Zeitraum leicht ab. Schön zu sehen sind die Heizphasen im Technikum, die ziemlich genau um 9 Uhr morgens starten. Die Temperaturen erreichen in der Regel um 17 Uhr ihr Maximum. Die Temperatur des Reingases folgt der Temperatur des Rohgases sehr schön.

Der Gang der Spannungsreferenz (Bild 114, das dargestellte Diagramm überlappt mit dem in Bild 126) ist ein Qualitätsmerkmal für die Präzision der anderen Sensoren, im Regelbetrieb von Reaktor 2 sind dies nur die zwei Temperatursensoren. Die Schwankungen, außerhalb der außergewöhnlichen Spitzen lagen langfristig bei nur 0,82 %.

### 5.9.2.3. Aufgetretene Störfälle im Regelbetrieb von Reaktor 2

Die verwendeten baugleichen Messgeräte (FIDAMAT) zeigten im Zeitraum des Experiments zahlreiche Ausfälle. Zumeist versagten die in den Geräten integrierten Pumpen, oder die Wasserstoffflamme brannte nicht stabil. Auch musste sehr häufig nachkalibriert werden, da die Messwerte einer großen Drift unterworfen waren.

*Tag 78 und 202:*

Komplettausfall des FIDs. Dieses ließ sich nicht mehr reaktivieren und musste ausgetauscht werden.

*Tag 120, 157 und 185:*

Ausfall der Wasserstoffflamme im FID. Nach der Neuzündung wurde abgewartet bis sich das Gerät equilibriert hatte, danach wurde neu kalibriert.

*Tag 129:*

FID – Ausfall aufgrund eines partiellen Stromausfalls. Die anderen Sensoren und der Computer für die Datenaquisition waren davon nicht betroffen.

*Tag 130:*

Die Spannungsquelle für die Sensoren wurde durch ein Fremdverschulden beschädigt und ist ausgefallen. Dies konnte glücklicherweise zeitnah entdeckt und behoben werden, so dass sie schon wieder am selben Tag in Betrieb genommen werden konnte. Die Spannungsreferenz wurde erst zwei Wochen später wieder aufgezeichnet.

**5.9.2.4. Veränderungen der Filterpackung**

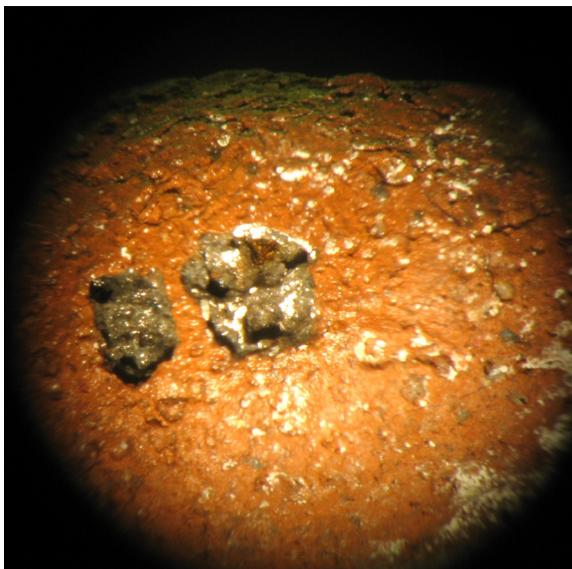
Der als Filterpackung dienende Blähton war während des Betriebs des Reaktors starken Veränderungen unterworfen. Ursprünglich wurde die gesiebte Fraktion mit einem Durchmesser von mehr als 11 mm eingesetzt (siehe Bild 104). Trotz mehrmaligem Vorwaschen emittierte die Packung in den ersten vier Wochen des Betriebs noch größere Mengen an einem sandartigem Material. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Abrieb oder Partikel, die mit den Blähtonkügelchen verbacken waren.



**Bild 104: Habitus des ursprünglich als Filterpackung eingesetzten Blähtons**

Der Blähton wurde gesiebt und nur die Fraktion mit einem Durchmesser von mehr als 11 mm wurde eingesetzt

Nach der Inbetriebnahme des Reaktors war die Packung von Reaktor 2 stellenweise mit Bakterien bewachsen. In dieser Situation begann der Regelbetrieb.



**Bild 105: Habitus des Filtermaterials bei Beginn des Regelbetriebs**

Im linken Bild, unter der Lupe betrachtet, sind kleine Bakterienkolonien zu erkennen. Im rechten Bild sind größerflächige Kolonien zu erkennen. Der Durchmesser eines Kornes liegt bei 12 mm.

Nach Ende des Regelbetriebs wurde Reaktor 2 erneut geöffnet. Es zeigte sich, dass das Filtermaterial und die Reaktorwand mit einem 2 – 3 mm dicken Biofilm besiedelt war (siehe Bild 106). Die Packung war um 14 cm kompaktiert, dies entspricht 21,5 % des ursprünglichen Volumens (siehe Bild 107). Die Blähtonkugeln waren von Läsionen übersät. Besonders in den Vertiefungen hatten sich Bakterien angesiedelt (siehe Bild 108).



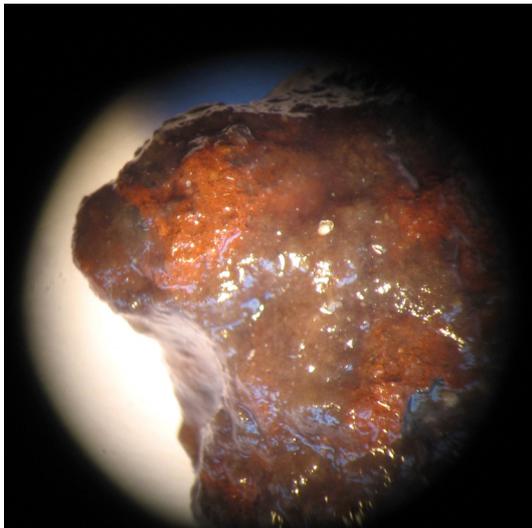
**Bild 106: Reaktor 2, Ende des Regelbetriebs**

Die Packung ist von einem Biofilm besiedelt, diese bedeckt unregelmäßig die Oberflächen und befindet sich vor allem in den Vertiefungen der Kügelchen. Das Bild zeigt Material aus ca. 10 cm Tiefe, also nicht von der angeströmten Oberfläche. Der minimale Korndurchmesser beträgt 11 mm.



**Bild 107: Reaktor 2, am Ende des Regelbetriebs**

Der Kopf wurde geöffnet, so dass die Anströmseite der Packung sichtbar wird. Dieses Bild entstand am Ende des Regelbetriebs. Der rote Pfeil markiert die Kompaktierungszone des Filtermaterials. Dieses sank während des Regelbetriebs um 14 cm. Die braune Schicht stellt den Biofilm dar. Die Vollkegeldüse erreichte ursprünglich exakt die Packungsoberfläche. Da diese abgesunken war, wurde durch die Bedüsung das Aufwachsen eines Biofilms an der Reaktorwand in diesem Bereich verhindert.



**Bild 108: Reaktor 2, Habitus des Filtermaterial am Ende des Regelbetriebs**

Im linken Bild ist ein Blähtonkugelchen aus dem Kern der Packung unter der Stereolupe abgebildet. Der Biofilm umgibt das Trägermaterial ungleichmäßig. Vor allem Vertiefungen sind besiedelt. Im rechten Bild ist ein Kugelchen abgebildet, das nahe der angeströmten Oberfläche der Packung aus etwa 3 cm Tiefen entnommen wurde. Hier befindet sich der Biofilm ausschließlich in den läsionsartigen Vertiefungen.



**Bild 109: Reaktor 2, Filtermaterial am Ende des Regelbetriebs**

Gezeigt werden vom Biofilm gereinigte Blähtonkügelchen. Diese zeigen zahlreichen Läsionen und Absplitterungen

#### 5.9.2.5 Analyse von Ablagerungen aus dem Sumpf

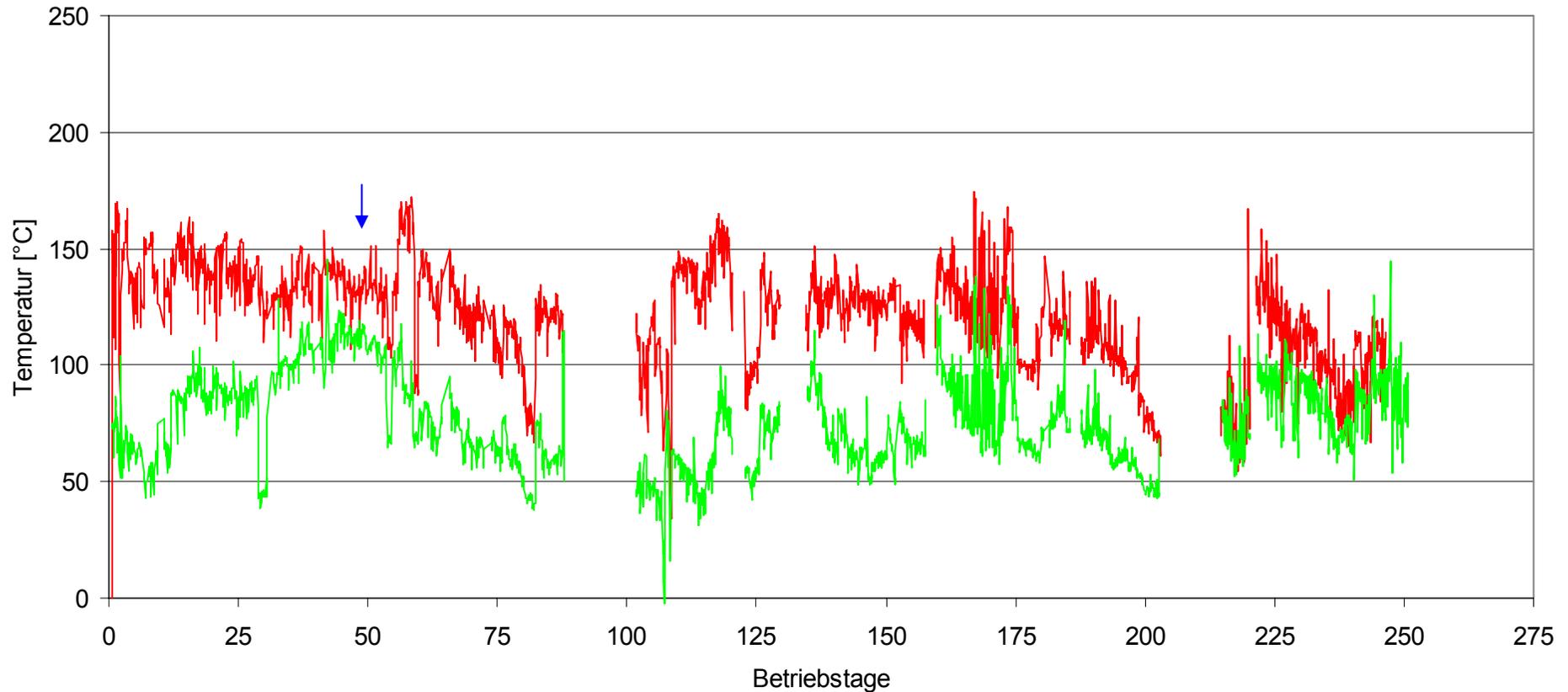
Nach 3 Monaten Betrieb der Anlage traten vermehrt weisse, kristalline Ablagerungen im Reaktorsumpf auf. Diese wurden am Ende der Betriebszeit entnommen, getrocknet und mittels energiedispersiver Röntgenanalyse (siehe Kapitel 4.8.4.) einer Elementaranalyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 57 zusammengestellt.

**Tabelle 57: Elementaranalyse der weißen Ablagerungen im Reaktorsumpf von Reaktor 2 am Ende der Betriebszeit**

Bestimmt werden konnten die Anteile aller Elemente, welche schwerer als Bor sind. Wasserstoff wird also nicht erfasst.

Element	C	O	F	Na	Mg	Al	Si	P	Ca
Massenanteil	9,2	27,7	2,8	1,0	2,2	1,5	5,3	14,5	35,7
Stoffmengenanteil	17,5	39,5	3,4	0,9	2,0	1,3	4,3	10,7	20,3

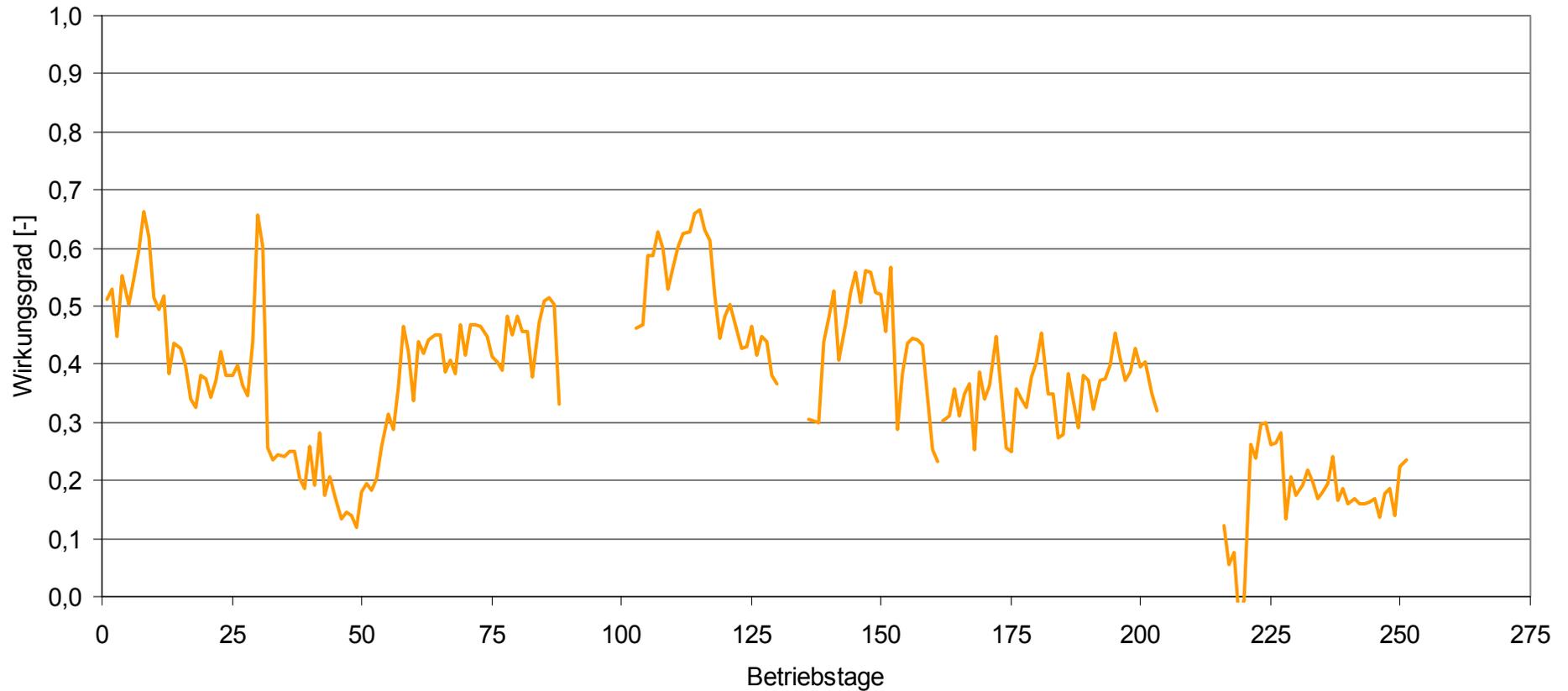
### Reaktor 2, Fluorbenzol als Reinsubstrat: Konzentrationen im Roh- und Reingas



**Bild 110: Reaktor 2, Abbau von Fluorbenzol - belasteter Luft, Konzentrationen im Roh- und Reingas**

Gang der Konzentration im Roh- (rot) und Reingas (grün). Die Lücken im Gang der Kurven sind auf FID – Ausfälle zurückzuführen. Nach ca. 45 Tagen brach der Wirkungsgrad dramatisch ein (blauer Pfeil). Um die Funktionalität des Reaktors wieder herzustellen, wurde der Sumpf des Reaktors komplett ausgetauscht, sowie die Packung mit ca. 360 Liter Frischwasser gewaschen.

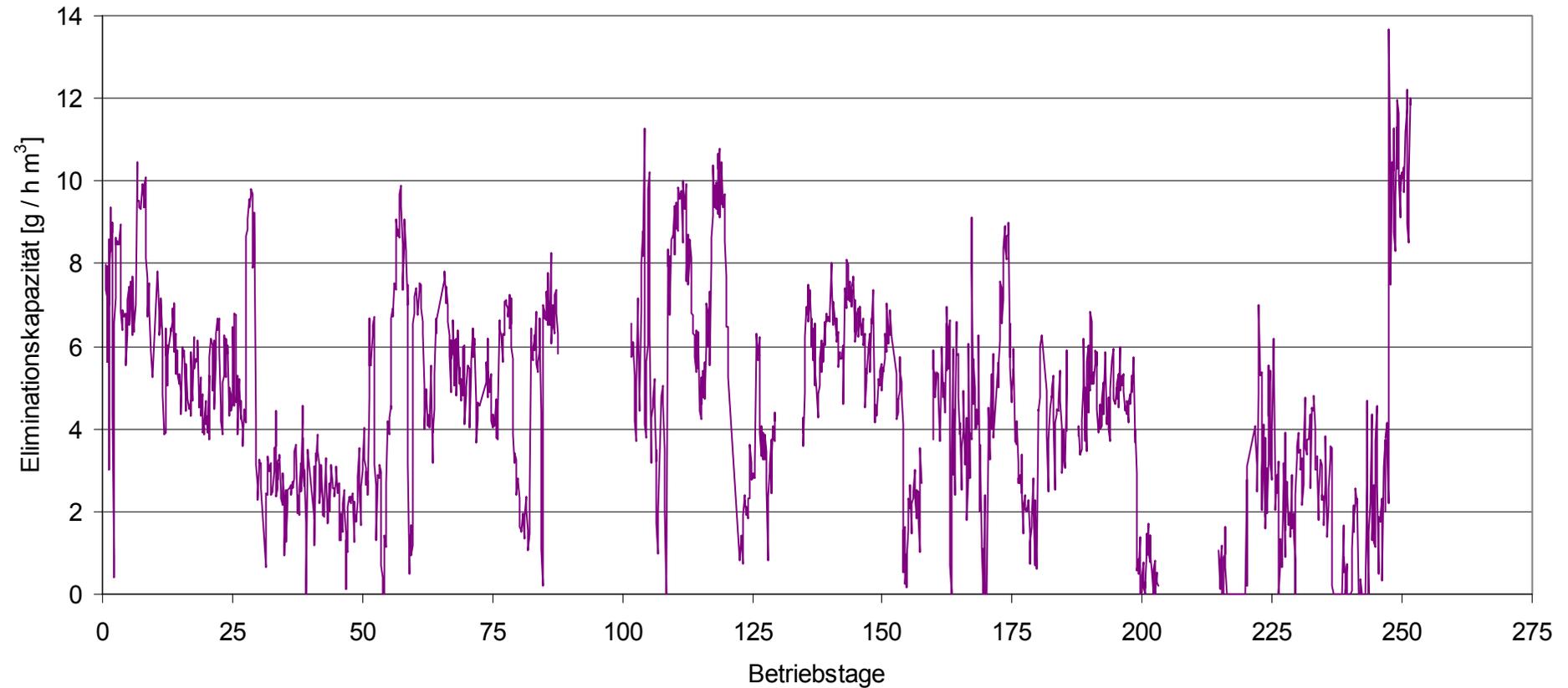
### Reaktor 2, Fluorbenzol als Reinsubstrat: Wirkungsgrad



**Bild 111: Reaktor 2, Abbau von Fluorbenzol - belasteter Luft, Wirkungsgrad**

Gang des Wirkungsgrads. Am Tag 1, Tag 48 und am Tag 219 fanden Inokulationen statt. Der Reaktor erreichte selten mehr als 45 % Wirkungsgrad.

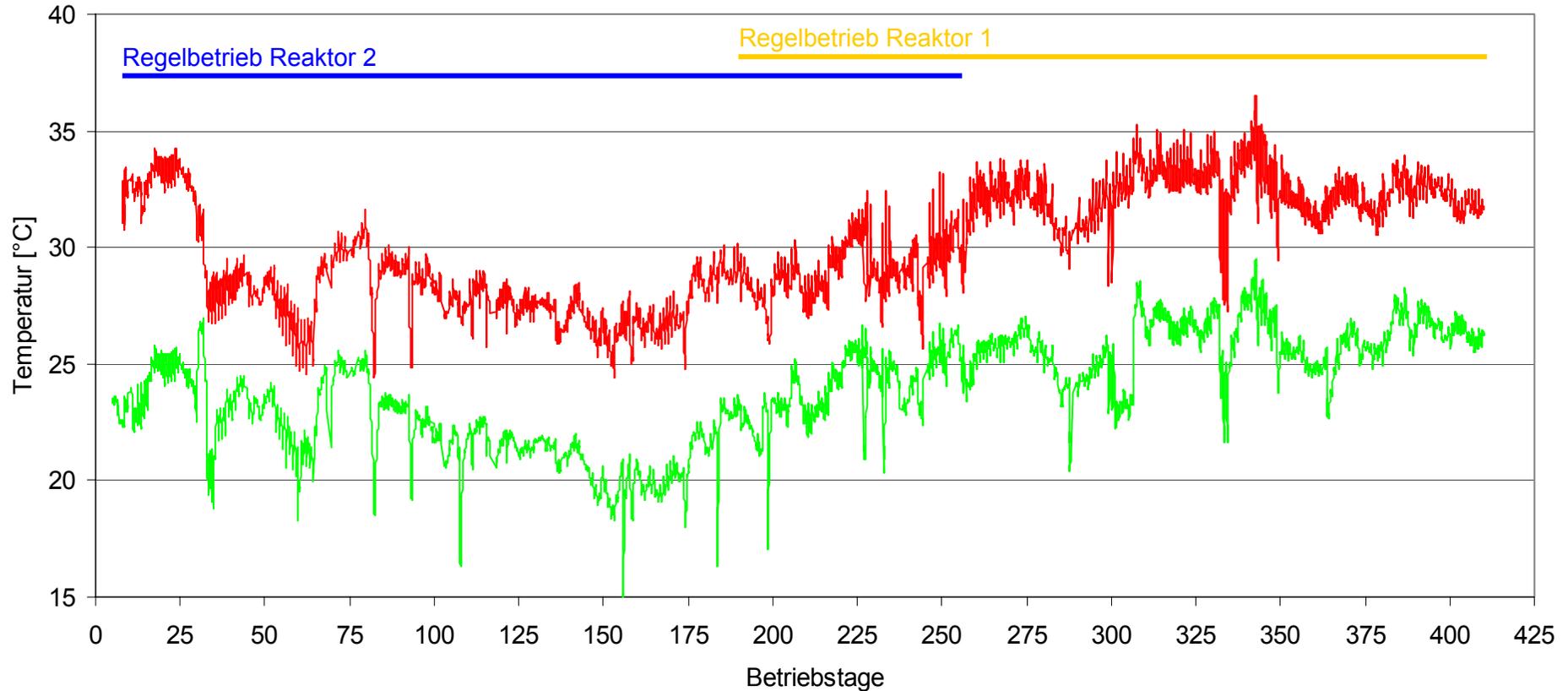
### Reaktor 2, Fluorbenzol als Reinsubstrat: Eliminationskapazität



**Bild 112: Reaktor 2, Abbau von Fluorbenzol - belasteter Luft, Eliminationskapazität**

Gang der Eliminationskapazität. Diese ist, wie die Konzentrationen an Fluorbenzol im Roh- und Reingas, von denen sie abgeleitet ist, starken Schwankungen unterworfen.

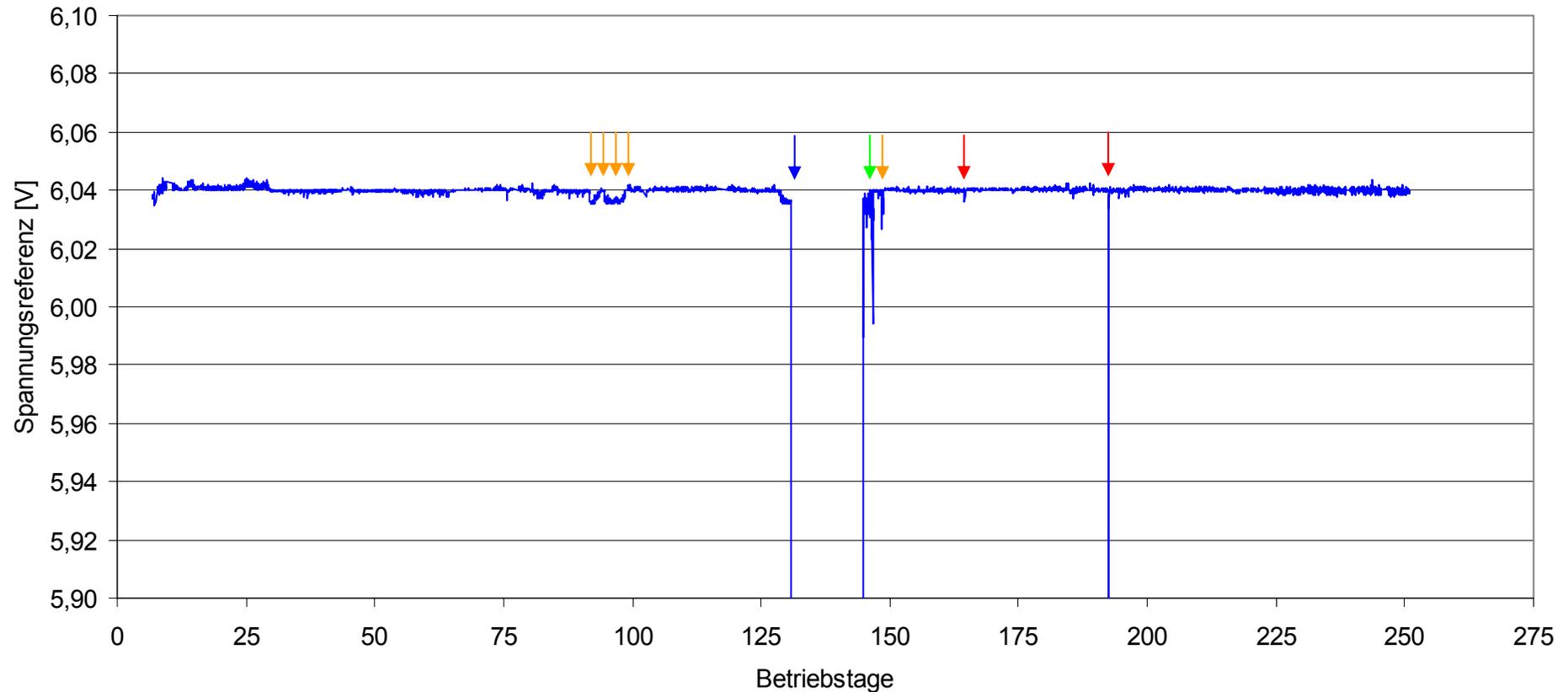
## Reaktor 2, Fluorbenzol als Reinsubstrat: Temperaturen des Roh- und Reingases



**Bild 113: Reaktor 2, Abbau von Fluorbenzol - belasteter Luft, Temperaturen**

Gang der Temperaturen des Rohgases (rot), Reingases (grün). Das Experiment dauerte von August 2005 bis September 2006 (Achtung: Andere Zeitskala als in den Bildern 110 – Bild 112 und Bild 114). Die Welligkeit der Kurven rührt von Tag- / Nachtzyklen her, Details siehe Bild 103. Im Reaktor verdampft stetig Wasser, dazu muss die Verdampfungsenthalpie aufgewendet werden, was den Luftstrom abkühlt. Daher ist die Temperatur des Reingases durchschnittlich um 6 °C geringer als die Rohgastemperatur. Die Temperatur des Reingases folgt der Temperatur des Rohgases. Sehr schön zu beobachten sind die jahreszeitlichen Einflüsse auf die Temperatur des Rohgases.

## Reaktor 2, Fluorbenzol als Reinsubstrat: Gang der Spannungsreferenz



**Bild 114: Reaktor 2, Abbau von Fluorbenzol - belasteter Luft, Spannungsreferenz**

Gang der Spannungsreferenz. Die roten Pfeile markieren die Bereiche, in denen Kontaktschwierigkeiten innerhalb der Spannungsreferenz auftraten (vergleiche Bild 126). Außergewöhnliche Schwankungen in der Spannungsversorgung der Sensoren werden durch orangene Pfeile markiert (siehe Text). Der blaue Pfeil markiert den Zeitpunkt des Ausfalls der Spannungsversorgung. Diese konnte schnell behoben werden, jedoch wurde die Spannungsreferenz erst später wieder in Betrieb genommen (grüner Pfeil).

### 5.9.3. Regelbetrieb der Reaktoren: Mischung aus Fluorbenzol und Chlorbenzol

Zwischen dem 15.02.2006 und dem 27.10.2007 wurde Reaktor 1 mit einer äquimolaren Mischung aus Chlorbenzol und Fluorbenzol betrieben. Der Umstieg von Fluorbenzol auf dieses Substratgemisch erfolgte fliegend, also ohne weitere Änderung an der Verfahrensführung. Die Reaktoren konnten konstant ohne größere Ausfälle betrieben werden.

#### 5.9.3.1. Beobachtungen während des Betriebs

Die Konzentrationen beider Komponenten im Rohgas schwankten während des Experiments um bis zu 40 % (siehe Bild 118, dunkelrote Kurve), jedoch blieb das Verhältnis von Fluorbenzol und Chlorbenzol weitgehend konstant (siehe Bild 115). Als Grund der Schwankungen der Messwerte im Rohgas kommen eigentlich nur systematische Fehler in Frage. So verlief die Probennahme in der Technikumsumgebung nicht immer perfekt, möglicherweise wurde Fremdluft mit eingezogen. Neben diesen unumgänglichen Probennahmeproblemen kommt auch der lange Transportweg der Gasproben aus dem Technikum zum Gaschromatographen in Betracht. Hier können sich die Substrate in kleinsten Wassertropfen lösen und so die ermittelten Konzentrationen weiter verfälschen. Am Tag 201 fiel der Dosimat aus, der die Substrate in die Rohluft einbrachte, konnte jedoch zeitnah wieder gestartet werden.

Die Konzentrationen von Fluorbenzol und Chlorbenzol im Reingas, während des Experimentenintervalls gemessen, zeigten deutliche qualitative und quantitative Unterschiede. So liegt die Konzentration des Chlorbenzols konstant bei ca.  $5 \text{ mg / m}^3$  mit nur wenigen Ausrissen nach oben (siehe Bild 116), vor allem gegen Ende des Experiments. Die Konzentration des Fluorbenzols im Reingas war wesentlich größer als die des Chlorbenzols. Der Abbau erfolgte nicht im ausreichenden Maß. In den ersten 100 Tagen des Experiments lag die Konzentration des Fluorbenzols bei über  $30 \text{ mg / m}^3$ , erst danach stabilisierte sie sich auf  $20 \text{ mg / m}^3$ , allerdings bei großen Ausschlägen nach oben und unten. In Bild 118 sind die Konzentrationen in Roh- und Reingas als Summenparameter aufgetragen. Auch hier sieht man, dass sich der Betriebszustand des Reaktors erst nach 100 Tagen stabilisierte.

Aus den Konzentrationen der Substrate im Roh- und Reingas lassen sich die selektiven Wirkungsgrade (siehe Bild 117) sowie der Gesamtwirkungsgrad berechnen (siehe Bild 119). Reaktor 1 zeigte im gesamten Zeitraum des Experiments bezüglich des Chlorbenzols einen Wirkungsgrad von durchschnittlich 90 %. Der Wirkungsgrad bei der Abreinigung von Fluorbenzol lag in der ersten Hälfte der Kampagne bei 40 % und stieg dann nach 115 Tagen auf 50 – 60 % an, was bis zum Ende des Experiments gehalten werden konnte. Fluorbenzol wird im System also deutlich schlechter abgebaut als Chlorbenzol. Dies hat auch Auswirkungen auf den Gesamtwirkungsgrad (siehe Bild 119). Dieser lag während des Experiments zwischen 60 und 75 %.

Die Eliminationskapazität, siehe Bild 120, folgt im Wesentlichen dem Gang der Gesamtrohgaskonzentration. Sie liegt im Mittel bei  $7 \text{ g} / \text{m}^3 \text{ h}$  und damit am unteren Bereich des für einen leistungsfähigen Biotricklingfilter zu erwartenden Bereichs. Allerdings muss hierbei auch die Degradierbarkeit der Substrate in die Überlegung miteinbezogen werden.

Der Gang des pH – Wertes des Reaktorsumpfs ist in Bild 121 dargestellt. In den ersten sechzig Tagen des Experiments ist er von starken Schwankungen betroffen. In diesem Bereich liegt ein Experiment, in dem der Sumpf gegen ungepuffertes Trinkwasser ausgetauscht wurde (Tag 24 - Punkt ①, bis 29 - Punkt ②). Hier wurde ein rascher Abfall des pH – Wertes beobachtet. Dieser ist vor allem auf den bei der Degradation von Chlorbenzol gebildeten Chlorwasserstoff, gelöst als Salzsäure, zurückzuführen. Der Beitrag des Fluorwasserstoffes zur Absenkung des pH – Wertes ist gering. Ab dem mit ③ gekennzeichneten Punkt in Bild 121 wurde dem Sumpf eine größere Menge  $\text{NaHCO}_3$  zugesetzt, um dessen Pufferbereich auszunutzen. Allerdings ist der pH – Wert daraufhin stark angestiegen, was durch einen kompletten Sumpfwechsel behoben werden konnte (Punkt ④). Ab Punkt ⑤ stellten sich stabilere Zustände im System ein. Der pH – Wert schwankte nur noch zwischen 6,0 und 7,5, später zwischen 6,0 und 7,0, also im optimalen Bereich für die Degradation von Monohalogenaromaten durch den Stamm FLU 100.

Der Gang der Temperaturen von Raumluft im Technikum, Rohgas und Reingas (siehe Bild 122) ist im wesentlichen durch die Tages- und Jahreszeiten bestimmt. Schön zu erkennen sind die Tag / Nachtzyklen und der Anstieg der Temperaturen zwischen Frühling und Sommer. Die Umgebungsluft wird durch den Kompressor angezogen und verdichtet. Dabei steigt die Temperatur zwischen 6 und  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  an. Im Reaktor verdampft ständig Wasser, dessen Verdampfungsenthalpie den Luftstrom wiederum um 4 bis  $6 \text{ }^\circ\text{C}$  abkühlt. Das Reingas verlässt das System also leicht erwärmt.

Das Rohgas tritt in das System leicht erwärmt ein, daher ist seine relative Feuchtigkeit gegen diejenige der Umgebungsluft leicht abgesenkt. Der Gang der Feuchtigkeit im Rohgas ist ebenfalls von Tages- und Jahreszeiten abhängig (siehe Bild 123) Im System verdampft Wasser. Während des ganzen Experiments war das Reingas wasserdampfgesättigt, selbst als der Kompressor kurze Zeit nicht arbeitete. Es befand sich also genügend Wasser im Rohrsystem um dies zu gewährleisten. Der absolute Feuchtigkeitsgehalt des Reingases ist demnach nur von dessen Temperatur bestimmt (siehe Bild 123). Er stieg aufgrund der Jahreszeiten, dem Übergang von Frühjahr zu Sommer an. Die verdampfte Menge an Wasser pro Stunde sank demnach von durchschnittlich  $80 \text{ g} / \text{h}$  auf ca.  $45 \text{ g} / \text{h}$  ab, siehe Bild 124.

Der Staudruck des Kompressors (siehe Bild 127) ist während der Messperiode sehr konstant. Nur an Tag 78 fiel der Kompressor kurze Zeit aus (siehe unten). Ab Tag 185 sank der Staudruck ab, da an anderen Reaktoren, welche am Kompressor angeschlossen waren, die Durchflussrate erhöht wurde.

Die interne Spannungsüberwachung des Sensorsystems (siehe Bild 126) zeigte eine hohe Stabilität des Systems. Insgesamt sank die Versorgungsspannung im System während der

Messkampagne nur um 0,28 % ab. Es sind drei Einschnitte zu erkennen. Zwei davon, an Tag 12 und 192, diese sind auf Kontaktschwierigkeiten in der Spannungsüberwachung zurückzuführen. An Tag 77 ereignete sich ein Stromausfall, der rasch behoben werden konnte, siehe unten.

### **5.9.3.2. Störfälle während des Betriebs**

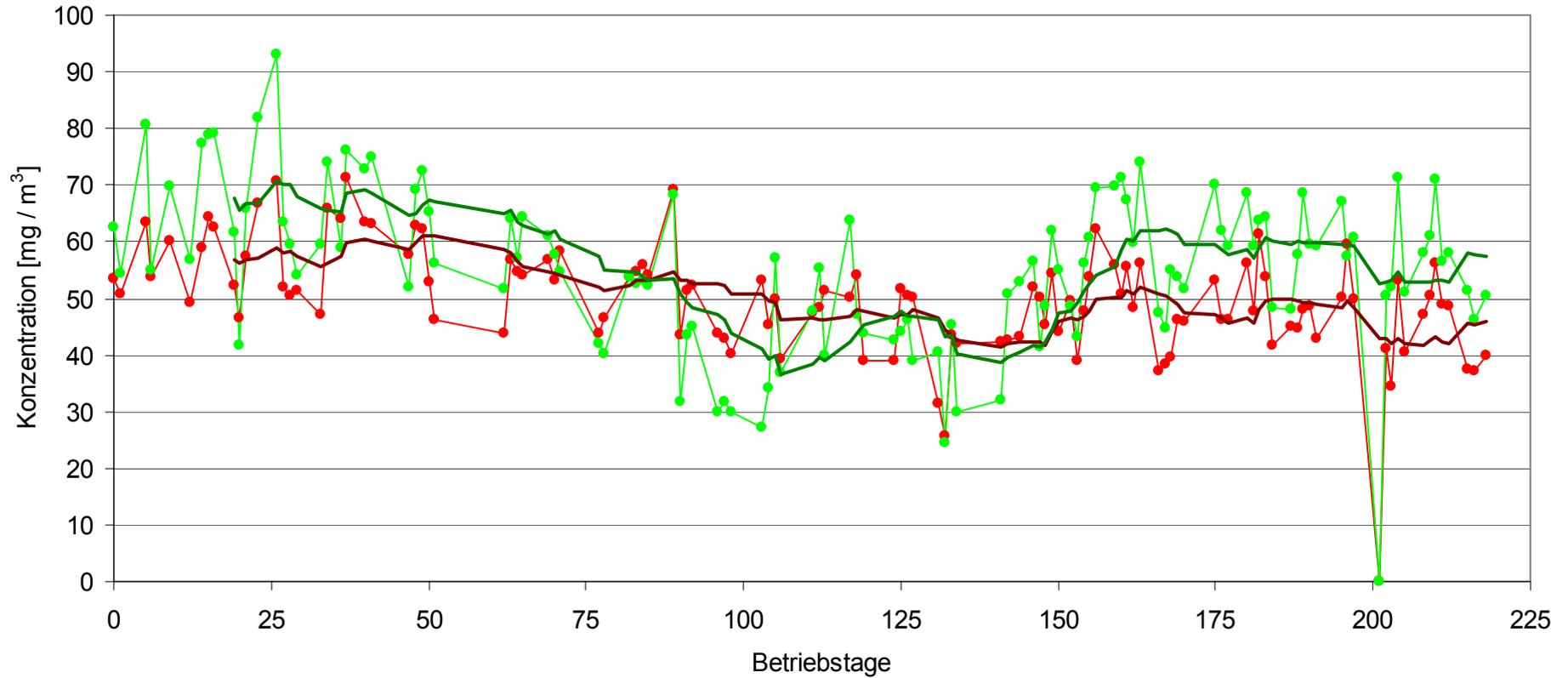
#### *Tag 78: Stromausfall*

Aufgrund eines Kurzschlusses im Technikum fiel der Strom für ca. eine Stunde aus. Dies geschah in den frühen Morgenstunden. Der Messcomputer und der Dosimat starteten daraufhin nicht automatisch, sondern mussten manuell gestartet werden. Dieser Stromausfall hatte keine Auswirkungen auf den Betrieb der Anlage.

#### *Tag 201: Ausfall des Dosimaten*

Aufgrund eines nicht nachvollziehbaren Fehlers fiel der Dosimat an diesem Tag aus. Er nahm keine manuellen Eingaben mehr an und musste durch kurzzeitiges Abklemmen von der Stromversorgung neu gestartet werden. Dieser Fehler trat nur einmalig auf.

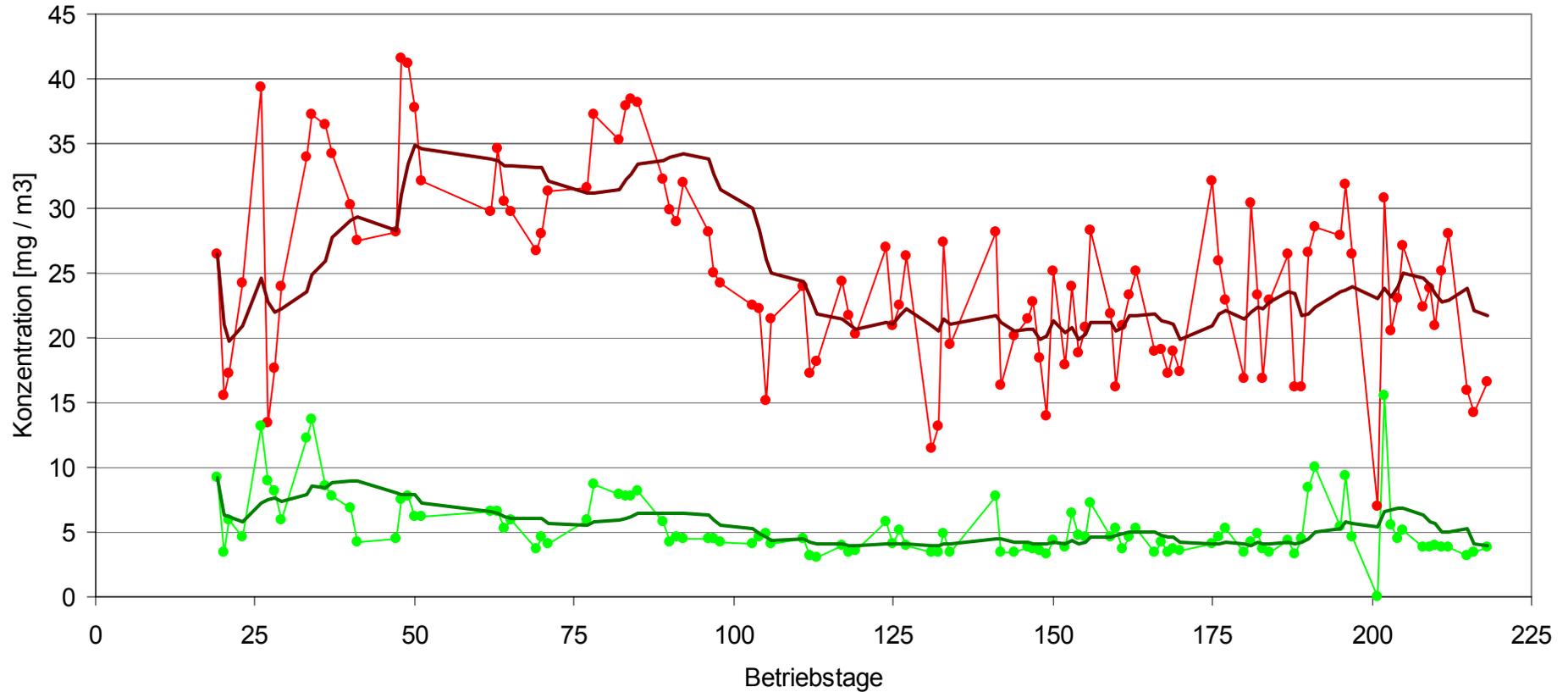
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Konzentrationen im Rohgas



**Bild 115: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Rohgaskonzentrationen**

Gang der Konzentrationen von Fluorbenzol (rot) und Chlorbenzol (grün) im Rohgas. Dargestellt sind zusätzlich die 10-Tagesmittelwerte für Fluorbenzol (dunkelrot) und Chlorbenzol (dunkelgrün). Die Schwankungen in den Konzentrationen verlaufen für beide Komponenten weitestgehend parallel, sind also auf systematische Einflussgrößen wie Änderung des Druckabfalls in den Reaktoren und Probennameeffekte zurückzuführen. Nichtsystematische Einflussgrößen liegen in der Meßmethode (GC) und in den unterschiedlichen Verdampfungsenthalpien von Fluorbenzol und Chlorbenzol. Am Tag 201 war der Dosimat ausgefallen, hier gingen die Konzentrationen auf 0 zurück.

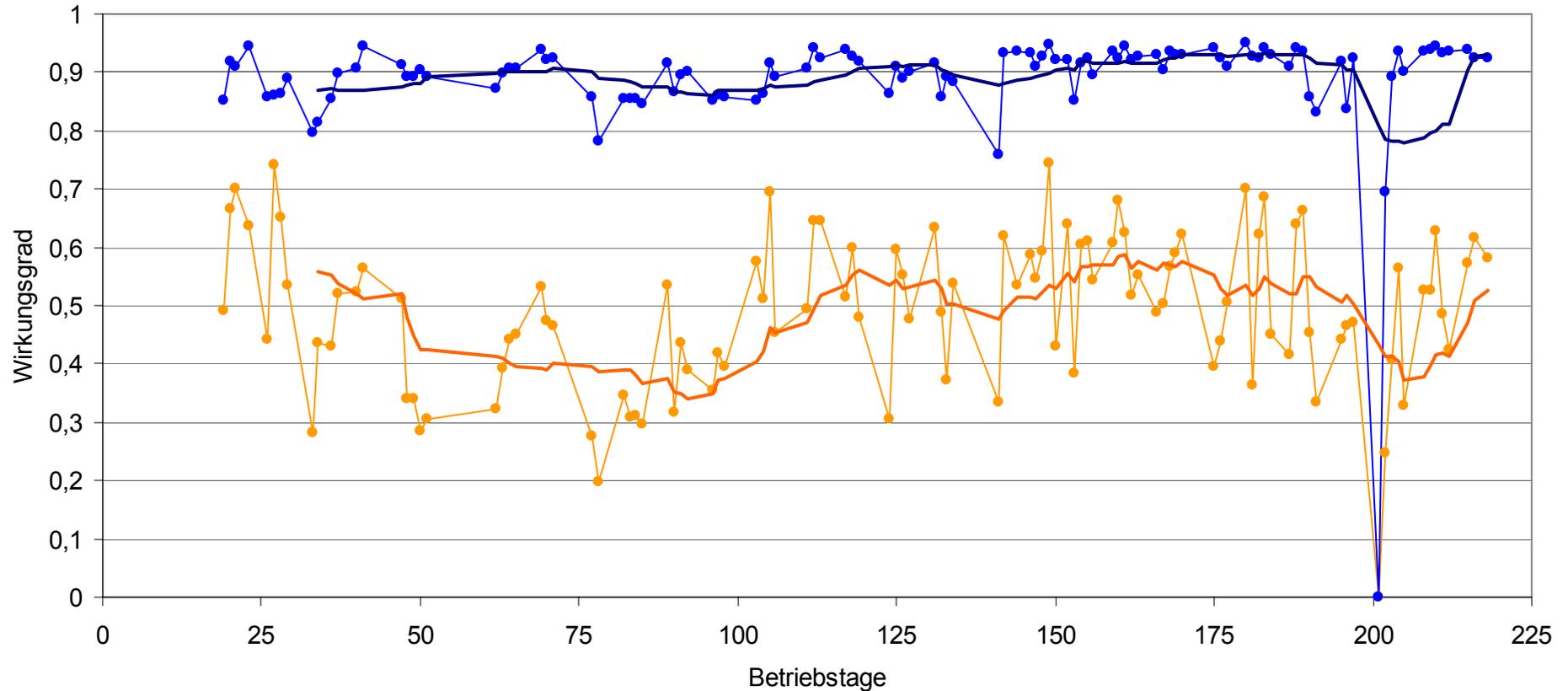
Reaktor 1, Mischsubstrat: Konzentrationen im Reingas



**Bild 116: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Reingaskonzentrationen**

Gang der Konzentrationen von Fluorbenzol (rot) und Chlorbenzol (grün) im Reingas. Dargestellt sind zusätzlich die 10-Tagesmittelwerte für Fluorbenzol (dunkelrot) und Chlorbenzol (dunkelgrün). Die Konzentration des Chlorbenzols liegt deutlich niedriger als die des Fluorbenzols. Vergleicht man die Reingaskonzentrationen mit den Rohgaskonzentrationen (siehe Bild 115) so fällt auf, dass Chlorbenzol deutlich besser abgebaut wird als Fluorbenzol.

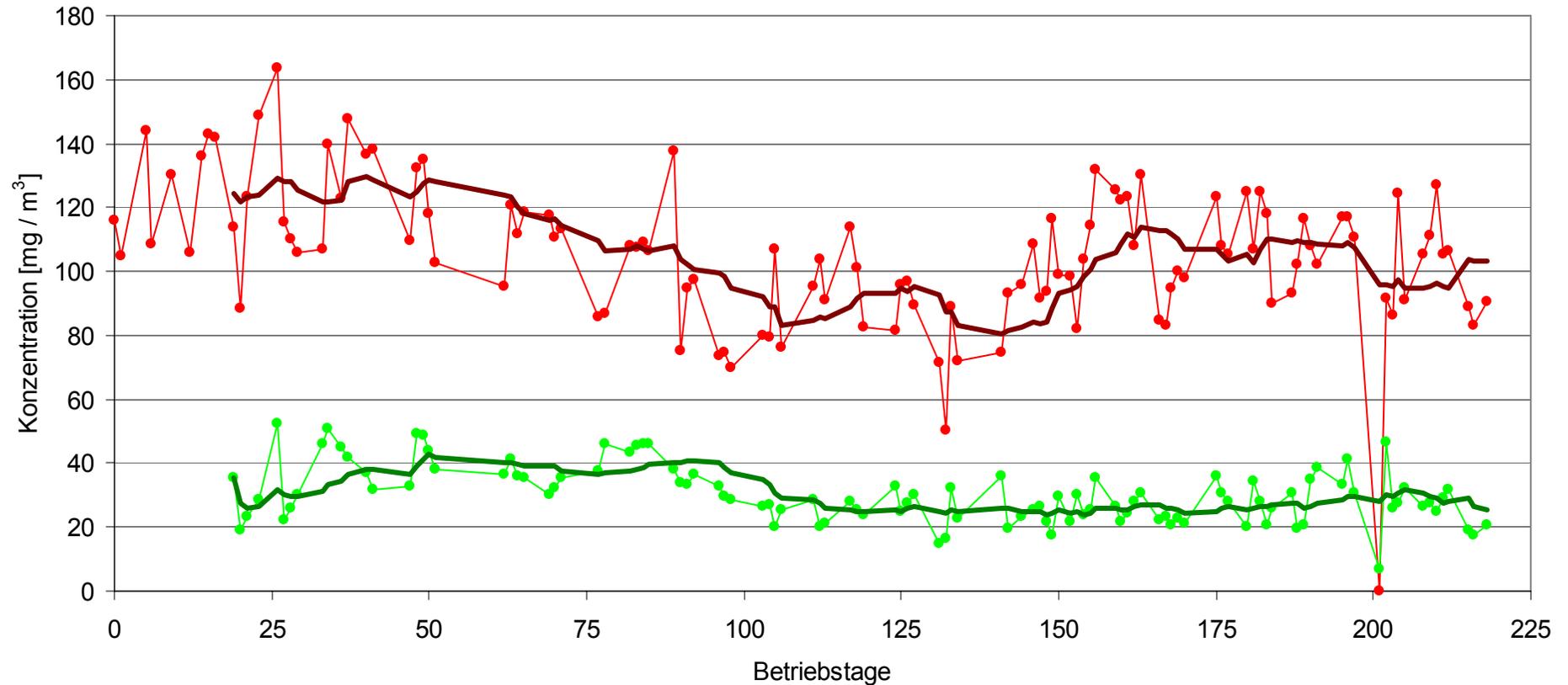
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Wirkungsgrade bezogen auf die Komponenten



**Bild 117: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Wirkungsgrade**

Gang der Wirkungsgrade beim Abbau von Fluorbenzol (orange) und Chlorbenzol (blau) im Reingas. Dargestellt sind zusätzlich die 10 - Tagesmittelwerte für Fluorbenzol (dunkelorange) und Chlorbenzol (dunkelblau). Das Fluorbenzol wird deutlich schlechter abgebaut als das Chlorbenzol. Bei letzterem ist der Wirkungsgrad des Reaktors über die ganze Betriebszeit erstaunlich stabil um die 90 %. Fluorbenzol wird weniger gut abgebaut, hier schwankt der Wirkungsgrad um 50 %.

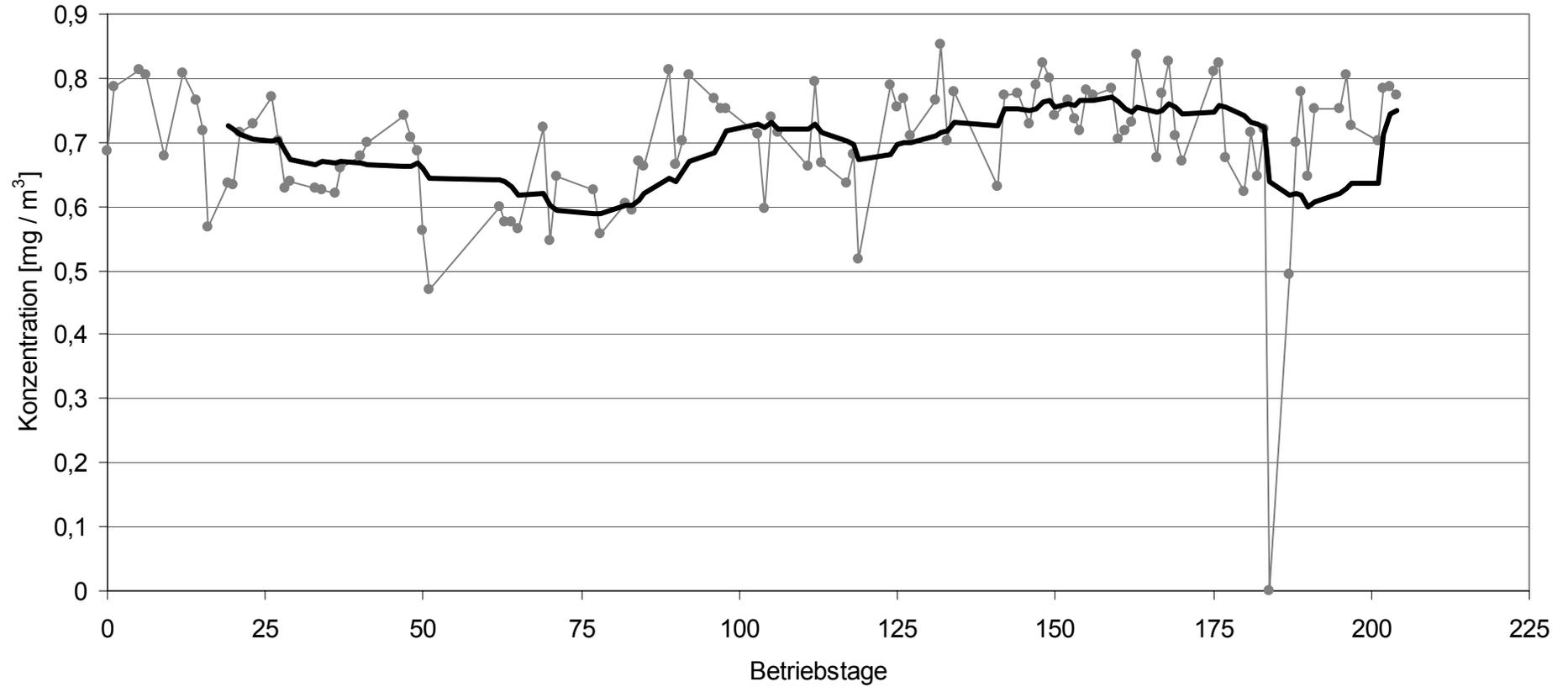
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Summenkonzentrationen im Rohgas und im Reingas



**Bild 118: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Summenkonzentrationen im Roh- und Reingas**

Gang der Summenkonzentrationen beim Abbau von Fluorbenzol und Chlorbenzol. Dargestellt sind Rohgas (rot), Reingas (grün) und zusätzlich die 10-Tagesmittelwerte für das Rohgas (dunkelgrün) und das Reingas (dunkelrot). Während die Gesamtkonzentration im Rohgas größeren Schwankungen unterworfen dagegen, stabilisiert sich die Konzentration an Monohalogenaromaten im Reingas nach 110 Betriebstagen.

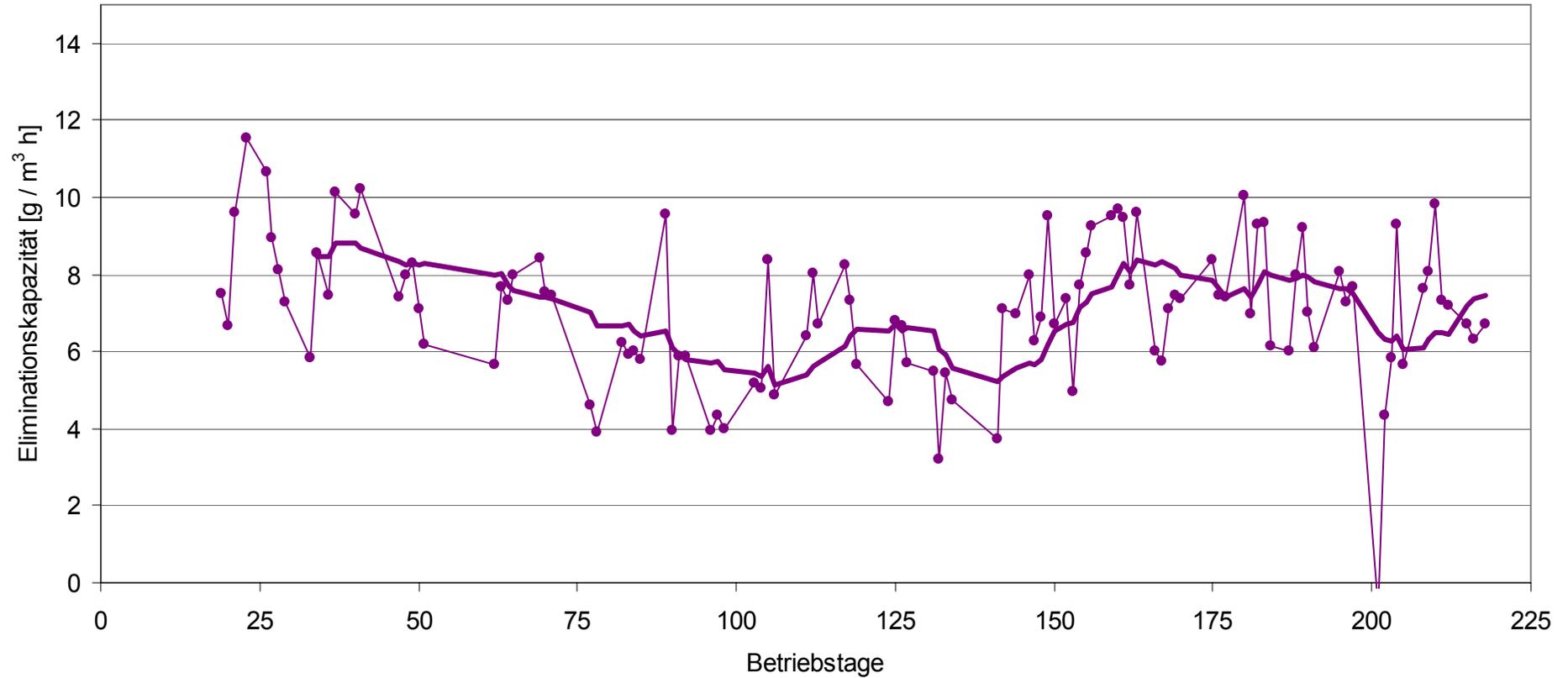
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Gesamtwirkungsgrad



**Bild 119: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Gesamtwirkungsgrad**

Gang des Gesamtwirkungsgrads der Anlage. Dargestellt ist außerdem noch der Gang des zugehörigen 10 – Tagesmittelwerts. Der Wirkungsgrad schwankt zwischen 60 und 80 %.

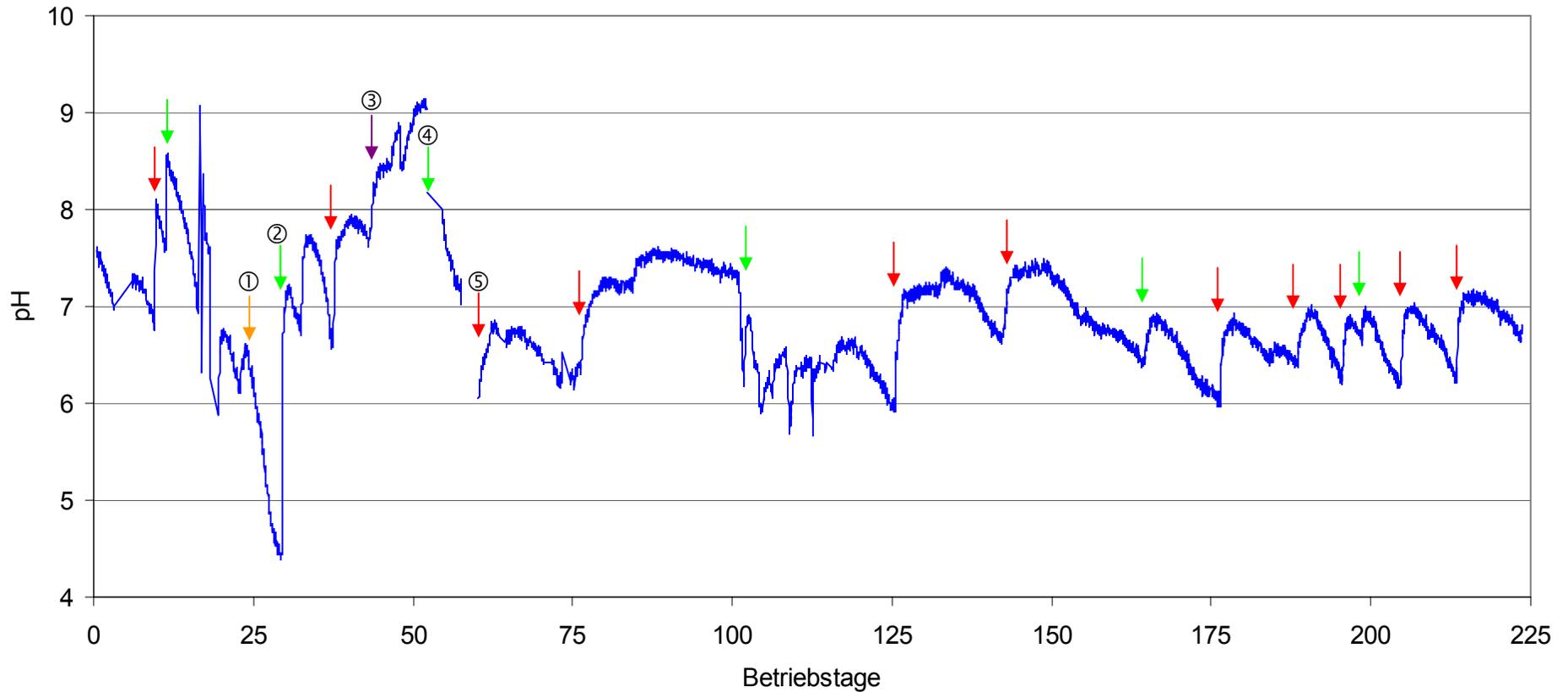
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Eliminationskapazität



**Bild 120: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Eliminationskapazität**

Gang der Eliminationskapazität. Diese folgt im wesentlichen der Gesamtrohgaskonzentration und liegt im Mittel bei  $7 \text{ g} / \text{m}^3 \text{h}$ .

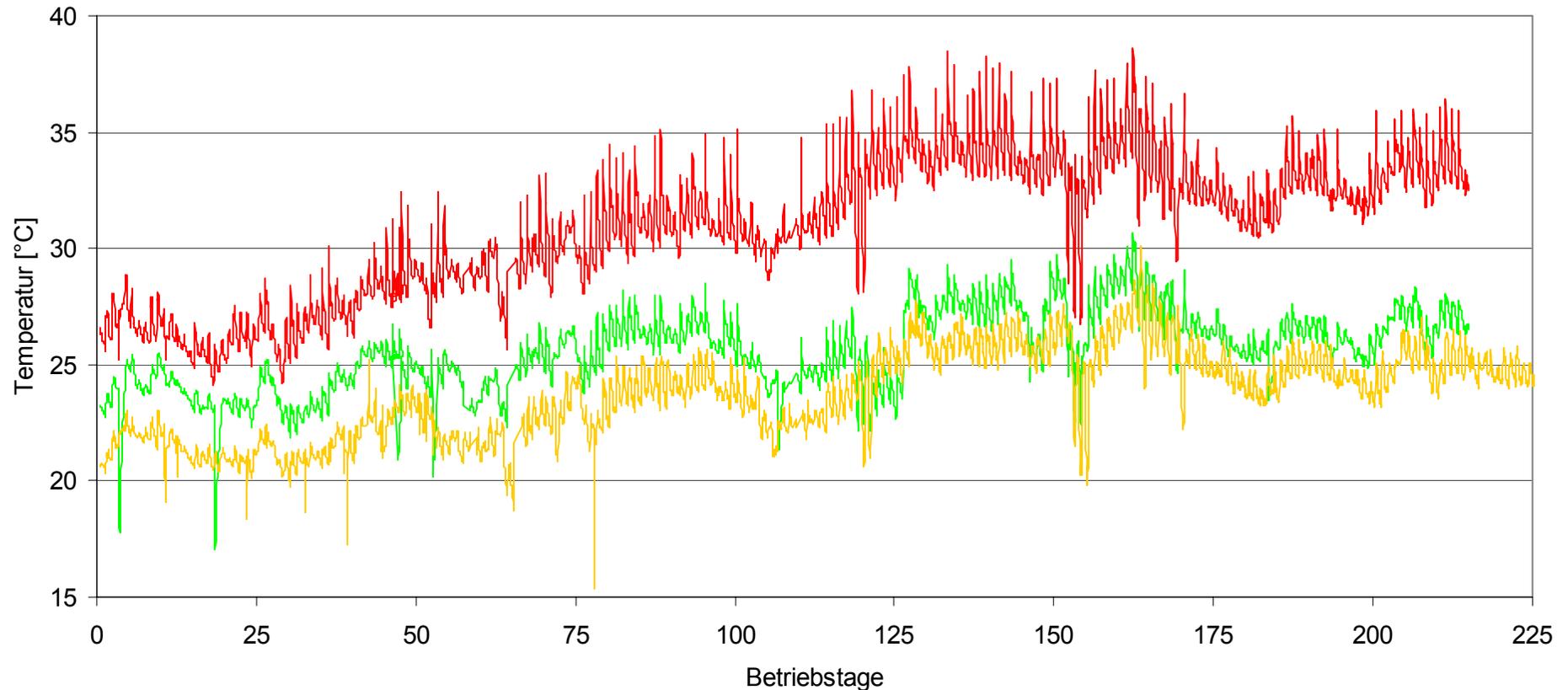
### Reaktor 1, Mischsubstrat: pH - Wert im Sumpf



**Bild 121: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, pH – Milieu im Sumpf**

Gang des pH – Wertes im Reaktorsumpf (blau). Dargestellt sind die Neutralisationszeitpunkte (rote Pfeile), Sumpfwechsel (grüne Pfeile). Am Zeitpunkt, der mit dem gelben Pfeil markiert ist, wurde der Sumpf gegen Trinkwasser ausgetauscht. Hier ist die volle Säurewirkung der beim Abbau von Fluorbenzol und Chlorbenzol gebildeten Metabolite zu sehen (siehe Text). Der violette Pfeil markiert den Beginn eines Experiments mit erhöhter Neutralisierungsmittelkonzentration ( $\text{NaHCO}_3$ ). Auf die nummerierten Pfeile wird im Text eingegangen.

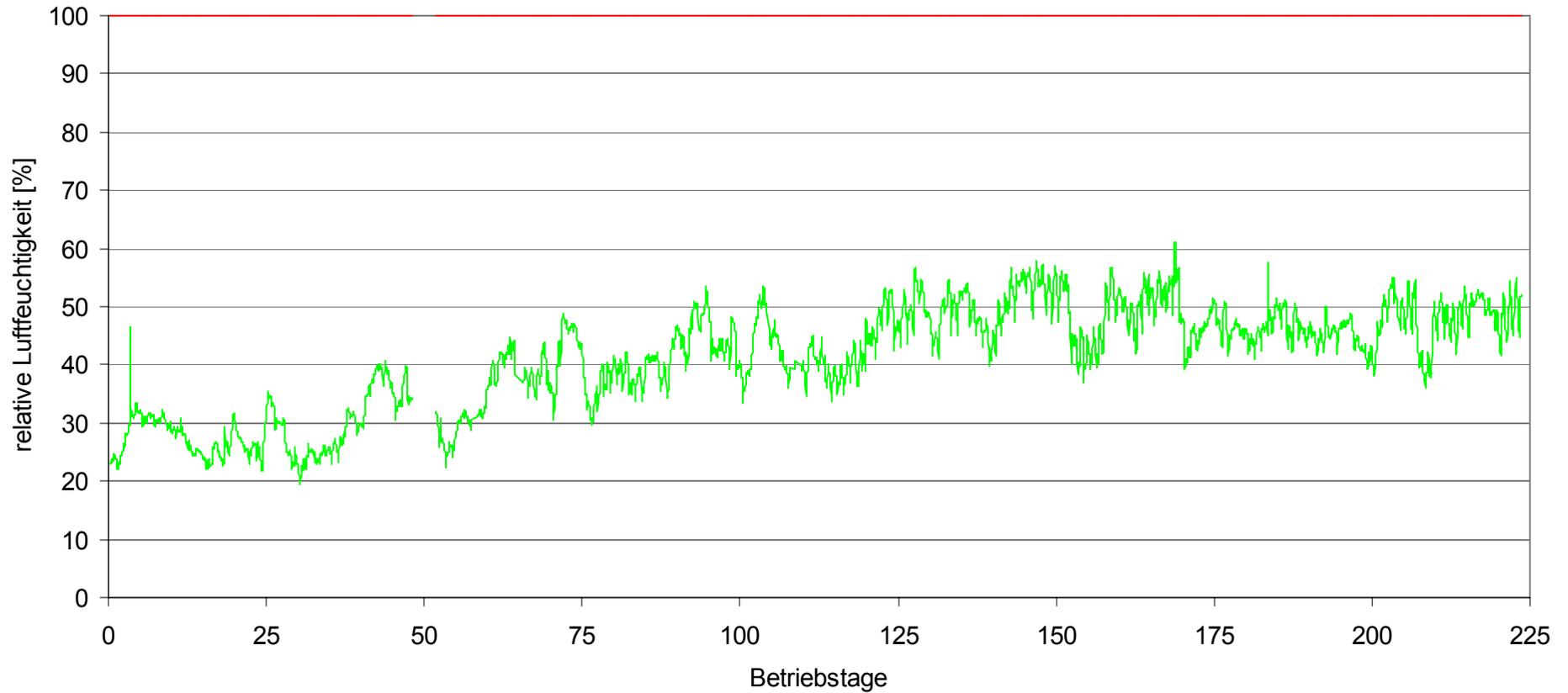
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Temperaturen des Roh- und Reingases



**Bild 122: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Temperaturen**

Gang der Temperaturen des Rohgases (rot), Reingases (grün) und der Raumluft im Technikum (gelb). Die Messkampagne dauerte von Mitte Februar bis Mitte September. Die jahreszeitlichen Temperaturschwankungen werden in der Rohgastemperatur gut wiedergegeben. Die Reingastemperatur folgt dem Gang der Rohgastemperatur nur bedingt. Ist diese höher, so verdampft mehr Wasser im System. Die aufgewendete Verdampfungsenthalpie hält die Temperatur des Reingases konstant. Die "Welligkeit" der dargestellten Kurven wird von den Tag / Nachtzyklen hervorgerufen. Die Rohgastemperatur folgt konstant der Raumtemperatur.

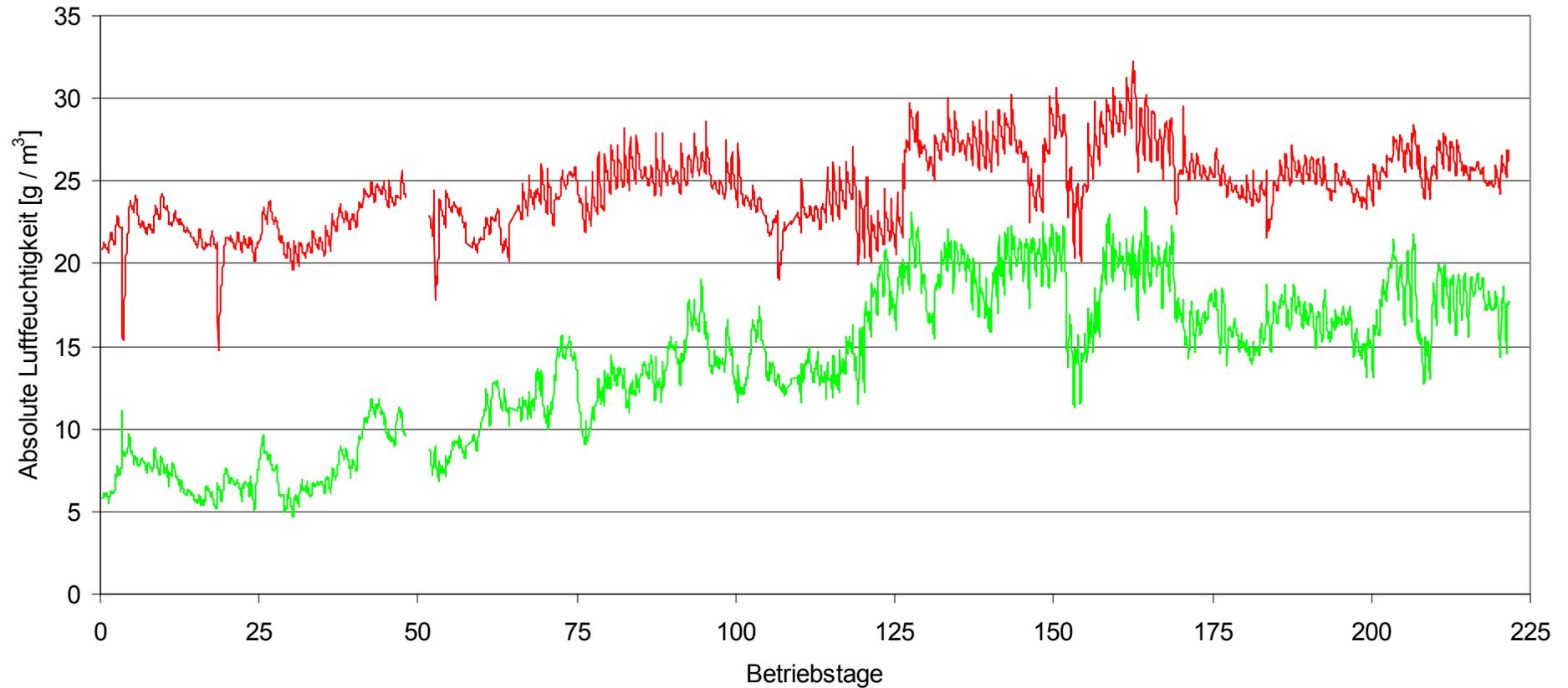
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Relative Feuchtigkeit des Roh- und Reingases



**Bild 123: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, relative Feuchtigkeitsgehalte im Roh- und Reingas**

Gang der relativen Feuchtigkeitsgehalte des Rohgases (grün) und Reingases (rot). Das Reingas war aufgrund der Verfahrensführung stets Wasserdampf - gesättigt. Der relative Feuchtigkeitsgehalt des Rohgases wird durch das Wettergeschehen bestimmt.

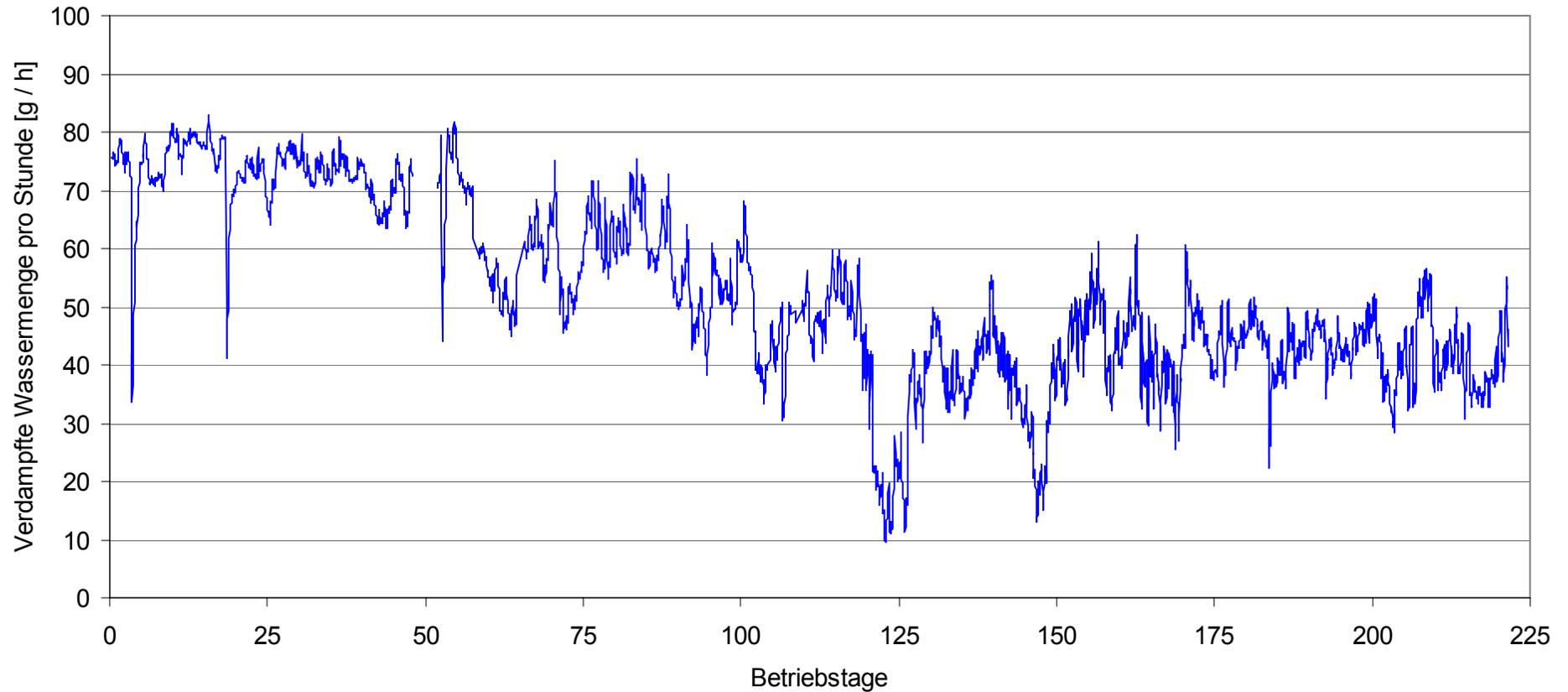
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Absolute Feuchtigkeit des Roh- und Reingases



**Bild 124: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, absolute Feuchtigkeitsgehalte im Roh- und Reingas**

Gang der absoluten Feuchtigkeitsgehalte des Rohgases (rot) und Reingases (grün). Während des Experiments stieg die absolute Feuchte des Rohgases aufgrund jahreszeitlicher Einflüsse an. Der absolute Feuchtigkeitsgehalt des Reingases war einzig von dessen Temperatur abhängig. Auch dieser folgt jahreszeitlichen Einflüssen.

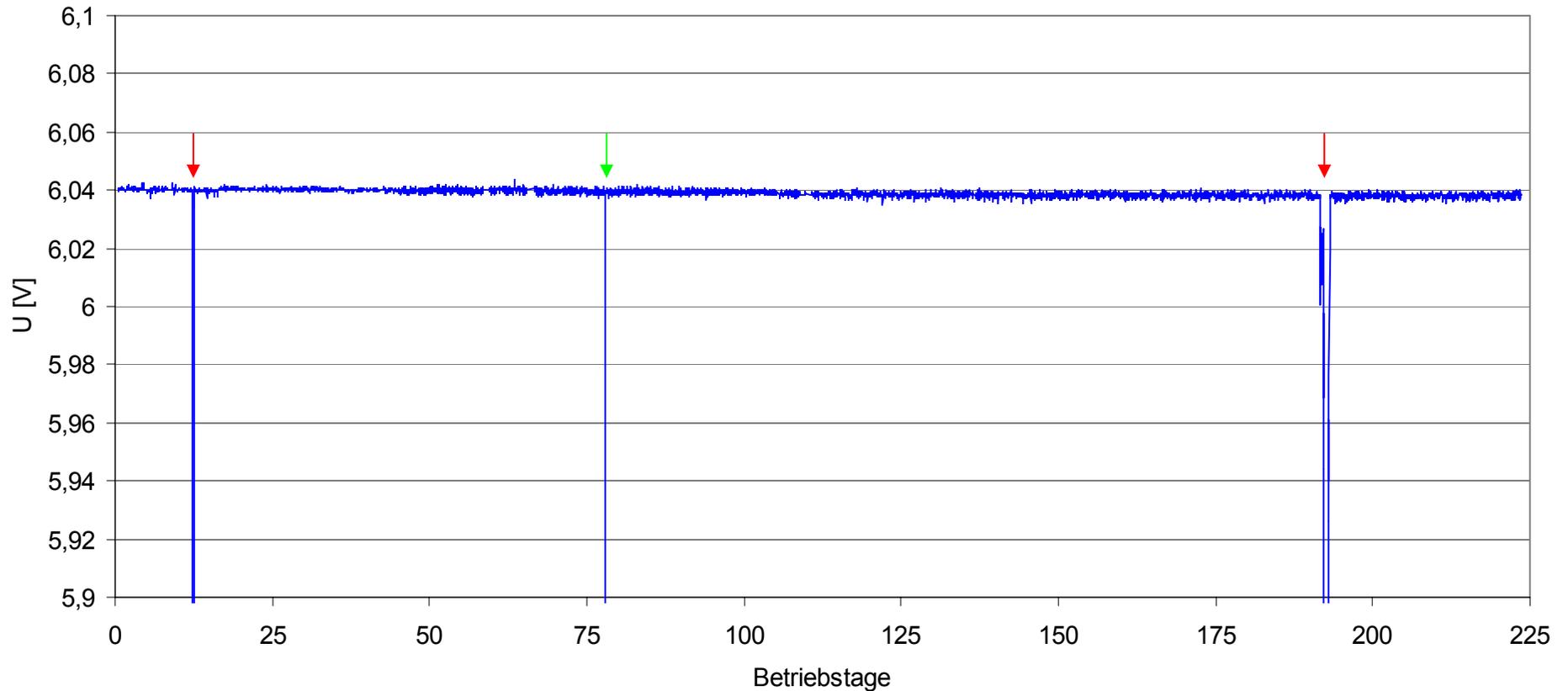
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Verdampfte Flüssigkeitsmenge pro Stunde



**Bild 125: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, verdampfte Wassermenge pro Stunde**

Gang der verdampften Wassermenge pro Stunde. Die Menge an verdampften Wasser sank während des Experiments von 80 g auf durchschnittlich 45 g pro Stunde ab. Dies lag an einer höheren relativen Feuchte des Rohgases und an einer geringeren Temperaturdifferenz zwischen Roh- und Reingas, siehe Bild 122 und Bild 123.

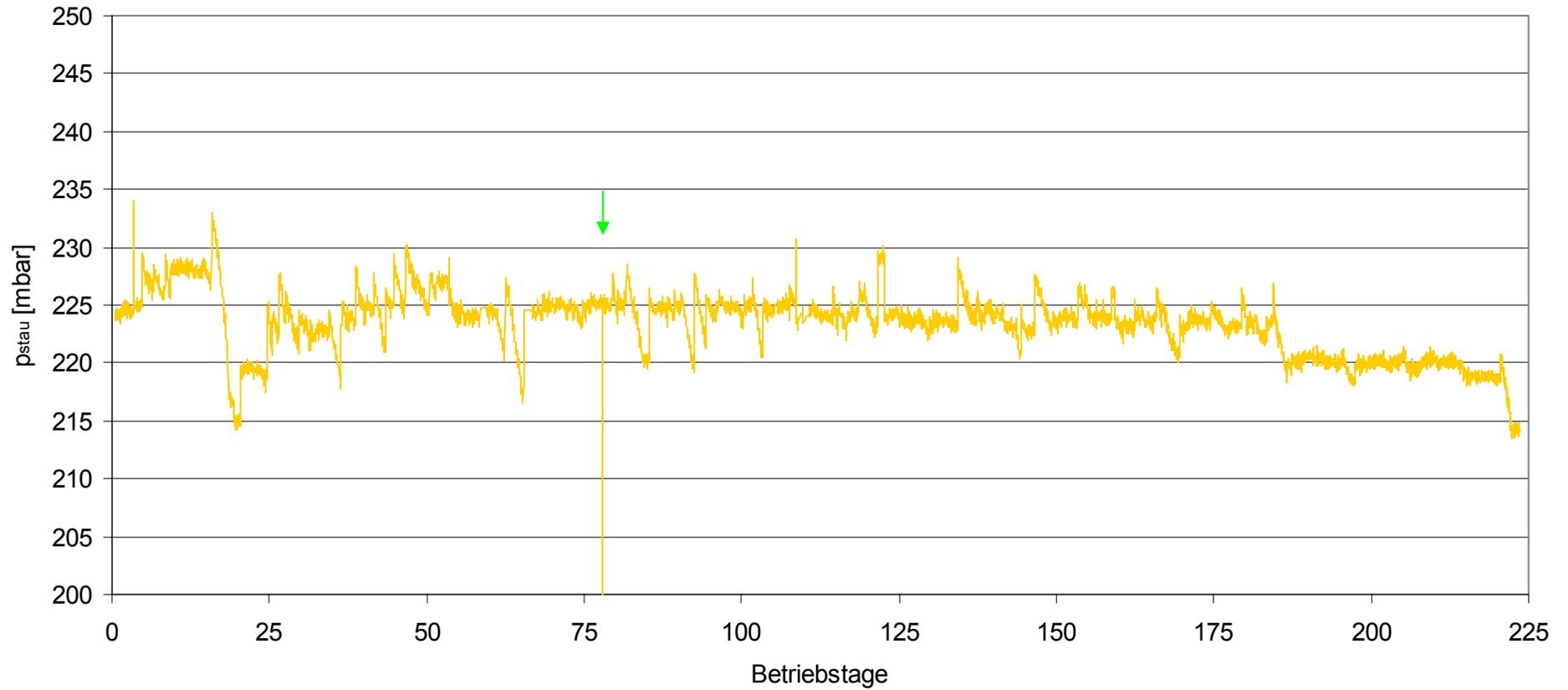
### Reaktor 1, Mischsubstrat: Spannungsreferenz



**Bild 126: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Spannungsreferenz**

Gang der Spannungsreferenz. Die Versorgungsspannung der Sensoren ist sehr stabil. Im Laufe des Experiments sank sie nur um 0,28 %. Nach 12 und 192 Tagen gab es Kontaktprobleme in der Spannungsreferenz (rote Pfeile), diese konnten aber sofort nach deren Entdeckung behoben werden. An Tag 78 gab es einen kurzen Stromausfall (grüner Pfeil), was auch in Bild 123, gelbe Kurve und in Bild 127 erkennbar ist. Dieser konnte schon nach 45 Minuten wieder behoben werden.

### Reaktor 1, Mischsubstrat: Staudruck am Kompressor



**Bild 127: Reaktor 1, Mischsubstratexperiment, Staudruck**

Gang des Staudruckes am Kompressor. Der grüne Pfeil kennzeichnet den Moment eines Stromausfalls. Der Staudruck war sehr konstant und lag im Mittel bei 225 mbar.

# Kapitel 6: Diskussion

## 6. Diskussion

### 6.1. Struktur der Diskussion

Fluorbenzol stellt eine ökologisch bedenkliche Chemikalie da, zudem ihm steigende wirtschaftliche Bedeutung zukommt, wie die Produktion von beispielsweise Pharmaka oder auch Flüssigkristalldisplays, siehe Kapitel 3.5.1. Aufgrund seiner Flüchtigkeit besteht stets die Gefahr, dass es in die Umwelt emittiert wird. So liegt es nahe, und das ist der Ansatz dieser Arbeit, diese Chemikalie in der Abluft biologisch abzubauen. In der folgenden Diskussion wird das Ergebnis erreicht, dass von den wenigen bekannten Bakterienstämmen (Strunk 2000, Cavallho 2002) *Burkholderia fungorum* FLU 100 (Strunk 2000) durchaus hierfür geeignet ist.

Diese Arbeit umfasst die ganze Themenspanne von den naturwissenschaftlichen Grundlagen bis zur ingenieurtechnischen Nutzung der erarbeiteten Ergebnisse, daher gliedert sich die Diskussion auch entsprechend breit von Grundlagen- bis ingenieurtechnisch verwertbaren Ergebnissen. Die Grundlagenergebnisse umfassen die Analyse von Enzym-, Stoffumsatz-, Metabolitproduktions- und Wachstumskinetiken, toxischer Produkte sowie den Metaboliten des Monohalogenaromaten-, Benzol- und Toluolabbaus. In den folgenden Kapiteln 6.2. bis 6.7. werden diese Thematiken behandelt. Diese zusammenstellende Diskussion ermöglicht die Konstruktion eines Teilabbauweges für die Monohalogenbenzole, Benzol und Toluol in *Burkholderia fungorum* FLU 100 (siehe Kapitel 6.8.).

Das Umsetzen dieser Ergebnisse in die technische Anwendung wird in Kapitel 6.9. anhand der Arbeiten im Technikum mit den Biotricklingfiltern getestet. Aus der Diskussion folgt, dass der gegenwärtige Abbau von Fluorbenzol durch FLU 100 für eine wirklich zufriedenstellende technische Abluftbehandlung noch zu langsam erscheint. Danach folgt ein Ausblick, siehe Kapitel 6.10.

### 6.2. Der fluorbenzolverwertende Stamm FLU 100

Der Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 ist ein Isolat aus einem technischen Versuchsbiofilter (Strunk 2000). Er hat als sich potenter Verwerter von Monohalogenbenzolen erwiesen und gehört zu den gramnegativen Bodenbakterien. Ein wichtiger Vorteil der Spezies *Burkholderia fungorum* FLU 100 ist, dass sie laut den Vorschriften der Biostoffverordnung in die Risikogruppe S1 einsortiert ist. Damit kann dieser Stamm in biotechnologischen Anlagen verwendet werden kann. Ebenso ermöglicht die Risikogruppe S1, dass Arbeiten ohne Statusänderung der vorhandenen Laboratorien am Institut für Siedlungswasserbau, Abteilung ALR, durchgeführt werden konnten.

Die Identifikation des Stammes erfolgte durch Sequenzierung der 16s rRNA Sequenz (Dr. Pieper, HZI Braunschweig). Hierzu wurden vorbereitend zwei kommerzielle Stoffwechselltests

eingesetzt, die jedoch diese Taxonomie nicht zuordnen konnten. Bei beiden fehlte *Burkholderia fungorum* in den Datenbanken. Immerhin identifizierte der API 20 NE Test FLU 100 als *Burkholderia cepacia*, was einen Hinweis auf die Gattung gab.

Die Spezies ist gramnegativ, was einen Vorteil für Enzym- und Proteomuntersuchungen darstellt, da sich die Zellen leicht aufschließen lassen, um native Enzyme zu erhalten. Auch erlaubt die Spezies den Einsatz der Transposonmutation durch Tn5 (siehe Kapitel 3.9.2). Entsprechende Ergebnisse werden in den Kapiteln 6.6. und 6.7. diskutiert.

### **6.3. Die metabolische Leistungsfähigkeit des Stammes FLU 100**

#### **6.3.1. Benzol und monosubstituierte Benzole**

Der Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 kann neben seinem Anreicherungssubstrat auch alle anderen Monofluorbenzole, Benzol und Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (siehe Kapitel 5.2.2.). In beliebigen Mischungen werden diese Substrate simultan abgebaut (siehe Kapitel 5.3.5.). Beim exponentiellen Wachstum können die genannten Substrate gewechselt werden, ohne dass eine erneute lag - Phase auftritt (siehe Kapitel 5.3.5.). Dies deutet darauf hin, dass für dieses Substrate ein gemeinsames Regulon vorhanden sein muss. Im Verlauf dieser Diskussion wird sich herausstellen, dass sich die Abbauege dieser Substrate zumindest in den ersten Schritten nicht unterscheiden (siehe Kapitel 6.8.) und damit die These des gemeinsamen Regulons bestätigt wird.

Ansonsten kann der in dieser Arbeit untersuchte Stamm FLU 100 keine weiteren monosubstituierten Benzole produktiv verwerten (siehe Kapitel 5.2.2.). Allerdings konnte der Ausgangsstamm (Strunk 2000) seinerzeit Benzoate als monosubstituiertes Benzol vollständig als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Der Stamm hat leider im Lauf der Jahre diese Fähigkeit verloren. Der ehemals funktionsfähige Benzoatabbaueweg verfügte über eine eigene Enzymatik (siehe 5.5.2. und Strunk 2000), welche getrennt von den Monohalogenbenzolabbauweg induziert wurde.

Raumerfüllende Substituenten am Benzolring, wie die Reste im Cumol, Styrol, Benzylalkohol, Benzylaldehyd, Ethylbenzol und auch die Aminosäure Phenylalanin werden ebenfalls nicht umgesetzt. Es werden auch keine Metabolite gebildet. Dies deutet darauf hin, dass FLU 100 über kein geeignetes initiales Oxygenasesystem verfügt, welches diese Substrate angreifen kann. Dies mag verwundern, denn das identifizierte Dioxygenasesystem zeigt große Ähnlichkeiten zu einer bekannten Isopropylbenzol – Dioxygenase (siehe Kapitel 5.6.2. und Anhang 7.3.2.). Offensichtlich wurde durch die Evolution des Stammes FLU 100 dieses Dioxygenasesystem auf Monohalogenbenzole hin optimiert mit der Konsequenz, dass die Fähigkeit des Cumolangriffes dabei verloren gegangen ist.

Der Stamm kann ausserdem Phenol nicht produktiv verwerten, dagegen wirkt dieses Substrat schon bei geringsten Konzentrationen toxisch auf FLU 100 (siehe 5.2.2.).

### **6.3.2. 1,2-Disubstituierte Benzole**

Bei der Betrachtung von 1,2-disubstituierten Benzolen fällt auf, dass ausser unsubstituiertem Catechol keines der getesteten Substrate produktiv abgebaut werden kann (siehe Kapitel 5.2.3.). Einzig 2-Fluor- und 2-Chlorphenol werden angegriffen, aber nur unvollständig abgebaut, Halogenid wird weit unterstöchiometrisch freigesetzt. Ob diese Substrate von dem initialen Monohalogenbenzol – Dioxygenasesystem oder einer Phenolmonooxygenase angegriffen werden, ist noch unklar.

### **6.3.3. 1,3-Disubstituierte Benzole**

Von den 1,3-disubstituierten Benzolen werden einzig Phenole größtenteils degradiert. Methylierte Halogenbenzole werden angegriffen, können aber nicht verwertet werden (siehe Kapitel 5.2.4.). 1,3-Dihalogenierte und 1,3-dialkylierte Benzole verhalten sich inert. Auch hier zeigt sich in der Toxizität des 3-Chlor-, 3-Methyl- und 3-Fluorphenols der größte Hemmschritt für deren Degradation. Alle drei Substrate werden zwar vom Stamm FLU 100 vollständig degradiert, was sich in einer nahezu stöchiometrischen Halogenidfreisetzung äußert, allerdings dürfen sie nur in geringen Konzentrationen ( $\geq 1$  mmol/L) vorliegen. Ansonsten bricht die Degradationsgeschwindigkeit ein. Des Weiteren muss aufgrund der Catecholproduktion beim Abbau dieser Substrate bei niedrigen pH – Werten gearbeitet werden, um deren Polymerisation zu vermeiden, daher ist der Umsatz durch FLU 100 weiter herabgesetzt. Beim Substratwechsel von Fluorbenzol zu 3-Fluorphenol ist eine lag – Phase zu beobachten. Dies deutet auf neuinduzierte Enzyme hin, vermutlich mindestens eine Phenolmonooxygenase. Die initiale Oxygenierung dieser Substrate verläuft sterisch weniger scharf als die initiale Oxygenierung der Monohalogenbenzole. Hier wird 1/6 des Substrates in das entsprechende 4- Catechol überführt, welches teilweise ausgeschieden wird und erst später von den Zellen von FLU 100 wieder aufgenommen und abgebaut wird. Es steht also zu vermuten, dass das initiale Dioxygenasesystem von FLU 100 in 1,3-Position substituierte Benzole aus sterischen Gründen nicht angreifen kann. Da ausschließlich phenolische Substrate dieser Art umgesetzt werden, steht zu vermuten, dass diese durch eine Phenolmonooxygenase angegriffen werden.

### **6.3.4. 1,4-Disubstituierte Benzole**

Das Verhalten von FLU 100 gegenüber 1,4-disubstituierten Benzolen stellt sich deutlich anders dar, als das gegenüber den 1,2-Position und 1,3-Position disubstituierten Benzolen. Von den 1,4-disubstituierten Benzolen werden zahlreiche Spezies angegriffen (siehe Kapitel 5.2.5). Allerdings werden auch hier, in Analogie zu den 1,3-disubstituierten Benzolen nur die halogenierten Phenole wenn auch sehr langsam, aber dennoch produktiv, verwertet. Dihalogenierte und halogenierte Alkylbenzole werden zwar angegriffen, aber nicht produktiv verwertet. In der Regel bleiben disubstituierte Catechole als Dead – end – Metabolite im Medium zurück. Besonders schön ist dies im Falle des 1,4-Difluorbenzols zu beobachten. FLU 100 produziert aus diesem Substrat 3,6-Difluorcatechol (siehe Kapitel 5.2.5 und 5.3.10.). Das initiale Dioxygenasesystem von FLU 100 kann in 1,4-Position substituierte Substrate angreifen. Die gebildeten Catechole können aber nicht weiter abgebaut werden. Beim Umsatz von 4-Halogenphenolen entstehen die korrespondierenden 4-Halogencatechole, welche nur langsam, aber dennoch nahezu vollständig mineralisiert werden können.

### **6.3.5. Tri- und höher substituierte Benzole**

In die Kategorie der getesteten dreifach substituierten Benzole gehören vor allem die monohalogenierten Catechole (siehe Kapitel 5.2.6.). Diese werden generell vollständig abgebaut (siehe Kapitel 6.3.2.). Doppelt halogenierte Catechole, wie sie beispielsweise von FLU 100 aus 1,4- disubstituierten Benzolen gebildet werden, werden von den Zellen nicht weiter umgesetzt. Analog zu den monofluorierten Phenolen wird 2,5-Difluorphenol, nach einer lag – Phase wird diese Substrat zu 3,6-Difluorcatechol oxidiert, welches dann nicht weiter umgesetzt wird.

### **6.3.6. Nichtaromatische Substrate**

Von den nichtaromatischen Substraten, die getestet wurden, zeigten sich die mutmaßlichen Metabolite der Monohalogenbenzole und des Benzols (siehe Kapitel 6.7. Transposonmutanten) als vollständig degradierbar. Monofluoriertes und –chloriertes Acetat wird von FLU 100 nicht abgebaut, dabei wirkt das Fluoroacetat erwartungsgemäß sehr toxisch auf die Zellen von FLU 100. Iodacetat hingegen kann degradiert werden, was an dessen Reaktionsfreudigkeit liegt. So reagiert Iodacetat beispielsweise mit Cytelinresten unter Iodwasserstoffeliminierung.

### 6.3.7. Klassifikation des Aromatenabbauverhaltens von FLU 100

Das Aromaten - Substratspektrum von FLU 100 hat sich im Vergleich zu anderen Vertretern der Gattung *Burkholderia* als eher eng erwiesen. Für diese Arbeit war es daher wichtig, das Aromaten - Abbauverhalten von FLU 100 zu klassifizieren. Hiermit wurde ermöglicht, die Substrate für diejenigen Transposonmutanten auszuwählen, die der Stamm FLU 100 angreifen kann. Tabelle 58 listet die Substrate nach ihrer Abbaubarkeit auf. Bezüglich des Substratpatterns von nicht aromatischen Substraten (siehe Kapitel 5.2.1. und Anhang 7.3.3.) ähnelt der Stamm FLU 100 den Bodenbakterien.

**Tabelle 58: Klassifikation des Aromatenabbauverhaltens von FLU 100**

<b>Substratgruppe</b>	<b>Abbaubarkeit</b>
Benzol	vollständig
Monohalogenbenzole	vollständig
Toluol	vollständig
1,2-Dihalogenbenzole	kein Abbau
1,3-Dihalogenbenzole	kein Abbau
1,4-Dihalogenbenzole	Angriff, aber kein Abbau
3-Halogencatechole	vollständig, temporäre Metabolitproduktion
4-Halogencatechole	vollständig, temporäre Metabolitproduktion
2-Halogenphenole	Angriff, aber kein Abbau
3-Halogenphenole	vollständig
4-Halogenphenole	nahezu vollständig

### 6.3.1. Wachstumsraten

#### 6.3.1.1. Wachstum auf Reinsubstraten

Der Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 weist auf Standardsubstraten der klassischen Mikrobiologie und auf Vollmedien mit Bodenbakterien vergleichbare Wachstumsraten auf, er wächst eher etwas langsamer als beispielsweise Pseudomonaden. Es lassen sich Substratausbeuten von 40 bis 50 % beobachten, die Generationszeiten betragen zwischen 1,5 Stunden (Nutrient Broth) und 2,3 Stunden (Acetat), siehe Kapitel 5.3.2.

Die Wachstumsraten bei Versorgung mit Monohalogenbenzol - Substraten liegen deutlich niedriger (vergleiche Tabelle 26). Hier lassen sich je nach Substrat minimale Generationszeiten (diejenige Generationszeit, die im Bereich des Geschwindigkeitsgesetzes der nullten Ordnung in der Monod – Beziehung auftritt) zwischen 4,0 und 18,2 h beobachten. Aufgrund der langen

Generationszeiten und des relativen Masseanteils von Halogenatomen in den entsprechenden Substraten liegen die Ausbeutekoeffizienten zwischen 20 % (Fluorbenzol) und nur 8 % (Iodbenzol). Beim Wachstum auf Toluol zeigt der Stamm FLU 100 eine deutlich kürzere minimale Generationszeit (9,2 Stunden), während beim Umsatz von Benzol eine minimale Generationszeit von 14,2 Stunden zu beobachten ist. Die Degradation kann dabei als nahezu vollständig angenommen zu werden, was anhand der Menge der freigesetzten Halogenidionen festgestellt werden kann (siehe Tabelle 28).

Der Stamm wurde über Jahre hinweg einzig auf Fluorbenzol gehalten. Trotzdem zeigt das Enzymsystem für den Halogenaromatenabbau keine besondere Spezifität für dieses Substrat. Die schwereren Homologen werden fast doppelt so schnell abgebaut (siehe Bild 62). Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit von FLU 100 wird bei der Degradation von Brombenzols erreicht, während die Wachstumsgeschwindigkeit auf Fluorbenzol nur etwas mehr als die Hälfte erreicht. Dies könnte an der besseren Polarisierbarkeit der schwereren Halogenatome liegen. Iodbenzol passt nicht in diese Reihe, hier liegen vermutlich kinetische Hemmungen beim Stofftransport oder bei Enzymreaktionen vor.

Für das Wachstum von FLU 100 auf Fluorbenzol konnte die Monodkinetik angewandt werden (siehe Gleichung 27 und Bild 63). Der Stamm kann dabei über 60 mg pro  $OD_{546}$  und Stunde degradieren. Zusammen mit dem niedrigen Ertrag an Biomasse erschien der Stamm FLU 100 als gut geeignet für den langfristigen und effizienten Betrieb eines Biotricklingfilters zur Abreinigung von fluorbenzolbelasteter Luft. Allerdings war aufgrund des langsamen Wachstums mit einer längeren Anfahrphase zu rechnen, diesem Effekt hätte durch ausreichende Inokulamengen begegnet werden können.

#### 6.3.1.2. Wachstum auf Mischsubstraten

Als besondere Eigenschaft zeigte sich, dass der Stamm FLU 100 Mischungen aus Monohalogenbenzolen, Benzol und Toluol degradieren kann. Dabei werden alle Substrate simultan umgesetzt, jedoch nicht in der gleichen Geschwindigkeit (siehe Kapitel 5.3.5). Die Degradationsgeschwindigkeit der Teilsubstrate in der Substratmischung orientiert sich an den maximalen Degradationsraten der Einzelsubstrate. So wird beispielsweise in einem anfangs äquimolaren Gemisch aus Fluorbenzol und Chlorbenzol letzteres deutlich schneller abgebaut (siehe Bild 64). Dennoch ist kein Diauxieeffekt beobachtbar. Auch Fluorbenzol wird *von Beginn an* degradiert, nur eben deutlich langsamer. Offensichtlich macht der Stamm FLU 100 keinen induktionstechnischen Unterschied zwischen den Substraten. Entweder werden die sechs genannten Substrate über denselben Abbauweg degradiert, oder es werden von einem wahlfreien Substrat mehrere Abbauwege induziert. Genetische Untersuchungen können diese Alternative klären.

Diese Eigenschaft des Stammes FLU 100 – eben die genannten Substrate simultan abbauen zu können – prädestiniert ihn für den umwelttechnischen Einsatz. In diesem Fall können kurzfristige Änderungen der Zusammensetzung auftreten.

### **6.3.2. Stoffumsätze**

#### **6.3.2.1. Der Umsatz von fluorierten Catecholen**

Zum besseren Verständnis des Abbauweges von Fluorbenzol (siehe Kapitel 6.8.) wurden Umsatzversuche mit 3- und 4-Fluorcatechol vorgenommen (siehe Kapitel 5.3.8.). Beide Catechole werden vom Stamm FLU 100 vollständig umgesetzt, allerdings treten in beiden Fällen temporär Metaboliten im Medium auf. Es wurden stets Metabolite des Orthoweges identifiziert, niemals jedoch Metaspaltungsprodukte. Dies erhärtet die in Kapitel 5.5.1 dargestellten und in Kapitel 6.5. diskutierten Ergebnisse, dass FLU 100 Monohalogenaromaten stets über den Orthoweg degradiert.

Beim Umsatz von Fluorcatechol lassen sich zwei unterschiedliche Phänotypen des Abbaus unterscheiden. Dabei wird das Fluorid entweder synchron mit der Abnahme des Catechols ausgeschieden oder verzögert.

Beim Abbau von 3-Fluorcatechol durch fluorbenzolinduzierte Zellen des Stammes FLU 100 bei pH 7 wird das Substrat sehr rasch umgesetzt, beispielsweise 2 mmol / L in weniger als einer Stunde bei einer  $OD_{546}$  von 4,2 (siehe Bild 72). Dabei wird etwa 50 % des Substrates als 2-Fluormuconat an das Medium abgegeben. Aus etwa einem Viertel des ursprünglich vorhandenem Substrates wird in dieser Zeit das enthaltene Fluor als Fluorid ins Medium freigesetzt. Erst innerhalb einiger Stunden wird danach das 2-Fluormuconat umgesetzt, äquimolare Mengen an Fluorid erscheinen erst stark verzögert im Medium. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Fluoridspeicherkapazität der Zellen, worauf im Kapitel 6.4.3. noch eingegangen wird. Die Fluoridbilanz schließt sich erst nach ca. 24 Stunden (siehe Bild 72). Offenbar limitiert das lactonisierende Enzym die Abbaugeschwindigkeit des 3-Fluorcatechols. Die Konzentration an 2-Fluormuconat innerhalb der Zelle steigt soweit an, dass dieser Metabolit aus der Zelle "herausgedrückt" wird.

Der Abbau von 4-Fluorcatechol erfolgt langsamer als der von 3-Fluorcatechol (siehe Bild 73). Es werden ebenfalls größere Mengen an Metaboliten ausgeschieden. Es konnte 3-Fluormuconat nachgewiesen werden. Neben diesem werden noch zwei unbekannte Metabolite ausgeschleust (siehe Bild 74). Analog zum 3-Fluorcatecholabbau verschwinden auch hier die Metabolite nach einiger Zeit. Unter identischen Bedingungen wird das 4-Fluorcatechol etwa drei Mal langsamer umgesetzt als 3-Fluorcatechol. Auch bei der Degradation von 4-Fluorcatechol durch FLU 100 wird das Fluorid zeitversetzt ins Medium abgegeben, allerdings ist hier der Effekt nicht so ausgeprägt wie beim Abbau von

3-Fluorcatechol. Zur Identität der unbekanntenen Metaboliten kann festgestellt werden, dass diese in der HPLC unter den für diese Arbeit definierten Standardbedingungen mit ähnlichen Retentionsvolumina eluieren und ähnliche UV – Spektren aufweisen wie fluorsubstituierte Muconolactone (siehe Bild 75 und Bild 76). Vermutlich handelt es sich bei diesen Metaboliten also um 3-Fluor- und 4-Fluormuconolacton (siehe Bild 128).

Das von FLU 100 aus 1,4-Difluorbenzol gebildete 3,6-Difluorcatechol wird nicht umgesetzt (siehe Kapitel 5.3.10), ebenso das aus 4-Fluortoluol erzeugte 3-Fluor-6-Methylcatechol. Monochlorierte und monomethylierte Catechole werden ebenfalls vollständig von FLU 100 umgesetzt.

Obwohl die Untersuchung des fluorbenzolinduzierten Catechol-1,2-dioxygenasesystems im Rohextrakt zeigte, dass 3-Fluorcatechol im Vergleich zu 4-Fluorcatecholen nur langsam umgesetzt wird (siehe Tabelle 35), wird dieses durch ganze, vitale Zellen deutlich schneller umgesetzt. Beim Abbau von Fluorbenzol limitiert das initiale Dioxygenasesystem die Produktion von 3-Fluorcatechol. Das Catechol-1,2-dioxygenasesystem ist offensichtlich nicht geschwindigkeitslimitierend und durch die initiale Limitation kann die Muconatcyclisomerase alle angebotenen Muconate synchron umsetzen. Es treten keine Konzentrationen auf, die dazu führen würden, dass entweder 3-Fluorcatechol oder aber 2-Fluormuconat ins Medium beim Fluorbenzolabbau von FLU 100 emittiert werden.

Im Gegensatz zur Degradation von 3-Fluorcatechol durch den Stamm *Burkholderia fungorum* FLU 100 wird das 4-Fluorcatechol von diesem temporär unvollständiger und langsamer umgesetzt. Dieser Befund lässt zusammen mit der Vielzahl der auftretenden Metabolite die Hypothese zu, dass 4-Fluorcatechol, entgegen der Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen des Catechol-1,2-dioxygenasesystems, kein Hauptmetabolit des Fluorbenzolabbauweges sein kann. Erhärtet wird dieser Befund durch die Untersuchungen zur Sterik des initialen Dioxygenaseangriffes (siehe Kapitel 5.6.1.4. und Tabelle 40). Diese weisen darauf hin, dass bei der Degradation von Monohalogenbenzolen und Toluol stets in der Majorität das an der 3-Position substituierte Produkt gebildet wird. Ein weiterer Hinweis hierauf ist die langsame Degradation von 4-Fluorphenol durch den Stamm FLU 100 (siehe Kapitel 5.2.4.): Wie Mutantenuntersuchungen zeigen, wird dieses Substrat vollständig zu 4-Fluorcatechol umgesetzt, was beim Umsatzversuch mit dem Wildtyp auch in größeren Mengen in das umgebende Medium emittiert wird.

Insgesamt gesehen kann also festgehalten werden, dass der Abbau von Monohalogenbenzolen über das entsprechende 3-substituierte Catechol und das 2-substituierte Muconat erfolgt. Dieses Ergebnis wird bei der Konstruktion des Abbauweges (siehe Kapitel 6.8.) benutzt werden. Die entsprechenden Enzymatiken liefern in Rohextraktexperimenten auf den ersten Blick hierzu widersprüchliche Ergebnisse insofern, als 2-Fluormuconat dort nahezu gar nicht umgesetzt wird (Tabelle 37). Die Degradationsexperimente der jeweiligen Catechole weisen jedoch in die andere Richtung,

offensichtlich ist die Geschwindigkeit des Muconatcyclosiomerasesystems jedoch unter nativen Bedingungen ausreichend, um den vollständigen Abbau von Monohalogenbenzolen durch den Stamm FLU 100 zu gewährleisten. Auch die in der Abbaukette nachfolgenden Enzyme sind in der Zelle an die aus dem 3-Halogencatechol folgenden Metaboliten angepasst. Der Abbau der 4-Halogencatechole erfolgt langsam und temporär unvollständig.

Wird die Umsatzrate der Catechole durch Absenken des pH-Wertes des Mediums verlangsamt, dann wird keine Metabolitproduktion beobachtet (siehe Bild 71). Unter diesen Bedingungen wird das im Substrat enthaltene Fluor äquimolar und synchron ausgeschieden.

### **6.3.2.2. Der Umsatz von möglichen Metaboliten des Monohalogenbenzol- und Benzolabbaus durch FLU 100**

Einige mutmaßliche Metabolite des Fluorbenzol- und Benzolabbauweges des Stammes FLU 100 wurden mit Hilfe von Mutanten erzeugt (siehe Kapitel 5.6.1). Der zellfreie Überstand dieser Kulturen wurde mit dem Wildtyp von FLU 100 inokuliert. Die Zellen bauen 3-Fluordiendiol, unsubstituiertes Diendiol, 2-Fluormuconat, Muconolacton und Dienlacton vollständig innerhalb vergleichsweise kurzer Zeit ab (siehe Kapitel 5.2.6.). Dies deutet im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Mutantenuntersuchungen (siehe Kapitel 6.7.) auf die Rolle dieser Metabolite im Rahmen des Fluorbenzol- respektive Benzolabbauweges.

### **6.3.2.3. Der Umsatz von 3-Fluorphenol, 1,4-Difluorbenzol und weiteren 1,4-disubstituierten Benzolen**

3-Fluorphenol induziert in FLU 100 mindestens ein Enzym, mutmaßlich eine Phenolmonooxygenase bei Wechsel von Fluorbenzol zu diesem Substrat hin, es ist also anzunehmen, dass 3-Fluorcatechol kein Metabolit des Fluorbenzolabbauweges ist. 3-Fluorphenol wird vollständig degradiert, Fluoridanionen werden von den Zellen nahezu stöchiometrisch in das Medium entlassen. Dabei wird ein Teil des Substrates (siehe Tabelle 40) in 4-Fluorcatechol umgewandelt, welches sich temporär im Medium nachweisen lässt. Es steht anzunehmen, dass der Abbauweg von 3-Fluorphenol ab der Catecholstufe mit dem des Fluorbenzols identisch ist. Auch wird durch die Befunde bezüglich dieses Substrates die Hypothese in Kapitel 6.3.2.1. bestärkt, dass der Abbau von 3-Fluorcatechol deutlich schneller und metabolisch sauberer von statten geht als derjenige von 4-Fluorcatechol.

1,4-Difluorphenol wird von FLU 100 zwar angegriffen, jedoch nicht mineralisiert. Es wird beim Wechsel von Fluorbenzol als Substrat auf 1,4-Difluorbenzol 3,6-Difluorcatechol als Dead - end - Metabolit ausgeschieden. Der Stamm verhält sich gegenüber den Analoga 4-Fluoriodbenzol und 4-Fluorbrombenzol sowie 4-Fluoracetophenon ähnlich (Cripps 1975). Es wird jeweils ein disubstituiertes Catechol produziert. 4-Methylfluorbenzol wird in der

Hauptsache zu 3-Fluor-6-Methylcatechol umgesetzt, wobei noch weitere bislang nicht identifizierte Metabolite produziert werden, möglicherweise Seitenkettenoxidationsprodukte. Offenbar kann das Catechol-1,2-dioxygenasesystem von FLU 100 keine an der 3,6-Position disubstituierten Catechole spalten. Dabei macht es keinen Unterschied, ob es sich hierbei um Halogen- oder Alkylreste handelt.

## **6.4. Toxizitäten**

### **6.4.1. Der Einfluss des pH - Wertes**

Der Stamm FLU 100 weist das schnellste Wachstum bei einem pH-Wert von 6,5 auf (siehe Bild 79). Das pH - Optimum ist scharf abgegrenzt, denn schon eine Verschiebung um 0,5 zum Sauren oder Alkalischen reicht aus, um die Wachstumsgeschwindigkeit zu halbieren. Dies ist vor allem wichtig für die optimalen Betriebsbedingungen in der technischen Anwendung des Stammes – in der biologischen Abluftreinigung. Das dieser Erkenntnis zugrunde liegende Experiment (siehe Kapitel 5.4.1) zeigte, dass selbst bei Wachstum auf einem "neutralen" Substrat, bei dem in der Regel nicht mit der Produktion saurer Metabolite zu rechnen ist, pH - Verschiebungen von bis zu 0,5 vorkommen können (siehe Tabelle 29). Daher war es auch nicht sinnvoll, das Experiment mit enger gestaffelten pH – Werten durchzuführen.

### **6.4.2. Das Antibiotikaspektrum**

Der Stamm FLU 100 weist eine natürliche Resistenz gegenüber Penicillin und Ampicillin auf, was bei einem Stamm der Gattung *Burkholderia* zu erwarten ist. Der Resistenzmechanismus basiert auf einer unterschiedlichen Struktur der Peptidoglycanschicht von *Burkholderia* im Vergleich zu den anderen gramnegativen Eubakterien, nicht jedoch in der Expression eines gegen  $\beta$ -Lactame gerichteten Gegenenzym (intrinsische Resistenz).

Die glücklicherweise vorhandene Labilität von FLU 100 gegenüber Kanamycin (siehe Kapitel 5.6.) erlaubte die erfolgreiche Durchführung der Transposonmutagenese mittels verschiedenen Tn5 Varianten (vergleiche 6.7.).

### **6.4.3. Der Einfluss von Halogenidanionen**

Ein herausstechendes Merkmal des Stammes *Burkholderia fungorum* FLU 100 ist seine Resistenz gegenüber Fluoridanionen dar. Fluorid ist ein für die meisten Spezies (Pro- und Eukaryonten) giftiges Anion. Es hat die Eigenschaft, innerhalb von Zellen Calciumionen in unlösliches Calciumfluorid zu überführen. Die durchgeführten Experimente zu Ermittlung der Abschnürkonzentration, also derjenigen Konzentration, bei der die Wachstumsrate gerade Null

beträgt, zeigten, dass FLU 100 eine vier bis fünf mal größere Toleranz gegenüber freien Fluoridionen im Medium als die getesteten Pseudomonaden aufweist (siehe Bild 81). Interessanterweise wirken Fluoridkonzentrationen oberhalb der Abschnürkonzentration von FLU 100 cytostatisch, während bei den Referenzstämmen ein negatives Wachstum beobachtbar ist (Bunick 1981, Brussock 1986, Chansley 1989).

Die hohe Fluoridresistenz von FLU 100 steht mit Sicherheit im Zusammenhang mit der Fähigkeit, Fluorbenzol und andere fluorierte Substrate vollständig mineralisieren zu können. Dieser Schluss wird gestützt durch den Befund, dass hierbei äquimolare Mengen an Fluorid im Cytosol anfallen. Dieses muss von der Zelle ausgeschleust werden, um die oben genannten negativen Effekte zu vermeiden.

Die Abschnürkonzentrationen von FLU 100 gegenüber den Chlorid, Bromid und Iod weisen im Vergleich zu anderen Bodenbakterien keine Besonderheiten auf.

#### **6.4.4. Resistenz gegenüber Fluorphenolen**

Die drei Fluorphenole wirken erwartungsgemäß toxisch auf den Stamm FLU 100. Schon bei Konzentrationen von 1 mmol / L ist ein deutlicher Hemmeffekt auf die Wachstumsrate in Nutrient Broth zu beobachten (siehe Bild 85). Die Eigentoxizität dieser Substrate macht Degradationsexperimente schwierig (siehe Kapitel 5.4.6.), folglich ist die Messung der Umsatzraten dieser Substrate schwierig. Es bleibt festzustellen, dass die Toxizität von 4-Fluorphenol halb so groß ist wie diejenige der anderen beiden Fluorphenole.

### **6.5. Enzymreaktionen**

#### **6.5.1. Catecholdioxygenase(n)**

Die erste Fragestellung bei der Aufklärung der Abbauwege von Monohalogenbenzolen im Stamm FLU 100 ist die Art der Catecholspaltung. Werden diese ortho- oder metagespalten. Erste Hinweise zum Catecholspaltungstyp lagen bereits für Fluorbenzol und Chlorbenzol vor (Strunk 2000).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass der Stamm FLU 100 Monohalogenbenzole, Benzol, Benzoat, Toluol und 3-Fluorphenol stets über den Orthoweg abbaut. Es können keinerlei Hinweise für eine Metaaktivität des Stammes gefunden werden; es fanden sich keine Metaspaltungsprodukte. Ergebnisse der Proteomuntersuchungen von FLU 100 (siehe Kapitel 5.8.4.1.) deuten darauf hin, dass neben der eigentlichen Chlorcatechol-1,2-dioxygenase noch mindestens eine weitere Catechol-1,2-dioxygenase durch Fluorbenzol coinduziert wird (siehe Kapitel 6.6.) Daher sind die im Rohextrakt von fluorbenzolinduzierten Zellen des Stammes

FLU 100 gemessenen Catechol-1,2-dioxygenaseaktivitäten als Summenparameter aller aktiven catechospaltenden Enzyme anzusehen (siehe Tabelle 35).

Die Rohextraktexperimente (Kapitel 5.5.2.) zeigen, dass die Catechol-1,2-Dioxygenaseaktivitätsmuster von fluorbenzol-, chlorbenzol- und toluolinduzierten Zellen von FLU 100 qualitativ mit den Literaturwerten von *Pseudomonas* sp. B13 übereinstimmen. Es bietet sich also an, die für diesen Stamm von Dorn 1978 (Dorn 1978A) eingeführte Nomenklatur der Catechol-1,2-dioxygenasen auch für FLU 100 zu übernehmen. In diesem Fall liegt ein Chlorcatechol-1,2-dioxygenasesystem von Typ II vor. Allerdings ist anzunehmen, dass die Aktivitätsmuster durch die coinduzierte Catechol-1,2-dioxygenase überlagert und verfälscht werden. Obwohl das Catechol-1,2-dioxygenasesystem von FLU 100 3-Fluorcatechol im Vergleich zu den anderen Catecholen nur langsam spaltet (siehe Tabelle 35), ist die Reaktion dennoch schnell genug, um das beobachtete produktive Wachstum von FLU 100 auf Fluorbenzol zu ermöglichen.

Beim Wachstum auf Benzoat konnte zu einem früheren Zeitpunkt ein Catechol-1,2-dioxygenasesystem detektiert werden, was dem Typ I System in *Pseudomonas* sp. B13 qualitativ folgt (Strunk 2000).

### **6.5.2. Muconatcycloisomerase und Dienlactonhydrolase**

Die außer Haus vorgenommenen Untersuchungen zu den Enzymen Muconatcycloisomerase und Dienlactonhydrolase lieferten diskussionswürdige Ergebnisse. Im zellfreien Kontext wird das 2-Fluormuconat, welches in den Umsatzexperimenten als Metabolit des Fluorbenzohauptabbauweges erkannt worden ist (siehe Kapitel 6.3.2.1. und Kapitel 5.6.1.), von der Chlormuconatcycloisomerase (durch Fluorbenzol in FLU 100 induziert) nur äußerst zögerlich umgesetzt. Das homologe 2-Chlormuconat wird unter identischen Bedingungen jedoch gut umgesetzt (siehe Tabelle 37). Die im Rohextrakt aktive Chlormuconatcycloisomerase entspricht in ihrem Aktivitätsmuster den in der Literatur beschriebenen Enzymen (beispielsweise Vollmer 1994, 1998 und 1999). Diese haben eine vernachlässigbare Aktivität gegenüber 2-Fluormuconat. (Chlor)-Muconatcycloisomerasen gelten im Rohextrakt als relativ stabil, sie sollten daher durch den Zellaufschluss nicht inaktiviert werden. Mit fluorbenzolinduzierten Zellen von FLU 100 konnte jedoch ein Umsatz von 2-Fluormuconsäure beobachtet werden (siehe Kapitel 5.3.8.), was den Rohextraktaktivitäten widerspricht. Daher ist die in ganzen Zellen vorhandene Muconatcycloisomeraseaktivität sicher nicht mit der geringen Aktivität im Rohextrakt enzymatisch identisch. Möglicherweise verfügt der Stamm FLU 100 über eines oder mehrere bisher noch unbekannte fluormuconatcyclisierende Enzyme, die entweder sehr labil sind oder aus anderen Gründen nur innerhalb des Zellkontextes funktionsfähig sind. Dieses neue

Enzymsystem ist jedoch im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Muconat- oder Chlormuconatcycloisomerasen befähigt, 2-Fluormuconat effektiv umzusetzen.

Die im Vergleich zum 2-Fluormuconat sehr hohe Aktivität der Chlormuconatcycloisomerase gegenüber dem 3-Fluormuconat äußert sich auch bei den bereits diskutierten Catecholumsatzexperimenten (siehe Kapitel 6.5.1.). Hier wird das 4-Fluorcatechol zum 3-Fluormuconat gespalten. Dabei wird weit weniger dieses Metaboliten in das Medium ausgeschleust verglichen mit der Degradation von 3-Fluorcatechol zu 2-Fluormuconat.

Das in der Fluorbenzolabbaukette der Muconatcycloisomerase folgende Enzym, die Dienlactonhydrolase weist keine Auffälligkeiten auf, *cis*-Dienlacton wird umgesetzt, *trans*-Dienlacton jedoch nicht.

## 6.6. Proteomik

Die Sequenzen der Proteinfragmente, die aus den drei untersuchten Proteinspots (siehe Kapitel 5.8.4.) gewonnen werden konnten, lieferten Hinweise auf die Verwandtschaft dieser Proteine mit den Enzymen Catechol-1,2-Dioxygenase, mit der Flavoproteinuntereinheit der Succinatdehydrogenase und mit einem Porin der äußeren Zellmembran. Allerdings ist keines der identifizierten Proteine direkt am Fluorbenzolabbau beteiligt. Die gefundene Catechol-1,2-Dioxygenase ist wahrscheinlich ein coinduziertes Enzym der Aromatenabbauwege. Leider zeigten ihre bekannten Sequenzen keine Ähnlichkeiten zu bekannten Chlorcatechol-1,2-Dioxygenasen (siehe Kapitel 5.8.4.1.). Die gefundene Succinatdehydrogenase ist offensichtlich ein falsch positives Ergebnis, da es sich um ein Enzym der zentralen Stoffwechselwege handelt. Das gefundene Porin könnte während des Fluorbenzolabbaus bei der Substratversorgung oder Entgiftung von *Burkholderia fungorum* FLU 100 eine Rolle spielen.

Insgesamt gesehen lieferte die Proteomuntersuchung nur wenige brauchbare Ergebnisse in Hinblick auf den Abbauweg von Monohalogenbenzolen durch FLU 100. Dennoch stellen die angewandten Methoden eine wirkungsvolle Ergänzung zu den Transposonexperimenten zu Aufklärung von Abbauwegen in Eubacteria, also auch FLU 100 dar. Denn die Transposonexperimente liefern neben analysierbaren Metaboliten im Idealfall eine Gensequenz. Die Proteomuntersuchungen zeigen, welche Enzyme zu einem gegebenen Zeitpunkt in einem Bakterienstamm wirklich aktiv sind.

## **6.7. Transposonmutagenese und Metabolite**

### **6.7.1. Allgemeine Bemerkungen**

Die Transposonmutagenese des Stammes *Burkholderia fungorum* FLU 100 erwies sich mit dem zuerst verwendeten Transposon als sehr schwierig. Obwohl über zwanzig Versuche durchgeführt wurden, konnte die von Daniel Dobslaw im Jahre 2003 erfolgreich durchgeführte Transposonmutagenese nicht reproduziert werden (Dobslaw 2003). Daher muss man den Donorstamm *Escherichia coli* S17.1 dyT miniTn5-Km als unbrauchbar für die Transposonmutagenese von FLU 100 ansehen.

Erst der Einsatz von *Escherichia coli* pCro2a / miniTn5495 führte zum Erfolg. Bereits durch die erste vorgenommene Mutagenese konnten zahlreiche Transformanten gewonnen werden. Das Screening der Transformanten erfolgte problemlos.

### **6.7.1. Identifikation der Mutanten mittels BOX - und ERIC - PCR**

Die Methode, mittels BOX- und ERIC-PCR Speziesvergleiche durchführen zu können, konnte erfolgreich in der Arbeitsgruppe ALR eingeführt werden (siehe Kapitel 5.6.1.4. und Kapitel 6.10.). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode dazu verwendet, mutmaßliche Transposonmutanten von FLU 100 zweifelsfrei von Kontaminaten zu differenzieren. Erst wenn die Transposonmutanten diesen Test bestanden hatten, wurden sie weiter untersucht.

### **6.7.2. Mit Hilfe der Transposonmutanten identifizierte Metabolite**

Es konnten nach mehrfachem Screening zahlreiche Transposonmutanten gefunden werden, welche die angebotenen Benzole in verschiedene Metabolite überführten. Dabei kristallisierten sich verschiedene Substanzklassen heraus, welche in dem klassischen Orthoabbauweg für Aromaten in Bakterien zu finden sind (Fuchs 2007): Diendiole, Catechole, Muconate und Muconolactone. Dienlacton konnte nicht identifiziert werden (siehe Kapitel 5.6.6.5.) Die zur Verfügung stehende analytische Technik konnte leider keine weiter unten im Abbauweg stehenden Metabolite identifizieren. Auch konnten systembedingt keine Transposonmutanten identifiziert werden, bei denen das initiale Dioxygenasesystem für den Monohalogenaromatenabbau deaktiviert wurde. Am wichtigsten waren die Metaboliten des Fluorbenzolabbaus. Allerdings wurden die Mutanten auch mit weiteren Substraten konfrontiert. Hierzu zählten in der Regel Chlorbenzol, Brombenzol, Iodbenzol, Benzol, Toluol, 1,4-Difluorbenzol und 4-Fluortoluol sowie 3- und 4-Fluorphenol. Durch das Zusammentragen aller der durch die Transposonmutanten gewonnenen Metabolite konnte ein guter Einblick in

die Aromatenabbauwege von FLU 100 gewonnen werden (siehe Kapitel 6.8. und Anhang 7.3.6.).

### **6.7.3. Diskussion prominenter Metabolitklassen.**

#### **6.7.3.1. Diendiole**

Es konnte nur eine einzige Transposonmutante entdeckt werden, welche die angebotenen Substrate in Diendiole überführt, FLU 100 P2R5, siehe Tabelle 39. Bei dieser Mutante ist die Diendioldehydrogenase von der Transposition betroffen und dadurch inaktiv geworden. Da für die Diendiole keine Standards zur Verfügung standen, wurden zahlreiche Methoden in Kombination zu ihrer Identifizierung angewandt. Als beste Methode zur Aufklärung der Konstitution der Diendiole erwies sich die  $^1\text{H}$  – NMR. Dazuhin erwies sich die Derivatisierung der Diendiole zu Phenolen (siehe Kapitel 5.7.1.1.) als robustes Identifikationsverfahren.

Naturgemäß müssen von FLU 100 P2R5 aus den Monohalogenbenzolen und aus Toluol jeweils zwei Diendiole produziert werden, welche ihren Substituenten an der 3-Position oder an der 4-Position tragen. Das Verhältnis der Konzentrationen dieser Metabolite sollte den in Tabelle 40 dargestellten Verhältnissen genügen, denn dieses wird durch das initiale Dioxygenasesystem definiert, welches in FLU 100 P2R5 nicht betroffen ist. Leider war die Menge der an ihrer 4-Position substituierten Diendiole zu gering, als sie aus den nach der Derivatisierung entstandenen Phenolen zu identifizieren. Auch ließen sich die an der 4-Position substituierten Diendiole für eine eigene NMR – Messung abtrennen.

Die Mutante FLU 100 P2R5 wandelt 3- und 4-Fluorphenol nicht in Metabolite um, in deren Abbauweg spielt das defekte Enzym, die Diendioldehydrogenase keine Rolle.

Insgesamt gesehen ergab die Analyse der von FLU 100 P2R5 gebildeten Diendiole keine Überraschungen, das initiale Dioxygenasesystem für Monohalogenbenzole und andere monosubstituierte Benzole von FLU 100 greift diese tatsächlich überwiegend in Orthoposition (siehe Kapitel 3.4.1.) an. Der Angriff in Metaposition wird nur zu einem geringen (vom Substrat abhängenden) Teil absolviert, wobei keinerlei Angriff in Ipsoposition erfolgt.

#### **6.7.3.2. Catechole**

Diese Metabolitklasse wird von zahlreichen Mutanten produziert, siehe Tabelle 44. Es zeigte sich, dass vornehmlich an der 3-Position substituierte Catechole gebildet werden (siehe Tabelle 40), 4-substituierte Catechole spielen nur eine untergeordnete Rolle. Für Catechol, Fluorcatechole, Chlorcatechole und die Methylcatechole standen Standards zur Identifikation zur Verfügung. Die anderen Catechole wurden anhand ihrer UV – Absorptionsspektren, Retentionsvolumen und durch Analogiebetrachtungen identifiziert. Von mutantengebildetem

3-Fluorcatechol, 3,6-Difluorcatechol und 3-Fluor-6-methylcatechol konnten zudem die Molekularmassen mittels HPLC – MS bestimmt werden (siehe Kapitel 5.7.2.).

Das initiale Dioxygenasesystem von FLU 100 definiert das Verhältnis zwischen den 3- und 4-substituierten Catecholen, die von den Catechol-1,2-dioxygenase - defekten Mutanten gebildet werden (siehe Tabelle 40). Für die Catechole lagen, im Vergleich zu den anderen Metabolitklassen die meisten Standards vor. Daher wurde diese Mutantenklasse dazu herangezogen, die genauen Zahlenwerte der Verhältnisse der 3- und 4-substituierten Produkte des initialen Dioxygenasesystems zu ermitteln.

#### **6.7.3.3. Muconate**

Die von einigen Mutanten gebildeten Muconsäurederivate (siehe Tabelle 42) erwiesen sich als schwieriger zu analysieren als die Diendiole und Catechole. Ausser unsubstituierter Muconsäure standen keine Standards zur Verfügung. Glücklicherweise konnten mittels des Stammes *Escherichia coli* Klon4 einige Muconsäuren aus den vorrätigen Catecholen produziert werden. So konnten die von den Transposonmutanten gebildeten Derivate durch Vergleich von Retentionsvolumen und UV – Absorptionsspektren identifiziert werden, dazu zählen das 2-Fluor-, 3-Fluor-, 2-Chlor und 2-Methylmuconat. Die weiteren in Tabelle 42 genannten Muconate wurden durch Analogiebetrachtungen identifiziert. Eine Ausnahme macht dabei das 3,6-Difluorcatechol, welches sich nicht in ein Muconat überführen ließ. Möglicherweise ist dieser Aromat wegen der Fluorsubstituenten für die Catechol-1,2-dioxygenase zu stark deaktiviert.

#### **6.7.3.4. Muconolactone**

Substituierte Muconolactone wurden, wie die Catechole, von zahlreichen Mutanten produziert. Es standen leider nur Standards für unsubstituiertes und 5-Methylmuconolacton zur Verfügung, so konnten die halogenierten Muconolactone nur durch Analogiebetrachtungen identifiziert werden (siehe Kapitel 5.6.6.4.).

## 6.8. Die Konstruktion des Abbauweges der Monohalogenbenzole im Stamm FLU 100

Die Ergebnisse der Mutantenuntersuchung (siehe Kapitel 5.6., 5.7. und 6.7.) sind ausreichend, um einen Teil des Abbauweges von Fluorbenzol und der anderen Monohalogenaromaten, sowie Benzol, Toluol, 3- und 4-Fluorphenol in *Burkholderia fungorum* FLU 100 zu konstruieren. Sämtliche Ergebnisse weisen darauf hin, dass beim Abbau nur der Orthoweg beschriftet wird; es finden sich keinerlei Hinweise auf eine Metaspaltungsaktivität in FLU 100 (siehe Kapitel 6.5.).

### 6.8.1. Der Abbauweg der Monohalogenbenzole, Toluol und Benzols

Im Folgenden wird der Abbauweg der Einfachheit halber zuerst am Fluorbenzol beschrieben, vergleiche Bild 128. Danach wird auf dieser Basis auf die Abbauege der anderen Substrate eingegangen. Kapitel 5.6.7. hat gezeigt, dass Fluorbenzol durch ein initiales Dioxygenasesystem angegriffen wird. (Die Gensequenz dieses Dioxygenasesystem weist Ähnlichkeiten auf mit der Isopropyldioxygenase von beispielsweise *Pseudomonas* sp. JR1.) Dieses Dioxygenasesystem oxidiert Fluorbenzol zu zwei unterschiedlichen Diendiolen (siehe Kapitel 5.6.6.2.). Zu fast 99 % wird an der Orthoposition zum Fluorsubstituenden am Benzolring angegriffen, welches zu 3-Fluordiendiol führt (vergleiche Bild 128 rechte Spalte, Hauptweg). Der Angriff zu etwas mehr als 1 % erfolgt in Metaposition und führt zu 4-Fluordiendiol (vergleiche Bild 128, linke Spalte, Nebenweg). Ein theoretisch möglicher Angriff in Ipsoposition wurde nie beobachtet.

Im nächsten Schritt der Abbaukette werden die Diendiole durch eine Dehydrogenase zu den korrespondierenden Catecholen (Hauptweg: 3-Fluorcatechol, Nebenweg: 4-Fluorcatechol) rearomatisiert (siehe Kapitel 5.6.6.2.). Vermutlich handelt es sich um eine einzige Dehydrogenase, welche beide Reaktionen katalysiert.

Im nächsten Schritt werden die gebildeten Catechole mittels einer Chlorcatechol-1,2-dioxygenase zu 2-Fluormucon- und 3-Fluormuconsäure gespalten. Dieses Enzym entspricht dem Typ II nach Dorn 1978A (siehe Kapitel 6.5.1.). Andererseits haben die Proteomuntersuchungen (siehe Kapitel 6.6.) gezeigt, dass eine weitere Catechol-1,2-dioxygenase aktiv ist, deren Rolle noch zu untersuchen ist.

Waren die Abbauschritte bisher in Haupt- und Nebenweg analog zueinander, müssen jetzt die beiden Wege getrennt diskutiert werden. Zu den weiteren Reaktionsschritten können aufgrund der Ergebnislage nur eingeschränkte Aussagen gemacht werden. Beim Hauptweg ergibt sich das Problem, dass die 2-Fluormuconsäure nach unseren Experimenten und Ergebnissen (siehe Kapitel 6.3.2.1.) zwar durch ganze Zellen gut abbaubar ist, jedoch im Rohextrakt nur mit einer verschwindend geringen Rate umgesetzt wird. Hierbei ist denkbar, dass das muconatcyclisierende Enzym sehr labil ist, also beim Zellaufschluß zerstört wird. Andererseits

wäre eine sehr langsam arbeitende Muconatcycloisomerase ein Widerspruch zu den beobachteten Phänomenen: Erstens, die Metaboliten in der Abbaukette von der Muconatcycloisomerase würden in diesem Fall akkumulieren. Dies ist jedoch am Wildtyp nicht beobachtet worden (siehe Kapitel 5.3.2.). Zweitens, das Experiment, bei dem 3-Fluorcatechol in großen Konzentrationen den fluorbenzolinduzierten Zellen von FLU 100 angeboten wurde (siehe Kapitel 5.3.6), zeigte, dass zwar intermediär 2-Fluormuconsäure gebildet wurde, diese aber rasch umgesetzt wurde, trotz des gewindigkeitslimitierenden Resorptionsvorgangs. Es muss also in den Zellen eine hinreichend schnelle Muconatcyclisierungsreaktion ablaufen. Drittens, einige Transposonmutanten produzieren ein fluoriertes Muconolacton, vermutlich 5-Fluormuconolacton, welches definitiv ein Produkt einer Muconatcycloisomerase darstellt. In der Konsequenz muss also angenommen werden, dass in den Zellen ein wirksamer Abbauprozess von 2-Fluormuconsäure abläuft. Vor diesen Argumenten lässt sich der in Bild 128 dargestellte Hauptabbauweg über ein fluoriertes Muconolacton, vermutlich 5-Fluormuconolacton, favorisieren. Hier endet die Konstruktion des Abbauweges aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit.

An dieser Stelle wird normalerweise aus dem halogenierten Muconolacton das Dienlacton gebildet (zum Beispiel Reinecke 1984, bewiesen für Chlormuconolacton), wobei auch das Fluoratom reaktiv aus dem Substrat entfernt wird. Der Stamm FLU 100 kann, wenn er fluorbenzolinduziert ist, Dienlacton vollständig und rasch abbauen (siehe Kapitel 5.2.6.). Entsprechend ist der Hauptabbauweg in Bild 128 mit dem klassischen Orthoweg zum 3-Oxoadipat ergänzt. Angesichts der hypothetischen Elemente des weiteren Abbauwegs von Fluormuconsäure muss man jedenfalls auch die Möglichkeit offen lassen, dass ein vollständig anderer Abbauweg eingeschlagen wird, in Bild 128 symbolisiert durch einen Pfeil mit Fragezeichen (Engesser 2006).

Der Nebenweg, der mit dem 4-Fluordiendiol startet, verläuft bis zur 3-Fluormuconsäure analog zum Hauptweg. Hinsichtlich des Schrittes danach zeigen die Experimente, dass fluorbenzolinduzierte Zellen von FLU 100 bei angebotenenem 4-Fluorcatechol mindestens zwei Metaboliten in das Medium ausschleusen. Deren chemische Natur ließ sich dahingehend festlegen, dass es sich um zwei verschieden fluorierte Muconolactone handeln könnte (siehe Bild 77.). Danach verlief der weitere Abbau wie beim Hauptweg über das Dienlacton (siehe Bild 128). Allerdings haben die Experimente (siehe Kapitel 5.3.7.) gezeigt, dass die im Nebenweg gebildeten fluorierten Muconolactone im Vergleich zum Hauptweg nur sehr langsam abgebaut werden. Dem entspricht, dass der Stamm FLU 100 im Falle der Konfrontation mit Substraten, die zwangsläufig zu 4-Fluorcatechol umgesetzt werden (beispielsweise 4-Fluorphenol) sehr langsam unter Emission von entsprechenden Metaboliten ins Medium abläuft (Kapitel 5.3.7.).

Die Abbauege des Chlorbenzols, Brombenzols und Iodbenzols sind nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen (Kapitel 6.7.) analog zu dem des Fluorbenzols (siehe Bild 129).

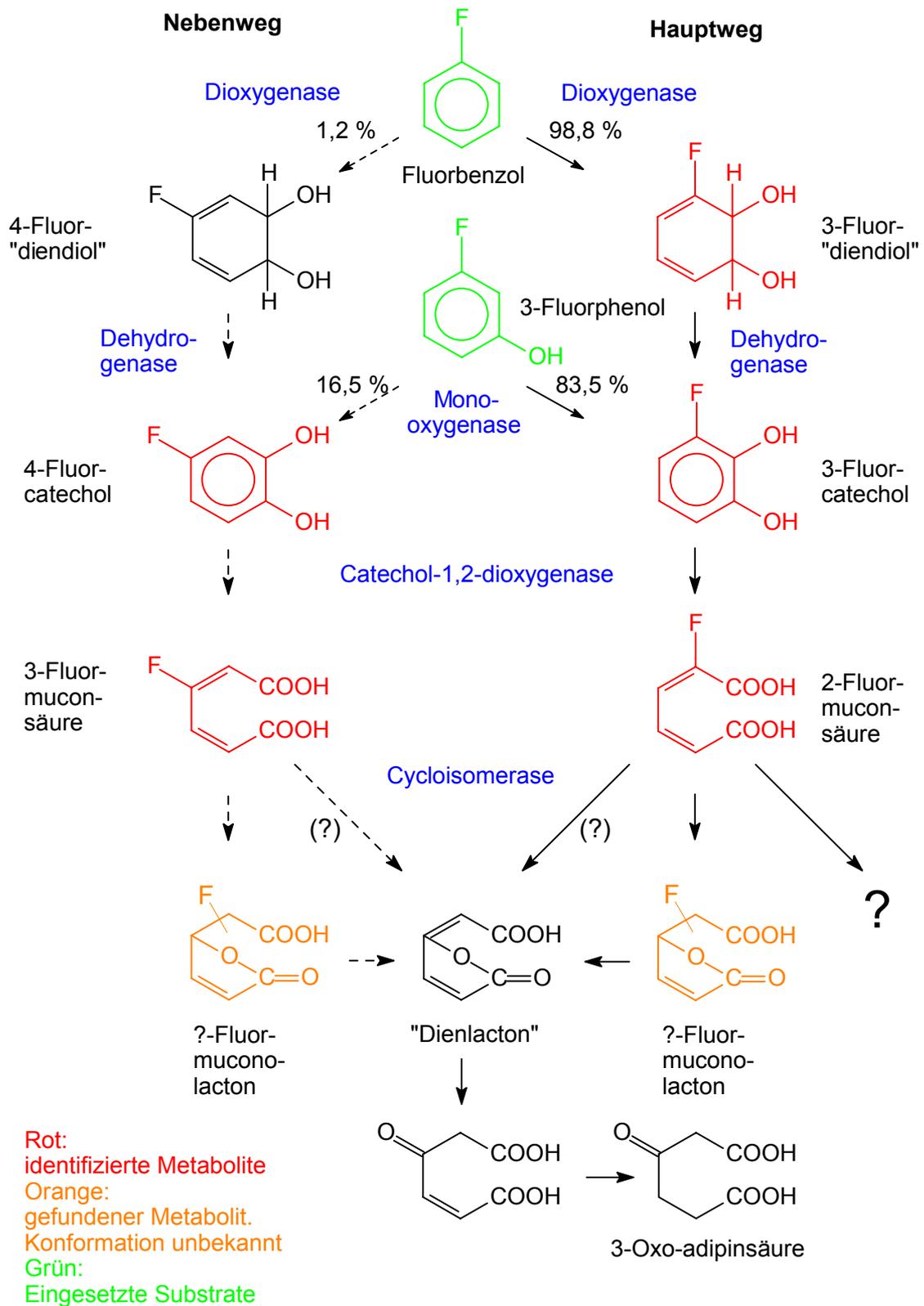
Allerdings bestehen Unterschiede. Der relative Anteil des jeweiligen Substrats, der über den Nebenweg abgebaut wird, ist höher, bis zu 5 % (siehe Kapitel 5.6.6.2.), als beim Fluorbenzolabbau. Auch konnten weniger Metabolite des Nebenweges analytisch erfasst werden als bei der Untersuchung des Fluorbenzolabbauweges.

Der Abbauweg des Toluols folgt dem des Fluorbenzols bis zur Stufe der Muconsäuren (siehe Bild 129). Wie die Mutantenexperimente zeigten, wird im Hauptweg 2-Methylmuconolacton gebildet (siehe Kapitel 5.6.5). Ab dieser Stufe muss der Abbauweg des Toluols prinzipiell anders als derjenige der Monohalogenaromaten verlaufen, denn die Methylgruppe kann nicht reduktiv abgespalten werden, sie verbleibt im Substrat. Zu bemerken ist auch, dass vom Toluol 7 % in den Nebenweg eingeschleust werden. Benzol hingegen (siehe Bild 129), wird von FLU 100 klassisch und ohne Überraschungen über den Orthoweg abgebaut (siehe Kapitel 5.6.).

### **6.8.2. Der Abbauweg weiterer substituierter Benzole**

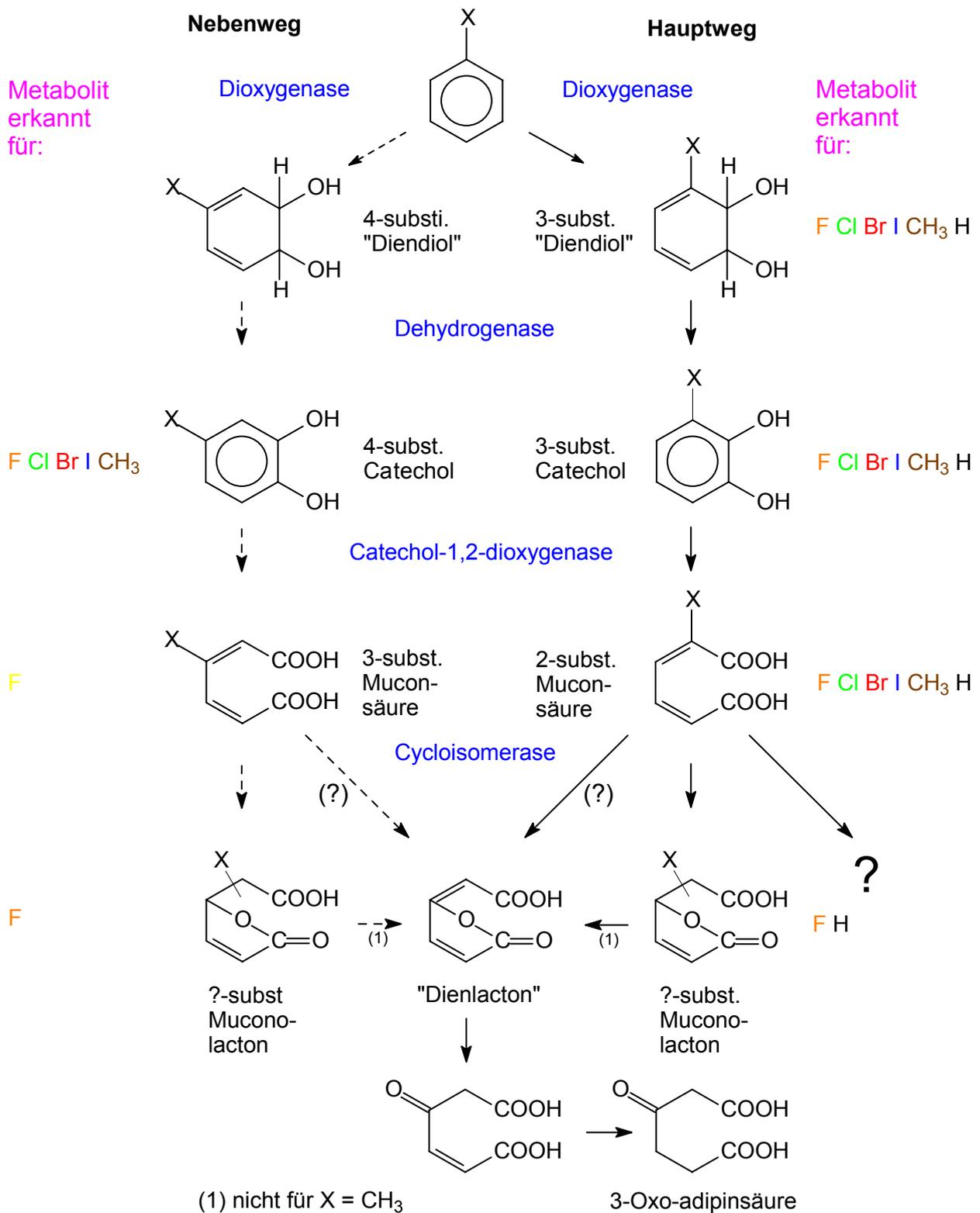
Der Abbauweg der Fluorphenole beginnt mit ihrer initialen Monooxygenierung (siehe Kapitel 5.3.8.). Dabei wird 2-Fluorphenol zu 3-Fluorcatechol, 4-Fluorphenol zu 4-Fluorcatechol und 3-Fluorphenol zu einer Mischung beider Fluorcatechole oxidiert. Mit den Fluorcatecholen münden die Fluorphenolabbauwege in den allgemeinen Fluorbenzolabbauweg ein (siehe Bild 128).

Weitere Substrate, die durch den Monohalogenbenzolabbauweg angegriffen, aber nicht produktiv degradiert werden, sind beispielsweise die 1,4-dihalogen-substituierten Benzole, welche bis zu den entsprechenden 3,6-Dihalogen-catecholen als Dead – end - Metabolite umgesetzt werden (siehe Kapitel 5.2.5).



**Bild 128: Konstruierter Abbauweg für Fluorbenzol in *Burkholderia fungorum* FLU 100.**

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchung der verschiedenen Transposonmutanten lässt sich dieser ortho – Abbauweg konstruieren. Fluorbenzol wird initial hauptsächlich in der 2,3-Stellung angegriffen. Ein kleinerer Anteil wird in 3,4-Stellung angegriffen. Details siehe Text.



**Bild 129: Konstruierter Abbauweg für Monohalogenbenzole und Toluol in *Burkholderia fungorum* FLU 100.**

Analog zum Fluorbenzolabbau können auch Abbauwege für die anderen Monohalogenbenzole (X = F, Cl, Br, I), Benzol (X = H) und Toluol (X = CH<sub>3</sub>) konstruiert werden. Die erkannten Metabolite sind gekennzeichnet. Sinngemäß gilt das gleiche, wie in Bild 128 beschrieben.

## **6.9. Der Einsatz von FLU 100 in Biotricklingfiltern**

### **6.9.1. Konzeption, und Aufbau der Technikumsreaktoren**

Nach Auswahl des Verfahrenstypes, dem Biotricklingfilter (siehe Kapitel 3.8.3.2.), wurden zwei vorhandene Reaktoren instandgesetzt und in Betrieb genommen. Es zeigte sich rasch in der Anfangsphase der Betriebszeit, dass mit einer automatischen kontinuierlichen Datenaufzeichnung die Anlagen besonders einfach optimiert und langzeitstabil gemacht werden können. Hierzu wurden entsprechende Sensoren für Temperatur, Druck, pH – Wert und relative Feuchtigkeit in den Gasströmen implementiert. Der Flamminduktions – Detektor wurde an den Messcomputer angebunden. Hierzu war auch nötig, eine eigene Konzeption einer Messelektronik selbst zu entwickeln und aufzubauen (vergleiche hierzu die Bilder in Kapitel 5.9. besonders jedoch Bild 114). Dadurch konnten Störfälle während des gesamten Betriebs zeitlich sehr genau eingekreist und mit anderen Ereignissen korreliert (siehe Kapitel 5.9.2.3 und 5.3.9.2) und zur Verbesserung von Konstruktion und Betrieb der Anlagen benutzt werden.

Diese Störfall - Erfahrungen zeigen, dass besonderes Augenmerk insbesondere im Hinblick auf die Konstruktion einer Prototypanlage auf mehrere Aspekte gelegt werden muss:

Die Tatsache, dass das Reingas wasserdampfgesättigt war (siehe Bild 123) bringt das zu berücksichtigende Problem mit sich, dass man in der Konstruktion einer Anlage Kondensatbildungen vermeiden oder anderweitige Lösungen schaffen muss.

Der als Packungsmaterial genutzte Blähton, der in der Hoffnung gewählt wurde, die entstehende Flusssäure zu binden, hat sich aus technischen Gründen nicht bewährt. Er emittierte bis zum Ende der Betriebszeit der Reaktoren feine Partikel, welche wahrscheinlich durch Abrasion entstanden sind (siehe Bild 104, Bild 105 und Bild 107). Diese beschädigten vor allem die eingesetzten Wasserpumpen. Als Folge schrumpfte das Filtermaterial um ca. 25 % seines Ausgangsvolumens (siehe Bild 106, vergleiche auch Kapitel 6.9.4.). Abhilfe bieten alternative Filtermaterialien, wie beispielsweise Kunststofffüllkörper, welche zwar die Flusssäure nicht binden, aber dagegen resistent sind. Diese Alternative konnte während dieser Arbeit leider nicht getestet werden.

Selbst kurzzeitige Stromausfälle im Technikum haben eindrücklich darauf hingewiesen, dass Reaktoren dieser Art selbstständig wieder anlaufen müssen. In technischen Anlagen sollten solche Dinge kein Problem darstellen.

### 6.9.2. Die Abreinigung von fluorbenzolbelasteter Luft

Der beginnende Regelbetrieb von Reaktor 2 zeigt schön die für biologische Abluftreinigungsanlagen typische Aufwuchsphase (siehe Bild 101 und Bild 102). Allerdings konnte im Rahmen des Experiments kein technisch zufrieden stellender Wirkungsgrad erreicht werden. Dieser bewegte sich um die 50 % (siehe Bild 111), 95 % wären in Hinblick auf technische Anwendungen wünschenswert. In der Konsequenz war offensichtlich die Filtervolumenbelastung um etwa den Faktor zwei zu hoch. Dies weist daraufhin, dass die erwartete Abbaukinetik für Fluorbenzol nicht erreicht werden konnte. Im Technikum konnte die Filtervolumenbelastung aufgrund technischer Limitierungen nicht weiter reduziert werden. Zu diesen Limitierungen zählen die minimale Fördermenge des Dosimaten und der maximal erreichbare Volumenstrom des Kompressors.

Im Hinblick auf die technische Verwertung würde diese hohe Filtervolumenbelastung bedeuten, dass die Filtervolumina möglicherweise unrentabel groß werden würden. Die erreichbare Eliminationskapazität bei der Degradation von Fluorbenzol ist mit durchschnittlich unter  $5 \text{ g} / \text{m}^3 \text{ h}$  in Anbetracht des xenobiotischen Substrates zwar nachzuvollziehen, aber dennoch eigentlich zu gering für eine industriell genutzte Anlage.

### 6.9.3. Die simultane Abreinigung von Fluorbenzol- und Chlorbenzol-belasteter Luft

Das in Kapitel 6.9.2. diskutierte Experiment am solitären Monohalogenaromaten stellt ein Idealfall dar, da im technischen Betrieb zumeist Substratmischungen vorliegen. Das Verhalten der fluorbenzoldegradierenden Biozönose gegenüber Beimischungen wurde anhand von Chlorbenzol studiert. Sinnvollerweise fand das Experiment in Reaktor 1 statt, in dem bereits eine entsprechende fluorbenzoldegradierende Biozönose vorlag.

Das erste wichtige Ergebnis war, dass keine besondere Aufwuchsphase nach Zumischen von Chlorbenzol beobachtet wurde (siehe Bild 115). Für die Komponente Fluorbenzol war dies zu erwarten. Überraschenderweise fehlte für das Chlorbenzol auch eine Induktionsphase. Chlorbenzol wurde von Anfang an mit Wirkungsgraden um 90 % degradiert (siehe Bild 117). Die Konzentration im Reingas und damit der Abbaugrad des Fluorbenzols bewegt sich im Rahmen des Wertes aus dem Regelbetriebs mit reiner Fluorbenzolversorgung von etwa 50 % (siehe Bild 115). Daraus ergibt sich ein Gesamtwirkungsgrad des Reaktors um die 70 % (siehe Bild 119). Dementsprechend ist auch die Eliminationskapazität mit 6 bis  $10 \text{ g} / \text{m}^3 \text{ h}$  höher als bei der reinen Fluorbenzoldegradation (siehe Bild 120). Allerdings ist auch diese Zahl im Hinblick auf technische Anwendungen noch zu niedrig.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass der vollständige Abbau von Chlorbenzol äquimolar Chlorwasserstoff, gelöst als Salzsäure, entstehen lässt. Da diese im Vergleich zur Flusssäure eine starke Säure ist, also durch  $\text{H}_3\text{O}^+$  nivelliert wird, war mit einer

wesentlich stärkeren Versauerung der Tricklinglösung und der Packung zu rechnen. Nach einigen Anfangsexperimenten konnte durch Batchneutralisierungen alle 3 – 5 Tage der pH - Wert der Tricklinglösung zwischen 6 und 7, und damit im optimalen Bereich für *Burkholderia fungorum* FLU 100 gehalten werden (vergleiche Bild 79). In einer großtechnischen Anlage ist eine kontinuierliche Neutralisation einzuplanen.

#### **6.9.4. Rückstände im Reaktorsumpf**

Im Kapitel 6.9.1. wurde darauf hingewiesen, dass sich vom Packungsmaterial Teilchen über die gesamte Betriebszeit bei beiden Reaktoren ablösen und das Filtermaterialvolumen um ca. 25 % geschrumpft ist. Möglicherweise riefen die von der getakteten Berieselung hervorgerufenen Druckstöße die beobachteten Läsionen des Blähtons hervor und damit auch die ständige Emission der feinen Partikel.

Die Elementaranalyse der Rückstände im Reaktorsumpf (siehe 5.9.2.5.) lieferte in größeren Stoffmengenanteilen (zwischen 10 und 40 %), Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor und Calcium, in kleineren Mengen Magnesium, Fluor und Silizium (zwischen 2 und 4 %), und in Spuren Natrium und Aluminium. Der Fluoranteil und damit der Calciumfluoridanteil ( $\text{CaF}_2$ ) ist entgegen den Erwartungen sehr niedrig, möglicherweise liegen ausgefallenes Calciumcarbonat und ausgefallene Calciumphosphate vor. Aluminium und Silizium sind verträglich mit der Zusammensetzung der mineralischen Phase der Packung. Der Natrium und Magnesiumanteil in der kristallinen Masse stammt vermutlich aus der Tricklinglösung, dort sind diese Elemente in großen Mengen vorhanden (siehe Kapitel 4.2.1). Das beim Fluorbenzolabbau anfallende Fluorid verbleibt zum größten Teil in der Tricklingslösung.

#### **6.9.5 Schlussfolgerungen aus dem Reaktorbetrieb**

Die Reaktoren zeigten, dass die Abreinigung von fluorbenzolbelasteter Luftströme selbst bei anwesendem Chlorbenzol prinzipiell möglich ist. Allerdings reichen die ermittelten Eliminationsleistungen noch nicht aus, um das System auf einen industriellen Maßstab, der auch wirtschaftliche Aspekte befriedigt, zu skalieren. Der als Filtermaterial eingesetzte Blähton hat den Nachteil fehlender Langzeitstabilität. Als Alternative bieten sich säureresistente Kunststofffüllkörper an.

## 6.10. Abschlussbemerkungen und Ausblick

Diese Arbeit hat gezeigt, dass mit *Burkholderia fungorum* FLU 100 ein Bakterienstamm existiert, mit dem Fluorbenzol und andere Monohalogenaromaten biologisch abgebaut werden können. Die zugehörigen Untersuchungen wurden an zwei entsprechend aufbereiteten Biotricklingfiltern durchgeführt, die automatisch überwacht und mit einer kontinuierlichen Datenaufnahme versehen waren. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass Fluorbenzol mit einem Wirkungsgrad von 50 % bei einer Eliminationsleistung von ca.  $5 \text{ g} / \text{m}^3 \text{ h}$  abgebaut wird. Diese Werte sind natürlich im Hinblick auf eine industrielle Anwendung zu klein. Ein weit höherer Wirkungsgrad lässt sich aber durch größere Filtervolumina prinzipiell erreichen.

Als Methoden zur Untersuchung der einzelnen Abbauschritte dienten Enzymkinetiken, Proteomuntersuchungen und die Transposonmutagenese mit anschließender Analyse der gebildeten Metabolite. Der Abbauweg konnte ein Stück weit für Fluorbenzol und die anderen Monohalogenbenzole, sowie Benzol und Toluol, bis zur Stufe der Muconolactone analysiert werden (Orthoweg). Für den weiteren Verlaufs des Abbauweges liegen Hinweise vor, dass dieser über das Dienlacton erfolgen könnte. In diesem Fall wäre die Muconatcycloisomerase für die Elimination des Halogenatoms aus dem Substat verantwortlich. Andererseits könnte ein noch völlig unbekanntes Enzymsystem einen alternativen, bisher unbekanntes weiteren Teilsabbauweg, ausgehend von dem 2-Halogenmuconolacton, initiieren. Die Klärung dieser Fragen muss zukünftigen Untersuchungen überlassen bleiben.

Mit dem Stamm FLU 100 sind wichtige Vorteile verbunden. Die Inkompatibilität von Monohalogenbenzolen und Toluol ist aufgehoben, diese werden auch in Mischungen simultan degradiert. Dabei treten keine lag-Phasen auf, der Abbau geht bei Substratwechseln unmittelbar weiter. Hieran scheitern normalerweise andere aromatendegradierende Bakterienstämme. Eine weitere bemerkenswerte Eigenschaft des Stammes FLU 100 ist seine Resistenz gegenüber hohen Konzentrationen von Fluorid im Medium, welches wichtig für technische Anwendungen ist. Wie sich diese Resistenz begründet, ist eine interessanter Punkt für weitere Arbeiten.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Mutanten von FLU 100 bieten sich aufgrund der Struktur des Transposons als Quellen für Klonierungsexperimente an. Damit können zukünftige Experimente die für den genannten Abbauweg verantwortlichen Gene identifizieren.

Das mit dieser Arbeit aufscheinende Potenzial des Stammes *Burkholderia fungorum* FLU 100 stellt durchaus eine Grundlage dar, deren weiterer Ausbau in Richtung technischer Anwendung lohnend ist.

# Anhang

## 7. Anhang

### 7.1. Ausführliches Inhaltsverzeichnis

1.	Verzeichnisse.....	7
1.1.	Inhaltsverzeichnis.....	7
1.2.	Abkürzungsverzeichnis .....	9
1.3.	Trivialnamenverzeichnis.....	9
1.4.	Geräteverzeichnis .....	10
	Zusammenfassung .....	12
	Abstract .....	13
2.	Einleitung .....	14
3.	Grundlagen .....	17
3.1.	Stand der Forschung.....	18
3.2.	Die chemischen Verhältnisse in Halogenaromaten und ihre Auswirkungen auf bakterielle Abbauaktivitäten .....	18
3.3.	Die Grundprinzipien der aeroben Dehalogenierung von Aromaten .....	21
3.4.	Die Grundprinzipien des Halogenaromatenabbaus .....	24
3.4.1.	Der obere Aromatenabbauweg, initiale Dioxygenierung und anschließende Dehydrogenierung.....	24
3.4.2.	Der untere Abbauweg, Ringspaltung und weitere Oxidation des Substrates .....	26
3.4.2.1.	Der Orthoweg.....	29
3.4.2.2.	Der Metaweg.....	31
3.5.	Charakterisierung der wichtigsten in dieser Arbeit eingesetzten Substrate .....	32
3.5.1.	Fluorbenzol .....	33
3.5.2.	Chlorbenzol .....	36
3.5.3.	Brombenzol .....	38
3.5.4.	Iodbenzol.....	40
3.5.5.	Toluol .....	41
3.5.6.	Benzol .....	42
3.5.7.	1,4-Difluorbenzol .....	43
3.5.8.	4-Fluortoluol .....	43
3.5.9.	Monofluorphenole .....	44
3.6.	Der Stamm FLU 100 .....	46
3.7.	Der Einfluss von freien Halogenidionen .....	46

3.8.	Biofiltersystem im Technikumsmaßstab zur Abreinigung von Fluorbenzolbelasteter Abluft.....	47
3.8.1.	Biologische Verfahren zur Abluftreinigung.....	47
3.8.1.1.	Der Biofilter.....	47
3.8.1.2.	Der Biowäscher.....	50
3.8.1.3.	Der Biotricklingfilter (Biorieselbettreaktor).....	53
3.8.3.	Konzeption eines Biotricklingfiltersystems zur Reinigung von Monohalogenaromaten belasteter Luft.....	56
3.8.3.1.	Erwartete Metabolite.....	56
3.8.3.2.	Wahl des Verfahrenstyps.....	57
3.8.3.3.	Anforderungen an das Packungsmaterial.....	57
3.8.3.4.	Anforderungen an die Verfahrensparameter.....	58
3.8.3.5.	Anforderungen an die Sensorik der Biotricklingfilter.....	58
3.8.3.6.	Die Calciumfluoridproblematik.....	58
3.9.	Methoden der Gentechnik.....	59
3.9.1.	Genetisches Fingerprinting bei Bakterien.....	59
3.9.1.1.	Integrierte Stoffwechselltests.....	59
3.9.1.2.	DNA-Sequenzierung.....	60
3.9.1.3.	DNA-Fingerprinting.....	60
3.9.1.4.	Das BOX – Element.....	61
3.9.1.5.	Das ERIC – Element.....	61
3.9.2.	Transposon Mutagenese.....	63
3.9.2.1.	Austausch genetischen Materials zwischen Bakterien.....	63
3.9.2.2.	Eigenschaften von mobilen genetischen Elementen.....	66
3.9.2.3.	Tn5 und abgeleitete Transposons.....	68
3.9.2.4.	Das Antibiotikum Kanamycin als Selektionsmarker.....	73
3.10.	Ansätze aus der Proteomik.....	74
3.11.	Bestimmung der Verdampfungsenthalpie.....	76
4.	Material und Methoden.....	79
4.1.	Verwendete Organismen.....	80
4.2.	Medien.....	80
4.2.1.	Minimalmedien.....	81
4.2.2.	Vollmedien.....	82
4.2.3.	Ausgangslösungen für die Minimalmedien.....	82
4.2.4.	Zusätze zu Medien.....	83
4.2.5.	Saline.....	85
4.2.	Lösungen für Stoffwechselltests und Enzymtests.....	85

4.3.	Identifikation und Beschreibung von Bakterienstämmen .....	85
4.3.1.	Aminopeptidase – Schnelltest.....	85
4.3.2.	KOH-Test (Schnelltest auf das Gramverhalten).....	86
4.3.3.	Oxidase – Schnelltest .....	86
4.3.4.	Nachweis von Katalase.....	86
4.3.5.	Gramfärbung .....	87
4.3.6.	Verwendung kommerzieller Schnelltests zur biochemischen Beschreibung und Identifizierung der isolierten Stämme.....	87
4.3.7.	Morphologische Bewertung.....	88
4.4.	Methoden der klassischen Mikrobiologie .....	89
4.4.1.	Stammerhaltung.....	89
4.4.2.	Bestimmung der optischen Dichte .....	89
4.4.3.	Herstellung von Flüssigkulturen und Bakteriensuspensionen.....	89
4.4.3.	Substratpattern.....	90
4.4.3.1.	Test auf produktives Wachstum.....	90
4.4.3.2.	Test auf Substratumsatz .....	90
4.4.4.	Bestimmung der Halogenidfreisetzung durch FLU 100 bei der Degradation halogener Substrate.....	91
4.4.5.	Wachstumskurven.....	91
4.4.6.	Korrelation zwischen koloniebildenden Einheiten und optischer Dichte .....	92
4.4.7.	Der Einfluss von Fluorid auf die Wachstumsrate von FLU 100.....	93
4.4.8.	Osmotik und Zellertrag.....	93
4.4.9.	pH - Abhängigkeit des Zellertrages.....	94
4.4.10.	Antibiotikaresistenzen .....	94
4.4.10.1.	Der Disktest.....	95
4.4.10.2.	Qualitative Bestimmung der Kanamycinlabilität.....	95
4.5.	Stoffwechsel- und Enzymtests .....	96
4.5.1.	Lösungen für Stoffwechseltests und Enzymtests.....	96
4.5.2.	Vorkulturen und Zellaufschluss.....	96
4.5.3.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	96
4.5.4.	Ringspaltungsenzyme.....	97
4.5.4.1.	Catechol-2,3-Dioxygenase.....	97
4.5.4.2.	Catechol-1,2-Dioxygenase.....	97
4.6.	Genetik.....	98
4.6.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	98
4.6.1.1.	Reagenzien für die PCR .....	98
4.6.1.2.	Präparation der Template-DNA.....	100
4.6.1.3.	PCR - Ansätze .....	101

4.6.1.4.	PCR - Programme.....	101
4.6.1.5.	Agarose Gelelektrophorese .....	102
4.6.2.	Transposonmutanten .....	104
4.6.2.1.	Erster Arbeitstag .....	104
4.6.2.2.	Zweiter Arbeitstag .....	105
4.6.2.3.	Dritter Arbeitstag .....	106
4.6.2.4.	Vierter Arbeitstag und Folgende .....	107
4.6.2.5.	Untersuchung der Transposonmutanten.....	108
4.6.3.	16S rRNA Gen Analyse .....	108
4.6.4.	Präparation von substituierten Muconsäuren mittels <i>Escherichia coli</i> Klon4 .....	109
4.7.	Methoden der Proteomik.....	109
4.7.1.	Die Zweidimensionale Gelelektrophorese (2D SDS PAGE) .....	109
4.7.2.	Lösungen für die Proteinaufarbeitung .....	109
4.7.3.	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE .....	110
4.7.4.	Lösungen zum Anfärben der Proteine im Polyacrylamidgel .....	111
4.7.5.	Induktion von Proteinen in FLU 100.....	113
4.7.6.	Ernte der Zellen und Aufarbeitung des Zell -Lysats .....	113
4.7.7.	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford .....	113
4.7.8.	Proteinfällung .....	114
4.7.8.1.	TCA- / Acetonfällung.....	114
4.7.8.2.	Acetonfällung .....	114
4.7.9.	Rehydratisierung und Beladung der IPG-Streifen.....	114
4.7.10.	Isoelektrische Fokussierung (erste Dimension der 2D SDS PAGE).....	115
4.7.10.1.	Multiphor II System .....	115
4.7.10.2.	Ettan IPGphor System .....	115
4.7.10.3.	Laufbedingungen der isoelektrischen Fokussierung.....	116
4.7.10.4.	Equilibrierung der IPG - Streifen .....	116
4.7.11.	SDS-PAGE (zweite Dimension der Gelelektrophorese) .....	117
4.7.11.1.	Präparation der Gele.....	117
4.7.11.2.	Laufbedingungen der SDS-PAGE.....	117
4.7.12.	Färben der Polyacrylamidgele .....	118
4.7.12.1.	Silberfärbung.....	118
4.7.12.2.	Fluoreszenzfärbung .....	118
4.7.13.	Auswertung der Gele und Identifikation einzelner Proteinspots.....	119
4.8.	Analytik.....	120
4.8.1.	Messung physikalischer und chemischer Parameter.....	120
4.8.1.1.	pH – Wert - Bestimmung.....	120
4.8.1.2.	Messung der optischen Dichte.....	120

4.8.1.3.	Sauerstoffgehalt .....	121
4.8.1.4.	Bestimmung der Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol .....	121
4.8.2.	Chromatographische Methoden .....	122
4.8.2.1.	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie .....	123
4.8.2.2.	Ionenchromatographie .....	126
4.8.2.3.	Gaschromatographie .....	128
4.8.3.	Strukturanalysen .....	129
4.8.3.1.	Kernspinresonanz .....	129
4.8.3.2.	Chromatographie – Massenspektrometer Kopplungen HPLC – MS (LC – MS) .....	130
4.8.4.	Elementaranalyse mittels EDS (Energiedispersive Röntgenanalyse) .....	131
4.9.	Reaktoren .....	132
4.9.1.	Aufbau und Betrieb der Reaktoren .....	132
4.9.2.	Definition der Kenngrößen der Reaktoren .....	136
4.9.2.1.	Filterflächenbelastung .....	136
4.9.2.2.	Filtervolumenbelastung .....	137
4.9.2.3.	Der Wirkungsgrad .....	137
4.9.2.4.	Die Eliminationskapazität .....	137
4.9.2.5.	Die Schütthöhe .....	138
4.9.2.5.	Anforderungen an das Rohgas .....	138
4.9.3.	Messtechnik für die Reaktoren .....	138
4.9.3.1.	Entwicklung und Aufbau elektronischer Sensorschaltungen .....	139
4.9.3.2.	Temperatursensor .....	142
4.9.3.3.	Feuchtigkeitssensor .....	145
4.9.3.4.	Drucksensor .....	150
4.9.3.5.	Das pH – Sensor System .....	152
4.9.3.6.	Anbindung des Flammenionisationsdetektor - Systems .....	153
4.9.3.7.	Referenzspannung .....	156
4.9.3.8.	Versorgungsspannung des Systems .....	157
4.9.4.	Verfahrensführung der Anlage .....	158
4.9.4.1.	Inokulation der Reaktoren und Anfahrphase .....	158
4.9.4.2.	Regelbetrieb der Reaktoren .....	158
4.10.	Die Synthese von 4-Fluorcatechol .....	159
5.	Experimente und Ergebnisse .....	161
5.1.	Der Stamm FLU 100 – Taxonomische Einordnung .....	162
5.1.1.	Genetische Identifikation von FLU 100 .....	163
5.1.2.	Einordnung der Gattung <i>Burkholderia</i> .....	164
5.2.	Substratpattern .....	165

5.2.1.	Nicht aromatische Substrate .....	165
5.2.2.	Benzol und monosubstituierte Benzole .....	166
5.2.3.	Benzole, die an der 1,2 – Position substituiert sind .....	169
5.2.4.	Benzole, die an der 1,3 – Position substituiert sind .....	171
5.2.5.	Benzole, die an der 1,4 – Position substituiert sind .....	172
5.2.6.	Höher substituierte Benzole und mögliche Metabolite des Monohalogenaromatenabbaus .....	174
5.3.	Wachstumskinetiken und Umsatzversuche .....	176
5.3.1.	Das Wachstum von FLU 100 auf Standardsubstraten der klassischen Mikrobiologie .....	177
5.3.2.	Der Umsatz von benzoiden Substraten .....	178
5.3.3.	Ableitung der Monod - Kinetik von FLU 100 beim Wachstum auf Fluorbenzol .....	180
5.3.4.	Fluorbenzolumsatzrate.....	181
5.3.5.	Der Metabolis von Substratmischungen .....	182
5.3.6.	Halogenidbilanzen beim Monohalogenbenzolabbau .....	185
5.3.7.	Der Umsatz von Fluorcatecholen durch FLU 100 .....	187
5.3.8.	Der Umsatz von 3-Fluorphenol durch FLU 100 .....	192
5.3.9.	Der Umsatz von 1,4-Difluorbenzol durch FLU 100.....	193
5.4.	Toxische Effekte.....	194
5.4.1.	Einfluss des pH – Wertes auf das Wachstum von FLU 100 .....	194
5.4.2.	Antibiotikaspektrum.....	195
5.4.3.	Qualitative Bestimmung der Kanamycintoleranzschwelle.....	196
5.4.4.	Der Einfluss von freiem Fluorid auf die Wachstumsrate von FLU 100.....	197
5.4.5.	Der Einfluss von freien Halogenidionen auf den Zellertrag von FLU 100 .....	199
5.4.6.	Der Einfluss von Fluorphenolen auf das Wachstum von FLU 100.....	201
5.4.7.	Sauerstoffzehrung.....	202
5.5.	Enzymreaktionen .....	204
5.5.1.	Typ der Ringspaltung .....	204
5.5.2.	Catechol-1,2-dioxygenase .....	206
5.5.3.	Muconatcycloisomerase und Dienlactonhydrolase .....	208
5.6.	Genetik.....	208
5.6.1.	Transposonmutagenese .....	208
5.6.2.	Korrelation zwischen optischer Dichte und der Zellkonzentration.....	209
5.6.3.	Durchführung der Transposonmutagenese .....	210
5.6.4.	Screening der Transformanten .....	210
5.6.5.	Untersuchung der Mutanten, Einsatz von genetischen Identifikationssystemen .....	211
5.6.6.	Untersuchung der von den Mutanten gebildeten Metabolite.....	212
5.6.6.1.	Metabolitengruppe Diendiole (Mutante FLU 100 P2R5) .....	212

5.6.6.2.	Metabolitengruppe Catechole (Mutanten FLU 100 P14R22, FLU100 P15R11 und FLU 100 T6) .....	213
5.6.6.3.	Metabolitengruppe Muconate (Mutanten FLU 100 P11R7 und FLU 100 P14R4) .....	214
5.6.6.4.	Metabolitengruppe Muconolactone (Mutanten FLU 100 P2R3 und FLU 100 P13R15 sowie unter gewissen Bedingungen FLU 100 Wildtyp) .....	215
5.6.6.5.	Gesamtergebnis der Mutantenuntersuchung .....	215
5.6.7.	Identifikation des initialen Dioxygenasesystems .....	217
5.7.	Analytische Methoden zur Identifikation von Metaboliten des Aromatenabbaus durch FLU 100 .....	217
5.7.1.	HPLC – Analysen .....	217
5.7.1.1.	Identifikation der Diendiole .....	220
5.7.1.2.	Identifikation der Catechole .....	225
5.7.1.3.	Identifikation der Muconate .....	226
5.7.1.4.	Identifikation der Muconolactone .....	227
5.7.2.	HPLC – MS – Analysen .....	227
5.7.2.1.	Ansatz Nr.: 1 .....	227
5.7.2.2.	Ansatz Nr.: 2 .....	228
5.7.2.3.	Ansatz Nr.: 3 .....	228
5.7.2.4.	Ansatz Nr.: 4 .....	228
5.7.2.5.	Ansatz Nr.: 5 .....	229
5.7.3.	Bestimmung der Verdampfungsenthalpie von Fluorbenzol .....	229
5.8.	Proteomik .....	230
5.8.1.	Zur Leistungsfähigkeit der Proteomanalyse .....	231
5.8.2.	Vergleich der Proteinspotmuster von FLU 100 nach Wachstum auf verschiedenen Substraten .....	233
5.8.3.	Vergleich der Spotmuster während der Induktion mit Fluorbenzol .....	236
5.8.4.	Sequenzierung der identifizierten Spots .....	241
5.8.4.1.	Spot 1 .....	241
5.8.4.2.	Spot 2 .....	243
5.8.4.3.	Spot 3 .....	244
5.9.	Betrieb der Biotricklingfilter im Technikumsmaßstab .....	246
5.9.1.	Umbau der vorhandenen Anlagen und Beobachtungen beim Betrieb, frühe Phase .....	246
5.9.2.	Regelbetrieb der Reaktoren: Fluorbenzol als Reinsubstrat .....	247
5.9.2.1.	Gang der Konzentrationen im Roh- und Reingas .....	247
5.9.2.2.	Gang der Temperaturen und der Spannungsreferenz .....	249
5.9.2.3.	Aufgetretene Störfälle im Regelbetrieb von Reaktor 2 .....	250

5.9.2.4.	Veränderungen der Filterpackung.....	251
5.9.2.5	Analyse von Ablagerungen aus dem Sumpf.....	255
5.9.3.	Regelbetrieb der Reaktoren: Mischung aus Fluorbenzol und Chlorbenzol.....	261
5.9.3.1.	Beobachtungen während des Betriebs .....	261
5.9.3.2.	Störfälle während des Betriebs .....	263
6.	Diskussion.....	278
6.1.	Struktur der Diskussion.....	278
6.2.	Der fluorbenzolverwertende Stamm FLU 100.....	278
6.3.	Die metabolische Leistungsfähigkeit des Stammes FLU 100 .....	279
6.3.1.	Benzol und Monosubstituierte Benzole.....	279
6.3.2.	1,2-Disubstituierte Benzole .....	280
6.3.3.	1,3-Disubstituierte Benzole .....	280
6.3.4.	1,4-Disubstituierte Benzole .....	281
6.3.5.	Tri- und höher substituierte Benzole .....	281
6.3.6.	Nichtaromatische Substrate.....	281
6.3.7.	Klassifikation des Aromatenabbauverhaltens von FLU 100.....	282
6.3.1.	Wachstumsraten.....	282
6.3.1.1.	Wachstum auf Reinsubstraten .....	282
6.3.1.2.	Wachstum auf Mischsubstraten .....	283
6.3.2.	Stoffumsätze .....	284
6.3.2.1.	Der Umsatz von fluorierten Catecholen .....	284
6.3.2.2.	Der Umsatz von möglichen Metaboliten des Monohalogenbenzol- und Benzolabbaus durch FLU 100.....	286
6.3.2.3.	Der Umsatz von 3-Fluorphenol, 1,4-Difluorbenzol und weiteren 1,4-disubstituierten Benzolen.....	286
6.4.	Toxizitäten.....	287
6.4.1.	Der Einfluss des pH - Wertes.....	287
6.4.2.	Das Antibiotikasppektrum .....	287
6.4.3.	Der Einfluss von Halogenidanionen.....	287
6.4.4.	Resistenz gegenüber Fluorphenolen .....	288
6.5.	Enzymreaktionen .....	288
6.5.1.	Catecholdioxygenase(n) .....	288
6.5.2.	Muconatcycloisomerase und Dienlactonhydrolase.....	289
6.6.	Proteomik.....	290
6.7.	Transposonmutagenese und Metabolite.....	291
6.7.1.	Allgemeine Bemerkungen.....	291
6.7.1.	Identifikation der Mutanten mittels BOX - und ERIC - PCR .....	291
6.7.2.	Mit Hilfe der Transposonmutanten identifizierte Metabolite .....	291

6.7.3.	Diskussion prominenter Metabolitklassen.....	292
6.7.3.1.	Diendiole .....	292
6.7.3.2.	Catechole .....	292
6.7.3.3.	Muconate .....	293
6.7.3.4.	Muconolactone.....	293
6.8.	Die Konstruktion des Abbauweges der Monohalogenbenzolen im Stamm FLU 100 .....	294
6.8.1.	Der Abbauweg der Monohalogenbezole, Toluol und Benzols .....	294
6.8.2.	Der Abbauweg weiterer substituierter Benzole .....	296
6.9.	Der Einsatz von FLU 100 in Biotricklingfiltern .....	299
6.9.1.	Konzeption, und Aufbau der Technikumsreaktoren .....	299
6.9.2.	Die Abreinigung von fluorbenzolbelasteter Luft .....	300
6.9.3.	Die simultane Abreinigung von Fluorbenzol- und Chlorbenzol- .....	300
6.9.4.	Rückstände im Reaktorsumpf.....	301
6.9.5.	Schlussfolgerungen aus dem Reaktorbetrieb .....	301
6.10.	Abschlussbemerkungen und Ausblick .....	302
7.	Anhang.....	304
7.1.	Ausführliches Inhaltsverzeichnis .....	304
7.2.	Literaturliste.....	313
7.3.	Ergänzungen zu den Ergebnissen .....	329
7.3.1.	Untersuchung des der 16S – rRNA zugehörigen Genes .....	329
7.3.2.	Sequenz des initialen Fluorbenzol - Dioxygenasesystems von FLU 100 .....	330
7.3.3.	Erweitertes Substratpattern des Stammes FLU 100.....	332
7.3.4.	Phylogenetische Einordnung des Stammes <i>Burkholderia fungorum</i> FLU 100 .....	335
7.3.5.	Abiotische Verfahren zur Abluftreinigung.....	336
7.3.6.	Beilage .....	337
7.4.	Bildnachweis .....	337
7.5.	Lebenslauf.....	338
7.6.	Danksagung .....	340

## 7.2. Literaturliste

Abraham, W.-R., B. Nogales, et al. (2002). "Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments." *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 246-253.

Alexander, M. (1975). "Environmental and microbiological problems arising from recalcitrant molecules." *Microb. Ecol.* **2**: 17-27.

Alfreider, A., C. Vogt, et al. (2002). "Microbial colonization of an in situ reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis." *J. Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 232-240.

Alloway, B. J. und D. C. Ayres (1996). "Schadstoffe in der Umwelt, Chemische Grundlagen zur Beurteilung von Luft-, Wasser- und Bodenverschmutzungen." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Andrup, L. und K. Anderson (1999). "A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis*." *Microbiology* **145**: 2001-2009.

Apajalahti, J. H. und M. S. Salkinoja-Salonen (1987). "Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*." *J. Bacteriol.* **169**(2): 675-681.

Arensdorf, J. J. und D. D. Focht (1995). "A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(2): 443-447.

Atkins, P. W. (1990). "Physikalische Chemie, 1. Auflage." VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.

Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty M. (1944). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III." *The Journal of Experimental Medicine*, 79: 137-158.

Bach, H. (1923). "Schwefel im Abwasser." *Gesundheits-Ingenieur* **46**(38): 370-377.

Baeyer, H. und W. Walter (1988). "Lehrbuch der organischen Chemie, 21. Auflage." S. Hirzel Verlag Stuttgart.

Bartels, I., H.-J. Knackmuss, et al. (1984). "Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-Halocatechols." *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 500-505.

Bast, E. (1999). "Mikrobiologische Methoden." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Beil, S., B. Happe, et al. (1997). "Genetic and biochemical characterization of the broad spectrum chlorobenzene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain PS12." *Eur. J. Biochem.* **247**: 190-199.

Beil, S., J. R. Mason, et al. (1998). "Identification of chlorobenzene dioxygenase sequence elements involved in dechlorination of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene." *J. Bacteriol.* **180**(21): 5520-5528.

Beil, S., K. N. Timmis, et al. (1999). "Genetic and Biochemical Analyses of the tec Operon Suggest a Route for Evolution of Chlorobenzene Degradation Genes." *J. Bacteriol.* **181**: 341-346.

van Belkum, A., Scherer, S., et al. (1998). "Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes Microbiol." Mol. Biol. Rev. **62**: 275-293.

Berg, D.E., Schmandt, M.A., Lowe, J.B. (1983). "Specificity of transposon Tn5 insertion." Genetics **105**: 813-828.

Bergmann et al. (1956). J. Am. Chem. Soc. **78**, 6037.

Bertini, I., A. Provenzani, et al. (2003). "NMR spectroscopy as a tool to investigate the degradation of aromatic compounds by a *Pseudomonas putida* strain." Magn. Reson. Chem. **41**: 615-621.

Boersma, M. G., T. Y. Dinariyeva, et al. (1998). "<sup>19</sup>F Nuclear Magnetic Resonance as a Tool To Investigate Microbial Degradation of Fluorophenols to Fluorocatechols and Fluoromuconates." Appl. Environ. Microbiol. **64**(4): 1256-1263.

Boldt, Y. R., M. J. Sadowsky, et al. (1995). "A manganese-dependent dioxygenase from *Arthrobacter globiformis* CM-2 belongs to the major extradiol dioxygenase family." J. Bacteriol. **177**(5): 1225-1232.

de Bont, J. A., M. J. Vorage, et al. (1986). "Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene." Appl Environ. Microbiol. **52**(4): 677-680.

Boyd, D. R., M. R. J. Dorrity, et al. (1991). "Enantiomeric excess and absolute configuration determination of cis-dihydrodiols from bacterial metabolism of monocyclic arenes." J. Am. Chem. Soc. **113**: 666-667.

Boyd, D. R. und G. N. Sheldrake (1997). "The dioxygenase-catalysed formation of vicinal cis-diols." School of Chemistry, NPR.

Boyd, D. R., N. D. Sharma, et al. (1998). "Enzymatic and chemoenzymatic synthesis and stereochemical assignment of cis-dihydrodiol derivatives of monosubstituted benzenes." J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1**: 1935-1944.

Bradford, M. (1979). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brock (2002) Biology of Microorganisms, Prentice Hall International.

Broderick, J. B. und T. V. O'Halloran (1991). "Overproduction, Purification, and Characterization of Chlorocatechol Dioxygenase, a Non-Heme Iron Dioxygenase with Broad Substrate Tolerance." Biochem J., **30**: 7349-7358.

de Bruijn, F.J. (1992). "Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2180-2187.

Brunsbach, F. R. und W. Reineke (1990). "Production of 3,4-dihalogenated catechols from toluene and benzoate analogues by *Pseudomonas putida* strain PaW1." Appl. Environ. Microbiol. **34**: 248-252.

Brussock, S. M. und T. A. Kral (1986). "In vitro fluoride resistance in a cariogenic streptococcus." Ohio J. Sci. **86**: 73-76.

Bunick, F. J. und S. Kashket (1981). "Enolases from Fluoride-Sensitive and Fluoride-Resistant Streptococci." Infect. Immun. **34**(3): 865-863.

- Burkholder, W.H. (1950). "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." *Phytopathology*. **40**: 115-117.
- Cappuccino, J. G. und N. Sherman (1992). "Microbiology a laboratory manual." The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc.
- Carvalho, M. F., C. C. T. Alves, et al. (2002). "Isolation and Initial Characterization of a Bacterial Consortium Able to Mineralize Fluorobenzene." *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 102-105.
- Carvalho, M. F., R. Ferreira Jorge, et al. (2005A). "Isolation and properties of a pure bacterial strain capable of fluorobenzene degradation as sole carbon and energy source." *Environ Microbiol.* **7**: 294-298.
- Carvalho, M. F., R. Ferreira Jorge, et al. (2005B). "Long-term performance and microbial dynamics of an up-flow fixed bed reactor established for the biodegradation of fluorobenzene." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1-8 [Epub ahead of print].
- Cass, A. E., D. W. Ribbons, et al. (1987). "Biotransformation of aromatic compounds. Monitoring fluorinated analogues by NMR." **220**(2): 353-357.
- Caysa, H. (2005). "Charakterisierung eines bakteriellen Abbauweges für Isophoron." Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft.
- Cha, C. J. (2001). "Biological production of optically active muconolactones by *Rhodococcus rhodochromus*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 453-457.
- Chansley, P. E. und T. A. Kral (1989). "Transformation of Fluoride Resistance Genes in *Streptococcus mutans*." *Infect Immun.* **57**(7): 1968-1970.
- Chapman P.J., Ribbons D.W. (1976). "Metabolism of resorcinylic compounds by bacteria: Orcinol pathway in *Pseudomonas putida*." *J. Bacteriol.* **125**: 975-998.
- Chatterjee, D. K., J. J. Kilbane, et al. (1982). "Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by pure culture of *Pseudomonas cepacia*." *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 514-516.
- Coenye, T., P. Vandamme, et al. (2001B). "Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex." *Journal of Clinical Microbiology* **39**(10): 3427-3436.
- Coenye, T., S. Laevens, et al. (2001A). "*Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 1099-1107.
- Coenye, T. und P. Vandamme (2003). "Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches " *Environ. Microbiol.* **5**(9): 719-729.
- Corse, J. und L. L. Ingraham (1951). "The Monofluorocatechols." *J. Org. Chem.* **16**: 1345-1348.
- Cripps, R. E. (1975). "The Microbial Metabolism of Acetophenone. Metabolism of acetophenone and some chloroacetophenones by an *Arthrobacter* species." *Biochem J.* **152**: 233-241.
- Dains, F. B. und R. Q. Brewster (1941). "Iodobenzene." *Organic Synthesis Collective* **1**: 323.

- Danganan, C. E., R. W. Ye, et al. (1994). "Nucleotide sequence and functional analysis of the genes encoding 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid oxygenase in *Pseudomonas cepacia* AC1100." *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4100-4106.
- Delhoménie, M.-C., L. Bibeau, et al. (2001). "Toluene removal by biofiltration: Influence of the nitrogen concentration on operational parameters." *Ind. Eng. Chem. Research.* **40**(23): 5404-5414.
- Delhoménie, M.-C., L. Bibeau, et al. (2003A). "Compared degradation of toluene, xylene and trimethylbenzene vapors by biofiltration." *J. Air Waste Management Assoc.* **53**: 217-226.
- Delhoménie, M.-C. und M. Heitz (2003B). "Elimination of chlorobenzene vapors from air in a compost-based biofilter." *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **78**(5): 588-595.
- Delhoménie, M.-C., L. Bibeau, et al. (2005). "A study of the biofiltration of high-loads of toluene in air: Carbon and water balances, temperature changes and nitrogen effect." *Can. J. Chem. Engineering.* **83**(2): 153-160.
- Demnerova, K., H. Stiborova, et al. (2003). "Bacteria degrading PCBs and CBs isolated from long-term PCB contaminated soil." *Water, Air and Soil Pollution: Focus* **3**: 47-55.
- Dermietzel, J., G. Krauss, et al. (1999). "Untersuchungen zum Abbau von Chloraromaten im Grundwasser und im Aquifer." *SAFIRA, 2. Statusbericht.* **17**(147-156).
- Dermietzel, J., A. Vieth, et al. (2000). "Bestimmung des Leistungspotentials der autochthonen Bakteriozönose für den Abbau von Chloraromaten in kontaminiertem Grundwasser." *Systemintegrierte Umweltbiologie zur Sanierung von organisch und anorganisch belasteten Grund- und Oberflächenwässern* **4**: 89-103.
- Deville, H.S.C. (1841). "Recherches sur les Résines. Étude du Baume de Tolu." *Compt. Rendus* **13**: 476-478.
- Dionisio, H., I. Matic, et al. (2002). "Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities." *Genetics* **162**: 1525-1532.
- Dobslaw, D. (2003). "Analytik des Toluolabbaus in bakteriellen Biofilterisolaten: Nachweis eines neuartigen Ortho - Weges." Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft.
- Dorn, E., M. Hellwig, et al. (1974). "Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad." *Arch. Microbiol* **99**: 61-70.
- Dorn, E. und Knackmuss H.-J. (1978A). "Chemical Structure and Biodegradability of Halogenated Aromatic Compounds – Substituent Effects on 1,2-Dioxygenation of Catechol." *J. of Biochem.* **174**: 85-94.
- Dorn, E. und H.-J. Knackmuss (1978B). "Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate grown Pseudomonad." *Biochem J.*, **174**: 73-84.
- Eaton, R. W. und K. N. Timmis (1986). "Microbiology Characterization of a Plasmid-Specified Pathway for Catabolism of Isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204." *J. Bacteriol.* **168**(1): 123-131.
- Eisenbrand und Metzler (2002). "Toxikologie 2., aktualisierte Auflage." Wiley-VCH, 2002.

- Engels, S. und R. Stolz (1989). "ABC Geschichte der Chemie." VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
- Engesser, K.-H. (1982). "Der Einfluß der Trifluormethylgruppe auf die biologische Abbaubarkeit von Aromaten." Dissertationsschrift, Georg-August-Universität Göttingen.
- Engesser, K.-H., G. Auling, et al. (1990). "3-Fluorobenzoate enriched bacterial strain FLB 300 degrades benzoate and all three isomeric monofluorobenzoates." *Arch. Microbiol* **153**: 193-199.
- Engesser, K.-H. und P. Fischer (1991). "Degradation of haloaromatic compounds." In Betts W.B. (ed.) *Biodegradation: Natural and synthetic materials*, Springer-Verlag, 15-54.
- Engesser, K.-H. (1992). "Kritische Reaktionen beim bakteriellen Abbau aromatischer Xenobiotika." Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart.
- Engesser, K.-H. und T. Plaggemeier (1997). "12 Microbiological aspects of biological waste gas purification." VCH-Herr Schmidt-REED/REHM **11c**.
- Engesser, K.-H. (2006). "mündliche Mitteilung."
- Eulberg, D., L. A. Golovleva, et al. (1997). "Characterization of Catechol Catabolic Genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP." *J. Bacteriol.* **179**(2): 370-381.
- Eulberg, D., E. M. Kourbatova, et al. (1998). "Evolutionary Relationship between Chlorocatechol Catabolic Enzymes from *Rhodococcus opacus* 1CP and Their Counterparts in Proteobacteria: Sequence Divergence and Functional Convergence " *J. Bacteriol.* **180**(5): 1082-1094.
- Findlay, T. J. V. (1969). "Vapor pressures of fluorobenzene from 5° to 50°C." *J. Chem. Eng. Data* **14**: 229.
- Flood, D. T. (1943). "Fluorobenzene." *Organic Syntheses Collective* **2**: 295.
- Fong, K. P. Y., Goh, C. B. H. et al. (1996). "Characterization an Expression of the Plasmid-Borne *bedD* Gene from *Pseudomonas putida* ML2, Which Codes for a NAD<sup>+</sup>-Dependent *cis*-Benzene Dihydrodiol Dehydrogenase." *J. Bacteriol.* **178**(19): 5592-5601.
- Franck-Mokroß, A. C. und E. Schmidt (1998). "Simultaneous degradation of chloro- and methyl-substituted aromatic compounds: competition between *Pseudomonas* strains using the ortho and metha pathway or the ortho pathway exclusively." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 233-240.
- Fuchs, G. und H. G. Schlegel (2007). "Allgemeine Mikrobiologie." Thieme Verlag Stuttgart.
- Gaillard, M., T. Vallaey, et al. (2006). "The *clc* Element of *Pseudomonas* sp. Strain B13, a Genomic Island with Various Catabolic Properties." *J. Bacteriol.* **188**: 1999-2013.
- García-Valdés, E., M. M. Castillo, aet al. (2003). "Polyphasic Characterization of *Pseudomonas stutzeri* CLN100 Which Simultaneously Degrades Chloro- and Methylaromatics: A New Genomovar Within the Species." *Syst. Appl. Microbiol.* **26**(3): 390-403.
- Gerhardt, P. und R. G. E. Murray (1981). "Manual of methods for general bacteriology." American Society for Microbiology. Washington D.C., USA.
- Gerrits, G. P., C. Klaassen, et al. (2005). "*Burkholderia fungorum* Septicemia." *Emerging Infectious Diseases* **11**(7): 1115-1117.

Gibson, D. T., B. Gschwendt, et al. (1973). "Initial reactions in the oxidation of ethylbenzene by *Ps. Putida*." *Biochem.* **12**(8): 1520-1527.

Gilbert, R. und C. Sandorfy (1971). "The vacuum-ultraviolet spectrum of fluorobenzene." *Chem. Phys. Lett.*, **9**: 121.

Göbel, M., K. Kassel-Cati, et al. (2002). "Degradation of Aromatics and Chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. Strain B13: Cloning, Characterization, and Analysis of Sequences Encoding 3-Oxoadipate:Succinyl-Coenzyme A (CoA) Transferase and 3-Oxoadipyl-CoA Thiolase." *J. Bacteriol.* **184**(1): 216-223.

Göbel, M., O. H. Kranz, et al. (2004). "Microorganisms degrading chlorobenzene via a meta-cleavage pathway harbor highly similar chlorocatechol-2,3-dioxygenase-encoding gene clusters." *Arch. Microbiol.* **182**: 147-156.

Görg, A. (1999A). "IPG-Dalt of very alkaline proteins." *Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols*, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

Görg, A., Weiss, W. (1999B): *Analytical IPG-Dalt methods in molecular biology. Methods in molecular biology, 2-D proteome analysis protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.

Görg A., Obermaier C. et al. (2000). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis* **21**: 328-337.

Goldman, P. (1986). "The use of microorganisms in the study of fluorinated compounds, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases." National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.

Goodfellow, M. und A. G. O'Donnel (1994). "Handbook of new bacterial systematics." Academic Press.

Gribble, G. W. (1994). "The natural production of chlorinated compounds." *Environ. Sci. Technol.* **28**(7): 310-379.

Gribble, G. W. (1996). "Naturally occurring organohalogen compounds - a comprehensive survey." *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **68**: 1-423.

Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113– 159.

Haigler, B. E., S. F. Nishino, et al. (1988). "Degradation of 1,2-dichlorbenzene by *Pseudomonas* sp." *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(2): 294-301.

Haigler, B. E., C. A. Pettigrew, et al. (1992). "Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150." *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7): 2237-2244.

Hartmann, J., W. Reineke, et al. (1979). "Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro-, and 3,5-dichlorobenzoate by a *Pseudomonad*." *Appl. Environ. Microbiol.* **37**(3): 421-428.

Havel, J. und W. Reineke (1993). "Microbial degradation of chlorinated acetophenones." *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(8): 2706-2712.

Helmer R. (1972). "Sorptions- und mikrobieller Abbau in Bodenfiltern bei der Desodorierung von Luftströmen" Forschungs- und Entwicklungsinsitut für Industrie und Siedlungswasserwirtschaft sowie Abfallwirtschaft e.V. (Hrsg.) *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*, 1. Auflage, Band 49, Oldenburg, München.

Henning W. (2002). *Genetik*, Springer Verlag.

- Herrero, M., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1990). "Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria." *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.
- Hesse, M., H. Meier, et al. (1991). "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 4. Auflage." Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Holleman, A. F. und N. Wiberg (2007). "Lehrbuch der Anorganischen Chemie." Walter de Gruyter, Berlin und New York.
- Holmes, A., J. Govan, et al. (2000). "Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health?" *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 221-227.
- Holt, J. G. (1984). "Bergey's manual of systematic bacteriology." Williams & Williams, Baltimore, London.
- Homans W.J. (1989). VDI-Ber. **735** S.59-75.
- Husain, M., B. Entsch, et al. (1980). "Fluoride elimination from substrates in hydroxylation reactions catalyzed by p-hydroxybenzoate hydroxylase." *J. of Biol. Chem.* **255**(9): 4189-4197.
- Hutzinger, O. und W. Verrkamp (1981). "Xenobiotic chemicals with pollution potential, microbial degradation of xenobiotics and racalcitrant compounds." Academic Press London: 3-45.
- Irie, S., S. Doi, et al. (1987). "Nucleotide sequencing and characterization of the genes encoding benzene oxidation enzymes of *Pseudomonas putida*." *J. Bacteriol.* **169**(11): 5174-5179.
- Iwaki, M. und M. Nozaki (1982). "Immobilization of metapyrocatechase and its properties in comparison with the soluble enzyme." *J. Biochem.* **91**: 1549-1553.
- Janke, D. und W. Frische (1979). "Dechlorierung von 4-Chlorphenol nach extradioler Ringspaltung durch *Pseudomonas putida*." *Z. Allg. Mikrobiol.* **19**: 139-141.
- Junca, H. und D. H. Pieper (2003). "Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3 dioxygenase gene diversity in soil bacteria." *J. Microbiol. Meth.* **55**: 697-708.
- Karasevich, Y. N. und G. M. Zaitsev (1984). "Utilization of 4-chlorobenzoic and 2,4-dichlorobenzoic acids by a mixed culture of microorganisms." *Microbiologiya* **53**: 374-380.
- Kasberg, T., Seibert, V. et al. (1997). "Cloning, characterization, and sequence analysis of the *clcE* gene encoding the maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13." *J. Bacteriol.* **179**(11): 3801-3803.
- Kaschabek, S. R. und W. Reineke (1992). "Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: dechlorination of chloromaleylacetates, metabolites in the degradation of chloroaromatic compounds." *Arch. Microbiol.* **158**(6): 412-417.
- Kaschabek, S. R. und W. Reineke (1993). "Degradation of chloroaromatics: purification, characterization of maleylacetate reductase from *Pseudomonas* sp. strain B13." *J. Bacteriol.* **175**(19): 6075-6081.
- Kaschabek, S. R. und W. Reineke (1995). "Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: specificity of substrate conversion and halide elimination." *J. Bacteriol.* **177**(2): 320-325.

- Kaschabek, S. R., T. Kasberg, et al. (1998). "Degradation of Chloroaromatics: Purification and Characterization of a Novel Type of Chlorocatechol 2,3-Dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31." J. Bacteriol. **180**(2): 296 - 302.
- Kaschabek, S. R., B. Kuhn, et al. (2002). "Degradation of Aromatics and Chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. Strain B13: purification, Characterization of 3-Oxoacidate:Succinyl-Coenzyme A (CoA) Transferase and 3-Oxoacidate-CoA Thiolase." J. Bacteriol. **184**(1): 207-215.
- Kaulmann, U., S. R. Kaschabek, et al. (2001). "Mechanism of chloride elimination from 3-chloro- and 2,4-dichloro-cis,cis-muconate: new insight obtained from analysis of muconate cycloisomerase variant CatB-K169A." J. Bacteriol. **183**(15): 4551-4561.
- Keuning, S. und D. Jager (1994). "Simultaneous degradation of chlorobenzene, toluene, xylene and ethanol by pure and mixed *Pseudomonas* cultures " Hinchee R. 332-336.
- Kim, I. S., J. Y. Kim, et al. (2004). "Proteome analysis of *Pseudomonas* sp. K82 biodegradation pathway." Proteomics **4**: DOI 10.1002/pmic.200400977.
- Klecka, G. M. und D. T. Gibson (1981). "Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol." Appl. Environ. Microbiol. **41**(5): 1159-1165.
- Klessinger, M. (1972). "Ionization potentials of substituted benzenes." Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 525.
- Klose, J. (1975) "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues." Human Genetics. **26**(3): 231-243.
- Knackmuss, H.-J. und M. Hellwig (1978). "Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13." Arch. Microbiol. **117**: 1-7.
- Knackmuss, H.-J. (1983). "Xenobiotic degradation in industrial sewage: Haloaromatics as target substrates." Biochem. Soc. Symp. **48**: 173-190.
- Knippers, R. (2006). Molekulare Genetik. Thieme Verlag.
- Kobelt, G. (1997). "Der Abbau von Fluorkohlenwasserstoffen mit einem Biofilter." Entsorgungs Praxis, Bertelsmann Verlag, 10/97, 40-42.
- Koch, R. und B. O. Wagner (1989). "Umweltchemikalien: physikalisch – chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten." VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Koerts, J., M. Velraeds, et al. (1997). "Influence of substituents in fluorobenzene derivatives on the cytochrome P450-catalyzed hydroxylation at the adjacent ortho aromatic carbon center." Chem. Res. in Toxicol. **10**(3): 279-288.
- Kuhn, R., Lederer, E. (1931) "Zerlegung des Carotins in seine Komponenten.(Über das Vitamin des Wachstums, I. Mitteil.). Ber. Dtsch - Chem. Ges.
- Laemmli, C. M., R. Schönenberger, et al. (2002). "TfdDII, one of two chloromuconate cycloisomerases of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), cannot efficiently convert 2-chloro-cis,cis-muconate to trans-dienelactone to allow growth on 3-chlorobenzoate." Arch. Microbiol. **178**: 13-25.
- Laemmli, C. M., C. Werlen, et al. (2004). "Mutation analysis of the different *tfd* genes for degradation of chloroaromatic compounds in *Ralstonia eutropha* JMP134." Arch. Microbiol. **181**: 112-121.

Lederberg, J., Tatum E. L. (1953). "Sex in Bacteria: Genetic Studies, 1945-1952." *Science*. **118**: 169 – 175.

Lengler, J. W., G. Drews, et al. (1999). "Biology of the Prokaryotes." Thieme Verlag Stuttgart.

Lessie, T.G., Hendrickson, W., et al. (1996). "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." *FEMS Microbiology Letters* **144** (2-3): 117–128.

Lorenzo, d. V., M. Herrero, et al. (1990). "Mini-Tn5 Transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative Eubacteria." *J. Bacteriol.* **172**(11): 6568-6572.

Lu, C., M.-R. Lin, et al. (2002). "Effects of pH, moisture, and flow pattern on trickle-bed air biofilter performance for BTEX removal." *Adv. Environ. Res.* **6**(2): 99-106.

Lucas, H. J. und E. R. Kennedy (1939). "Iodobenzene." *Organic Sythesis* **19**: 55-60.

Lynch, R. M., J. M. Woodley, et al. (1997). "Process design for the oxidation of fluorobenzene to fluocatechol by *Ps. putida*." *J. Bacteriol.* **58**: 167-175.

Madigan, M. T. und J. M. Martinko (2006). "Brock: Mikrobiologie." Pearson Studium, München.

Mahenthalingam, E., M. Campbell, et al. (1995). "*Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis." *N. Engl. J. Med* **332**: 819.

Majer, V. und V. Svoboda (1985). "Enthalpies of Vaporization of Organic Compounds: A Critical Review und Data Compilation." Blackwell Scientific Publications, Oxford: 300.

Makris, J. C., P. L. Nordmann, et al. (1988). "Mutational Analysis of Insertionssequence 50 (IS50) and Transposon 5 (Tn5) ends." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2224-2228.

Maltseva, O. V., I. P. Solyanikova, et al. (1994). "Dienelactone hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* 1 CP: purification and properties." *Arch. Microbiol* **162**: 368-374.

Marinucci, A. C. und R. Bartha (1979). "Biodegradation of 1,2,3- and 1,2,4-Trichlorobenzene in Soil and in Liquid Enrichment Culture " *Appl. Environ. Microbiol.* **38**(5): 811-817.

Mars, A. E., T. Kasberg, et al. (1997). "Microbial Degradation of Chloroaromatics: Use of the meta-Cleavage Pathway for Mineralization of Chlorobenzene." *J. Bacteriol.* **179**(14): 4530-4537.

Mars, A. E., J. Kingma, et al. (1999). "Conversion of 3-Chlorocatechol by Various Catechol 2,3-Dioxygenases and Sequence Analysis of the Chlorocatechol Dioxygenase Region of *Pseudomonas putida* GJ31." *J. Bacteriol.* **181**(4): 1309-1318.

Marston, R. M. (1985). "110 Operationsverstärker-Schaltungen." Heise Verlag.

Martin, A.J.P., Synge, R.L.M. (1941). "A new form of chromatogram employing two liquid phases." *Biochem. J.* **35**: 1358.

Martin, B., O. Humbert, et al. (1992). "A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*." *Nucleic. Acids Res.* **20**: 3479–3483.

Mathur, A. K., J. Sundaramurthy, et al. (2006). "Kinetics of the removal of mono-chlorobenzene vapour from waste gases using a trickle bed air biofilter." *J. Hazardous Materials*.

McClintock, B. (1950). "The origin and behavior of mutable loci in maize." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **36**(6): 344-555.

van der Meer, J. R. (1997). "Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds." Ant Leeuwenhoek Int. J. Microbiol. **71**: 159-178.

van der Meer, J. R., S. F. Nishino, et al. (1998). "Evolution of a Pathway for Chlorobenzene Metabolism Leads to Natural Attenuation in Contaminated Groundwater." Appl. Environ. Microbiol. **64**(11): 4185-4193.

Merck (1994). "Safety data sheet of Sodium fluoride."

Miguez, C. B., C. W. Greer, et al. (1993). "Purification and properties of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Alcaligenes denitrificans* BRI 6011." Can. J. Microbiol. **39**(7): 2453-2460.

Miller, V. L. und J. L. Mekalanos (1988). "A Novel Suicide Vector and Its Use in Construction of Insertion Mutations: Osmoregulation of Outer Membrane Proteins and Virulence Determinants in *Vibrio cholerae* Requires toxR." J. Bacteriol. **170**(6): 2575-2583.

Moiseeva, O. V., I. P. Solyanikova, et al. (2002). "A New Modified ortho Cleavage Pathway of 3-Chlorocatechol Degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: Genetic and Biochemical Evidence " J. Bacteriol. **184**(19): 5282-5292.

Monferrán, M. V., J. R. Echenique, et al. (2005). "Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer." Chemosphere **61**(1): 98-106.

Monod, J. (1949). "The growth of bacterial cultures." Ann. Rev. Microbiol. **3**: 371-394.

Moore, E.R.B., Mau M. et al. (1996). "The determination and comparison of the 16S rRNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and estimation of the natural intrageneric relationships." Systematic and applied microbiology, **19**(4): 465-643.

Mortimer, C. E. (1987). "Chemie (Das Basiswissen der Chemie)." Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Mpanias, C. J. und Baltzis B. C. (1998). "Biocatalytic removal of mono-chlorobenzene vapor in trickling filters." Catalysis Today **40**: 113-120.

Müller, D., Schlömann, M., et al. (1996). "Maleylacetate reductases in chloroaromatic-degrading bacteria using the modified ortho pathway: comparison of catalytic properties." J. Bacteriol. **178**(1): 298-300.

Müller, D., Werlen, C., et al. (2003). "Evolution of a chlorobenzene degradative pathway among bacteria in a contaminated groundwater mediated by a genomic island in *Ralstonia*." Environ. Microbiol. **5**(3): 163-173.

Müller, R. und Lingens, F. (1986). "Mikrobieller Abbau halogenierter Kohlenwasserstoffe: Ein Beitrag zur Lösung vieler Umweltprobleme?" Angew. Chem. **98**: 778-787.

Nakai, C., T. Nakazawa, et al. (1988). "Purification and properties of catechol-1,2-dioxygenase (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 in comparison with that from *Pseudomonas arvilla* C-1." Arch. Biochem. Biophys. **267**: 701-713.

Nakazawa, T. und T. Yokota (1973). "Benzoate metabolism in *pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways." J. Bacteriol. **115**(1): 262-267.

Natarajan, R., Azerada, R., Badetb, B., Copin, E. (2005). "Microbial cleavage of C–F bond" *Journal of Fluorine Chemistry* **126**: 425–436.

Ngai, K.-L. und L. N. Ornston (1988). "Abundant expression of *Pseudomonas* genes for chlorocatechol metabolism" *J. Bacteriol.* **170**(5): 2412-2413.

Niemann, S., T. Dannmann-Kalinowski, et al. (1999). "Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *Sinorhizobium meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment." *Arch. Microbiol.* **72**(22-30).

Nikodem, P., V. Hecht, et al. (2003). "New Bacterial Pathway for 4- and 5-Chlorosalicylate Degradation via 4-Chlorocatechol and Maleylacetate in *Pseudomonas* sp." *J. Bacteriol.* **185**(23): 6790-6800.

Nishino, S. F., J. C. Spain, et al. (1992). "Chlorobenzene Degradation by Bacteria Isolated from Contaminated Groundwater." *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(5): 1719-1726.

Nozaki, M. (1970). "Metapyrocatechase." *Pseudomonas* **17**(A): 522-525.

Oh, Y.-S. und R. Bartha (1994). "Design and performance of a trickling air biofilter for chlorobenzene and o-dichlorobenzene vapors." *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(8): 2717-2722.

Oltmanns, R. H., H. G. Rast, et al. (1988). "Degradation of 1,4-dichlorobenzene by enriched and constructed bacteria " *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **28**(6): 609-616.

Onaca, C. (2005). "Molekulare Analyse des Methyl-Ethyl-Keton-Abbaus bei *Pseudomonas fluorescens* MEK 700." Diplomarbeit am Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart.

Onaca, C., M. Kieninger, et al. (2006). "Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii* MEK 700." to be submitted to *J. Bacteriol.*

Pérez-Pantoja, D., T. Ledger, et al. (2003). "Efficient Turnover of Chlorocatechols Is Essential for Growth of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) in 3-Chlorobenzoic Acid." *J. Bacteriol.* **185**(5): 1534-1542.

Pettigrew, C. A., J. C. Spain, et al. (1991). "Simultaneous Biodegradation of Chlorobenzene and Toluene by a *Pseudomonas* Strain." *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(1): 157-162.

Pfennig, N. und K. D. Lippert (1966). "Über das Vitamin B12 – Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien." *Arch. Mikrobiol.* **55**: 245-256.

Pflugmacher, U., G. Gottschalk, et al. (1996). "Cloning, sequencing, and expression of isopropylbenzene degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain JR1: identification of isopropylbenzene dioxygenase that mediates trichloroethene oxidation." *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(11): 3967–3977.

Pieper, D. H. (1986). "Metabolismus von substituierten Phenoxyacetaten, Phenolen und Benzoaten durch *Alcaligenes eutrophus* JMP-134 and Derivate." Dissertationsschrift, Gesamthochschule Wuppertal.

Pieper, D. H., K. Pollmann, et al. (2002). "Monitoring Key Reactions in Degradation of Chloroaromatics by In Situ 1H Nuclear Magnetic Resonance: Solution Structures of Metabolites Formed from cis-Dienelactone." *J. Bacteriol.* **184**(5): 1466-1470.

Pieper, D. H. und W. Reineke (2004). "Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas*(d)s." *The Pseudomonads: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular metabolism.* **3**: 509-574.

Pieper, D. H. (2006). "Key enzymes and genes for aromatic degradation." 1 st Course in Microbial Bioremediation & Environmental Genomics, 12th March – 16th March, 2006, CEUB Bertinoro (FC), Italy.

Pilgrim, E. (1950). "Entdeckung der Elemente." Mundus Verlag Stuttgart.

Plaggemeier, T. (2000). "Elimination der schwer wasserlöslichen Modellabluftinhaltsstoffe n-Hexan und Toluol im Biorieselbettverfahren." Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Abteilung Biologische Abluftreinigung, Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft.

Pohl, F. (2005). "Abbau von Halogenaromaten durch FLU 100 - Untersuchung verschiedener Induktionszustände mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese." Studienarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft.

Pollmann, K., S. Beil, et al. (2001). "Transformation of Chlorinated Benzenes and Toluenes by *Ralstonia* sp. Strain PS12 *tecA* (Tetrachlorbenzene Dioxygenase) and *tecB* (Chlorobenzene Dihydrodiol Dehydrogenase) Gene Products." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(9): 4057-4063.

Pollmann, K., V. Wray, et al. (2005). "Chloromethylmuconolactones as Critical Metabolites in the Degradation of Chloromethylcatechols: Recalcitrance of 2-Chlorotoluene." *J. Bacteriol.* **187**(7): 2332-2340.

Potrawfke, T., J. Armengaud, et al. (2001). "Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71." *J. Bacteriol* **183**(3): 997-1011.

Que, L., R. C. Kolanczyc, et al. (1987). "Functional models for catechol 1,2-dioxygenase. Structure, reactivity and mechanism." *J. Amer. Chem. Soc.* **109**(18): 5373-5380.

Rademaker, J. L. W., Louws, F. J. und de Bruijn, F. J. (1998). "Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting." In *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.4.3.1 – 3.4.3.27.

Raschke, H., T. Fleischmann, et al. (1999). "cis-Chlorobenzene Dihydrodiol Dehydrogenase (*TcbB*) from *Pseudomonas* sp. Strain P51, Expressed in *Escherichia coli* DH5(pTCB149), Catalyzes Enantioselective Dehydrogenase Reactions." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(12): 5242-5246.

Raschke, H., M. Meier, et al. (2001). "Biotransformation of Various Substituted Aromatic Compounds to Chiral Dihydrodihydroxy Derivates." *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(8): 3333-3339.

Reinecke, W. (1984). "Microbial degradation of halogenated aromatic compounds, Microbial degradation of organic compounds." Marcel Dekker Inc, New York.

Reinecke, W. und H.-J. Knackmuss (1988). "Microbial degradation of haloaromatics." *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 263-287.

Reinecke, W., W. Otting, et al. (1978). "cis-Dihydrodiols microbially produced from halo- and methylbenzoic acids." *Tetrahedron* **34**: 1707-1714.

Reinecke, W., S. R. Kaschabek, et al. (2006). "Chlorinated hydrocarbon metabolism." *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000472.pub2.

- Reineke, W. und H.-J. Knackmuss (1984). "Microbial Metabolism of Haloaromatics: Isolation and Properties of a Chlorobenzene-Degrading Bacterium." *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(2): 395-402.
- Renganathan, V. (1988). "Possible Involvement of Toluene-2,3-Dioxygenase in Defluorination of 3-Fluoro-Substituted Benzenes by Toluene-Degrading *Pseudomonas* sp. Strain T-12." *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(2): 330-334.
- Ribbons, D. W. (1987). "Biotransformations of fluoroaromatic compounds." *J. of Fluorine Chem.* **27**: 299-326.
- Ribbons, D. W., Cass, A. E. G., et al. (1987). "Biotransformations of Fluoroaromatic Compounds." *Journal of Fluorine Chemistry* **37**: 299-326.
- Ridder, L., F. Briganti, et al. (1998). "Quantitative structure/activity relationship for the rate of conversion of C4-substituted catechols by catechol-1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* (arvilla) C1." *Eur. J. Biochem.* **257**: 92-100.
- Rosenbrock, P., S. Langener, et al. (2000). "Vergleichende Untersuchungen des Chloraromatenabbaus im Bitterfelder Grundwasser durch Spezialkulturen und die autochthone Mikroflora." *Systemintegrierte Umweltbiologie zur Sanierung von organisch und anorganisch belasteten Grund- und Oberflächenwässern.* **4**: 132-141.
- Sala-Trepat, J. M. und W. C. Evans (1971). "The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species (4-oxalocrotonate pathway)." *Eur. J. Biochem.* **20**: 400-413.
- Salles, J. F., F. A. de Souza, et al. (2002). "Molecular Method To Assess the Diversity of Burkholderia Species in Environmental Samples." *App. Environ. Microbiol.* **68**(4): 1595-1603.
- Sánchez-Cortés, S., O. Francioso, et al. (2001). "Catechol Polymerization on Silver Surface." *Colloids und Surfaces* **176**(2-3): 177-184.
- Schirz S. (1996) Stand der Technik biologischer Abgasreinigungsverfahren in der Industrie VDI Berichte - VDI Verlag GmbH.
- Schlömann, M. (1988). "Die verschiedenen Typen der Dienlacton-Hydrolase und ihre Rolle beim bakteriellen Abbau von 4-Fluorbenzoat." *Dissertationsschrift, Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart.*
- Schlömann, M., P. Fischer, et al. (1990A). "Enzymatic formation, stability and spontaneous reactions of 4-fluoromuconolacton, a metabolite of the bacterial degradation of 4-fluorobenzoate." *J. Bacteriol.* 5119-5129.
- Schlömann, M., E. Schmidt, et al. (1990B). "Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate utilizing bacteria." *J. Bacteriol.* **172**(9): 5112-5118.
- Schlömann, M., P. Fischer, et al. (1991). "Enzymatic formation, stability, and spontaneous reactions of 4-fluoromoconolactone, a metabolite of the bacterial degradation of 4-fluorobenzoate." *J. Bacteriol.* **172**(9): 5119-5129.
- Schlömann, M., K.-L. Ngai, et al. (1993). "Dienlactone Hydrolase from *Pseudomonas cepacia*." *J. Bacteriol.* **175**(10): 2994-3001.
- Schlömann, M. (1994). "Evolution of chlorocatechol catabolic pathways " *Biodegradation* **5**(3-4): 301-321.

Schmidt, E. und H.-J. Knackmuss (1980). "Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid." *J. Biochem.* **192**: 339-347.

Schmidt, E. und H.-J. Knackmuss (1984). "Production of cis,cis-muconate from benzoate and 2-fluoro- cis,cis-muconate from 3-fluorobenzoate by 3-chlorobenzoate degrading bacteria." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 352-355.

Schmidt, E. und H.-J. Knackmuss (1990). "Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate utilizing bacteria." *J. Bacteriol.* **172**(9): 5112-5118.

Schraa, G., M. L. Boone, et al. (1986). "Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175." *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(6): 1374-1381.

Schreiber, A., M. Hellwig, et al. (1980). "Critical reactions in fluorobenzoic acid degradation by *Pseudomonas* sp. B13." *Appl. Environ. Microbiol.* **39**(1): 58-67.

Scott, D. W., J. P. McCullough, et al. (1956). "Fluorobenzene: Thermodynamic properties in the solid, liquid and vapor states; a revised vibrational assignment." *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 5457-5463.

Seigneur, C., N. Adler, et al. (2002). "Effect of Biotrickling Filter Operating Parameters on Chlorobenzenes Degradation." *J. Environ. Engineering* **128**(4): 360-366.

Shevchenko, A., Wilm, M., et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels." *Anal. Chem.* **68**: 850-858.

Shields, M. S., M. J. Reagin, et al. (1995). "TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4): 1352-1356.

Simpson, H. D., J. Green, et al. (1987). "Purification and some properties of a novel heat-stable cis-toluene dihydrodiol dehydrogenase." *Biochem. J.* **244**: 585-590.

Skiba, A., H. J. Hecht, et al. (2002). "Formation of Protoanemonin from 2-Chloro-cis,cis-Muconate by the Combined Action of Muconate Cycloisomerase and Muconolactone Isomerase." *J. Bacteriol.* **184**(19): 5402-5409.

de Smet, M.-J., M. B. Friedman, et al. (1989). "Plasmid control of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* phenotypes and of linalool and p-cymene oxidation." *J. Bacteriol.* **171**(9): 5155-5161.

Solyanikova, I. P., O. V. Maltseva, et al. (1995). "Characterization of muconate and chloromuconate cycloisomerase from *Rhodococcus erythropolis* 1CP: indications for functionally convergent evolution among bacterial cycloisomerases." *J. Bacteriol.* **177**(10): 2821-2826.

Solyanikova, I. P., O. V. Moiseeva, et al. (2003). "Conversion of 2-fluoromuconate to cis-dienelactone by purified enzymes of *Rhodococcus opacus* 1CP." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(9): 5636-5642.

Sommer, C. and H. Görisch (1997). "Enzymology of the degradation of (di)chlorobenzenes by *Xanthobacter flavus* 14p1." *Arch. Microbiol.* **167**: 384-391.

Song, B., N. J. Palleroni, et al. (2000). "Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(8): 3446-3453.

Sonogashira, K., Y. Tohda, et al. (1975). "A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines." *Tetrahedron Let.* **16**(50): 4467-4470.

Spain, J. C. und S. F. Nishino (1987). "Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp." *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(5): 1010-1019.

Spain, J. C. (1990). "Metabolic pathways for biodegradation of chlorobenzene." Silver S., Chakrabarty A.M., Iglewski B. und Kaplan S. (ed) *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.: 197-202.

Sperl, G. T. und G. J. Harvey (1988). "Microbial adaptation to bromobenzene in a chemostat." *Curr. Microbiol.* **17**: 99-103.

Spiess, E. und H. Görisch (1996). "Purification and characterization of chlorobenzene cis-dihydrodiol dehydrogenase from *Xanthobacter flavus* 14p1." *Arch. Microbiol.* **165**: 201-205.

Spiess, E., C. Sommer, et al. (1995). "Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Xanthobacter flavus* 14p1." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(11): 3884-3888.

Strunk, H. L. (2007). "mündliche Mitteilung."

Strunk, N. (2000). "Halogenaromaten in der biologischen Abluftreinigung." Diplomarbeit, Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft.

Strunk, N. und Engesser, K.-H. (2003). "Skript zur Vorlesung Mikrobiologie III - Spezielle Umweltmikrobiologie." Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Abteilung Biologische Abluftreinigung, Universität Stuttgart.

Strunk, N., D. Dobsław, et al. (2006). "Isolation and characterization of strain FLU 100, a bacterium with the rare capability to simultaneously degrade toluene and all monohalosubstituted benzenes including fluorobenzene." *Biospektrum Tagungsband 2006*: 64.

Strunk, N., D. Pieper, et al. (2008). "Degradation of fluorobenzene by *Burkholderia fungorum* FLU 100." in preparation, to be submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*

Stryer, L. (1996). "Biochemie, 4. Auflage." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Süßmuth, R., J. Eberspächer, et al. (1997). "Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum." Thieme Verlag Stuttgart.

Sutton, S. V., G. R. Bender, et al. (1987). "Fluoride inhibition of proton-translocating ATPase of oral bacteria." *Infect Immun.* **55**(11): 2597-2603.

Taegert, K., H.-J. Knackmuss, et al. (1988). "Biodegradability of mixtures of chloro- and methylsubstituted aromatics: Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and 3-methylbenzoate." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 603-608.

Takizawa, N., N. Kaida, et al. (1994). "Identification and Characterization of Genes Encoding Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenase and polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dihydrodiol Dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82." *J. Bacteriol.* **176**(8): 2444-2449.

Tropel, D. und J. R. Van der Meer (2004). "Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds." *Microbiol. Molecular Biol. Reviews.* **68**(3): 474-500.

Tros, M. E., T. N. P. Bosma, et al. (1996). "Measurement of minimum substrate concentration (S<sub>min</sub>) in a recycling fermentor and its prediction from the kinetic parameters of *Pseudomonas* sp. strain B13 from batch and chemostat cultures." *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(10): 3655-3661.

Versalovic, J., T. Koeuth, et al. (1991). "Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes." *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831.

Vogt, C., A. Alfreider, et al. (2002A). "Two pilot plant reactors designed for the in situ bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water: Hydro-geological and chemical characteristics and bacterial consortia." *Water Air Soil Pollut.* **2**: 161-170.

Vogt, C., A. Alfreider, et al. (2004). "Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide." *J. of Contaminant Hydrology* **68**(1): 121-141.

Vogt, C., A. Alfreider, et al. (2002B). "Optimization of bioremediation of Chlorobenzene polluted aquifer sediments." *Grundwasser* **7**(3): 156-164.

Vollhardt, K. P. C. und N. E. Schore (2000). "Organische Chemie." Wiley – VCH Weinheim.

Vollmer, M. D., P. Fischer, et al. (1994). "Inability of Muconate Cycloisomerases To Cause Dehalogenation during Conversion of 2-Chloro-cis,cis-Muconate." *J. Bacteriol.* **176**(14): 4366-4375.

Vollmer, M. D., H. Hoier, et al. (1998). "Substrate specificity of and product formation by muconate cycloisomerases: an analysis of wild-type enzymes and engineered variants." *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3290-3299.

Vollmer, M. D., U. Schell, et al. (1999). "Substrate specificities of the chloromuconate cycloisomerases from *Pseudomonas* sp. B13, *Ralstonia eutrophus* JMP134 and *Pseudomonas* sp. P51." *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 598-605.

Vora, K. A., C. Singh, et al. (1988). "Degradation of 2-fluorbenzoate by a pseudomonad." *Curr. Microbiol.* **17**: 249-254.

Wallach, O. (1886). "Über einen Weg zur leichten Gewinnung organischer Fluorverbindungen." *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **235**: 255-271.

Westermeier, R. (1990). *Elektrophorese-Praktikum.* Wiley VCH Verlag, Weinheim.

Whitford, G. M., G. S. Schuster, et al. (1977). "Fluoride Uptake by *Streptococcus mutans* 6715." *Infect. Immun.* **18**(3): 680-687.

Wirsum, S. (2000). "Das Sensor-Kochbuch." MiTP-Verlag Bonn.

Wunderwald, U., G. Kreisel, et al. (2000). "Formation and degradation of a synthetic humic acid derived from 3-fluorocatechol." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 441-446.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, et al. (1992). "Proposal of *Burkholderia* gen. nov. und transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*." *Microbiol. Immunol.* **36**(12): 1251-1275.

Zaitsev, G. M., J. S. Uotila, et al. (1995). "Utilization of halogenated benzenes, phenols, und benzoates by *Rhodococcus opacus* GM-14." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(12): 4191-4201.

### 7.3. Ergänzungen zu den Ergebnissen

#### 7.3.1. Untersuchung des der 16S – rRNA zugehörigen Genes

Sequenz des von FLU 100 abgeleiteten 16S – rRNA Genes, der nicht überlappende Anfang ist in Rot dargestellt.

**ATTGAACGCTG**GCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGGGCAACCCTGGTGGCGAGT  
GGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGTCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAT  
ACCGCATAACGCTCTACGGAGGAAAGGGGGGGATCTTAGGACCTCCCCTACAGGGGCGGCCGATGGCAGA  
TTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAA  
CCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAA  
ACGCCGTGGTTAATACCCGTGGCGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCA  
GCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTCCGC  
TAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCA  
GAGGGGGGTAGAATCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCA  
GCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTCGGGCTTTCATGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAG  
TTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG  
GATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCCTGCTGA  
GAGGTGGGAGTGCCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGA  
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGAC  
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCAC  
ACGTCATAAATGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCAGAAAACCGATCGT  
AGTCCGGATCGCACTCTGCAACTCGAGTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG  
CGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGG  
CTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTG

Sequenz des von *Burkholderia fungorum* LMG16225 (AF215705 ) abgeleiteten 16S – rRNA Genes, das nicht überlappende Ende ist in Rot dargestellt.

GCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGGGGCAACCCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT  
GAGTAATACATCGGAACGTGTCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACG  
TCTACGGAGGAAAGGGGGGGATCTTAGGACCTCCCCTACAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTG  
GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAG  
CAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAAACGCCGTGGTT

AATACCCGTGGCGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
 ACGTAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTCCGCTAAGACAGATG  
 TGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAG  
 AATTCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGC  
 CAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTA  
 AACGATGTCAACTAGTTGTGCGGGTCTTCATTGACTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTG  
 GGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGA  
 TTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGTATGGAATCCTGCTGAGAGGTGGGAGT  
 GCCCGAAAGGGAGCCATAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAA  
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACA  
 AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGTCATACAA  
 TGGTCGGAACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCG  
 CACTCTGCAACTCGAGTGCCTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG  
 TTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACC  
 GCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAA  
 GG

### 7.3.2. Sequenz des initialen Fluorbenzol - Dioxygenasesystems von FLU 100

Sequenz des von der Arbeitsgruppe Dr. Pieper (HZI) mit Gensonden gefundenen initialen  
 Fluorbenzol – Dioxygenasesystems in *Burkholderia fungorum* FLU 100:

IpbAa-IpbAb FLU100 DNA

GACAGCGCACTCGCGCGGATGCCGAGCGCTGTACCGCATTGTTGCGGGCGCACATTGAGTCATCGATTT  
 CGGTGGTTCGGCAATTCGGTTTTGTTGCGGTGATGCCGACACCGCGGTGTTTTGTTTTCCGCGCGATGGAAG  
 AGGTGTTGATTTTTTTTTCCCGCCCTGCCAAGGGCATTACAAAGGAGACGTTAAGTCATGAGTTCATCAATC  
 AAAGAAGTGCAGGAATCCCCTGTGAAGTGGGTGAAAACTGGACGCCCGATGCGATTCCGGCGCTGGTTCG  
 ATCAGGACAAGGGGCGGCTTGACCCCCGCATCTATGCTGACCAAAGCCTTTACGAGCTGGAGCTTGAGCG  
 GGTCTTTGGCCGCTCTTGGCTGTTGCTTGGGCATGAGAGTCACATTCCTAAAACCGGGGACTTCCTGAGT  
 ACCTATATGGGTGAAGACCCGGTAGTCATGGTGCGGCAGAAAAGATAAAAAGCATTAAGGTGTTCTGAAAC  
 AGTGCCGCCATCGCGGCATGCGCATCTGTGCTCGGATGCTGGCAACGCCAAGTCCTTTACCTGCACCTA  
 CCACGGCTGGGCCTATGACATCGCGGGCAATCTGGTGAACGTGCCGTTGAGAAAGAGGCGTTTTGCGAT  
 AAGAAGGAGGGGAGACTGCGGCTTTGACAAGGCCGACTGGGGTCCGTTGCAAGCACGCGTGGCCACCTACA  
 AGGGCCTGGTTTTTCGCCAACTGGGACGCAGAAGCCCCTGATCTGAAGACTTATTTGAGGGACGCCACTCC  
 CTACATGGATGTGATGCTTGATCGCACCGAGGCGGGTACTGAGGTGATCGGCGGCATGCAGAAGTGGGTG  
 ATTCCCTGCAATTGGAAGTTTGGCGCTGAGCAGTTTTGCAGCGATATGTACCATGCCGGTACGATGGCGC  
 ACCTGTCTGGGGTCTGGCCAGCCTGCCACCCGACATGGACTTGTCCCAGGTGAAGCTGCCGACGACTGG

AAATCAATTCCGGGCCAGTGGGGTGGACATGGGACGGGTGGTTCAATGACGACTTTGGACTTCTGCAG  
 GCCATCACGGGCCCAAGATCGTGAATACTGGACCAAAGGTACGGCTGCTGAGCGGGCGCAAAAACGTC  
 TGGCTGACGTCTTCTGAAGCGAATCGTATGGTCCTCAGCACATGACAGTCTTTCCGACCTGCTCATT  
 TCTTCCGGGGATCAATACCGTCCGCAGCTGGCATCCGCGCGGCCCAATGAGGTGGAGGCTGGGGCGTTT  
 GTGGTGGTCGATGCTGATGCGCCCGAAGAAATCAAGGACGAATTTTCGTCGGCAAAATATTCGCACTTTCA  
 ACGCAGGGGGTGTGTTTGAAGCAGGACGACGGGGAAAATTGGGTTCGAGGTTTCAGAAAGTACTGCGCGGCCA  
 TATGGCCAAGAGCCAGCCGCTCAATGCTCAGATGGGTATAGGGGTGCCTAACAAAAACAATCCGGAATTC  
 CCGGGCAAAACATCTTATGTCTATGCTGAAGAAGCGGCGCGTGGTCTTTACCATCACTGGAGTCGCATGA  
 TGTCCGAGCCGAGTTGGGCCACGCTCAAGCCTTGAAGTGAACACCAGTCTCCAACCTTTCAGTTGGACGA  
 TAACTTTACCAAAGCGGGGTGCTCATCCGTACGAGCGGATGAGCACCAGCACCCGTCAGTAAATATATAC  
 GTTTGTAGGAAATTAACCATGACATTCACCAATTTGATTAAAGAACTTACTGGCCGACAAAGGCCGTC  
 GCCTTGATTTGCAAAACGAGATCGAACAGTTTTACTACCGGAAGCACAATTGCTCGATCACCATGCCTA  
 CGATGCCTGGTTCGCGCTGCTTGAAGAAGATATCCGATACTTTATGCCACTGCGTACCAACCGGACGTTT  
 AAGGAAAAAATCTAGAGTATTCTGGAAATGGGGAATACGCTCACTTCGACGAAACCTATGAAACCATGC  
 GTGGGCGTATTTCGCAAGCAGACCTCGGAGCTTGGCTGGGCAGAGGACCCACCTTCACGTACGCGCCATAT  
 TGTCTCCAATGTCATGGTCAGGAATACGGAAGAGCTGAACACCTTCGAAGTGAAGTTCCGGCCTTCATCCTG  
 TACCGTAATCGCTTGGAGCGCCAGGTCGACATCTTCGCGGGCGAGCGCCGGGACGTGCTGCACCGCGCCG  
 ACAACGGCCTTGCTTCAAGATCGCAAGCGTACCATCCTGCTCGACCAGAGCAGCTGTTGTGCAACAA  
 CCTCAGCATGTTTTTCTAAGCAAGAAACCTGAACCTTGCTGAA

### Daraus abgeleitete Proteine:

#### A - Untereinheit

MSSSIKEVQESPVKWVKNWTPDAIRALVDQDKGRLDPRIYADQSLYELELERVFRSWLLLGHESHI PKT  
 GDFLSTYMGEDPVVMVRQKDKSIKVFLNQCRHRGMRI CRSDAGNAKSFTCTYHGWAYDIAGNLVNVPF EK  
 EAFCDKKEGDCGFDKADWGPLQARVATYKGLVFANWDAEAPDLKTYLRDATPYMDVMLDRTEAGTEVIGG  
 MQKWVIPCNWKFAAEQFCSDMYHAGTMAHLSGVLASLPPDMDLSQVKLPPTGNQFRAQWGGHGTGWFNDD  
 FGLLQAITGPKIVEYWTGTAAERAQKRLADVLPEANRMVLQHMTVFPTCSFLPGINTVRSWHPRGPNEV  
 EVWAFVVVDADAPEEIKDEFRRQNIRTFNAGGVFEQDDGENWVEVQKVLRGHMAKSQPLNAQMGIGVFNK  
 NNPEFPGKTSYVYAEAAARGLYHHWSRMMSEPSWATLKP

#### B - Untereinheit

MTFTNLIKELDWPTKAVSLDLQNEIEQFYRYEAQLLDHHAYDAWFALLEEDIRYFMPLRTRNRTFKEKNLE  
 YSGNGEYAHFDETYETMRGRIRKQTSSELGWAEDPPSRTRHIVSNVMVRNTEELNTEFEVSSAFILYRNRLE  
 RQVDIFAGERRDVLHRADNGLGFKIAKRTILLDQSTLLSNNLSMFF

### 7.3.3. Erweitertes Substratpattern des Stammes FLU 100

Für ein besseres Bild des Stammes FLU 100 sind hier die Ergebnisse des erweiterten Substratpatterns dargestellt.

**Tabelle 59: Substratpattern von FLU 100 für weitere mikrobiologisch bedeutsame, nichtaromatische Substrate.**

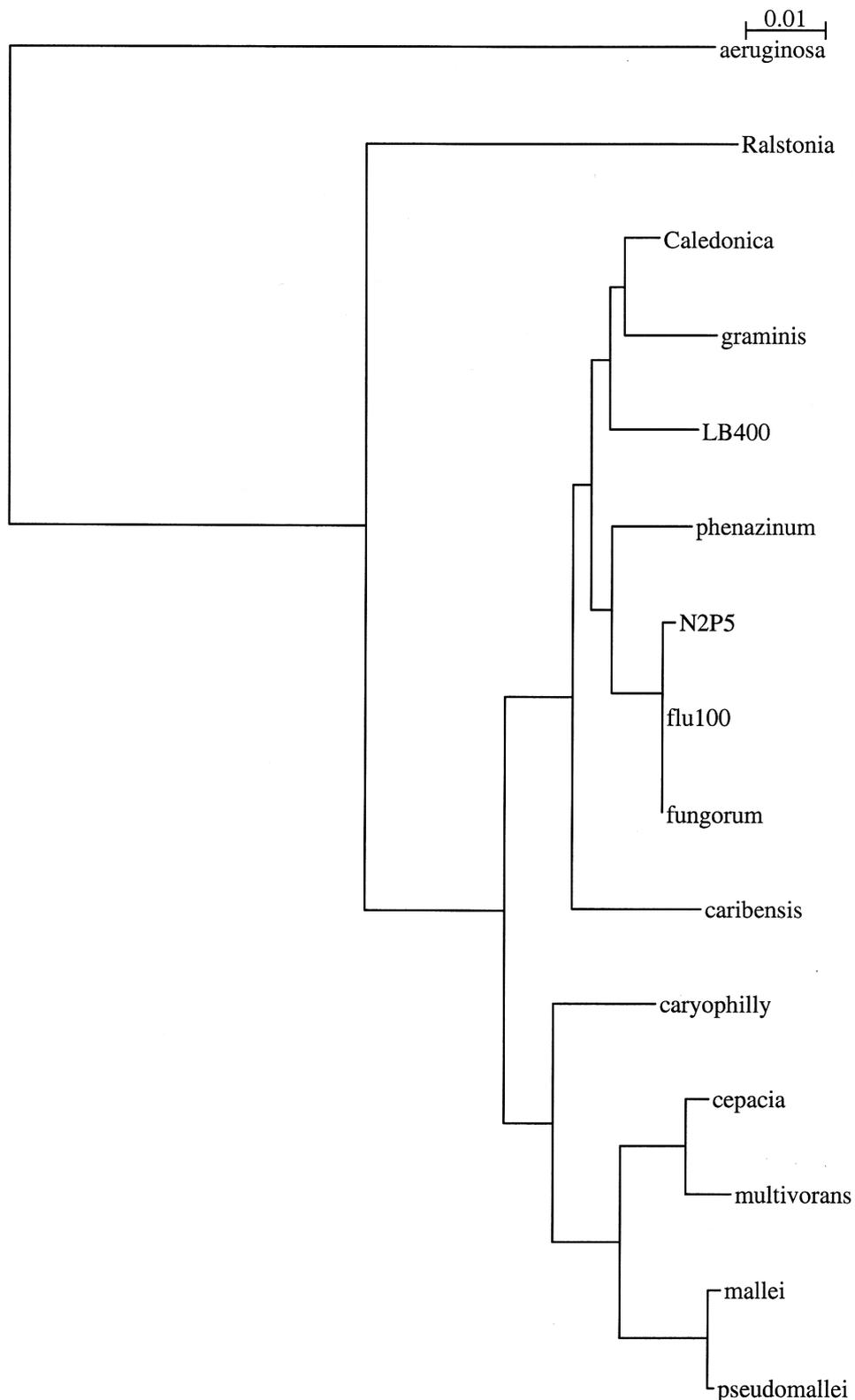
Aufgezählt sind die getesteten Substrate sowie die Bewertung ihrer produktiven Abbaubarkeit (Deg.).

Substrat	Deg.	Bemerkung
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	ein ringförmiges Hexasaccharid
Dextrin	-	Hydrolyseprodukt der Stärke
Glycogen	-	Polysaccharid, Speicherstoff
Tween 40	+	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, ein Detergenz
Tween 80	+	Polyoxyethylensorbitanmonooleat, ein Detergenz
n-Acetyl-D-galactosamin	-	Bestandteil bakterieller Zellwände
n-Acetyl-D-glucosamin	+	Bestandteil bakterieller Zellwände
Adonitol	-	Synonym: Ribitol
L-Arabinose	+	eine Pentose
D-Arabitol	+	Zuckeralkohol: Reduzierte Arabinose
D-Cellobiose	-	zwei Glucosen: 1,4- $\beta$ -glycosidisch verknüpft
Erythritol	-	Zuckeralkohol: Reduzierte Tetrose
L-Fructose	-	Linksdrehende Fructose
Gentiobiose	-	zwei Glucosen: 1,6-glycosidisch verknüpft
Inosit	-	Zyklischer Hexazuckeralkohol
$\alpha$ -D-Lactose	-	Milchzucker, Glucose - Galactose Disaccharid
Lactulose	-	Fructose - Galactose Disaccharid
Maltose	-	zwei Glucosen: 1,4- $\alpha$ -glycosidisch verknüpft
D-Mannit	+	von der Mannose abgeleiteter Zuckeralkohol
D-Mannose	+	eine Aldohehexose
D-Melibiose	-	Disaccharid aus Glucose und Galactose
$\beta$ -Methyl-D-glucosid	-	Methoxylierte Glucose
D-Psicose	-	Ketohehexose
D-Raffinose	-	ein Trisaccharid aus Glucose, Fructose, Galactose
D-Ramnose	-	eine Desoxyaldohehexose
D-Sorbitol	-	ein Hexazuckeralkohol
Saccharaose	-	Sucrose, Glucose – Fructose Disaccharid
D-Trehalose	+	Mycose, zwei Glucosen: 1,1- $\alpha$ -glycosidisch verknüpft

<b>Substrat</b>	<b>Deg.</b>	<b>Bemerkung</b>
Turanose	-	ein Glucose – Fructose - Disaccharid
Xylitol	-	ein Pentazuckeralkohol
Brenztraubensäuremethylester	+	ein Pyruvatderivat
Bernsteinsäuremonomethylester	-	Succinatderivat
<i>cis</i> -Aconitinsäure	+	Metabolit des Tricarbonsäurezyklus
Ameisensäure	-	Klassischer C <sub>1</sub> – Körper
D-Galactonsäurelacton	+	
D-Galacturonsäure	-	oxidierte Galactose
D-Gluconsäure	+	Fruchtsäure
D-Glucosaminsäure	+	
D-Glucuronsäure	-	Entgiftungsstoff in tierischen Zellen
$\alpha$ -Hydroxybuttersäure	-	Ketonkörper
$\beta$ -Hydroxybuttersäure	+	Ketonkörper
$\gamma$ -Hydroxybuttersäure	-	Ketonkörper
Itaconsäure	-	Pyrolyseprodukt der Citronensäure
$\alpha$ -Ketobuttersäure	-	Fettsäureauf- und Abbaumetabolit
$\alpha$ -Ketoglutarsäure	+	Metabolit im Zitronensäurezyklus
$\alpha$ -Ketovaleriansäure	-	Levulinsäure
D,L-Milchsäure	+	Gärungsprodukt
Malonsäure	+	Metabolit des Tricarbonsäurezyklus
Propionsäure	-	Gärungsprodukt
Chinasäure	+	Fruchtsäure
D-Saccharinsäure	+	D-Glucose Oxidationsprodukt
Sebacinsäure	-	$\alpha,\omega$ -Octandisäure
Brombernsteinsäure	-	
Bernsteinsäure	-	Metabolit des Tricarbonsäurezyklus
Glucuronamid	-	
L-Alaninamid	-	
D-Alanin	+	Aminosäure, rechtsdrehend
L-Alanin	+	Aminosäure
L- Alanylglycin	+	
L-Asparagin	+	Aminosäure
L-Asparaginsäure	+	Aminosäure
L-Glutaminsäure	+	Aminosäure
Glycyl-L-asparaginsäure	-	
Glycyl-L-glutaminsäure	+	
L-Histidin	-	Aminosäure
Hydroxy-L-Prolin	+	Posttranslatorisch modifiziertes Prolin

<b>Substrat</b>	<b>Deg.</b>	<b>Bemerkung</b>
L-Leucin	+	Aminosäure
L-Ornithin	-	Metabolit des Harnsäurezyklus
L-Prolin	+	Aminosäure
L-5-Oxoprolin	+	Posttranslatorisch modifiziertes Prolin
D-Serin	-	Aminosäure, rechtsdrehend
L-Serin	+	Aminosäure
L-Threonin	-	Aminosäure
D,L-Carnitin	+	Funktion ähnlich zu Coenzym A
$\gamma$ -Aminobuttersäure	+	Buttersäurederivat
4-Imidazoleacrylsäure	-	Abbauprodukt von Histidin
Inosin	+	Nucleosid
Uridin	+	Nucleosid
Thymidin	-	Nucleosid
1,4-Diaminobutan	-	Putrescin, Abbauprodukt von Aminosäuren
2-Aminoethanol	+	Standardchemikalie in der chemischen Industrie
Glycerin	-	Zuckeralkohol
2,3-Butadiol	+	Gärungsprodukt der gemischten Säuregärung
D,L- $\alpha$ -glycerinphosphat	-	Aktiviertes Glycerin
$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat	-	Metabolit des Glycogenabbaus
D-Glucose-6-phosphat	-	Metabolit der Glycolyse

### 7.3.4. Phylogenetische Einordnung des Stammes *Burkholderia fungorum* FLU 100



**Bild 130: Phylogenetische Einordnung des Stammes *Burkholderia fungorum* FLU 100**

Die Einordnung erfolgte aufgrund der 16S – RNA Sequenz (siehe Anhang 7.4.1.) durch die Arbeitsgruppe von Dr. D. Pieper, HZI Braunschweig. Entgegen früheren Annahmen ist der Stamm FLU 100 nicht mit dem Stamm *Burkholderia fungorum* LB 400 identisch.

### 7.3.5. Abiotische Verfahren zur Abluftreinigung

Die Auswahl eines abiotischen Verfahren zur Reinigung von belasteten Ablüften hängt von Faktoren wie Art der Schadstoffe, deren Konzentration und Volumenstrom ab.

Liegen wenige Komponenten oder gar ein Reinstoff in sehr hoher Konzentration vor, so können diese durch Kondensation aus dem Abluftstrom entfernt werden. Dieses regenerative Verfahren funktioniert durch Abkühlung des Volumenstromes unter den (azeotropen) Taupunkt der Komponenten (Kühlfallenprinzip). Das Verfahren stellt sich bei tiefsiedenden Schadstoffen sehr energieaufwändig dar. Auch muss bedacht werden, dass der "Reinluftstrom" immer noch Schadkomponenten mit dem zur Temperatur der Kühlfalle korrespondierendem Dampfdruck enthält. Dies kann dazu führen, dass weitere Reinigungsstufen nachgeschaltet werden müssen.

Ergänzend zur Reinigung durch Kondensation kann ein Membranverfahren nachgeschaltet werden. Die Differenz der Partialdrücke der Schadstoffe zwischen den beiden Seiten einer geeigneten Membran verursacht die Diffusion der Schadstoffe. Das Permeat kann in den Volumenstrom vor dem Kondensator zurückgeführt werden, während das Retentat weiter an Schadstoffen verarmt wurde.

Ein weiteres regeneratives Verfahren nutzt die Sorption der Schadstoffe an bestimmte Materialien wie beispielsweise Aktivkohle. Das Sorbens wird mit den Schadstoffen beladen, dann aus dem Volumenstrom des Rohgases entfernt und später mit geeigneten Mitteln, wie beispielsweise Wasserdampf desorbiert. Die Schadstoffe, zumeist Lösemittel, werden dadurch aufkonzentriert und können wiedergewonnen werden. Dieser Schritt ist allerdings recht kostenintensiv, oft wird das beladene Sorbens entsorgt, bzw. in dafür ausgelegten Anlagen verbrannt.

Die thermischen Verfahren der Abluftreinigung basieren auf der Totaloxidation der organischen Schadstoffe bei Temperaturen von 700 bis zu 1000 °C. Selten liegen die Kontaminanten in so hoher Konzentration vor, dass eine autothermische Verfahrensführung möglich wird. Ansonsten muss der zu reinigende Volumenstrom durch eine Stützfeuerung auf die Nenntemperatur erhitzt werden. Vor allem bei großen Volumenströmen mit geringer Schadstoffkonzentration ist dies in Anbetracht der massiv steigenden Energiekosten ein unwirtschaftliches und aufgrund der Nutzung von fossilen Brennstoffen auch ein unökologisches Verfahren. Lediglich die anfallende Wärme kann genutzt werden, um beispielsweise über Wärmetauscher den Rohgasstrom zu erhitzen.

Durch geeignete Katalysatoren wie Platin oder andere Edelmetalle kann die Zieltemperatur der Oxidationsreaktionen auf 180 bis 500 °C herabgesetzt werden.

Die Verbrennung von organohalogenhaltigen Schadstoffe setzt korrosive Gase wie HCl und HF frei. Diese können bei der Wahl ungeeigneter Materialien zu Korrosionsproblemen führen.

Weitere Ansätze in der abiotischen Abluftreinigung sind beispielsweise Kaltplasma- und UV - Verfahren. Hierbei werden die Schadstoffmoleküle durch elektrische oder elektromagnetische Anregung labilisiert, um dann entweder direkt mit Sauerstoff oder katalytisch oxidiert zu werden.

### **7.3.6. Beilage**

Dieser Arbeit liegt eine Zusammenstellung der wichtigsten Substrate und Metabolite von FLU 100 bei. Gezeigt sind optische Spektren zwischen 200 und 350 nm Wellenlänge. Zusätzlich sind noch Strukturformeln und die Wellenlängen von Minima und Maxima der optischen Spektren dargestellt. Das "Periodensystem" folgt den postulierten Abbauwegen (siehe Kapitel 6.8.).

### **7.4. Bildnachweis**

- Bild 1, 29, 30, 31, 38: Hans Bühler  
Bild 2: Wikipedia, gemeinfrei  
Bild 36: Christina Onaca und Dr. Josef Altenbuchner  
Bild 40, 47: Martin Kieninger  
Bild 42, 45, 48, 51, 53: Dannecker Photography, 73082 Salach, Maks Dannecker  
Bild 91, 130: Dr. Dietmar Pieper  
Bild 94 bis 100: Niko Strunk und Ferdinand Pohl

Alle nicht aufgeführten Bilder: Niko Strunk

## 7.5. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

**Niko Strunk,**

**Staatsangehörigkeit: Deutsch**

**geboren am 24. Juli 1970 in Stuttgart,**

**Familienstand: ledig**

**Obere Bismarckstr. 78**

**70197 Stuttgart**

**Telefon: Festnetz: 0711- 6572237, Mobil: 01633364713**

### SCHULAUSBILDUNG

**1977 – 1979**

**Vogelsang Grundschule, Stuttgart**

**1979 – 1980**

**Hickory Hollow School, Newfield, NY, USA**

**1980 – 1990**

**Freie Waldorfschule am Kräherwald, Stuttgart,**

Abschluß: Abitur

### STUDIUM

**Okt. 1990 – Juli**

**1993 Universität Konstanz**

Studium der Chemie

**Okt. 1995 – Sep.**

**2000 Universität Stuttgart**

Studium der Umweltschutztechnik

Abschluß: Diplom, mit Auszeichnung bestanden

### PRAKTIKA

**Juli 1990 – März 1991**

**Max-Planck-Institut für Festkörperforschung**

Praktikum im Bereich Gefahrstoffe

**Aug. 1991 – März 1992**

**Max-Planck-Institut für Festkörperforschung**

Praktikum im Bereich Synthesen organischer Stoffe

**Sep. 1998 – Okt. 1998**

**Umweltanalytikinstitut Dr. Haller**

Grundpraktikum im Bereich Umweltanalytik

**Dez. 1999 – Feb. 2000**

**Trumpf Lasertechnik GmbH**

Fachpraktikum im Bereich Mikrobiologie

**Okt. 2001 – Feb. 2002**

**Praktika an der Universität Stuttgart**

Biochemie, Genetik 1, Genetik 2 und Isotopenkurs

**ARBEITSERFAHRUNG**

<b>Aug. 1985</b>	<b>Max-Planck-Institut für Festkörperforschung</b>
<b>Jul. 1986 – Aug. 1986</b>	<b>Max-Planck-Institut für Festkörperforschung</b>
<b>Jul. 1988</b>	<b>Max-Planck-Institut für Festkörperforschung</b> Jeweils im Kristallzüchtungslabor und elektronenmikroskopische Präparation
<b>Okt. 1994 – Okt. 1997</b>	<b>Restaurant Ketterer in Stuttgart</b>
<b>Feb. 1995</b>	<b>Institut für Werkstoffwissenschaften, Universität Erlangen</b> Einrichten verschiedener Arbeitsplatzrechner
<b>Juli 1998</b>	<b>Institut für Politikwissenschaften, Universität Stuttgart</b> Mitarbeit an einer Umfrage zu einem Großprojekt
<b>Okt. 1998 – Dez. 1998</b>	<b>Institut für technische Thermodynamik, Universität Stuttgart</b> Auswertung verschiedener Meßergebnisse
<b>ab Okt. 2000 bis heute</b>	<b>Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Abteilung Biologische Abluftreinigung, Universität Stuttgart</b> Festanstellung im Rahmen des DFG - Forschungsprojektes "Charakterisierung von Halogenbenzol und Alkylbenzol mineralisierenden Bakterienstämmen und deren umwelttechnischer Einsatz", und Ausrichtung und Betreuung verschiedener Praktika, Administration des Abteilungsnetzwerkes. Bearbeitung von Industrieaufträgen, Betreuung von Studien-, Diplom- und Masterarbeiten.

## 7.6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Karl-Heinrich Engesser, der diese Dissertation erst möglich gemacht hat, für seine Betreuung und seine schier unendliche Geduld. Des Weiteren gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die im Rahmen des Projektes "Halogenbenzol- und Alkylbenzol-mineralisierende Bakterienstämme: Charakterisierung und umwelttechnischer Einsatz" für die Finanzierung der meisten Arbeiten sorgte. Im Rahmen dieses Projektes erfolgte auch die sehr gute Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dietmar Pieper, Herrn Dr. Josef Altenbuchner und Herrn Dipl.-Ing. Daniel Dobslaw. Danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Abteilung Biologie sowie den Sekretärinnen Frau Metzger und Frau Matzig für ihre Unterstützung.

Sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit hat Dipl.-Ing. Martin Kieninger beigetragen, ich bin ihm zu großem Dank verpflichtet. Danken möchte ich auch meinen Hiwis, Diplomanden und Studienarbeitern, die ich parallel zu dieser Arbeit betreut habe, vor allem Ms. sc. Oktay Karas, Dipl. biol. (t.o.) Ferdinand Pohl, Dipl.-Ing. Alexandra Saraev und Dipl. biol. (t.o.) Henrike Caysa. Des Weiteren will ich Monique Serio und Christian Herter, ohne die wir das Mutantenscreening nicht geschafft hätten, besonders danken.

Ich danke auch meiner Familie für ihre Geduld und moralische Unterstützung, insbesondere während Zeiten besonderer Anspannung. Ein spezielles Dankeschön geht an Frau Helene Lotte Strunk.