Der mikrobielle Abbau von Etherverbindungen unter besonderer Berücksichtigung von Aralkyl- und Alkylethern

Anreicherung, Isolierung, Charakterisierung und Klassifizierung der abbauenden Bakterien und vergleichende Untersuchungen der Abbauwege mit Modelletherchemikalien

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Yong-Hak Kim

aus Seoul / Korea (süd)

Hauptberichter: Prof. Dr. K.-H. Engesser
Mitberichter: Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Mirberichter: Prof. Dr.-Ing. P. Kämpfer

Tag der mündlichen Prüfung: am 24. Juni 1999

Universität Stuttgart
Institut für Mikrobiologie
1999

Zur

Ehre Gottes

im Namen der

Familien

Die Arbeiten für die vorliegende Abhandlung wurden am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) der Universität Stuttgart Abteilung biologische Abluftreinigung (ALR) durchgeführt.
Diese Arbeit wurde von mir selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits auf Tagungen vorgestellt (VAAM-Frühjahrstagungen in Bayreuth 1996, in Hamburg 1997, in Frankfurt 1998).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 1

Zusammenfassung 2

1. **Einleitung** 4

1.1 Mikrobielle Aktivität und Mannigfaltigkeit 4
1.2 Die Biodegradation von Ethern 5
1.2.1 Glykole und Glykolether 11
1.2.2 Diarylether 13
1.2.3 Aliphatische Alkylether 16
1.2.4 Cyclische Alkylether 18
1.2.5 Epoxide als Zwischenprodukte des Abbaues von Kohlenwasserstoffen 19
1.2.6 Aralkylether 19
1.2.7 Dibenzylether und Benzylphenylether 22
1.3 Bekannte Enzymsysteme für die monooxidative Etherspaltung ... 23
1.3.1 Cytochrome-P450 23
1.3.2 Ligninasen 25
1.4 Zielsetzung 29

2. **Material und Methode** 31

2.1 Anreicherung und Isolierung 31
2.1.1 Probebehandlung und Anreicherung 31
2.1.2 Isolierung einer Reinkultur 32
2.1.3 Stämme 32
2.1.4 Medien und Nährlösungen 34
2.1.4.1 Komplexmedien 34
2.1.4.2 Minimalmedien 35

2.1.4.3 Bodenextrakt 36
2.1.5 Anzucht 37
2.1.6 Kontrolle des Wachstums 37
2.1.7. Lebendzellzahlbestimmung 38
2.1.7.1 ′TAR′-Faktorzahl 38
2.1.7.2 ′r′-Zahl 39
2.1.8 Stammerhaltung 39
2.2 Charakterisierung und numerische Klassifizierung 39
2.2.1 Morphologie und Mikroskopie 40
2.2.2 Katalase- und Oxidasetest 40
2.2.3 Physiologische und biochemische Charakteristika 41
2.2.3.1 Wachstumsversuche 41
2.2.3.2 Substratspektren 43
2.2.3.3 Einfache Bestimmung des Abbaues der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) 46
2.2.3.4 Hydrolyse der Polymere 47
2.2.3.5 Empfindlichkeit gegenüber antibiotischen Hemmstoffen 47
2.2.4 Numerische 2D-Analyse der taxonomischen Charakteristika 49
2.2.5 Distanz der Vektoren für die Ähnlichkeits- und Gruppenanalyse ... 52
2.2.5.1 Distanz zwischen einzelnen Vektoren 52
2.2.5.2 Dispersitätsgröße einer geometrischen Gruppe 52
2.2.5.3 Distanz zwischen Gruppen 53
2.3 pH-Messung 54
2.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) 54
2.5 Galvanische Messung 55
2.5.1 Diethylether- und Ethanol-Oxidation 55
2.5.2 Bestimmung optimalen pH-Wertes 56
2.6 Chemikalien 56

3. **Ergebnisse** 57

3.1 Anreicherung & Isolierung 57
3.1.1 PAK-abbauende Stämme 57

3.1.2 Phenylether und Benzylether-abbauende Stämme 64
3.1.3 Polyethylenglykol (PEG)-abbauende Stämme 64
3.1.4 Alkylether-abbauende Stämme 65
3.1.4.1 Aralkylether-abbauende Stämme 66
3.1.4.2 Cyclische Alkylether-abbauende Stämme 72
3.1.4.3 Aliphatische Alkylether-abbauende Stämme 77
3.1.4.4. Spontane Mutation der aliphatische Alkylether-Abbauenden Stämme 82
3.2 Charakterisierung und numerische Klassifizierung 86
3.2.1 Numerische 2D-Gruppenanalyse der verwendeten Stämme 87
3.2.2 Die Cluster-Analyse der Gram-negativen Stämme 92
3.2.3 Die Cluster-Analyse der gram-positiven pleomorphen Stämme ... 98
3.2.3.1 Pyren-abbauende Stämme 99
3.2.3.2 Fluoren- und Dibenzofuran-abbauende Stämme 102
3.2.3.3 Alkylether-abbauende Stämme u.a. 105
Aralkylether-abbauende Stämme 109
Cyclische Alkylether-abbauende Stämme 112
Aliphatische Alkylether-abbauende Stämme 114
3.3 Ruhezellenversuche 118
3.3.1 Die 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden Stämme 119
3.3.2 Die Aralkylether-abbauenden Stämme 122
3.3.2.1 Umsatz – und Oxidationsmuster des Stammes St127 124
3.3.2.2 Umsatz – und Oxidationsmuster des Stammes DEE5311 127
3.3.2.3 Umsatz – und Oxidationsmuster des Stammes MOB600 132
3.3.3 Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme 136
3.3.3.1 Oxidationsaktivitäten für aliphatische Alkylether und Alkohole ... 136
3.3.3.2 Spezifische Hemmungen von der *O*-Dealkylase und der Alkohol-Oxidase zur kinetischen Untersuchungen 145
3.3.3.3 Hemmwirkungen des Glutaraldehydes auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase 149
3.3.3.4 Hemmwirkungen des Ethylvinylethers auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase 154
3.3.4 Der Abbau von Dibenzylether 161
3.3.5 Die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme 166

4. **Diskussion** …… 169

4.1 Fragestellungen …… 169
4.2 Numerische Taxonomie …… 173
4.2.1 Zweidimensionale Analyse …… 175
4.2.2 Klassifizierung der Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme 178
4.2.3 Differenzierung der Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme 180
4.3 Hypothetische Abbauwege der Alkylether …… 186
4.3.1 1,4-Dialkoxybenzole …… 186
4.3.2 Aralkylether …… 188
4.3.3 Aliphatische Alkylether …… 192
4.3.3.1 Schlüsselenzyme zum Etherabbau : *O*-Dealkylase und Alkohol-Oxidase …… 193
4.3.3.2 Die Hemmwirkungen von Glutaraldehyd und Ethylvinylether auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase …… 195
4.3.3.3 Hypothetische Abbauwege des Ethylvinylethers …… 196
4.3.3.4 Der Abbau von Dibenzylether …… 199
4.3.4 Cyclische Alkylether …… 202

Summary (English) …… 206

5. **Literatur** …… 210

ANHANG: Testfelder X und Y (1,44MB, 3,5″ Diskette-Version**)**

Abkürzungsverzeichnis

ALR	Abteilung biologische Abluftreinigung am ISWA
DC	Dünnschichtechromatographie
DMM	Definiertes Minimal-Medium
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikrobiologie und Zellkulturen GmbH
HMO	Hypothetischer mittlerer Organismus
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ISWA	Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart
Korr[r]	Korrelationskoeffizient
OD	Optische Dichte
NA	Nutrient-Agar
PAK	Polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff
′r′	Prozentuales ′reversibel′-Verhältnis [%] nach der Gleichung (2.2) im Text
RT	Retentionszeit (Minute)
′TAR′	′Total Available Recovery′-Wert [%] nach der Gleichung (2.1) im Text
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trypticase-Soja-Agar
Upm	Umdrehungszahl pro Minute
UV	Ultraviolett
h	Hill-Koeffizient bzw. Kooperativitätsfaktor eines allosterischen Enzymes
[I]	Konzentration eines Inhibitors
K	Fraktion der aktiven Form nach der hypothetischen Wechselwirkung eines allosterischen Enzymes
K_M	Halbsättigungsgrad entspricht der Substratkonzentration nach der Michaelis-Menten-Gleichung, wenn $v = ½\ V_{max}$
K_s	Halbsättigungsgrad entspricht der Substratkonzentration nach der Monod-Gleichung, wenn $\mu = ½\ \mu_{max}$
K_{SI}	Hemmkonstante bei einer Substrathemmung
K_i	Hemmkonstante bei einer enzymatischen Hemmung
M	Molarkonzentration, mM = 10^{-3} M, µM = 10^{-6} M, nM = 10^{-9} M
mmHg	Druckeinheit, 760 mmHg = 1 Bar
pO_2	Sauerstoffaufnahme der Zellen bei 30°C [nM min^{-1}]
[S]	Substratkonzentration
t_d	Verdopplungszeit [h]
μ	Spezifische Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]
µm, nm	Längeneinheit, µm = 10^{-6} Meter, nm = 10^{-9} Meter
μ_{max}	Maximale Wachstumsgeschwindigkeit
%	Prozentuales Volumen (v/v) oder Gewicht (w/v)

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Anreicherung und Isolierung von Aralkylether- sowie Alkylether-abbauenden Bakterien aus verschiedenen Umweltkompartmenten. Verschiedene Stämme wurden mit den im folgenden beschriebenen Anreicherungssubstraten aus Belebtschlammproben der Kläranlage Stuttgart-Büsnau isoliert. Aus der numerischen Taxonomie gehörten die meisten Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme zu *Rhodococcus*. Es schlossen sich die Charakterisierung und Klassifizierung der Isolate an, und die korrespondierenden Abbauwege wurden soweit wie möglich aufgeklärt.

1. Die zwei *Rhodococcus* Stämme DEOB100 und DEOB200 konnten durch eine *O*-Dealkylierungsreaktion Ethoxylgruppe(n) von 1,4-Diethoxybenzol als C/E-Quelle verwerten. Methoxylgruppen von 1,3- bzw. 1,4-Dimethoxybenzol wurden dadurch nur abgespalten, nicht aber verwertet.

2. Der Abbau von Ansiol und Phenetol als Modellchemikalien für die Klasse der Aralkylether wurde mit den *Rhodococcus* Stämmen St127 und DEE5151 untersucht. Als sie entweder mit Anisol oder Phenetol als einzigem Substrat wuchsen, wurden 1-Hydroxy-2-Alkoxybenzolen jeweils für die *ortho*-Hydroxylierung als Initialreaktion nachgewiesen. Aber der mit Diethylether angezogene *Rhodococcus* Stamm DEE5151 setzte diese Modellchemikalien durch eine *O*-Dealkylierungsreaktion zu Phenol um.

Der bisher taxonomisch nicht klassifizierte Stamm MOB600, der ein breites Substratspektrum an substituierten Benzolen und Phenolen wie z.B. Benzol, Toluol, Styrol, Anisol, Phenetol, *o/m/p*-Kresole, 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol sowie an Biphenyl besaß, setzte nicht nur 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol zu einem Metabolit 3-Methoxybrenzcatechin, sondern auch 1,2-Methylendioxybenzol zu einem ′dead-end′ Produkt 3,4-Methylendioxyphenol um. Die unterschiedlichen Umsatz- und Oxidationsmuster vom Stamm MOB600 wiesen eine Beteiligung des Dioxygenasesystems zur primären Oxidation von Aralkylethern hin.

3. Alle aliphatische Alkylether-abbauende Isolate wurden innerhlab von *Rhodococcus* gekennzeichnet. Sie besaßen ein breites Substratspektrum an aliphatischen Alkylethern, Phenetol und Dibenzylether. Während des Stoffwechsels von geeignetem Ether (z.B. Diethylether) wurde

auch die Alkohol-Oxidase induziert, um stöchiometrisch freigesetzte Alkohole und Aldehyde weiter zu Carbonsäuren zu oxidieren.

Ethylvinylether und Glutaraldehyd hemmten spezifisch die beiden *O*-Dealkylase und Alkohol-Oxidase. Aus den Hemmexperimenten damit wurde festgestellt, daß die beiden Enzymsysteme während des Stoffwechsels von Diethylether zusammenwirkend aktiv sind.

4. Dibenzylether wurde sowohl durch die aliphatische Alkylether-abbauenden Rhodokokken (z.B. DEE5151) als auch durch *Sphingomonas* Stämme BZE101 und BZE102 via Benzoesäure abgebaut. Die Stämme BZE101 und BZE102 konnten nur Dibenzylether abbauen, während der Stamm DEE5151 (aufgrund der breiten Aktivität von den *O*-Dealkylase- und Alkohol-Oxidasesystemen) aliphatische Alkylether, Anisol, Phenetol und Dibenzylether abbauen konnte.

Die Umsatzversuche mit Anisol, Phenetol und Dibenzylether bestätigten, daß die *O*-Dealkylase vom Stamm DEE5151 bevorzugt ein *O*-Methylen-C-Atom attackierte, wenn dieser Enzym eine Hydroxylierungsreaktion am aliphatischen *O*-Methyl- oder *O*-Methylen-C-Atom (Cα-Hydroxylierung) katalysierte,

5. Die cyclische Alkylether-abbauenden Isolate konnten nicht nur cyclische Alkylether wie z.B. Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran, sondern auch Diethylether als einzige C/E-Quelle verwerten. Vergleichend mit dem Stamm DEE5151 ergaben die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme THF100 und THF400 ein anderes Oxidationsmuster mit cyclischen, aliphatischen und halogenierten Alkylethern. Daraus wurde hypothetisch postuliert, daß die THF-Hydroxylase nur *cis*-Rotationsisomer von Diethylether, das der Struktur von Tetrahydrofuran ähnelt, spezifisch oxidieren kann.

1. Einleitung

1.1. Mikrobielle Aktivität und Mannigfaltigkeit

Mikroorganismen, die toxische und schwer abbaubare Organochemikalien umsetzen oder abbauen, sind heutzutage von öffentlichem Interesse.

Mikrobielle Mannigfaltigkeit ist hervorragend. Die Leistungsfähigkeiten von Mikroorgansimen sind abwechselungsreich in der Natur. Sie beteiligen sich am Abbau von toxischen bzw. schwer abbaubaren Substanzen sogar unter extremen - z.B. thermophilen, acidophilen und hypersalzigen - Bedingungen. Ihre Enzymsysteme werden schnell induziert, um sich der Umwelt gut einzufügen (Palleroni, 1995). Die enzymatische Vielfalt ist normalerweise viel größer als bei höheren Lebewesen. Für die schnelle Umsatzrate (′turn-over′) spielt die groβe Zelloberfläche zu –volumen Ratio von Bakterien eine wichtige Rolle.

Bakterien (Prokaryoten) werden intensiv geforscht, weil sie sich unter den Laborbedingungen besser anpassen können, und weil die Zelle als eine Lebenseinheit für alle Lebewesen aus wenigen Zellkompartmenten besteht. Statistische Genforschungen machten es bekannt, daß sich die Genmutation aus einer normalen Population (Kolonie) oder einer natürlichen Artengemeinschaft wenig ereignet, aber daß sich die Mutationsrate mittels mutagener Chemikalien, antibiotischer Hemmstoffe (Datta, 1985), oder ultravioletter Einstrahlung viel erhöhen kann. Eventuell unter einer günstigen Bedingung kann eine sich aus einer Zelle entwickelte Population in ganzem Standort vorherrschen. Natürliche Populationen verändern sich immer. Genetische Mechanismen wie z.B. Gentransfer, Mutationswege, Genrekombination und Gentransposition beschleunigen die Evolution bakteriellen Stoffwechsels (van der Meer, 1992). Eine genetisch unveränderliche Population ist weder in der Natur noch im Labor vorhanden. Die Genmutation oder die Stammveränderung ereignet sich immer, solange sich die Zelle vermehrt. Auf diesem Weg erhalten sich natürliche oder angewandte Mikroorganismen in ordnungsmäßiger Form, um eine gezielte Arbeit zu erledigen.

In diesem Hinblick halten sich die Forschung und die Entwicklung von Spezial-Mikroorgansimen für erheblich, um die mikrobielle *Biodegradation* und *Biotransformation* schwer abbaubarer Chemikalien zu verwirklichen. Dieses Thema wird zur weltweiten Diskussion in der allgemeinen und angewandten Mikrobiologie immer mehr zunehmend gestellt.

1.2. Die Biodegradation von Ethern

Der Verbrauch von Etherverbindungen, die eine Etherbindung (-C-O-C-, *Abk.* Ether) als Strukturelement besitzen, weist steigende Tendenz auf. So werden Ether unter anderem als Lösungsmittel bei der chemischen Synthese und Vorbereitung von Arzneimitteln und Antibiotika eingesetzt. Auch werden sie bei der Herstellung von Waschmitteln (Polyethylenglykol-Detergentien) und bei der Lackierungen üblicherweise verwendet.

Da Etherbindung eine hohe Bindungsenergie von 360 kJ (86 kcal) mol^{-1} besitzt, werden Etherverbindungen als biologisch schwer abbaubar eingestuft und daher für Xenobiotika gehalten (Cain, 1981a). Zahlreiche Zwischenfälle, die teilweise zur massiven Schädigung von Menschen und Umwelt geführt haben, brachten die Gefährlichkeit dieser Verbindungsklasse ins öffentliche Bewußtsein. Ein Beispiel ist der Einsatz des Pflanzengiftes 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) während des Vietnam-Krieges (Tamburro, 1992).

Als große Emissionsquelle giftiger Etherchemikalien gelten nach dem U.S. EPA besonders Petroleum Raffinerie, Benzin-transport und -lagerstelle (1994, 1995a), die Bearbeitung von Holzmöbeln (1995b), die Herstellung von Pharmazeutika (1997), die Abfallbehandlung und die Wiederverwertung (1996), die Herstellung von Polyethern und Polyolen (1998a), Papiermühle und -brei (1998b), usw. Hier ist eine Emissionskontrolle angebracht.

In der Tabelle 1-1 werden toxische luftverschmutzende Ether und Glykole kurz vorgestellt, die von der U.S. EPA als Gefahrenquelle eingestuft werden. Obwohl die Liste nicht vollständig ist, kann man daraus die Intensität der Giftigkeit und die Gefährlichkeit entnehmen. Der logarithmische Wert von einem Octanol-Wasser-Gemisch (Log K_{ow}) gibt uns ein Kriterium für die Bioakkumulation und die Biokonzentration der aufgeführten Chemikalien, die eine natürliche Nahrungskette zur Folge hat. Der nach dem Henry'schen Gesetz errechnete Dampfdruck (kH) ist ein Freisetzungsfaktor flüchtiger Chemikalien. Als ein Kriterium für die Schwer-Abbaubarkeit von Chemikalien wird eine Degradationsrate in der Natur definiert, wenn weniger als die Hälfte des Stoffes pro Jahr abgebaut wird. ED_{10} meint eine Dosierung für 10 %ig zunehmende Krebsfälle im Vergleich zum natürlichen Background. Der zunehmende Kehrwert, $1/ED_{10}$, macht die krebserregende Einwirkung auf Menschen um so größer. Ähnlich definiert ′Unit Risiko′ die Carcinogenität bei der Inhalation. LD_{50} und LC_{50} zeigen akute Effekte an, indem sie diejenige Dosierungs- oder Inhalationskonzentration angeben, bei der die Hälfte der untersuchten Biosysteme getötet wird.

Tab. 1-1. Ether und Glykolether aus den nach dem ″Clean Air Act″ (CAA) bestimmten 190 toxischen luftverschmutzenden Chemikalien von dem U.S. Environmental Protection Agency (EPA)

Chemikalien	Parameter / Grenzwert / CAS	Log K_{ow} (Octanol / Wasser)	Dampfdruck	Abbau Konstante	Niedrigste Emissionsgrenze z.B. in den U.S.A	'Oral-RfD'	1 / ED_{10}	LC_{50} RfC	'Unit Risiko'	Akut	Chronisch	Chemikalien-Gruppe **	Emission 1994, U.S.A.
	Grenzwert	dimensionlos	mmHg	< 0,5 pro Jahr	mg / m³ in Luft **mg / l** in wasser **mg / kg (RfD, LD_{50})** **mg / m³ (RfC)**	mg / kg pro Tag	(mg / kg pro Tag) $^{-1}$	mg / m³	Inhalation (mg/m³) $^{-1}$ **Oral** (g / l) $^{-1}$			IRAC **EPA**	Tonne (pro Jahr)
Bis-(chlormethyl)-ether	542881	- 0,38	30		1,6 ×10(-8)		1400		62	✓	✓	**A**	0,116
Chlormethylmethylether	107302							181~1030		✓	✓	**A**	
Dibenzofuran	132649	3,18 ~ 4,12	0,0175									**D**	
Bis-(2-chlorethyl)-ether	111444	1,58	0,71		3 ×10(-6)		6,4		3,3 ×10(-7)	✓		**B2**	1,47
3,3′-Dimethoxybenzidin	119937						27			✓		**B2**	
1,4-Dioxan	123911		30		**0,0136**		0,034		**3,1×10(-7)**	✓	✓	**B2**	
Epichlorhydrin	106898		22		8 ×10(-4)	0,002	0,021	**0,001**	0,0012	✓	✓	**B2**	
1,2-Epoxybutan	106887		176					**0,02**		✓	✓	---	
Ethylenglykol	107211	- 1,36	0,06		10	2		10876		✓	✓	**D**	> 4,6 ×10(6)
Ethylenoxid	75218	- 0,30	430		< 0,2	1,3		1500		✓	✓	**B1**	
Methoxychlor	72435				**0,005 (RfD)**	0,005				✓	✓	**D**	
o-Methoxyanilin (o-Anisidin)	90040				0,5					✓	✓	2B	
Methyl-*tert*-butylether (MTBE)	1634044		245		**3 (RfC)**			**3,0**		✓		---	
Propylenoxid	75569	-0,13	445		3 ×10(-4)		0,16	**0,03**	0,0037	✓	✓	**B2**	488
Styroloxid	96093		0,3		**>1500 (LD_{50})**					✓		2A	
2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin* **	1746016	✓		✓	**1,78 ×10(-10)**		✓		✓	(✓)	✓		
Glykolether** : z.B.**	---									✓	✓	---	22000
Methoxyethanol		-0,74	9,5		**0,02 (RfC)**	0,001		**0,02**					
Ethoxyethanol		-0,10	5,5		**0,2(RfC)**	---		**0,4**					

[Anmerkung von Tabelle 1-1]
Die aufgeführten Daten wurden aus dem ′Office of Solid Waste (1996)′ und dem ′Office of Air Quality Planning & Standards (1998)′ des ′U.S. EPA′ zitiert.

IARC** : *I*nternational *A*gency for *R*esearch on *C*ancer, Gruppe 2A = möglicherweise human-carcinogen, 2B = wahrscheinlich human-carcinogen

U.S. EPA** **A** = bekannt human-carcinogen, **B1** = möglicherweise human-carcinogen, **B2** = mittel/niedrig möglicherweise human-carcinogen, **D** = noch nicht klassifiziert als human-carcinogen, --- = nicht definiert

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin*** repräsentiert die höchste Toxizität von polychlorierten cyclischen Diarylethern (Furanen und Dioxinen), die noch nicht bestimmt werden (konnten)

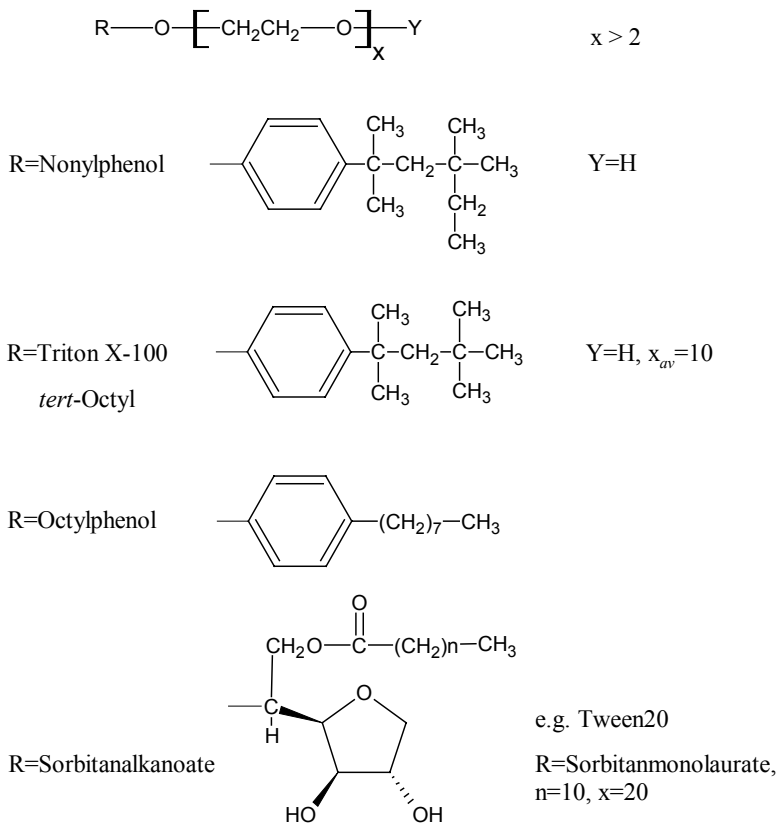
Glykolether**** schließen Derivate von Ethylenglykol, Diethylenglykol, und Triethylenglykol ein

R-$(OCH_2CH_2)_n$-OR′, n = 1, 2 oder 3

R = Alkyl- oder Arylgruppe

R′ = R, H, oder Reste. Wenn sie abgespalten werden, werden Glykolether R-$(OCH_2CH_2)_n$-OH hergestellt.

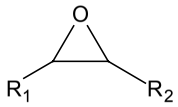
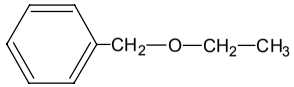
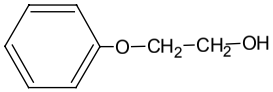
Oligo- und Polymere (n > 3) werden aus der Liste ′Titel III′ ausgeschlossen (U.S.EPA, 1995c)

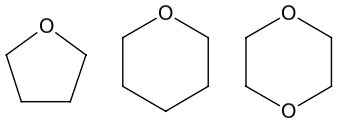
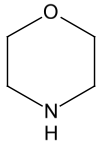
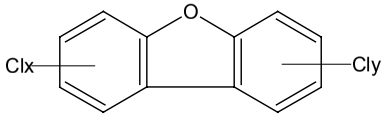
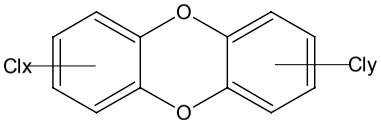
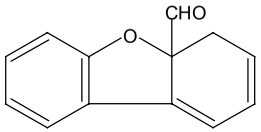
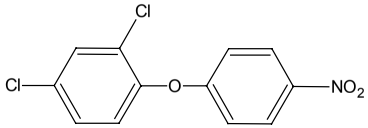
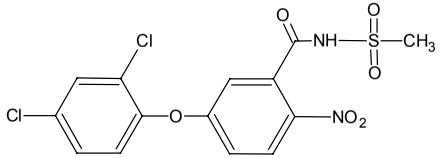


R=Alkyl-: e.g. cetyl-($C_{16}H_{33}$-), lauryl-($C_{12}H_{25}$-), usw.

Abb. 1-1. Typischen Strukturen der Polyethylenglykole: Der nicht-ionische Rest Y = H wird manchmal mit anionischer Sulfonsäure (Polyethylenglykolsulfonsäure) ersetzt.

Tab. 1-2. Auftrennung der in großen Mengen produzierten und freigesetzten Ether, und die korrespondierenden Abbaumikroorganismen

Produktbeziehung	Struktur	Anwendung	Gattung	Referenz
Polyglykole Ethylenglykole , x=2 Propylenglykole , x=3 1,4-Butandiole, x=4	$R_1-[O-(CH_2)x]_n-O-R_2$ $n \geq 10$	Detergens Tenside Kosmetik Petrochemikalien	*Acetobacterium* *Corynebacterium* *Flavobacterium* *Pseudomonas* *Pelobacter* *Xanthobacter*	Cain (1981) Griffiths et al. (1987) Wagener & Schink (1988) Obradors & Aguilar (1991) Maki et al. (1994) Kawai (1985,1995) John & White (1998)
Alkylether Diethylether, R_1,R_2=Ethyl 2-Chlorethylethylether, R_1=2-Chlorethyl, R_2=Ethyl Bis-(2-chlorethyl)-ether, R_1,R_2=2-Chlorethyl Isopropylether, R_1,R_2=Isopropyl Methyl-tert-Butylether, R_1=tert-Butyl, R_2=Methyl 1,2-Diethoxyethane, R'_1,R'_2 = Ethyl	R_1-O-R_2 $R'_1-[O-(CH_2)_2]_n-O-R'_2$ **Glykolether**; n = 1 ~ 3	Petrochemikalien Lösungsmittel Räucherung Narkose Plastik Plastikhärter	1,6-Dichlorhexan-, Propan-Abbauer *Arthrobacter* *Burkholderia* *Graphium* (Pilz) *Methylobacterium* *Methylococcus* *Nitrosomonas* *Pseudomonas*(CAM) *Rhodococcus*	Stirling & Dalton (1980) Janssen et al. (1988) Hyman et al. (1994) Hardison et al. (1997) Hur et al. (1997) Mo et al. (1997) Steffan et al., (1997)
Epoxide Ethylenoxid, R_1,R_2= H Propylenoxid, R_1=H,R_2= Methyl Glycidol, R_1=H, R_2= CH_2OH Epichlorhydrin, R_1=H,R_2= Chlormethyl		Räucherung Polymer Polymerhärter	*Nocardia* *Pseudomonas* *Xanthobacter*	Ensign (1996) Allen & Ensign (1998) Pancke et al. (1998)
Benzylether Ethylbenzylether Dibenzylether **Benzylphenylether**		Plastik Nahrungsmittel Zutat		
Aralkylether 2-Phenoxyethanol		Plastik	*Acetobacterium* *Beijerinckia* *Holophaga* *Pseudomonas* *Rhodococcus* *Clostridium*	Daniel et al. (1991) Karlson et al. (1993) Resnik & Gibson (1993) Kreft & Schink (1997) Kaufmann et al. (1998)

Cyclische Ether Tetrahydrofuran Tetrahydropyran 1,4-Dioxan		Petrochemikalien Lösungsmittel	Actinomyceten *Rhodococcus*	Bernhardt & Diekmann (1991) Parales et al. (1994) Bock et al. (1996)
Heterocyclische Ether Morpholin		Lösungsmittel Korrosionsschutz Gummizutat Antioxidant Antibiotika Fotoentwicklung	*Arthrobacter* *Mycobacterium* *Pseudomonas*	Mazure & Truffaut (1994) Chandrasekaran & Lalithakumari (1998) Combourieu et al. (1998) Poupin et al. (1998)
Furane, Dioxine Polychlorierte-Dibenzofurane (PCDFs) Polychlorierte-Dibenzo-[*p*]-dioxine (PCDDs) MGK® Insektengift II	 x + y= 0 ~ 8   **MGK** Insektizid	Petrochemikalien Abgas und Nebenprodukte -Motor -Verbrennungsanlage -Halogenchemieindustrie Insektizide	*Phanerochaete* (Weiβfäulepilz) *Pseudomonas* *Sphingomonas* *Staphylococcus* *Terrabacter* *Trichosporon* (Hefe)	Fortnagel et al., (1990) Engesser et al. (1991) Valli et al. (1992) Wittich et al. (1992) Monna et al. (1993) Takada et al. (1996) Sato et al.(1997) Schmid et al. (1997) Armengaud & Timmis (1998) Hammer et al. (1998)
Diphenylether Nitrofen Fomesafen (Flex ®) 4-Bromphenylphenylether	 **Nitrofen**  **Fomesafen**	Herbizide Insektizide	*Pseudomonas* *Sphingomonas*	Pfeifer et al. (1989) Engesser et al. (1990) Topp & Akhtar (1991) Schmidt et al.(1992a, 1992b) Dehmel et al.(1995)

Inhalation RfC (Referenz-Konzentration) oder Oral-RfD (Referenz für Dosierung), die jeweils aus der Tagesimmission und –einnahme mit dem wahrscheinlichen Äquivalent abgeschätzt wird, beurteilt eine chronische Einwirkung in den nicht-krebserregenden Fällen. EPA ordnete 190 flüchtige toxische Chemikalien nach den folgenden Stufen ein: A, B1, B2, C, D und E, um die Carcinogenität schnell zu erkennen. Die Emissionsdaten im Jahr 1994 wurden aus ′Toxic Release Inventory (TRI)′ in den U.S.A. angeführt (Tab. 1-1). In der Tabelle 1-2 sind synthetische Etherchemikalien aufgeführt, die in Industrien, Landwirtschaften und Haushalten vorkommen. Sogar befinden sich heutzutage diese Etherchemikalien überall in Abfallprodukten bzw. Nebenprodukten von öffentlichen Prozessen wie z.B. Abfallversorgungen, Abgasreinigungen und öffentlichem Verkehr. Dazu sind in der Tabelle 1-2 Mikroorganismen aufgeführt, die eine bestimmte Etherbindungsklasse als Substrate verwerten oder umsetzen können.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Etherchemikalien lassen sich zusammenfassend mit den Tabellen 1-1 und 1-2 bezüglich ihrer chemischen Strukturen, Eigenschaften und mikrobiellen Abbaubarkeiten in die folgenden 8 Gruppen aufgliedern.

i) Glykole
- *i-i)* Ethylenglykol und Diethylenglykol als Bausteine der Polymere
- *i-ii)* Glykolether wie z.B. Methoxyethanol und Ethoxyethanol

ii) Aliphatische Alkylether wie z.B. Diethylether

iii) Epoxide wie z.B. Ethylenoxid und Prophylenoxid

iv) Cyclische Alkylether
- *iv-i)* Homocyclische Alkylether wie z.B. Tetrahydrofuran
- *iv-ii)* Heterocyclische Alkylether wie z.B. Morpholin
- *iv-iii)* Cyclische Polyether wie z.B. 1,4-Dioxan

v) Aralkylether wie z.B. Anisol (Methoxybenzol)

vi) Diarylether
- *vi-i)* Cyclische Diarylether wie z.B. Dibenzofuran
- *vi-ii)* Diphenylether

vii) Benzylether wie z.B. Dibenzylether

viii) Benzylphenylether

1.2.1. Glykole und Glykolether

Polyethylenglykole (PEG, Polyoxyethylene), Polypropylenglykole und Polybutylenglykole werden heutzutage in Industrien, Landwirtschaften und Haushalten als nicht-ionische Detergenzien und Tensid massiv verbraucht, und die Abfälle fließen in kommunale Abwässer ein. Manche handelsübliche Produkte enthalten Etherbindungen, die einerseits aus einer hydrophoben Alkyl- bzw. Aralkylgruppe und anderseits aus einem hydrophilen Polyethylenglykol zusammengesetzt werden (Cross, 1987). In der Abbildung 1-1 zeichnen sich einige typische Strukturen von Polyethylenglykolen ein. Hydrophobe Aralkylgruppen wie z.B. Nonylphenol sind schwer abbaubar, und lassen sich als ′dead-end′-Produkte in der Natur beständig bleiben. Dieses Exoestrogen ruft manchmal endokrinologische Probleme hervor, wenn es ins Grund- oder Abwasser gelangt (John & White, 1998). Es is jedoch unbekannt, ob sich die gegenwärtig konsumierte Menge an Polyglykolen auf die menschliche Gesundheit schädlich einwirken kann (U.S. EPA, 1995c).

Ethylenglykol ist nicht nur als ein Baustein von Polyglykolen, sondern auch als Frostschutzmittel, Enteisungsmittel auf Brücken und Flughäfen, Lack- und Plastik-lösungsmittel, usw. gebräuchlich. Im Jahr 1993 betrug die gesamte Luftfreisetzung ca. $4{,}6 \times 10^5$ Tonnen allein in den U.S.A. (Timm, 1996), aber die toxische Einwirkung bei der Inhalation ist noch unbekannt, ob es akut oder chronisch einwirkt.

Einige Studien über den Polyglykolabbau berichteten, daß PEG nicht oxidativ abgebaut wird. Indem eine terminale Hydroxylgruppe zum benachbarten C-Atom umgelagert wird, bildet sich ein instabiles Halbacetal. Als Katalysator ist die Umlagerungsreaktion des Vitamins B_{12} benötigt. Daraus entstandene Halbacetal zerfällt spontan in ein um zwei C-Atome verkürztes PEG und ein Acetaldehyd (Nicht-oxidative Exospaltung, Abb. 1-2A: White et al., 1996; John & White, 1998).

Obradors und Aguilar (1991) behaupteten, daß PEG unter Beteiligung einer PEG-Dehydrogenase vom Stamm *Pseudomonas stutzeri* JA1001 an der peripheren Zellmembran oxidativ abgebaut wird. Daraus entsteht Glyoxylat als Hauptmetabolit. Glyoxylat wird dann unter Beteiligung eines Schlüsselenzymes (i.e. Malat-Synthase) während des kreisenden Stoffwechsels von Di-carbonsäuren assimiliert (oxidative Exospaltung, Abb. 1-2B).

Der *Pseudomonas* Stamm DES1 kann PEG an verschiedenen Endo-Positionen hydroxylieren. Demzufolge werden Abbauprodute mit verschiedenen Kettenlängen hergestellt (oxidative Endospaltung: Griffiths et al., 1987).

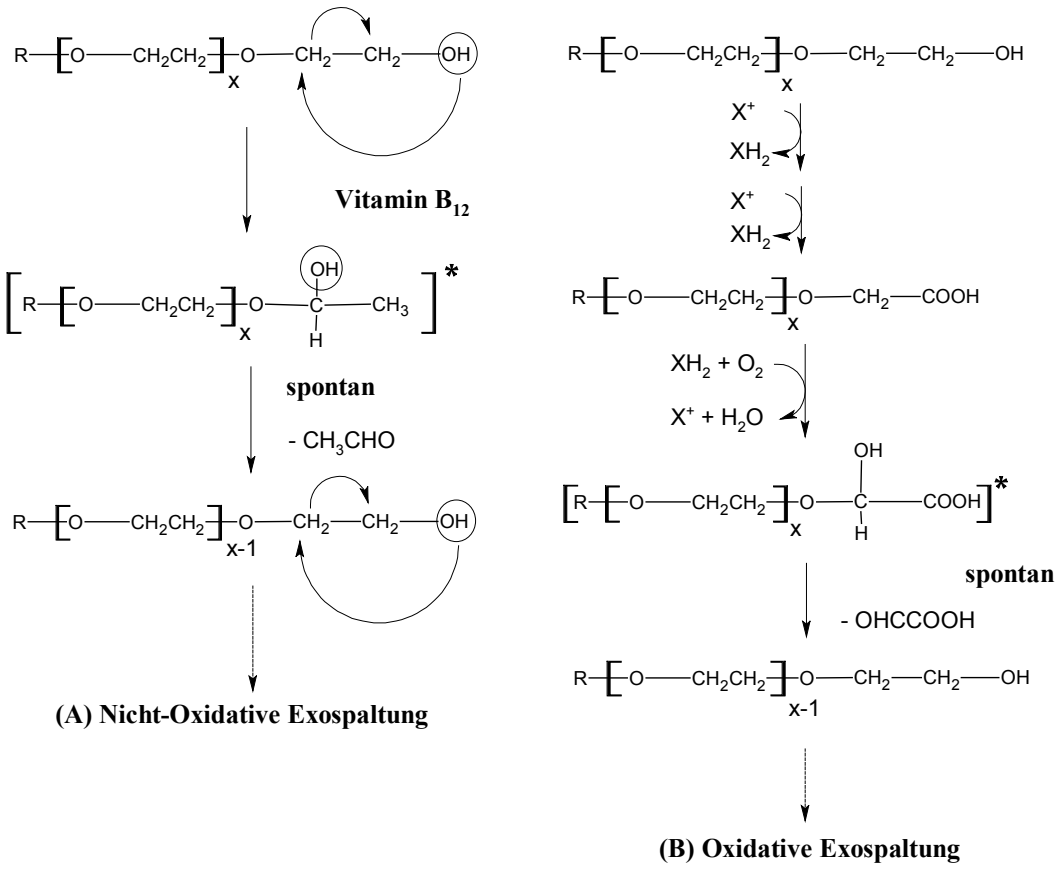


Abb. 1-2. Postulierte hypothetische Abbauwege der Polyethylenglykole: **(A) Nicht-oxidative Umlagerung** einer Hydroxylgruppe am terminalen Kohlenstoffatom zum benachbarten Kohlenstoffatom. Diese Reaktion benötigt eines Coenzymes Vitamin B_{12}. Je nach der Umlagerungsreaktion entsteht ein instabiles Halbacetal, woraus ein Acetaldehyd spontan freigesetzt wird. **(B) Oxidative Exospaltung** erfolgt mit den zweimaligen Dehydrogenierungsreaktionen am terminalen Kohlenstoffatom. Danach geschieht die einmalige Cα-Monooxygenation, und ein Glyoxylat wird dann als Folgemetabolit freigesetzt.

PEG kann auch von anaeroben Bakterien wie z.B. *Pelobacter propionicus*, *Acetobacterium* sp., usw. durch katalytische Umlagerungsreaktion einer Hydroxylgruppe am terminalen Kohlenstoffatom abgebaut werden (vgl. nicht-oxidative Exospaltung: Wagener & Schink, 1988).

Toxische Glykolether, wie z.B. Methoxyethanol und Ethoxyethanol, werden aus verschiedenen Quellen zunehmend freigesetzt. In der aeroben Hydrosphäre werden sie durch Nonylphenolethoxylate-, Polyether- oder Glykolether-abbauende Bakterien wie z.B. *Pseudomonas, Xanthobacter* usw. oxidativ abgebaut und assimiliert (Maki et al., 1994; Kawai, 1985 und 1995).

1.2.2. Diarylether

″Dioxin″ spielt eine hervorragende Rolle als Schlagwort in der öffentlich geführten Diskussion um die Auswirkungen eines jahrzehntelangen und sorglosen Umgangs von umweltgefährdenden Chemikalien. Zahlreiche Zwischenfälle, die teilweise zur massiven Schädigung von Menschen und Umwelt geführt haben, brachten die Gefährlichkeit dieser Bindungsklasse ins öffentliche Bewußtsein. Bei genauer Betrachtung wird unter Verwendung des Oberbegriffes ″Dioxin″ eine Vielzahl von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen (Dioxinen, PCDD) und Dibenzofuranen (Furanen, PCDF) summiert. Die Biodegradation und Biotransformation solcher Substanzen ist daher von großem Interesse.

In dieser Kategorie werden allerdings Diphenylether und seine Derivate wie z.B. Nitrofen, Fomesafen, Pentabrom- und Octabromdiphenylether, usw., die möglicherweise als human-carcinogen eingestuft werden, eingeschlossen. Sie befinden sich in Herbiziden, Insektiziden und Nebenprodukten von Halogenchemieindustrien, und die RfD (Referenz für Dosierung) beträgt niedriger als $1{,}3 \times 10^{-2}$ mg/kg pro Tag (U.S.EPA, 1996).

Es werden immer mehr Studien über den mikrobiellen Abbau von Diarylethern (z.B. Dibenzofuran, Diphenylether, Dibenzo-*p*-dioxan) durchgeführt. Daraus wird festgestellt, daß Diarylether, wie z.B. Diphenylether (Pfeifer et al., 1993), Dibenzofuran (Engesser et al.,1989) und Dibenzo-*p*-dioxin (Wittich et al., 1992), durch bakterielle Dioxygenierung unter Bildung von *cis*-Diendiolen (Dihydrodiolen) abgebaut werden. Zum Beispiel wird Dibenzofuran an den 2,3-Positionen des Kernringes neben dem Sauerstoffatom oxygeniert, damit sich ein instabiles Halbacetal bildet. Da die Aromatizität des Benzolringes aufgehoben wird, wird das Halbacetal unter Rearomatisierung (Enol-Tautomerie) spontan abgespalten, um ins 2,2′,3-Trihydroxybiphenyl überzugehen. In der Abbildung 1-3(A) wird die typische anguläre Dioxygenierung des Dibenzofurans mit dem *Terrabacter* Stamm DPO360 (Engesser et al., 1989; Schmid et al., 1997) dargestellt.

Wittich et al. (1992) bestätigten die primäre anguläre Dioxygenierungsreaktion am Abbau von Dibenzofuran und Dibenzo-*p*-dioxin durch bakterielle Kultur *Sphingomonas* sp. RW1, wobei 2,2′,3-Trihydroxybiphenyl und 2,2′,3-Trihydroxydiphenylether als spontane Abbauprodukte von den instabilen Halbacetalen (i.e. 2,3-*cis*-Dihydrodiolen) nachgewiesen wurden.

Die Carbazol-1,9a-Dioxygenase vom *Pseudomonas* Stamm CA10 setzt auch Dibenzo-*p*-dioxin und Dibenzofuran zu den entsprechenden Metaboliten 2,2′,3-Trihydroxydiphenylether und 2,2′,3-Trihydroxybiphenyl um. Diese Reaktion geschieht unter Beteiligung einer angulären Dioxygenase, wie oben erwähnt. Daraus wird angenommen, daß die Carbazol-1,9a-Dioxygenase eine anguläre

Dioxygenierungsreaktion nicht nur mit *O*-heterocyclischen Substratanaloga katalysiert, sondern auch mit *N*-heterocyclischem Carbazol (Sato et al., 1997).

Andererseits gibt es zwei unterschiedliche Abbauwege von Diphenylether. Einerseits wird Diphenylether mit einem 2,3-Dioxygenasesystem vom Stamm *Pseudomonas cepacia* Et4 primär oxygeniert (Abb. 1-3(C), Pfeifer et al., 1993). Diese Enzymaktivität vollzieht aber keine spontane Etherspaltung nach der primären 2,3-Dioxygenierung von Diphenylether, ohne das instabile Halbacetal zu bilden. Daraus entsteht Diphenylether-2,3-dihydrodiol als Schlüsselintermediat. Diphenylether-2,3-dihydrodiol wird dann durch enzymatische Reaktionen mit einer Dehydrogenase und einer 2,3-Dihydroxydiphenylether-1,2-dioxygenase (extradiolisch arbeitende *meta*-Dioxygenase) weiter abgebaut. Im Vergeilch dazu werden Diphenylether und die substituierten Derivate (z.B. 3-Methyldiphenylether) mit einem 1,2-Dioxygenasesystem vom *Sphingomonas* Stamm SS3 unter Bildung von den instabilen Halbacetalen abgebaut (Abb. 1-3(B), Schmidt et al., 1992a und 1992b), so ähnlich wie oben beim Abbau von cyclischen Diarylethern erwähnt. Wurde der Stamm SS3 an 4,4′-Difluordiphenylether einige Wochen lang adaptiert, evolvierte sich daraus der Stamm SS33, der auch 4,4′-Dichlordiphenylether als einzige C/E-Quelle verwerten konnte. Der evolvierte Stamm SS33 setzt 4,4′-Dibromdiphenylether und 2,4-Dichlordiphenylether zu den entsprechenden Halophenolen und Halobrenzkatechinen um (Schmidt et al., 1993).

Pseudomonas pseudoalcaligenes POB310 baut 3-Carboxydiphenylether und 4-Carboxydiphenylether durch eine anguläre 1,2-Dioxygenierungsreaktion via instabile Halbacetale stöchiometrisch zu Phenol und Protocatechusäure ab (Engesser et al., 1990; Dehmel et al., 1995). Ähnlich baut der *Pseudomonas* Stamm ET1 auch 3-Carboxydiphenylether und 4-Carboxydiphenylether zu Phenol ab (Topp & Akhtar, 1991). Bei diesen unterschiedlichen Abbaumikroorganismen wurde aber kein Abbau von 2-Carboxydiphenylether bestätigt.

Bisherige Studien liegen vor, daß Pilzstämme kein primäres Dioxygenasesystem für den Abbau von Dibenzofuran und Dibenzo-*p*-dioxin besitzen, sondern daß sich ihre Monooxygenasesysteme daran beteiligen. Der bekannteste Weißfäulepilzstamm Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* baut 2,7-Dichlordibenzo-*p*-dioxin zum Schlüsselmetabolit 1,2,4-Trihydroxybenzol ab, wobei die Lignin-Peroxidase zur oxidativen [C-O-C]-Spaltung unter Bildung von 4-Chlor-1,2-benzochinon und 2-Hydroxy-1,4-benzochinon aktiv ist. Beim weiteren Abbau dieser Folgemetabolite (z.B. 1,2,4-Trihydroxybenzol) spielen die intrazelluläre Enzymsysteme eine Rolle (Valli et al., 1992). Als ein anderes Beispiel baut der Weißfäulepilzstamm *Phanerochaete sordida* YK-624 vier bis acht congenere polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) und Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) unter ligninolytischen Bedingungen ab (Takada et al., 1996). Die Hefestamm *Trichosporon mucoides*

spaltet keine Etherbindung von Dibenzofuran und Dibenzo-*p*-dioxin ab, sondern monooxygeniert sie nur an der angulären Position (Hammer et al., 1998).

Diphenylether und cyclische Diarylether wie z.B. Dibenzofuran und Dibenzo-*p*-dioxin unterscheiden sich bezüglich ihrer chemischen Strukturen und biochemischen Abbaumechanismen. Dementsprechend gliedern sich Diarylether-abbauende Bakterien in die zwei Stammgruppen auf, nämlich die cyclische Diarylether-Abbauer und die offenkettige Diphenylether-Abbauer.

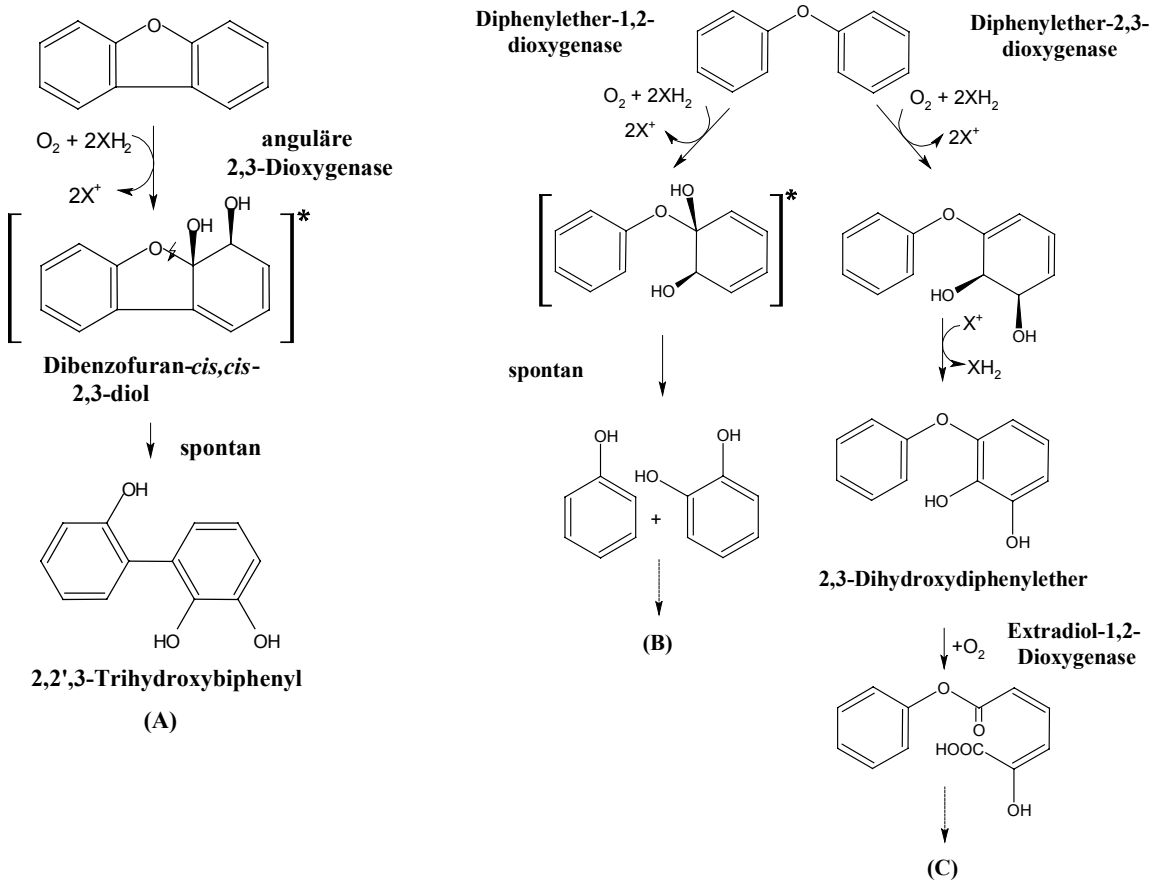


Abb. 1-3. **Postulierte Abbauwege von Dibenzofuran und Diphenylether: (A) Der Abbau von Dibenzofuran durch eine anguläre Dioxygenierungsreaktion:** Als Folgemetabolit wird 2,2′,3-Trihydroxybiphenyl nachgewiesen. **(B) Der Abbau von Diphenylether durch eine 1,2-Dioxygenierungsreaktion:** Phenol und Brenzcatechin werden stöchiometrisch gebildet. **(C) Der Abbau von Diphenylether durch eine 2,3-Dioxygenierungsreaktion ohne Bildung des instabilen Halbacetals:** Dann beteiligen sich einer Dehydrogenase und einer Extradiol-1,2-dioxygenase an der Ringspaltung des 2,3-Diphenols weiter.

1.2.3. Aliphatische Alkylether

Flüchtige Alkylether sind bekannt für Anästhetika, wie z.B. Endoflurane, Isoflurane, I-653, usw. Sie Werden sie unter Beteiligung von Cytochromen-P450 abgebaut, bewirken sie akute immunologische und hepatische Erkrankungen mit den Folgemetaboliten, sog. Trifluoraldehyden (Abb.1-4, Elliott & Strunin, 1993). Daher ist ihre Nutzung heutzutage kritisch.

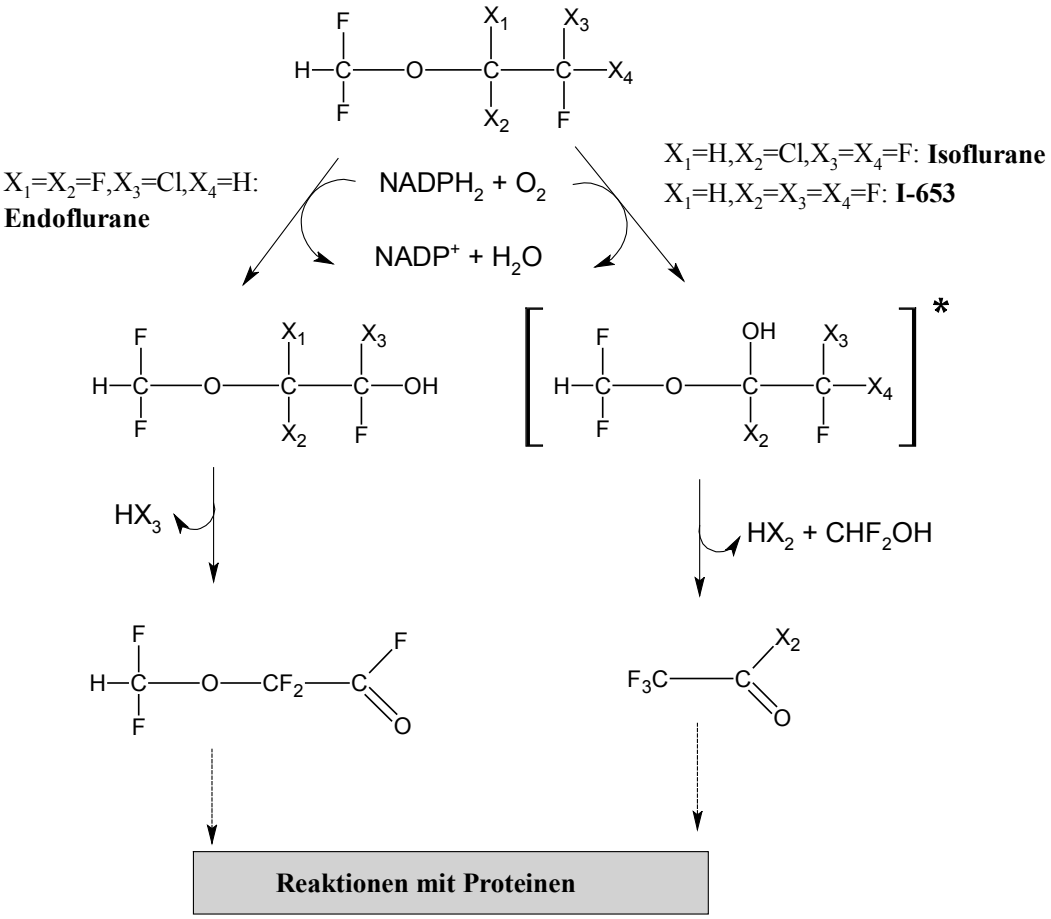


Abb. 1-4. Der Abbau von etherischen Anästhetika unter Beteiligung von Cytochrom-P450-Enzymen in der Leber: Die Folgemetabolite Trifluoraldehyde (TFA) verursachen besonders eine immunologische Hepazytose, weil sie mit Proteinen reaktiv sind.

Eine aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) gereinigte Methan-Monooxygenase oxidiert den einfachsten Ether, Dimethylether, stöchiometrisch zu Formaldehyd und Methanol. Methoxymethanol wird dabei als ein instabiles Zwischenintermediat nachgewiesen (Stirling & Dalton, 1980). Eine gereinigte Dehalogenase vom 1,6-Dichlorhexan abbauenden Stamm GJ70, mit dem 1-Halo-n-Alkane (C5 ~ C9), sekundäre Alkylhalogenide und halogenierte Alkohole dehalogenieren, kann auch halogenierte Ether, wie z.B. 2-Chlorethylvinylether und Bis-(2-chlorethyl)-ether, umsetzen, um Chlorid (Cl^-)-Ionen freizusetzen (Dehalogenierung, Janssen et al., 1988).

Der Stamm *Burkholderia cepacia* G4/PR1, der eine Toluol-2-Monooxygenase konstitutiv besitzt, verwertet nach der Toluol-Anzucht Diethylether als einzige C/E-Quelle zufällig, während der Wildtyp mit Diethylether nicht wächst (Hur et al., 1997). Die Diethylether-abbauenden Zellen oxidieren auch Butylmethylether, Diethylsulfid und 2-Chlorethylethylether. Die gereinigte Toluol-2-Monooxygenase spaltet Diethylether stöchiometrisch zu Ethanol und Acetaldehyd ab. Steffan et al. (1997) berichteten, daß einige Propan-abbauende Stämme, die mit Propan wachsen, Benzin-Antiklopfmittel, wie z.B. Methyl-*tert*-butylether (MTBE), Ethyl-*tert*-butylether (ETBE) und *tert*-Amylmethylether (TAME), abbauen. MTBE und ETBE werden stöchiometrisch zu *tert*-Butanol und den jeweiligen Aldehyden abgebaut. Das von MTBE freigesetzte Formaldehyd wird dann weiter mineralisiert, und *tert*-Butylalkohol wird via 2-Methyl-2-Hydroxy-1-propanol zu 2-Hydroxyisobuttersäure oxidiert. Kein Abbauprodukt dient aber zum Zellwachstum. Es wird vermutet, daß sich ein lösliches Cytochrom-P450-Enzymsystem an den beiden Oxidationen von MTBE und *tert*-Butanol beteiligt. Ähnlich oxidiert das Cytochrom-P450cam-Enzymsystem von *Pseudomonas putida* CAM MTBE zu *tert*-Butanol.

Mo et al. (1997) isolierten einige MTBE-abbauende Stämme, die innerhalb von *Methylobacterium, Rhodococcus* und *Arthrobacter* zugeordnet wurden. Sie verwerten *tert*-Butanol als einzige C/E-Quelle, aber mineralisieren MTBE nur langsam (ca. 8 % $^{14}CO_2$-Freisetzung pro Woche). Ein Nitrifizier-Stamm *Nitrosomonas europaea*, dessen Ammoniak-Monooxygenase Ammoniak zu Hydroxylamin oxidiert, und dessen Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO, P460, EC 1.7.3.4, Mr = 17300 ~ 18500, Numata et al., 1990) Hydroxylamin weiter zu Nitrit autotroph dissimiliert, baut Dimethylether unter Beteiligung der Ammoniak-Monooxygenase stöchiometrisch zu Formaldehyd und Methanol ab. Solange sich der Abbau von Dimethylether cooxidativ ereignet, hemmt Dimethylether die Ammoniak-Monooxygenaseaktivität zur Nitrifikation kompetitiv (Hyman et al., 1994).

Ein *Graphium* Pilzstamm, der n-Butan und Diethylether als einzige C/E-Quelle verwertet, cooxidiert MTBE via *tert*-Butylformat als ein transitorisches Intermediat mit dem Cytochrom-P450-Enzymsystem (Hardison et al., 1997), um *tert*-Butanol zu bilden.

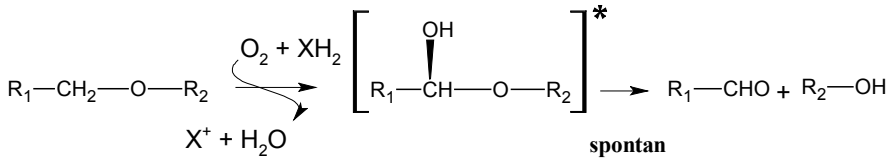


Abb. 1-5. **Hypothetische Abbauwege von Alkylethern durch enzymatische Monooxygenierung:** Als Intermediat bildet sich ein Halbacetal, das stöchiometrisch ins Alkohol und Aldehyd spontan zerfällt.

In der Abbildung 1-5 geht es um die hypothetischen Abbauwege von Alkylethern, worauf ein Alkyl-C-Atom neben dem Sauerstoffatom initial oxygeniert wird.

Ligninasen von Weißfäulepilzen, z.B. von *Phanerochaete chrysosporium*, zeigen umfangreiche Oxidationspotentiale auf schwer abbaubare PAKs und verschiedene Etherverbindungen von Lignin, aber sie können weder Polyethylenglykole noch Alkylether (z.B. MTBE) abbauen (Kay-Shoemake & Watwood, 1996).

1.2.4. Cyclische Alkylether

Bernhardt und Diekmann (1991) isolierten einige cyclische Alkylether abbauende Stämme, die zu *Rhodococcus* angehörten. Alle verwerten 1-Butanol, Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran als einzige C/E-Quelle, und zwei Stämme davon wachsen auch mit 1,4-Dioxan. Die Wachstumsverhalten vom Stamm *Rhodococcus* sp. 219 bestätigten, daß cyclische Alkylether an der 2-Position primär hydroxyliert werden. Bock et al. (1996) unterstützten diese Behauptung dadurch, daß *Rhodococcus ruber* 219, der Diethylether und cyclische Alkylether, wie z.B. Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran verwerten, 2,5-Dimethyltetrahydrofuran durch eine Hydroxylierungsreaktion an der 2-Position zu 2-Hydroxyhexan-5-on und Hexan-2,5-dion umsetzt.

Parales et al. (1994) isolierten einen Actinomycete Stamm CB1190, der 1,4-Dioxan als einzige C/E-Quelle verwertete. Der Stamm CB1190 wächst nicht nur heterotroph mit 1,3-Dioxan, 2-Methyl-1,3-dioxolan, Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, Diethylether oder n-Butylmethylether, sondern auch autotroph nur mit molekularem Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid.

Es gibt noch keine Berichte, daß Tetrahydrofuran-, Tetrahydropyran- bzw. 1,4-Dioxan-abbauende Bakterien *N*-heterocyclische Alkylether wie z.B. Morpholin als einzige C/E- bzw. C/N-Quelle verwerten, oder zumindest cooxidativ umsetzen kann. Mazure und Truffaut (1994) berichteten, daß der Stamm *Mycobacterium aurum* MO1, der *N*-heterocyclische Verbindungen, wie z.B. Morpholin,

Piperidin, und Pyrrolidin, als einzige C/N-Quelle verwertet, aber weder *S*-/*O*-heterocyclische Verbindung, wie z.B. Thiophen, Tetrahydrofuran, und Tetrahydropyran, noch ungesättigte *N*-heterocyclische Verbindung, wie z.B. Pyrrol und Pyridin, abbaut. Combourieu et al. (1998) und Poupin et al. (1998) behaupteten, daß sich ein Cytochrom-P450 an der primären Monooxygenierung von Morpholin beteiligen, und daß die initiale Angriffstelle kein Kohlenstoffatom neben dem Sauerstoffatom ist, sondern ein Kohlenstoffatom neben dem Stickstoffatom.

Das Schlüsselenzym vom Stamm *Pseudomonas fluorescens* CAS102, das Morpholin initial oxidieren kann, ist auf einem Plasmid (140 kb) kodiert. Während des Stoffwechsels des Morpholins wird das spätere Wachstum durch Akkumulation des daraus freigesetzten Ammoniaks allmählich gehemmt (Chandrasekaran & Lalithakumari, 1998).

1.2.5. Epoxide als Zwischenprodukte des Abbaues von Kohlenwasserstoffen

Epoxide entstehen aus Alkenen und Halohydrinen sowohl durch enzymatische Monooxygenierung als auch durch ultraviolette Sonneneinstrahlung. Während biologischen Stoffwechsels sind verschiedene Enzymsysteme von Prokaryoten bis höhere Eukaryoten (z.B. Menschen) für die Epoxibildung verantwortlich. Epoxide sind wegen der chemischen Struktur (z.B. Bindungswinkel) und elektronenanziehenden Effektes von Sauerstoffatom instabil und radikal reaktiv.

Besonders sind niedermolekulare Alkyloxide, wie z.B. Ethylenoxid, Propylenoxid, 1-Epoxybutan sowie Styroloxid, und ihre korrespondierenden Edukte, wie Ethylen, Propylen, 1-Buten und Styrol, toxisch. Hierbei wird eine strenge Emissions- und Immissionskontrolle zur Abgasreinigung angebracht, einmal wegen ihrer Toxizität (Tab. 1-1) und zum anderen wegen ihrer sekundären Reaktivität in der Luft (z.B. Ozonbildung).

Der Abbau von Epoxiden wird mit verschiedenen Enzymsystemen wie z.B. Hydrolasen bzw. Epoxidasen (Ensign, 1996, Archer, 1997), Isomerasen (Panke et al., 1998), NAD^+/NADPH-abhängige-Carboxylasen (Allen & Ensign, 1998) katalysiert, deren Aktivitäten jeweils vom abbauenden Organismus abhängig sind.

1.2.6. Aralkylether

4-Jodanisol wird in Gegenwart von Mikrosomen der Rattenleber entweder oxidativ oder nicht-oxidativ umgesetzt. Damit erhalten sich 4-Jodphenol, 2-Jod-5-methoxyphenol, 2-Methoxy-5-jodphenol, 4-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol im Verhältnis von 5 : 2 : 4 : 1 : 1. Aus dieser

Zusammensetzung haben Rizk und Hanzlik (1995) vorgeschlagen, daß sich ein Cytochrom-P450-Enzym auch an der reduktiven Dejodierung beteiligt.

Resnick und Gibson (1993) versuchten, Anisol (Methoxybenzol) und Phenetol (Ethoxybenzol) mit verschiedenen Biosystemen, die aus Wildtyp-Stämmen, Mutanten und Rekombinanten zusammengesetzt werden, umzusetzen. Jedes Biosystem enthält diejenige Oxidase, die Toluol, Naphthalin, oder Biphenyl oxidieren kann. Ein Toluol-abbauender Stamm *Pseudomonas putida* F39/D, der Toluol zu Toluol-2,3-dihydrodiol oxidieren kann, setzt mit einer induzierten Toluol-Dioxygenase Anisol und Phenetol zu Anisol-2,3-dihydrodiol und Phenetol-2,3-dihydrodiol um. Anisol und Phenetol werden entweder mit einer Naphthalin-Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816/11 oder einer Biphenyl-Dioxygenase von *Beijerinckia* sp. B8/36 zu Phenol und Ethylenoxybenzol umgesetzt. Sie werden auch mit einer TOL-Monooxygenase (TOL Plasmid PpBG1) von *Pseudomonas putida* BG1 zu Phenol umgesetzt. Eine Toluol-4-Monooxygenase von *Pseudomonas mendocina* oxidiert Anisol zu 4-Methoxyphenol, und Phenetol zu verschiedenen Isomeren wie z.B. 2-Ethoxyphenol, 3-Ethoxyphenol und 4-Ethoxyphenol. Daraus folgt, daß verschiedene Oxygenasesysteme entweder an der Kernoxidationsreaktion oder *O*-Dealkylierungsreaktion mit Aralkylethern beteiligen.

Der Stamm *Rhodococcus rhodochrous* 116 induziert zwei immunologisch verschiedene Arten von Cytochromen-P450, nämlich $P450_{RR1}$ und $P450_{RR2}$, je nach der Anzucht mit 2-Ethoxyphenol oder 4-Methoxybenzoesäure. Jedes Cytochrom-P450 zeigt die eigene Substratspezifität an der substituierten Alkoxylgruppe(n) von Phenolen und Benzoesäuren (Karlson et al., 1993).

Wie in der Abbildung 1-6 zu sehen ist, wird der Abbau von Aralkylethern entweder durch eine Kernoxidation (z.B. 2-Monooxygenierung oder 2,3-Dioxygenierung) oder eine Alkylmonooxidation (i.e., *O*-Dealkylierung) von verschiedenen bakteriellen Oxygenasesystemen eingeleitet.

Die *O*-Demethylierung von Aralkylethern ist auch eine der bekanntesten Initialreaktionen für den Ligninabbau von Weißfäulepilzen. Dadurch metabolisiert der bekannteste Weißfäulepilzstamm, *Phanerochaete chrysosporium,* Aralkylether unter Beteiligung von Lignin-Peroxidasen (LiP), Mangan-Peroxidasen (MnP) und Laccasen (Phenol-Oxidasen).

Nicht-oxidative *O*-Demethylierung von Aralkylethern wird vom Tetrahydrofolsäure-Corrinring-*O*-Demethylasesystem unter anaeroben Bedingungen katalysiert. So setzt der Stamm *Acetobacterium dehalogenans ortho*-hydroxylierte Aralkylether (*ortho*-System) wie z.B. Vanillinsäure zu 3,4-Dihydroxybenzoesäure um (Kaufmann et al., 1998).

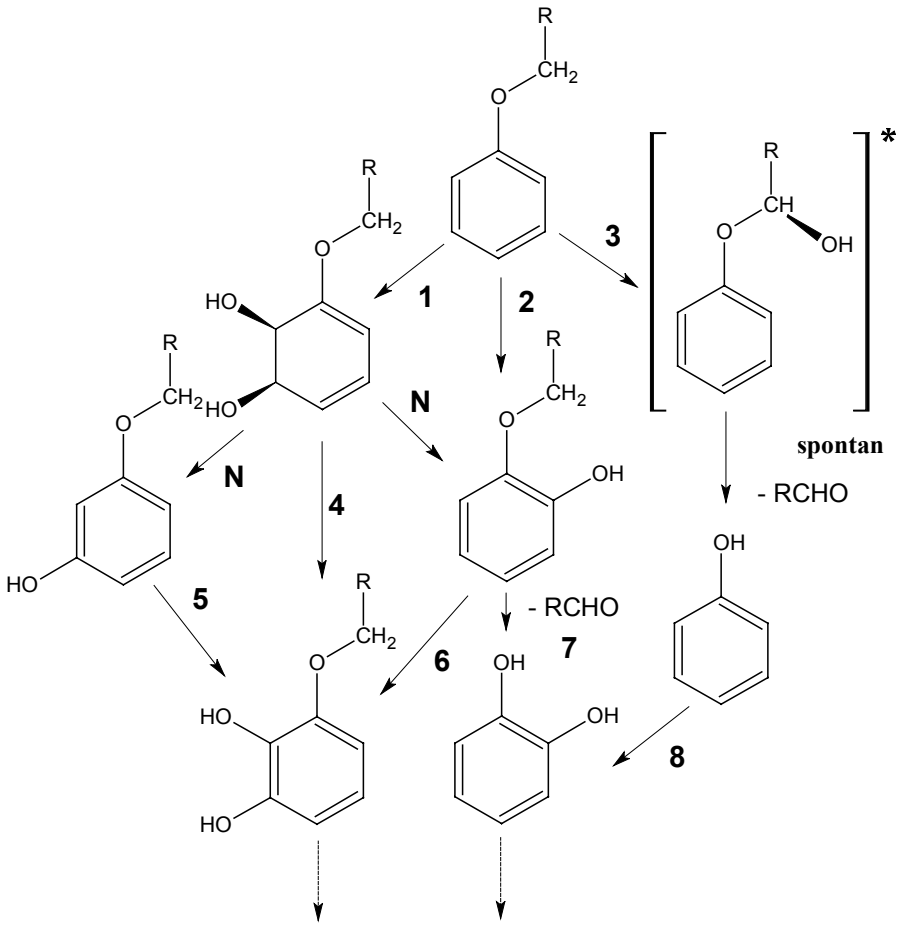


Abb. 1-6. **Postulierte Abbauwege von Aralkylethern: 1**. 2,3-Dioxygenation **2**. 2-Monooxygenation **3**. *O*-Dealkylation **4**. Dehydrogenation **5**. 3-Hydroxyaralkylether-2-monooxygenation **6**. 2-Hydroxyaralkylether-3-monooxygenation **7**. 2-Hydroxyaralkylether-*O*-dealkylation (Cytochrom-P450-Enzym), **8**. Phenol-Hydroxylation **N**. Nicht-enzymatische Dehydratation

Nicht-oxidative *O*-Demethylierung von Aralkylethern erfolgt auch unter Beteiligung der Tetrahydrofolsäure-Corrinring-*O*-Demethylase vom absolut anaeroben acetogenen Stamm *Holophaga foetida* TMBS4. Dieser Stamm besitzt verschiedene Dealkylasesysteme, die je nach der Anzucht entweder mit *ortho*-hydroxyliertem bzw. -methoxyliertem Aralkylether (*ortho*-System; z.B. 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure) oder *meta*-hydroxyliertem Aralkylether (*meta*-System; z.B. 3-Hydroxyanisol und 3,5-Dihydroxyanisol) unterschiedlich induziert werden (Kreft & Schink, 1997).

Daniel et al. (1991) beobachteten eine breite Demethylaseaktivität vom acetogenen *Clostridium thermoaceticum* (ATCC39073) für verschiedene Aralkylether, wie z.B. 1,2,3-Trimethoxybenzol, 2,3-Dimethoxyphenol, 2,6-Dimethoxyphenol und 3-Methoxybrenzkatechin. Die *O*-Demethylierungs-

reaktion verläuft nur in Gegenwart von Kohlenmonoxid, und die *O*-Demethylase ist wahrscheinlich in der Plasmamembran fest verankert.

1.2.7. Dibenzylether und Benzylphenylether

Dibenzylether (CAS Nr. 103-50-4) ist ein Nahrungsadditiv, das von der amerikanischen ´Food and Drug Administration´ (FDA) genehmigt ist. Das wird als ein synthetisches Aroma in der Nahrungszubereitung verwendet. In den USA wurden ca. 2000 Kilogramm jährlich verbraucht. Damit wird gerechnet, daß eine Person in den USA durchschnittlich 23,6 µg täglich einnimmt. Diese Menge - als Nahrungsadditiv aufgenommen – scheint auf die Menschen keine Wirkung auszuüben (Burdock & Ford, 1992).

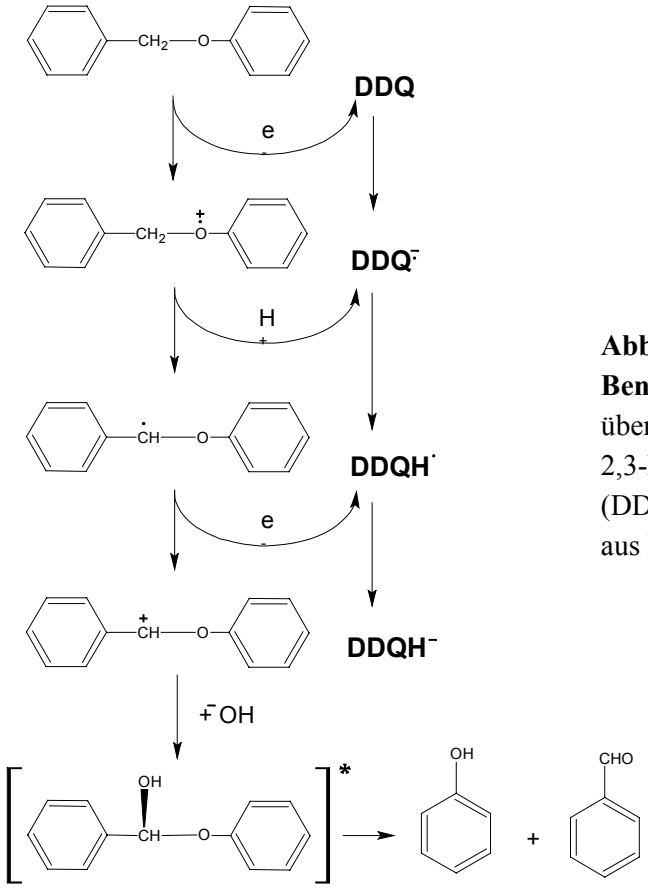


Abb. 1-7. Chemische Etherspaltung von Benzylphenylether durch eine Elektronen übertragende Reaktion in Gegenwart von 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) als Elektronenakzeptor (modifiziert aus Penn & Lin, 1990)

Penn und Lin (1990) versuchten ***chemische*** Etherspaltung synthetischer Benzylphenylether via instabile Intermediate, sog. σ-Komplexe (Arenium-Ionen). Damit erhalten sich Benzaldehyde und Phenole als Folgeprodukte stöchiometrisch, wenn 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) als ein Elektronenakzeptor fungiert (Abb. 1-7). Aber ***biologische*** Abbaumechnismen von Dibenzylether und Benzylphenylether sind noch unbekannt.

1.3. Bekannte Enzymsysteme für die monooxidative Etherspaltung

Wie oben beschrieben, werden manche Etherverbindungen außerhalb von Diarylethern durch enzymatische Monooxygenierung abgebaut. Dadurch entstehen Aldehyde und Alkohole stöchiometrisch.

Monooxidative Enzymsysteme werden - in unterschiedlicher Präzision der Begriffsbildung - als ′eine hypothetische Monooxygenase′, ′ein Cytochrom-P450-Enzym′, oder sogar eine ′Peroxidase′ gekennzeichnet. Im folgenden werden Cytochrome-P450 und Peroxidasen als die bekanntesten Beispiele beschrieben.

1.3.1. Cytochrome-P450

Cytochrome-P450 gehören der ′Häm-Thiolat′-Gruppe an, weil der Porphyrinring mit einem Cysteinrest den fünften Ligand - einen Thioether - bildet. Cytochrome-P450 werden deshalb mit einem Sulfhydrylgift (z.B. *p*-Chlormercuribenzoesäure) stark gehemmt (Schenkman, 1993).

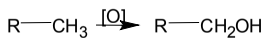
Cytochrom-P450-Enzyme katalysieren eine Monooxygenierungsreaktion, bei der in einem Elektronenübergang von NAD(P)H Elektronen über die Redoxin-Reduktase auf die prosthetische Gruppe Hämeisen übertragen werden. Als ein Beispiel ist die *Pseudomonas putida* Campher Hydroxylase (EC 1.14.15.1, P450cam) bekannt geworden:

$$\text{NADH} \rightarrow \text{Putidaredoxin Reduktase} \rightarrow \text{Putidaredoxin} \rightarrow \text{P450cam}$$

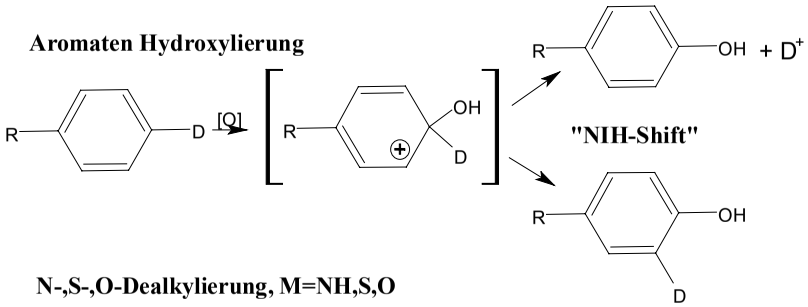
Das Cytochrom-P450-Enzym fungiert eigentlich als eine Monooxygenase. Hierbei wird ein Sauerstoffatom, das von Sauerstoffmolekül (O_2) dissoziiert, ans Substrat hinzugefügt, während das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird.

$$RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$$

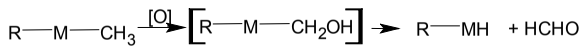
Aliphaten Oxidation



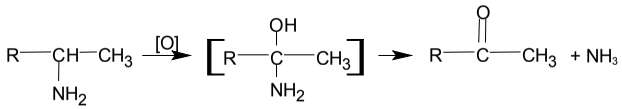
Aromaten Hydroxylierung



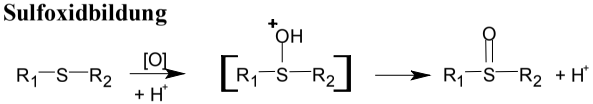
N-,S-,O-Dealkylierung, M=NH,S,O



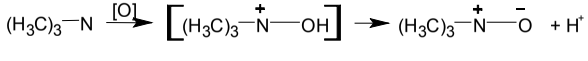
Oxidative Deaminierung



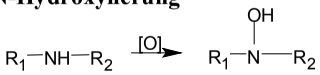
Sulfoxidbildung



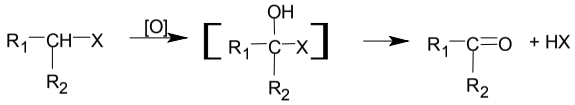
N-Oxidation



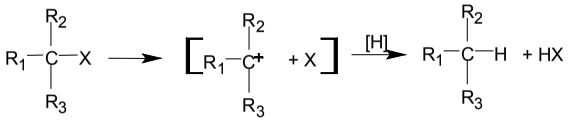
N-Hydroxylierung



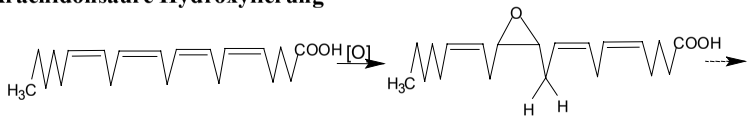
Oxidative Dehalogenierung



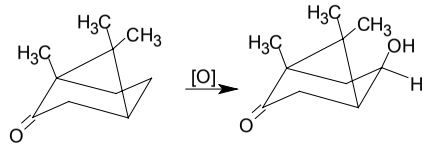
Reduktive Dehalogenierung



Arachidonsäure Hydroxylierung



Campher Hydroxylierung



Steroide Hydroxylierung, z.B. 17a-Hydroxylierung

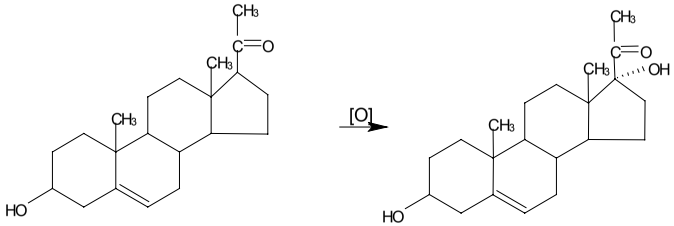


Abb. 1-8. Beispiele für diverse Funktionen der Cytochrom-P450-Enzyme

Das Absorptionsspektrum des Cytochrom-P450-Pigmentes ergibt in Gegenwart von Kohlenmonoxid ein charakteristisches Soret-Band bei 450 nm. Dafür ist der fünfte Ligand eines Cysteinrestes im Porphyrinringsystem, die sogenannte ′Thioetherbindung′, verantwortlich.

Cytochrom-P450-Enzymsysteme bestehen normalerweise aus vier unterschiedlichen Komponenten in der Membran (Elstner, 1990): einem Flavoprotein als einer Oxidoreduktase, einem Nicht-Hämeisen-Protein, einem b-Cytochrom (Cytochrom b_5) und einem Hämeisen-Protein (P450).

Wie aus der Abbildung 1-8 hervorgeht, haben Cytochrom-P450-Enzyme ein breites Substratspektrum sowohl an endogenen als auch exogenen Substanzen. Cytochrom-P450-Enzyme beteiligen sich an umfangreichen Reaktionen wie z.B. Monooxygenierung, Hydroxylierung, *N-, O-* und *S*-Dealkylierung, oxidativer Deaminierung, Sulfoxidbildung, *N*-Oxidation, *N*-Hydroxylierung, oxidativer bzw. reduktiver Dehalogenierung sowie Hydroxylierungen von Campher, Arachidonsäure und Steroiden.

Bei Abwesenheit von NAD(P)H und Sauerstoffmolekül katalysieren sie andererseits eine Hydroperoxid- bzw. Wasserstoffperoxid-abhängige Hydroxylierungsreaktion. Oxidative *O*-Dealkylierung erfolgt auch mit den Cytochrom-P450-Enzymen auf Kosten von zwei Elektronen, während Peroxidasen bei der Abstraktion eines Wasserstoffatomes nur ein Elektron kosten (Hollenberg, 1992). Für die Oxidation von Etherverbindungen katalysieren Cytochrom-P450-Enzyme eine α-Deprotonierung, und Peroxidasen radikale Reaktionen. Dazu fungieren Cytochrome-P450 auch als eine TPNH-Oxidase, um endogenes Wasserstoffperoxid herzustellen (Schenkman,1993).

Estabrook et al. (1982) fassten Cytochrom-P450-Enzymsysteme mit den folgenden Funktionen kurz zusammen: Sie können in Gegenwart von Sauerstoffmolekül auf Kosten von zwei Elektronen entweder *i)* Peroxide abbauen, oder *ii)* Peroxide bilden. Sie führen entweder *iii)* zur Heterolyse des von *ii*) entstanden Hydroperoxides unter Bildung von Epoxiden, oder *iv)* Homolyse, um Substrate zu hydroxylieren.

1.3.2. Ligninase

Eigentlich katalysieren Peroxidasen eine ′Ein-Elektronen-Oxidation′, während Cytochrom-P450-Enzyme eine Monooxygenierungsreaktion katalysieren. Die beiden Enzyme besitzen hoch valente Eisen-Ionen an ihren Aktivzentren für die Elektronen übertragende Reaktion. Die Peroxidaseaktivität ist abhängig von den chemischen Ionisierungspotentialen ihrer Substrate. Daher verlaufen diese

Enzymreaktionen unspezifisch, aber Cytochrom-P450-Enzyme führen zu den spezifischen Reaktionen an seinem Aktivzentrum (Wood, 1992).

Extrazelluläre Peroxidasen kommen allgemein in Lignin-abbauenden Fäulepilzen und Lignin-abbauenden Bakterien vor (Orth et al., 1993). Peroxidasen besitzen ein breites Substratspektrum und die Enzymaktivitäten sind stabil sogar unter außergewöhnlichen Reaktionsbedingungen, wie z.B. bei einer hohen Temperatur und einem sauren pH-Wert in organischen Lösungsmitteln. Sie spielen eine wichtige Rolle am Abbau der global reichen Ligninkomponenten, die ca. 35 % von gesamten organischen Substanzen in der Erde betragen. Lignin enthält heterogene Pflanzenbestandteile, die sich aus zahlreichen chemischen Verbindungen zusammensetzen. Deshalb sind seit langem Lignin-abbauende extrazelluläre Peroxidasen von großem Forschungsinteresse.

Peroxidasen katalysieren nicht nur oxidative Reaktionen, sondern auch Reduktionen (Reddy et al., 1998). Bisher werden zahlreiche Anwendungsbeispiele in verschiedenen biologischen und chemischen Verfahren vorgestellt, wie z.B. beim Biopapierbleichen, bei der ligninolytischen Abfallbehandlung, bei der biologischen Detoxifizierung der Umwelt bzw. Gesundheit gefährenden Chemikalien, und bei der Bioherstellung niedermolekularer Feinchemikalien (Tien, 1987).

Extrazelluläre Lignin-Peroxidasen (EC 1.11.1.14, Diarylpropan : Sauerstoff, Wasserstoffperoxid Oxidoreduktase, Mr = 38000 ~ 43000) und Mangan-Peroxidasen (EC 1.11.1.13, Mn(II) : Wasserstoffperoxid Oxidoreduktase, Mr = 43000 ~ 49000) werden eindeutig in der sekundären Stoffwechselphase vom Weißfäulepilzstamm *Phanerochaete chrysosporium* unter ligninolytischen Bedingungen (Stickstoffmangel beim pH ~ 4,5) induziert. Verschiedene Arten von Peroxidasen befinden sich in Weiß- und Braunfäulepilzen und Myzelbakterien wie z.B. *Streptomyces* sp. (Crawford, 1978). Sie spielen entweder an der Depolymerisierung des Lignins oder an der Oxidation etherischer Lignin-Komponenten eine große Rolle.

Wegen der Komplexität des Lignins werden die Abbaustudien nur auf phenolische oder nicht-phenolische Modellverbindungen begrenzt. Manche Studien liegen vor, daß Lignin-Peroxidasen, Mangan-Peroxidasen und Laccasen auf die Modellverbindungen unterschiedliche Oxidationspotentiale ergeben. So katalysieren Ligninasen mittels transitorischer Radikale verschiedene Reaktionen für die C-C-Spaltung, die *O*-Demethylierung, die Oxidation und die Ringspaltung. Die Hauptrolle von Ligninasen ist die Depolymerisation des Lignins. Dafür ist die oxidative [C_α-C_β]-Spaltung von Arylglycerol-β-Arylethern besonders wichtig (Abb. 1-9). Arylglycerol-β-Arylether betragen ca. 50 bis 60 % der im Lignin vorkommenden Aryl-Aryl Bindungsarten (Kirk & Farrell, 1987; Umezawa & Higuchi, 1989).

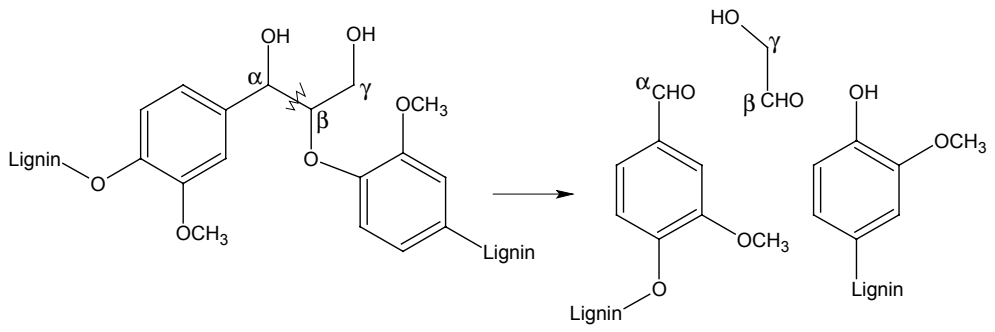


Abb. 1-9. Abbauwege von Arylglycerol-β-arylethern: Die Cα-Cβ-Position wird erst nach dem Initialangriff von Lignin-Peroxidasen abgespalten.

Die Lignin-Peroxidase von *Phanerochaete chrysosporium* wird während des sekundären Stoffwechsels (Idiophase) unter ligninolytischen Bedingungen (z.B. Stickstoffmangel) induziert, um sowohl phenolische als auch nicht-phenolische Ligninkomponenten zu oxidieren. Weil die Lignin-Peroxidase ein hohes Oxidationspotential besitzt (Kersten et al., 1990), beteiligt sie sich sogar am Abbau von schwer abbaubaren unnatürlichen Chemikalien, wie z.B. polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs), Dioxinen (Hammel et al., 1986; Valli et al., 1992), Polychlorphenolen (Hammel & Tardone, 1988; Joshi & Gold, 1993), Polychlorbiphenylen (Eaton, 1985; Dietrich et al., 1995), Azofarbstoffen (Spadaro et al., 1992; Ollikka et al., 1993), und Creosoten (Bogan & Lamar, 1995).

In jüngster Zeit lagen einige Studien hingegen vor, daß manche Organochemikalien nicht nur mit den extrazellulären Lignin-Peroxidasen von *Phanerochaete chrysosporium* unter ligninolytischen Bedingungen, sondern auch ohne Induktion extrazellulärer Peroxidasen unter nicht-ligninolytischen Bedingungen abgebaut werden. Unter nicht-ligninolytischen Bedingungen sind intrazelluläre Enzymsysteme für den Abbau solcher Substanzen verantwortlich (Köhler et al., 1988; Dhawale et al., 1992; Yadav & Reddy, 1993; Yadav et al., 1995; Barclay et al., 1995; Beaudette et al., 1998).

Laccasen (Phenol-Oxidase, EC 1.10.3.2, Benzoldiol : Sauerstoff Oxidoreduktase, Mr = 60000 ~ 80000) abstrahieren ein Elektron direkt vom Substrat ohne Verbrauch eines Wasserstoffperoxides. Mangan-Peroxidasen oxidieren Mangan-Ion Mn(II) zu Mn(III) nur in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Mangan (III)-Ionen bilden radikale Mangan (III)-Komplexe in Gegenwart von günstigem Chelator, wie z.B. Weinsäure, Bernsteinsäure, Milchsäure und Oxalsäure. Mangan (III)-Komplexe fungieren als ein frei diffundierendes Oxidans, um ein vom Aktivzentrum entferntes Substrat zu oxidieren (Glenn et al., 1986). Trotz dieses Vorteils gelten Mangan (III)-Komplex als ein

schwächeres Oxidans wegen ihrer niedrigen Oxidationspotentiale (Wariishi et al., 1991). Die Mangan-Peroxidase läßt sich anhand ihrer vorbereitenden Oxidation von Mn(II) zu Mn(III) leicht detektieren, wenn sich Mangan (III)-Komplexe nach der Oxidation eines Farbstoffes wie z.B. PolyB schnell erkennen. Die Mangan-Peroxidase katalysiert auch eine NADH-Oxidation bei Abwesenheit von H_2O_2, um exogenes H_2O_2 zu generieren (Glenn et al., 1986). Es wird vermutet, daß Mangan-Peroxidasen und ihre diffundierende Mn(III)-Chelate am Abbau phenolischer Substrate hauptsächlich neutrale Dienyl-Radikale herstellen (Popp & Kirk, 1991). Damit wird gerechnet, daß Mangan-Peroxidasen an der Depolymerisierung hochmolekularer Ligninpolymere eine Hauptrolle spielen. Dann oxidieren Lignin-Peroxidasen niedermolekulare Lignin-Komponenten weiter.

Während des Wachstums von *Phanerochaete chrysosporium* unter ligninolytischen Bedingungen werden die Induktionen von der Lignin Peroxidase und der Mangan-Peroxidase mit verschiedener Faktoren wie z.B. Wasserstoffperoxid, Sauerstoff, Chemikalien, Mangan, Chelator (z.B. Oxalsäure) und extrazelluläre Proteasen reguliert (Perez & Jeffries, 1992; Reddy, 1993; Li et al., 1995; Dass et al., 1995).

Konzentrierte Ligninasen von *Phanerochaete chrysosporium* polymerisieren Pentachlorphenol und Ferulasäure unter ligninolytischen Bedingungen bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Detergentien (Ruttimann-Johnson & Lamar, 1996). Ein wichtiges Beispiel für homolytische Reaktionen von Peroxidasen mit Aromaten ist die Phenol-Oxidation in Gegenwart von einem Ein-Elektronen anziehenden Oxidationsmittel wie z.B. Eisen(III)-Ion im basischen Medium. Ein ungepaartes Elektron des resultierenden Phenoxy-Radikales greift ein weiteres Phenolmolekül oder Phenolat-Ion am Sauerstoffatom oder am *o-/p*-Kohlenstoffatom an. Aus dieser Kettenreaktion entsteht ein Dimer zweier Phenoxyl-Radikale (Kupplung, Abb. 1-10).

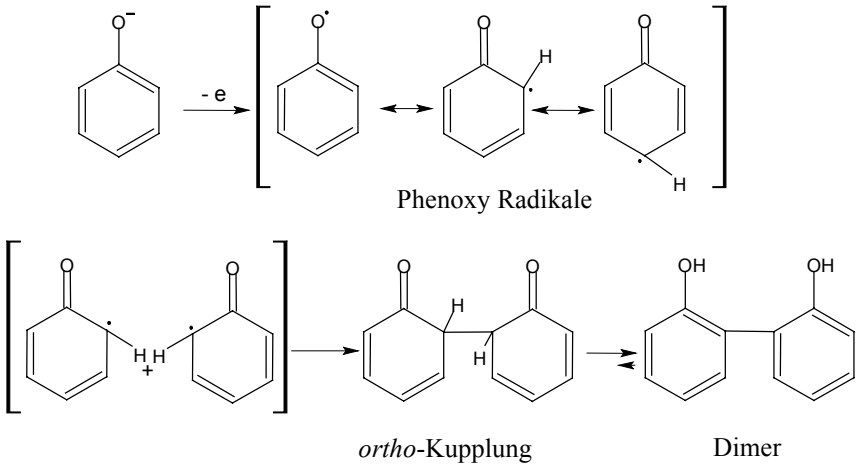


Abb. 1-10. Phenoxy-Radikal und die Dimerisierung beispielsweise für die *ortho*-Kupplung

Enzymatische Phenolkupplungen (Phenol-Oxidationen) sind wichtig nicht nur für die Biosynthese des Lignins in den Pflanzen, sondern auch für die Biosynthese wertvoller Naturstoffe wie z.B. Alkaloide, Pigmente, Antibiotika, usw.

Unter nicht-enzymatischen Bedingungen werden diese Biokatalysator mit Eisen (II)-Ionen ersetzen. Es trifft sich gut in der chemischen ′Fentons-Reaktion′ für die Phenolkupplung in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (Sykes, 1988).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + {}^{-}OH + Fe^{3+} \quad \text{(Fentons Reaktion)}$$

Außer den Mn(II)/Mn(III)- und Fe(II)/Fe(III)-Metallionen spielt das Cu(I)/Cu(II)-System an den zahlreichen radikalen Reaktionen in der biologischen und organischen Chemie eine wichtige Rolle.

Einige Bakterien sind bekannt für den Ligninabbau. Sie gehören meistens zu Actinomyceten an, wie z.B. *Streptomyces* (Crawford, 1978) und *Thermomonospora* (McCarty et al., 1989). Lignin-abbauende Bakterien besitzen auch extrazelluläre Mangan-Peroxidasen oder Laccasen. Bakterielle Ligninasen beteiligen sich sowohl an der Solubilisierung des Lignins als auch am Abbau von verschiedenen Sulfonylazofarbstoffen (Paszczynski et al., 1992; Goszczynski et al., 1994).

Außerhalb von Actinomyceten ist der gram-negative Stamm *Sphingomonas* (ehemalig *Pseudomonas) paucimobilis* SYK-6 für den Abbau von β-Arylethern bekannt geworden (Katayama et al., 1988). Dieser Stamm verwertet verschiedene Lignin-Komponenten als einzige C/E-Quelle, wie z.B. 2,2′-Dihydroxy-3,3′-dimethoxy-5,5′-dicarboxybiphenyl, Syringasäure, 3-*O*-Methylgallinsäure, Vanillinsäure, β-Arylether, β-1-Diarylpropan, und Phenylcumaran. Er setzt 2,2′-Dihydroxy-3,3′-dimethoxy-5,5′-dicarboxybiphenyl via 2,2′,3-Trihydroxy-3′-methoxy-5,5′-dicarboxybiphenyl zu 5-Carboxyvanillinsäure um. Die sogenannte β-Aryletherase beteiligt an der primären Oxidation von β-Arylethern. Unter Beteiligung von einer Cα-Dehydrogenase und einer Protocatechusäure-4,5-dioxygenase wird 5-Carboxyvanillinsäure weiter abgebaut und assimiliert (Masai et al., 1993a, 1993b und 1999).

1.4. Zielsetzung

Vergleichend mit den Studien über die Biodegradation und die Biotransformation von Diarylethern und Diphenylethern wurden bisher nur wenige Studien über die bakterielle Degradation von Aralkylethern, cyclischen Alkylethern, aliphatischen Alkylethern und Benzylethern durchgeführt.

In dieser Arbeit werden Bakterien aus verschiedenen Umweltkompartmenten isoliert, indem verschiedene Etherchemikalien, die für die Anreichung und Isolierung von bakteriellen Kulturen als

einzige C/E-Quelle genutzt werden, bezüglich ihrer chemischen physikalischen Eigenschaften und Abbaumustern in verschiedene Bindungsklassen aufgegliedert werden, wie z.B. Glykolether (z.B. Diethylenglykol-mono-butylether), Diarylether (z.B. Dibenzofuran und Diphenylether), aliphatische Alkylether (z.B. Diethylether und MTBE), cyclische Alkylether (z.B. Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, 1,4-Dioxan und Morpholin), Aralkylether (z.B. Anisol und Phenetol) und Dibenzylether. Bakterielle Isolate werden unter Abgleich mit Referenzstämmen taxonomisch untersucht. Diese Isolate sollten dann mittels verschiedener Kriterien einem Vergleich mit bekannten spezialen Stämmen unterworfen werden, deren Abbaufähigkeiten für schwer abbaubare Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Biphenyle, polycyclische aromatische Kohlenwasser-stoffe (PAKs, z.B. Fluoren, Phenanthren, Pyren), BTEX (Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol), n-Alkane (C_5 ~ C_8) und Styrol, schon veröffentlicht worden sind.

Weitgehend werden die morphologischen und physiologischen Änderungen untersucht, die besonders während des Wachstums von Alkylether-abbauenden Stämmen mit toxischen flüchtigen Ethern geschehen, um die Mutationsereignisse soweit wie möglich darzustellen.

Zur Erklärung der Abbauwege von Alkylethern werden die Umsatz- und Oxidationsmuster von ausgewählten Stämmen mit Modellsystemen untersucht.

2. Material und Methode

2.1. Anreicherung und Isolierung

Die Anwendung dieser Techniken zur Erhaltung von Reinkulturen ist ein entscheidender Faktor für die Charakterisierung, die Klassifizierung und die Identifizierung neu isolierter Mikroorganismen. Seit Winogradsky und Beijerinck sind die Versuche für die Mikrobiologen notwendig, um neue mikrobielle Aktivitäten zu finden. Diese Arbeite tragen auch zu einer systematischen Erfassung der physiologischen und biochemischen Vielfalt mikrobieller Ökosysteme bei.

2.1.1. Probebehandlung und Anreicherung

Seit Oktober 1994 wurden 7 Proben aus verschiedenen Umweltkompartmenten aufs Exempel genommen, wie eine Kokereibodenprobe (COK) aus Essen, eine Humus-Bodenprobe aus Schwäbischer Alb (SA), Belebtschlammproben des Klärwerks Stuttgart-Büsnau (BS), zwei PAK-belastete Bodenproben aus Neustadt (NS) und Rositz (RZ) in der ehemaligen DDR, eine Humus-Bodenprobe aus dem Schwarzwald (SW) und eine mit halogenierten Benzolen belastete Bodenprobe aus einem ehemaligen Produktionsgelände der chemischen Industrie (CLx).

Wäßrige Proben aus einer Belebungsanlage des Klärwerks Stuttgart-Büsnau wurden direkt nach der Probeaufnahme mit ca. 500 mg l^{-1} Cycloheximid versetzt und unter aeroben Bedingungen bei 30°C über Nacht geschüttelt. Cycloheximid war ein Inhibitor, um die Peptidyltransferase der 60S-Ribosomenuntereinheit von Eukaryoten zu hemmen (Stryer, 1990). Je 10 ml wäßrige Probe wurde mit 0,05 ~ 0,1 %iger (v/v, w/v) geeigneter Chemikalie als einziger C/E- oder C/N-Quelle versetzt. Jede Wachstumskontrolle wurde ohne Zugabe einziger C/E- oder C/N-Quelle unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Je 1 ml Mischkultur, dessen Wachstum sich anhand einer Trübungsmessung (OD_{546}) sichtbar machte, wurde bis zu 10^{-7}fach verdünnt. Von den 10^{-5} ~ 10^{-7} Verdünnungsstufen wurde je 100 µl Teilchen entnommen, um einmal auf Minimalagarplatten (2.1.4.2) mit geeignetem Substrat ausplattiert zu werden, und um zum anderen in frische Kolben mit derselben Zusammensetzung weiter überimpft zu werden. Diese Prozesse wurden bis zur Gewinnung einer Reinkultur alle 1 ~ 2 Wochen wiederholt. Wäßrige Proben und Kulturen wurden in 100 ml Glasschüttelkolben zur besseren Durchmischung mit vier seitlichen Schikanen inkubiert, und flüchtige Chemikalien wurden mit Teflongummi-beschichtetem Schraubdeckel gesichert. Während der Inkubation wurden sie auf einem Rotationsschüttler (Fa. Infors, Schweiz) bei 108 Upm aufgesetzt.

Agarplatten wurde im angeschlossenen Glasgefäß über die substratgesättigte Atmosphäre (ca. 20 mg pro Platte) im 30°C-Blutschrank bebrütet.

Bodenproben wurden gut gemischt und 10 g Naßgewicht dann eingewogen. Die Bodenproben wurden in 100 ml ∅ 0,22 µm-Membran-filtriertem Bodenextrakt (2.1.4.3) suspendiert und daraufhin wie die oben erwähnten wäßrigen Proben behandelt.

2.1.2. Isolierung einer Reinkultur

Zur Gewinnung von Reinkulturen wurden verschiedene Komplexmedien (2.1.4.1) mit unterschiedlichen Kohlenstoffgehalten, wie z.B. R2A-Agar, Nutrient-Agar (NA) und Trypticase-Soja-Agar (TSA), verwendet.

Typische Koloniemorphologie wurde 1 ~ 2 Wochen nach der Bebrütung auf Komplexagarplatten (z.B. TSA) beobachtet. Eine gut gewachsene Kolonie wurde daraus ausgewählt, und sie wurde auf frische Komplexagarplatten und dann auf selektive Minimalagarplatten mit geeignetem Substrat gestrichen. Wurde die typische Koloniemorphologie auf Komplexagarplatten wieder hergestellt, wurde die Reinheit von der ausgewählten Kolonie unter Mikroskopierung festgestellt. Wurde die ausgewählte Kolonie auf einer selektive Agarplatte gut gewachsen, wurden dann die gut gewachsenen Kolonien in flüssige Minimalmedien überimpft, um die Abbaufähigkeit für eine eingesetzte Chemikalie festzustellen. Wenn die Biomasse (z.B. OD_{546} oder KBE) entsprechend der Abnahme des eingesetzten Substrates zunahm, wurde dann dieser Stamm als Verwerter bestimmt.

Bis zur Gewinnung von Reinkulturen der Spezial-Mikroorganismen, die eine eingesetzte Chemikalie als einzige C/E- oder C/N-Quelle verwerteten, wurden die oben geschriebenen Prozesse wiederholt.

2.1.3. Stämme

Die in der Tabelle 2-1 aufgeführten Reinkulturen wurden als Referenzstämme verwendet. Ihre physiologische, biochemische und taxonomische Eigenschaften sind aus bisherigen Studien zum Teil bekannt geworden. Einige Mischkulturen DPM200, DBE1, CLN100 und PCH100, die jeweils Fluoren (DPM), Dibenzylether (DBE), 2-Chlornaphthalin (CLN) und Phenylcyclohexan (PCH) abbauen konnten, wurden aus der Stammsammlung in der Abteilung biologische Abluftreinigung am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart entnommen und zur weiteren Verwendung nach der Methode (2.1.2) rein isoliert.

Tab. 2-1. Verwendete Referenzstämme und Mischkulturen

Stamm	Substrat(en) / Eigenschaft	Herkunft / Referenz
Sphingomons yanoikuyae DSM6900	Phenanthren, Fluoranthen	DSM6900 [a]
Sphingomonas paucimobilis DSM7526	Phenanthren, Fluoranthen	DSM7526 [a]
Mycobacterium sp. S10	Pyren	Fraunhofer Gesellschaft Stuttgart
Terrabacter sp. DPO Stämme	Biphenyl, Dibenzofuran, Fluoren	Engesser et al.(1989), Schmid et al. (1997)
DPM200 (Mischkultur)	Biphenyl, Fluoren	ALR [b]
DBE1 (Mischkultur)	Dibenzylether	ALR [b]
DPE1	Diphenylether	ALR [b]
Pseudomonas putida 4MP1	p-Kresol	ALR [b]
BIB 7	Bibenzyl	ALR [b]
Ralstonia eutropha JMP134	2,4-D und Chlorierte Aromaten	Pieper et al. (1993), Yabuuchi et al. (1995)
Ps. putida CLB250	2-Chlorbenzoesäure	Engesser & Schulte (1989)
Ps. pseudoalcaligenes POB310	3- oder 4-Phenoxybenzoesäure	Dehmel et al. (1995)
Pseudomonas fluorescens DSM6506	Naphthalin, Phenanthren (+/-)	DSM6506 [a]
Pseudomonas putida DSM8368	Naphthalin, Phenanthren (+/-)	DSM8368 [a]
CLN 100 (Mischkultur)	2-Methyl-, 2-Chlornaphthalin	ALR [b]
PCH 100 (Mischkultur)	Phenylcyclohexan	ALR [b]
Rhizomonas sp. DBP100	Carbazol	Dohms (1995)
Hexan-abbauende Stämme	n-Alkane (C5 ~ C8)	ALR [b] / T. Plaggemeier
Pseudomonas sp. VLB120	Styrol	ALR [b] / Panke et al.,(1998)
VLB130, 140, 160	Styrol	ALR [b] / F. Albrecht (1995)
Pseudomonas sp. NCIB10643	Biphenyl, Styrol	Smith et al. (1991)
MLB110, 120	Toluol, Styrol	ALR [b] / F. Albrecht (1995)
ELB120	Ethylbenzol, Styrol	ALR [b] / F. Albrecht (1995)
M2A	Styrol	ALR [b] / F. Albrecht
THF400	THF, THP	ALR [b]
Methylobacterium extorquens DSM1338	Methanol	DSM1338 [a]
Rhodococcus sp. St116 und St117	Alkoxylierte Phenole (P450)	Karlson et al.(1993)
R. rhodochrous ID90-364 und ID90-365	DSM[a] - I.D. von den Stämmen St116 und St117	U. Karlson(Dänemark)
Rhodococcus sp. MOP100	Guajakol	K. Käser (1993)
Pseudomonas aeruginosa	Referenzstamm	ALR [b]
Pseudomonas putida	Referenzstamm	ALR [b]
Pseudomonas fluorescens	Referenzstamm	ALR [b]
Escherichia coli	Referenzstamm	ALR [b]
Bacillus subtilis	Referenzstamm	ALR [b]

Anm:

DSM[a] : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

ALR[b] : Stammsammlung in der Abteilung biologische Abluftreinigung am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) der Universität Stuttgart

2.1.4. Medien und Nährlösungen

Wenn nicht anders beschrieben, sind die Zusammensetzungen der Medien und der Nährlösungen in gebrauchsfertigen Konzentrationen angegeben.

2.1.4.1. Komplexmedien

Trypticase-Soja-Agar (TSA, modifiziert aus Difco)

Caseinpepton	15 g
Sojamehlpepton	5 g
NaCl	5 g
Bacto-Agar, Oxoid Nr.1	15 g
H_2O_{bidest}	1000 ml
Nach dem Autoklavieren wurde Calcium-Magnesium-Lösung (2.1.4.2) zugegeben	1 ml

Nutrient-Agar (NA)

Fleischextrakt	3 g
Proteose Pepton	5 g
NaCl	5 g
H_2O_{bidest}	1000 ml

R2A-Medium und –agar (modifiziert aus APHA, 1985)

Hefeextrakt	0,5 g
Proteose Pepton	0,5 g
Caseinhydrolysat	0,5 g
D-Glucose	1,0 g
Na-Pyruvat	0,3 g
Na-Acetat	0,3 g
K_2HPO_4	0,3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g
H_2O_{bidest}	1000 ml
Für die Agarplatte wurde Bacto-Agar (Oxoid Nr.1) zugetan	12 g

Alle Substanzen wurden 20 min lang bei 121°C autoklaviert.

2.1.4.2. Minimalmedien

Definiertes Minimalmedium (DMM)

$NaNO_3$	0,5 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
KH_2PO_4	2,5 g
Na_2HPO_4	1,0 g
Spurenlösung	1 ml
5 N NaOH	0,5 ml
H_2O_{bidest}	1000 ml

Stickstoff-freies Minimalmedium (NMM)

KH_2PO_4	2,5 g
Na_2HPO_4	1,0 g
Spurenlösung	1 ml
5 N NaOH	0,5 ml
H_2O_{bidest}	1000 ml

Spurenlösung (1000 ×)

$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$	1,94 g
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,0 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	54,0 g
H_3BO_3	11,0 g
KBr	0,5 g
KI	1,0 g
LiCl	0,5 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7,0 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,5 g
$Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$	0,5 g
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0 g
$SnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,5 g
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	0,62 g
H_2O_{bidest}	18 L

Calcium-Magnesium-Lösung (1000 ×)

$CaCl_2$	30 g
$MgCl_2$	20 g
H_2O_{bidest}	1000 mL

Vitaminlösung (1000 ×)

Para-Aminobenzoesäure	200 mg
Biotin	200 mg
Folsäure	200 mg
Nikotinsäure	200 mg
Calcium-Pantothenat	100 mg
Pyridoxin-HCl	100 mg
Riboflavin	100 mg
Thiamin	100 mg
Vitamin B_{12}	1 mg
H_2O_{bidest}	1000 mL

Cycloheximidlösung (1000 ×)

Cycloheximid	5 g
Aceton	100 ml
mittels PTFE-Membran steril filtriert	

Nach Autoklavieren wurden 1 ml ∅ 0,22µm-Membran-filtrierte Vitaminlösung und 1 ml separat autoklavierte Calcium-Magnesium-Lösung ins 1 Liter Minimalmedium für alle hinzugefügt.

Wurde große Zellmenge entweder für die Umsatzversuche oder für die Vorbereitung zellfreien Extrakts hergestellt, wurde die Vitaminlösung mit 5 %iger (w/v) Hefeextraktlösung (1000×, mit Zusatz von 100 mg l^{-1} Thiamin und 1 mg l^{-1} Vitamin B_{12}) ersetzt.

Wenn Agarmedien (12 g l^{-1} Oxoid Nr. 1-Agar, Fa. Oxoid, Wesel) gegenüber Eukaryoten selektiv sein sollten, wurde 1 ml Cycloheximidlösung bevor Agargießen bei ca. 50ºC zugetan.

2.1.4.3. Bodenextrakt

Während der Anreicherung und Isolierung bakterieller Stämme bedarf man häufig einen unbekannten Nährstoff oder eine natürliche Zusammensetzung in Kulturmedien. Daher benutzt man manchmal eine natürliche Zusammensetzung von Seewasser, Süßwasser, Bodenextrakt, Serum, o.a. in Grundmedien.

In dieser Arbeit wurde 2,5 l Bodenextrakt von humifiziertem Waldboden aus Paffenwaldring Stuttgart vorbereitet:

i) 5 kg Boden (Naßgewicht) in 5 l bidestilliertes Wasser einmischen

ii) 30 min lang Stickstoffgas bei Raumtemperatur blasen

iii) Über Nacht stehen lassen

iv) Flüssigen Überstand durch Glaswolle abscheiden

v) Bei 8000 Upm (Sigma 6K10, Fa. Sigma) 15 min lang zentrifugieren

vi) Über Nacht bei 4°C stehen lassen

vii) Niederschlag anhand einer Glasfaser-beschichteten ∅ 0,45 µm-Membran beseitigen

viii) Klaren Überstand bis zur Nutzung bei 4°C aufbewahren

Direkt vor der Nutzung wurde der Bodenextrakt anhand einer ∅ 0,22 µm-Membran steril filtriert.

2.1.5. Anzucht

Jede Zellkultur wurde in 100-, 250-, 500-, 1000-, oder 3000 ml Glasschüttelkolben mit vier seitlichen Schikanen, die sich mit Teflongummi-beschichtetem Schraubdeckel fest verschloβen, bis zur späteren exponentialen Wachstumsphase auf einem Rotationsschüttler bei 30°C inkubiert. Die Flüssigkeit betrug dabei 10 ~ 20 % des Kolben-Nennvolumens.

Zur Herstellung der Ruhezellen wurde jede Zellkultur bei 4°C, 8000 Upm (Sigma6K10) 15 min abzentrifugiert. Die Zellpaste wurde im gleichen Volumen von 50 mM Phosphat Puffer (pH 7,0 ~ 7,2) zweimal gewaschen und zentrifugiert. Große Zellmenge wurde anhand eines mit einem Magnetikrührer (350 Upm) ausgerüsteten 5 l Umlaufreaktors bei 30°C gewonnen.

2.1.6. Kontrolle des Wachstums

Die Trübungsmessumung erfolgte entweder anhand einer Kunststoffküvette (1 cm^3) mit einem UVIKON941 Plus-Spektrophotometer (Fa. Bio-Tek/Kontron) bei 546 nm, oder *in situ* anhand eines mit Teflon-beschichtetem Schraubdeckel gedichteten ∅ 20 mm-Wheaton-Teströhrchens (Nennvolumen: 45 ml) mit einem Filterphotometer (Fa. Biolog, USA) bei 590 nm (± 10 nm).

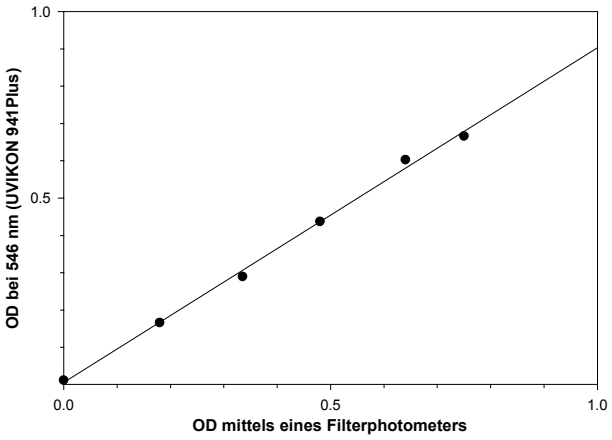


Abb. 2-1. Korrelation einer Trübungsmessung vom Spektrophotometer bei 546 nm (Schichtdicke: 1 cm, UVIKON941 Plus) im Vergleich mit dem Filterphotometer bei 590 nm (±10 nm, Schichtdicke: ∅ 20 mm-Teströhrchen, Fa. Biolog): $OD_{546nm} = 1{,}114 \times OD_{Filter}$ ($r^2 > 0{,}99$)

Die Gerät-abhängige Leistung der beiden Geräte wurde mit verschiedenen Verdünnungsstufen einer McFarland-Lösung (Fa. Bio Merieux, Frankreich) kalibriert (Abb. 2-1).

Bei den semi-kontinuierlichen Wachstumsversuchen im Umlaufreaktor wurde je 100 ml Zellkultur zeitlich auf Probe genommen, damit das Naßgewicht der abzentrifugierten Zellpaste eingewogen wurde.

2.1.7. Lebendzellzahlbestimmung

Üblicherweise wurde die Kolonie-bildende Einheit (KBE) als die gesamte Lebendzellzahl bestimmt. Jede Probe wurde mittels sterilen Verdünnungsröhrchens bis zur 10^{-7}fach verdünnt. Davon wurden drei fortlaufende Verdünnungen entweder auf Minimalagarplatten mit geeignetem Substrat oder auf Komplexagarplatten (z.B. R2A-Agar) ausplattiert. Aus den gewachsenen Agarplatten wurde eine günstige Agarplatte ausgewählt, worauf die gesamte Koloniezahl zwischen 30 und 300 lag. Die Agarplatten wurden entweder zur Bestimmung der Lebendzellzahl 48 Stunden oder zur Beobachtung der morphologischen und physiologischen Veränderungen 1 ~ 2 Wochen bei 30°C bebrütet.

2.1.7.1. ′TAR′-Faktorzahl

Der ′TAR′-Wert (′Total Available Recovery′, Gl.2.1) war ein prozentuales Verhältnis des auf selektiven Minimalagarplatten beobachteten KBE-Wertes gegenüber dem auf Komplexagarplatten beobachteten KBE-Wert.

$$TAR(\%) = \frac{KBE\ auf\ selektiven\ Agarplatten}{KBE\ auf\ R2A - Agar\ Medien} \times 100 \qquad (2.1)$$

Das wurde aus dem TAPR-Wert (′Total Available *Pseudomonas* Recovered′) von Grant und Holt (1977) modifiziert. R2A-Agar (2.1.4.1) wurde zur Bestimmung des ′TAR′-Wertes verwendet.

Damit wurde die Stabilität einer stammspezifischen Abbauaktivität in Gegenwart von einem selektiven Faktor wie z.B. einem toxischen Substrat, einem Hemmstoff, einem zusätzlichen Nährstoff oder Hilfsmittel untersucht. Je größer der Wert war, desto stabiler war die Abbauaktivität eines Teststammes unter den Testbedingungen.

2.1.7.2. ′r′-Zahl

Der ′r′-Wert (′reversibel′, Gl. 2.2) zeigte die Wiederherstellbarkeit einer stammspezifischen Abbaufähigkeit an.

$$r(\%) = \frac{\textit{Die auf selektiven Agarplatten gewachsene Koloniezahl}}{\textit{Die aus TSA} - \textit{Medien ausgewählte Koloniezahl}} \times 100 \quad (2.2)$$

Ca. 30 bis 300 gewachsene Kolonien von einem Teststamm wurden anhand sterilen Zahnstochers auf selektive Agarplatten aufgepickt. Bevor dem Versuch sollte der Teststamm unter der nicht-selektiven Bedingung wie z.B. auf TSA-Medien inkubiert werden.

Je größer der r-Wert war, desto größer war die Wiederherstellbarkeit der untersuchten Abbaufähigkeit, d.h. der Teststamm hat während des Wachstums under der nicht-selektiven Bedingung seine Abbaufähigkeit nicht oder nur wenig verloren.

2.1.8. Stammerhaltung

Jede Mischkultur oder Reinkultur wurde nach der Anzucht auf Minimalagarplatten oder in flüssigen Zellkulturen mit geeignetem Substrat bei einer finalen Konzentration von 1 ~ 3 mM frisch aufbewahrt. Die Agarplatten wurden im geschlossenen Glasgefäß über die luftgesättigte Dampfphase bei 30°C inkubiert, worin 20 µl Menge an einem flüchtigen Substrat pro Platte zugegeben wurde. Die Überimpfung wurde jede 2 ~ 3 Monate frisch gemacht. Einzelne Koloniemorphologie und die morphologische Stammveränderung wurden je nach der Überimpfung auf frische Komplexagarplatten (z.B. TSA) untersucht.

Für die langfristige Stammaufbewahrung wurden sämtliche Agarkulturen mit sterilem 50%(v/v)igem Glycerin versetzt. Flüssige Zellkulturen wurden mit sterilem DMSO (Dimethylsulfoxid) bei einer finalen Konzentration von 15 %(v/v) eingemischt. Die Glycerin- bzw. DMSO-Stockkulturen wurden entweder nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C oder ohne Schockgefrieren bei -30°C aufbewahrt.

2.2. Charakterisierung und numerische Klassifizierung

Numerische Taxonomie von Bakterien konnte man einmal unter Verwendung von handelsüblichen Testsystemen und ihren Datenbanken wie z.B. API-Systemen (Fa. Bio-Merieux, Frankreich) oder

Biolog-Systemen (Fa. Biolog, USA) schnell durchführen. Zum anderen konnte man sie auch nach der eigenen Methode unter Verwendung der taxonomisch anerkannten Referenzstämme (z.B. DSM-Stämme) durchführen. Dafür waren die taxonomisch relevanten Merkmale in der ′Methods for General and Molecular Bacteriology′ (Gerhardt et al., 1994) und der ′Bergey's Manual of Systematic Bacteriology′ Vol.1 (Krieg & Holt, 1984), Vol. 2 (Sneath et al., 1986) und Vol. 4 (Williams et al., 1989) üblich verwendbar.

2.2.1. Morphologie und Mikroskopie

Für die Beschreibung der Morphologie wurden die Koloniegestalt, die Pigmentbildung, die Zellform und –größe (Durchschnitt × Länge) und die Beweglichkeit untersucht. Bakterielle Stämme unterschieden sich besonders aufgrund ihrer Zellwandbestandteile. Charakteristische Zellwandbestandteile ließen sich entweder mittels eines günstigen Farbstoffes unter Mikroskopierung oder anhand eines alternativen Tests schnell erkennen.

Die Gramfärbung wurde nach der Methode von Bartholomew (1981) bestimmt. Zusätzlich wurden der 3 %ige KOH-Test (Powers, 1995) und der Aminopeptidasetest (Costin et al., 1983, Fa. Merck, 13301) durchgeführt.

Aufgrund des Vorhandenseines von Mykolsäure wurden *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium* (CNM) und die verwandte Stammgruppe von den anderen unterschieden. Die Ziehl-Neelsen-Färbung wurde unter Verwendung eines Referenzstammes *Mycobacterium* sp. S10 besonders zur mikroskopischen Bestimmung von *Mycobacterium* verwendbar gemacht (Murray et al., 1994).

Dauerhafte Keimbildung (i.e. Endospore) wurde mittelbar dadurch bestimmt, daβ eine Impföse Zellen ins flüssige Komplexmedium suspendiert, und bei 80°C 10 min lang erhitzt wurde. Die Zellsuspension wurde bei 30°C auf einem Rotationsschüttler 2 Tage inkubiert, damit Endospore-bildende Stämme anhand einer Trübungsmessung (OD_{546}) bestimmt wurden (Holt & Krieg, 1994). Die Wirksamkeit jeder Hitzebehandlung wurde unter Verwendung von Referenzstämmen wie z.B. *Escherichia coli* als einem Negativstamm und *Bacillus subtilis* als einem Positivstamm nachgeprüft.

2.2.2. Katalase- und Oxidasetest

Eine Impföse Zellen eines Teststammes wurde auf einen Objektträger schmiert, wo die Entwicklung von Sauerstoffbläschen nach Zutropfen 3 %igen Wasserstoffperoxides beobachtet wurde. Katalase-positiver Stamm ergab die rasche Entwicklung von Sauerstoffbläschen. Die Intensität von den sich

entwickelten Sauerstoffbläschen (Breite und Höhe) ermöglichte eine semi-quantitative Bestimmung für die Katalase.

Die Oxidase wurde mittels eines Teststäbchens (Baktident Oxidase, Fa. Merck) untersucht. Bei diesem Versuch sollte keine Metallimpföse verwendet werden, die eine falsche Oxidation des Farbindikators ergäbe. Der daraus resultierte Farbumschalg wurde maximal innerhalb einer Minute erledigt, und dann anhand einer Farbskala vom Hersteller bewertet.

2.2.3. Physiologische und biochemische Charakteristika

Die Wachstumstests mit verschiedenen Testchemikalien als einziger C/E- oder C/N-Quelle und die Empfindlichkeitstests gegenüber antibiotischen Hemmstoffen wurden durchgeführt. Dazu wurden die Abbaufähigkeiten für polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und Polymere untersucht.

Jeder Teststamm wurde in 100 ml Minimalmedium mit einer Mischung von 0,05 %igem Hefeextrakt und 0,05 %igem geeignetem Substrat zur spät-exponentiellen Wachstumsphase bei 30°C, 108 Upm 24 ~ 72 h angezogen. Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen bei 4°C, 4000 Upm 15 min abzentrifugiert. Die Zellpaste wurde in 100 ml Phosphat Puffer (pH 7,0) suspendiert, und bei 30°C 2 ~ 4 Stunden geschüttelt, um übrige Substrate zu beseitigen. Die Zellsuspension wurde noch mal bei 4°C, 4000 Upm 15 min abzentrifugiert, und die Hungerzellen wurden in 5 ~ 10 ml geeignetem Minimalmedium resuspendiert. Dann lieβ sich die Zellsuspension bis zur Nutzung auf Eis aufbewahren.

2.2.3.1. Wachstumsversuche

Die optische Dichte von Hungerzellen wurde anhand eines Filterphotometers auf 0,05 ~ 0,1 in geeignetem Testmedium verstellt. Je 5 ml Zellsuspension wurde ins ∅20 mm-Teströhrchen (45 ml) dispensiert, das je 0,05 %iges Testsubstrat enthielt. Das Teströhrchen, das sich mit Teflon-beschichtetem Schraubdeckel verschloß, bei 30ºC auf einem Rotationsschüttler (108 Upm) inkubiert.

Wurde die optische Dichte *in situ* anhand eines Filterphotometers in einem Zeitraum zwischen t_1 und t_2 ($t_1 < t_2$) gemessen, ergab sich die optische Dichteänderung von D_1 nach D_2. Beim exponentiellen Wachstum sollte die erste Messung (D_1) 10 % oder größer als der initiale Wert (D_0) sein.

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, μ, und die Verdoppelungszeit, t_d, wurden nach der ersten Ordnung mit den folgenden Gleichungen (2.3 ~ 2.5)berechnet.

$$\frac{dD}{dt} = \mu \times D \qquad (2.3)$$

$$\mu = \frac{\ln(\frac{D_2}{D_1})}{(t_2 - t_1)} \qquad (2.4)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \qquad (2.5)$$

War die Konzentration an einem Substrat, [*S*], verschieden, wurde die spezifische Wachstumskurve von einem Teststamm nach der Monod-Gleichung (2.6) untersucht. Dafür wurde jede spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, μ, bei einer gegebenen Konzentration nach der Gleichung (2.4) berechnet. Wenn die spezifische Wachstumskurve eine hyperbolische Gestalt aufwies, ergab die reziproke Linie, 1/μ vs. 1/[*S*] (Gl. 2.7), eine hohe Linearität. Daraus wurden das Maximum Wachstumsgeschwindigkeit, μ_{max}, und der Substrat-Halbsättigungsgrad, K_S, abgeschätzt.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times [S]}{K_S + [S]} \qquad (2.6)$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\mu_{\max}} \qquad (2.7)$$

Überflüssige Substratmenge wirkte manchmal aufs Zellwachstum toxisch ein. Unter dieser toxischen Bedingung wies die spezifische Wachstumskurve keine hyperbolische Gestalt auf. Mit zunehmender Konzentration an toxischem Substrat erschwerte sich das Zellwachstum, wobei die beiden kinetischen Parameter von dem Maximum Wachstumsgeschwindigkeit und dem Substrat Halbsättigungsgrad abnahmen (Price & Steven, 1989). In diesem Fall übte toxisches Substrat eine Hemmwirkung aufs Zellwachstum aus, so ähnlich wie ein nicht-kompetitiver Inhibitor an der Ein-Substrat-Enzymreaktion (Chaplin & Bucke, 1990).

Bei verschiedenen Konzentrationen an einem toxischen Substrat [*S*] wurde jede spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, μ, nach der Gleichung (2.4) berechnet. Die spezifische Wachstumskurve wurde nach der Gleichung (2.8) dargestellt, vorausgesetzt, daß die Substrathemmung der nicht-kompetitiven Enzymkinetik folgte:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \times [S]}{K_S + [S] \times (1 + {}^{[s]}\!/_{K_{SI}})} \qquad (2.8)$$

Aus der nicht-linearen Anpassung wurde die Hemmwirkung eines Substrates aufs Wachstum mit der Hemmkonstante, K_{SI}, bewertet. Diese Formel besagte, daß die Toxizität um so größer ist, je kleiner die Hemmkonstante ist.

Die Wachstumsoptima an Temperatur, pH, und Salzkonzentration wurden unter den in der Tabelle 2-2 aufgeführten Bedingungen untersucht. Als Grundmedien wurden flüssige R2A-Medien verwendet, damit die Verdoppelungszeit (t_d) nach der Gleichung (2.5) abgeschätzt wurde.

Tab. 2-2. Testbedingungen[1)] für die Bestimmung der Wachstumsoptima an Temperatur, pH und Salzkonzentration

Test	Variabel	Konstant
Temperatur (°C)	20, 25, 30, 35, 40, 45	pH 7, 0 % NaCl
pH	4½, 5½, 6½, 7, 7½, 8½, 9½	30°C, 0 % NaCl
Salzkonzentration (% NaCl)	0, ½, 1, 2, 4, 7½, 15	30°C, pH 7

Anm.
Als Grundmedien wurden flüssige R2A-Medien verwendet

2.2.3.2. Substratspektren

Für die numerische Taxonomie und die Charakterisierung von Isolaten wurden verschiedene Chemikalien als einzige C/E- oder C/N-Quelle verwendet (Tab. 2-3).

Die optische Dichte (OD_{546}) von Hungerzellen wurde verdünnungsweise auf 0,1 im Minimalmedium verstellt. Je 2 ml Zellsuspension wurde ins sterile 20 ml Testflaschen (Fa. WGA, Düsseldorf) dispensiert, das je 1 bis 2 mg Menge an einem Testsubstrat enthielt. Das Testflaschen wurde mit Teflongummi-beschichtetem Aludeckel abgedichtet, und bei 30°C, 108 Upm 3 Tage inkubiert. 3 Tage nach Versuchsbeginn wurde 1 ml Zellkultur aus jedem Testflaschen auf Probe genommen, damit die optische Dichte mit der negativen Wachstumskontrolle verglichen wurde.

Tab. 2-3. Die Charakteristika zur numerisch taxonomischen Klassifizierung

Diagonalfeld X				Diagonalfeld Y	
Koloniemorhpologie	TSA, 30°C, 2 ~ 7 Tage			**C/E-Quelle (0,05%)**	DMM
1. Größe (Durchmesser)	> 3 mm	1~3mm	< 1 mm	1. Dimethylether (Gas)	Siehe die Definition der C/E-Quelle im Diagonal-feld X Ethinylethylether* ist eine 60%ige Lösung in Hexan. Daher wurde dieses Test bei den Hexan-Abbauern ausgeschlossen DiEG*: Diethylen-glykol
2. Zellpigmente	Ja	v*	Nein	2. Diethylether	
3. lösliche Pigmente	Ja	v*	Nein	3. Di-n-propylether	
4. Substratmyzel	Ja	v*	Nein	4. 2-Bromethylethylether	
Zellmorphologie	Mikroskopierung 600×			5. 2-Chlorethylethylether	
5. Größe (Dicke, µm)	> 1	0,5 ~ 1	< 0,5	6. 60% Ethinylethylether*	
6. Kokken	Ja	v*	Nein	7. Di-n-butylether	
7. Stäbchen	Ja	v*	Nein	8. Di-n-pentylether	
8. Zyklus (pleomorph)	Ja	Andere	Nein	9. Ethylvinylether	
9. Beweglichkeit (30°C)	Hängender Tropfen			10. n-Butylethylether	
10. Gleiten (30°C)	1,5 % Agaroberfläche			11. n-Butylmethylether	
Grambestimmung	v* : variabel			12. Isopropylether	
11. 3 %[w/v] KOH	+	v*	-	13. Methyl-*tert*-butylether	
12. Aminopeptidase	Fa. Merck 13301			14. Isoamylether	
13. Gramfärbung	+	v*	-	15. DiEG*-mono-butylether	
14. Säurefestigkeit	Ziehl-Neelsen-Färbung			16. DiEG*-di-butylether	
15. Sporenbildung	Hitztest bei 80°C, 10 min			17. ±Butyl-2,3-glycidylether	
16. Katalase	O_2-Bildung durch H_2O_2			18. *t*-Butyl-2,3-glycidylether	
17. Oxidase	Fa. Merck 113300			19. Brij58	
Wachstumsoptima	R2A-Medien			20. Dimethylsuloxid	
18. Temperatur (°C)	> 35	25 ~ 35	< 25	21. Tetrahydrofuran	
19. pH	> 8,5	5,5~8,5	< 5,5	22. Tetrahydropyran	
20. Salz (%)	< 2	2 ~ 4	> 4	23. 1,4-Dioxan	
C/E-Quelle (0,1 %)	DMM, 30°C			24. 3,4-Dihydro-2H-pyran	
21. Erythritol	**1** : Wachstum mehr 50% als die Negativ-kontrolle **0** : Wachstum nicht mehr 50% als die Negativkontrolle, aber einen positiven Farbumschlag 24 h nach Zugabe von 10 µg ml^{-1} Tetrazolium-violett (Fa. Sigma) **-1** : Wachstum nicht mehr 50% als die Negativkontrolle, und keinen Farbumschlag 24 h nach Zugabe von 10 µg ml^{-1} Tetrazolium-violett (Fa. Sigma)			25. 2,3-Dihydrofuran	
22. D-Arabinose				26. 2,5-Dihydrofuran	
23. L-Arabinose				27. Furan	
24. Ribose				28. 2,3-Epoxy-1-propanol	
25. D-Xylose				29. 1,2-Epoxyhexan	
26. L-Xylose				30. 1,2-Epoxyoctan	
27. Adonitol				31. Methanol	
28. D-Arabitol				32. Ethanol	
29. L-Arabitol				33. 1-Propanol	
30. Xylitol				34. 1-Butanol	
31. D-Glucose				35. 1-Pentanol	
32. Galactose				36. Isopropanol	
33. D-Fructose				37. ±)2-Butanol	
34. D-Mannose				38. ±)2-Pentanol	
35. L-Sorbose				39. 1,4-Butandiol	
36. Rhamnose				40. 2-Methyl-1-Butanol	
37. Dulcitol				41. 3-Methyl-1-Butanol	
38. Inositol				42. 2-Chlorethanol	
39. Mannitol				43. *tert*-Butanol	
40. Sorbitol				44. Glycerin	
41. α-Methyl-D-Glucoside				45. Ethylengylkol	
42. α-Methyl-D-Mannoside				46. Diethylenglykol	
43. Salicin				47. n-Pentan	
44. Cellobiose				48. n-Hexan	
45. Maltose				49. n-Heptan	
46. Lactose				50. 1-Hexen	
47. Melibiose				51. 1-Octen	
48. Saccharose				52. Isooctan	
49. Trehalose				53. n-Hexadecan	
50. Melezitose				54. Pristan	
51. D-Raffinose				55. Aceton	
52. ß-Gentiobiose				56. Ethylacetat	
53. Glykogen				57. Vinylacetat	
54. Milchsäure				58. Formaldehyd	
55. Pyruvat				59. Chloressigsäure	

56. Zitronensäure	
57. DL-Isocitrat	
58. 2-Oxo-glutarat	
59. Glutarat	
60. Succinat	
61. Fumarat	
62. L-Malat	
63. Malonat	
64. Maleinsäure	
65. Oxalacetat	
66. Glyconat	
67. Adipinsäure	
68. Benzoesäure	
69. Salicylsäure	
70. Gluconsäure	
N-Quelle+0,1% Glucose	NMM, 30°C
71. ohne zusätzl. N-Quelle	Siehe die Definition der C/E-Quelle Nur wenn die Kode 71 positiv ist, ist es schwer, die Testchemikalien von 72 bis 85 als N-Quelle zu bestimmen
72. Urea	
73. Creatine	
74. Nitrit	
75. Nitrat	
76. L-Glutamat	
77. L-Lysin	
78. L-Arginin	
79. Acetamid	
80. Acrylamid	
81. Benzamid	
82. Nicotinamid	
83. Pyrazinamid	
84. Xanthin	
85. Uracil	
C/N-Quelle (0,1%)	NMM, 30°C
86. D-Alanin	Siehe die Definition der oben erwähnten C/E-Quelle
87. L-Alanin	
88. L-Aspartat	
89. L-Asparagin	
90. L-Cystein	
91. L-Cystin	
92. S-Methyl-L-Cystein	
93. L-Glutamat	
94. Glycin	
95. L-Histidin	
96. L-Isoleucin	
97. L-Leucin	
98. L-Lysin	
99. L-Methionin	
100. L-Phenylalanin	
101. L-Prolin	
102. L-Serin	
103. L-Threonin	
104. DL-Tryptophan	
105. L-Tyrosin	
106. L-Valin	
107. L-Arginin	
Hydrolyse (2%)	
108. Casein	Klare Zonenbildung
109. Zellulose	
110. Chitin	
111. Gelatine	
112. Pectin	
113. Poly-ß-hydroxybutyrat	
114. Stärke (löslich)	
115. Tween20/80 (1:1)	Calcium-Niederschlag
116. Agar (Oxoid Nr.1)	Ohne zusätzliches Substrat

60. Chloracetaldehyd	
61. Benzol	
62. Phenol	
63. Anisol	
64. Phenetol	
65. Styrol	
66. Toluol	
67. Xylol	
68. 2-Methoxyphenol	
69. 3-Methoxyphenol	
70. 4-Methoxyphenol	
71. 2-Ethoxyphenol	
72. 2-Ethoxyanisol	
73. Eugenol	
74. Benzylalkohol	
75. Benzylaldehyd	
76. 1,2-Diethoxybenzol	
77. 1,3-Diethoxybenzol	
78. 1,4-Diethoxybenzol	
79. 1,2-Dimethoxybenzol	
80. 1,3-Dimethoxybenzol	
81. 1,4-Dimethoxybenzol	
82. 1,2-Methylenoxidbenzol	
83. Benzo(b)furan	
84. 1,4-Benzodioxan	
85. Dibenzofuran	
86. Dibenzylether	
87. Diphenylether	
88. Benzylphenylether	
89. Biphenyl	
90. 2-Methoxybiphenyl	
91. 4-Methoxybiphenyl	
92. Naphthalin	
93. 1-Methoxynaphthalin	
94. 2-Methoxynaphthalin	
95. 1-Methylnaphthalin	
96. 2-Methylnaphthalin	
PAK-Abbau & Umsatz	Aktivkohle-Agar
97. Bibenzyl	Definition in Abschnitt 2.2.3.3
98. Biphenylen	
99. Acenaphthen	
100. Phenanthren	
101. Anthracen	
102. Fluoren	
103. Carbazol	
104. Dibenzothiophen	
105. Xanthen	
106. Acridin	
107. Dibenzofuran	
108. Acridon	
109. Phenoxazin	
110. Iminostilben	
111. Fluoranthen	
112. Pyren	
113. Benzo(a)pyren	
C/N-Quelle (0,1%)	NMM
114. . Mono-ethanolamin	Siehe die Definition der C/ E-Quelle im Diagonal-feld X
115. Acetamid	
116. Acrylamid	
117. Imidazol	
118. 2-Aminobenzoat	
119. 4-Aminobenzoat	

Die Ergebnisse wurden unter Verwendung eines dreierlei Zahlsystem, {+, ±, -}, semi-quantitativ bewertet. Der positive Test ergab ein deutliches Wachstum mit der Zunahme der optischen Dichte mehr als 50 %. Wenn die optische Dichte nicht mehr als 50 % zunahm, hielt sich dann dieses Testergebnis für undeutlich. Dann wurde die andere 1 ml Zellkultur nach der Zugabe von Tetrazolium-violett (10 µg ml^{-1}) noch 24 Stunden bei 30ºC inkubiert. Wurde nach der zusätzlichen Inkubation der Farbumschlag von farblos nach violett deutlich sichtbar gemacht, war diese eingesetzte Chemikalie ein ′undefinierbares (±)′ Substrat. Wenn sich weder Wachstum noch Farbumschlag ergab, war das Testergebnis negativ. Bei jedem Versuch sollte die negative Wachstumskontrolle weder Wachstum noch Farbumschlag ergeben.

2.2.3.3. Einfache Bestimmung des Abbaues von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs)

Schwer wasserlösliche PAKs werden normalerweise durch eine bakterielle Aktivität (z.B. Hydroxylierung) mobilisiert, und die Abbauprodukte lassen sich manchmal mit einer sichtbaren Farbe in der Flüssigkeit sehen, wie z.B. braun, gelb, orange, schwarz, o.a.

Um die Abbaufähigkeiten von Isolaten für polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe einfach zu bestimmen, wurden Minimalagarmedien mit dem Zutat von 0,5 g l^{-1} Aktivkohle (Norit W20, Amersfoort-Nederland) vorbereitet. Aktivkohle vermag, organische Verbindungen zu adsorbieren. Damit wurde die unerwartete Kreuzfütterung zwischen den Stämmen auf eine Agarplatte vermeidet. Als einzige C-Quelle wurden polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe bei einer finalen Konzentration von 1 bis 2 mM ins Diethylether aufgelöst. Je 1 ml PAK-Lösung wurde auf Aktivkohle-haltige Agarplatten dispendiert, und Diethylether verdampfte unter einer Sterilbank, um einen dünnen PAK-Film auf die Agaroberfläche übrig zu lassen.

45 Stämme wurden auf eine ∅ 85 mm-Petrischale gleichzeitig aufgepickt, um einen mindesten Abstand zweier Teststämme bei 1 cm zu halten. Jeder Teststamm wurde anhand sterilen Zahnstochers auf eine Minimalgarplatte als eine negative Wachstumskontrolle, und dann auf Testagarplatten aufgepickt. Um das Austrocknen zu vermeiden, stellte man die Platten ins geschlossene Glasfaß bei 30°C 3 ~ 4 Wochen.

Unter Abgleich mit der Negativkontrolle wurden die Koloniegröße, die klare Zone und lösliche Pigmente ums Inokulum herum beobachtet. Wenn Kolonien deutlich größer wuchsen, diente die eingesetzte Chemikalie zum Wachstum (positiv). Wenn sich die klare Zone oder lösliche Pigmente ohne deutliches Wachstum darum herum entwickelten, diente die eingesetzte Chemikalie als kein

einziges Substrat, sondern sie wurde nur transformiert (undefinierbar). War überhaupt keine Änderung zu erkennen, war das Testergebnis negativ.

2.2.3.4. Hydrolyse der Polymere

Biopolymere, wie z.B. Casein, Zellulose, Chitin, Gelatine, Poly-β-hydroxybutyrat, Pectin und Stärke (löslich) und eine Tween 20/80-Mischung (1:1 v/v), wurden bei einer finalen Konzentration von 2%(w/v) ins Wasser aufgelöst. Die pH-Werte wurden auf 7,0 verstellt. Das Grundmedium enthielt 0,5 g Hefeextrakt, 0,5g Proteose Pepton, 0,5 g Na-Acetat, 0,3 g Na-Pyruvat, 0,05 g $MgSO_4$, und 0,3 g K_2HPO_4 in 1 Liter Wasser. Jede Polymerlösung und das Grundmedium wurden separat autoklaviert, und bevor Agargießen bei ca. 50°C im Verhältnis 1 : 1 (v/v) zusammengemischt.

Für die Bestimmung der Hydrolyse einer Mischung von Tween 20 und 80 wurde eine $CaCl_2$-Lösung separat vorbereitet und autoklaviert. Die $CaCl_2$-Lösung wurde bevor Agargießen bis zur finalen Konzentration von 0,1 % mit den anderen Zusammensetzungen durchgemischt.

Teststämme, außer den zwei Stämmen PHE3112 und MOB600, wurden bei 30°C auf TSA-Medien 1 Woche angezogen. Der Aralkylether-abbauende Stamm MOB 600 wuchs nicht (nur langsam) auf Komplexmedien ohne Zugabe von 10 µl Phenol pro Platte. Der Phenanthren-abbauende Stamm PHE3112 wuchs erfolgreich nur auf R2A-Agarmedien von den getesteten Komplexmedien. Eine gut gewachsene Kolonie jedes Teststammes wurde nach der TSA-Anzucht ausgewählt, und als Inokulum verwendet. Während die Agarplatten bei 30°C 3 ~ 14 Tage inkubiert wurden, wurde die klare Zone (z.B. Casein, Zellulose, Chitin, Gelatine, Poly-β-hydroxybutyrat, Pectin und wasserlösliche Stärke) oder der Ca^{2+}-Niederschlag ums Inokulum herum beobachtet, wie in 'Methods of General and Molecular Microbiology' (Gerhardt et al., 1994) und 'Microbiological Methods' (Collins & Lyne, 1984) beschrieben.

Zur Bestimmmung der Pectin-Hydrolyse wurden die bebrüteten Testplatten mit 3,2 %igem HCl überflutet. Dann vollzog sich darauf eine klare Zone, wenn Pectin abgebaut wurde.

Die Agar-Hydrolyse wurde auf 2,0 %ige Bacto-Agarplatten (Oxoid Nr.1) ohne zusätzliche C/E-Quelle getestet. Die Agar-Hydrolase zerstörte das Agargewebe, und senkte die Agaroberfläche als positive Testergebnisse.

2.2.3.5. Empfindlichkeit gegenüber antibiotischen Hemmstoffen

Zur Differenzierung der Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme wurden die Empfindlichkeitstests gegenüber antibiotischen Hemmstoffen wie z.B. Antibiotika, Lysozym und

Kalium-Tellurit anhand eines ∅ 6 mm-Filterblättchens aus der Zellulose (Dicke: 0,2 mm) durchgeführt.

Als Grundmedien war TSA-Medium nutzbar, in dem separat sterilisierte 10 g l^{-1} D-Glucose ergänzend zugetan wurde. Je 20 ml Agarmedium wurde auf ∅ 90 mm-Petrischale gegossen und kondensiertes Oberflächenwasser ließ sich bei Raumtemperatur 24 ~ 48 Stunden lang trocknen. Je 1 ml Zellsuspension eines Teststammes (OD_{546} =1,0 cm^{-1}) wurde auf drei Testagarplatten ausplattiert. Überflüssiges Oberflächenwasser ließ sich unter steriler Luftströmung 2 ~ 4 Stunden lang trocknen. 17 Antibiotische Filterblättchen und ein negatives Filterblättchen wurden auf drei Testagarplatten regelmäβig aufgesetzt, und die Platten wurden bei 30°C 24 ~ 72 Stunden inkubiert.

Tab. 2-4. Die Konzentration der Hemmstoffe pro ∅ 6 mm-Testblätterchen

Hemmstoffe	Menge
Ampecilin	10 µg
Carbenicillin	100 µg
Chloramphenicol	30 µg
Cyclohexamid	50 µg
Ethambutol	10 µg
Kanamycin	30 µg
Nalidixinsäure	30 µg
Penicillin G	10 µg
Polymyxin	30 µg
Rifampicin	30 µg
Streptomycin	10 µg
Suphadiazin	100 µg
Tetracyclin	10 µg
Oxoid Pseudomonas C-F-C	10 µg Cetrimid
	+ 10 µg Fucidin
	+ 50 µg Cephaloridin
Oxoid Pseudomonas C-N	200 µg Cetrimid
	+15 µg Nalidixinsäure
Lysozym	10 µg
Kalium-Tellurit ($KTeO_4$)	37,5 µg

Die eingesetzte Konzentration an den untersuchten antibiotischen Hemmstoffe (pro Filterblättchen) wurde in der Tabelle 2-4 aufgeführt. Jede Hemmstoffelösung wurde bevor der Nutzung frisch vorbereitet, und anhand eines ∅ 0,22µm-Membran-Filters sterilisiert.

Die Hemmungszone oder der Farbumschlag von Kalium-Tellurit wurde je 24, 48 und 72 Stunden nach dem Versuchsbeginn beobachtet.

2.2.4. Numerische 2D-Analyse der taxonomischen Merkmale

Die Probleme der mathematischen Statistik bestehen darin, aufgrund von Kenntnissen über gewisse Eigenschaften einer Teilmenge von Elementen, die einer gewissen Gesamtmenge entnommen sind, etwas über die entsprechenden Eigenschaften der Gesamtmenge auszusagen. Diese Gesamtmenge heißt die Grundgesamtheit. An der Grundgesamtheit interessiert ein gewisses Merkmal, welches zufallsbedingt ist und quantitativer oder qualitativer Natur sein kann (Bronstein & Semendjajew, 1989).

Unter einer Stichprobenentnahme vom Umfang n versteht man eine zufällige Auswahl von n-Objekten aus der Grundgesamtheit, wobei die Auswahl der einzelnen Objekte unabhängig voneinander geschieht. Das Ergebnis der Stichprobenentnahme, die Stichprobe vom Umfang n, ist dann ein n-Paar $(x_1, x_2, \bullet\bullet\bullet, x_n)$ von Merkmalswerten.

Phenetische (numerische) Klassifizierung basiert auf die gesamte Ähnlichkeit zwischen lebenden Organismen. Dabei versucht man alle mögliche Charakteristika zu untersuchen, und die mittlere Ähnlichkeit abzuschätzen, vorausgesetzt, daß alle Charaktere eine gleiche Wichtigkeit (Wertigkeit) haben. Die Klassifizierung wird schließlich als sogenanntes Dendrogramm schematisch dargestellt, wobei die ′Cluster′ in der trigonalen Matrix bei einem taxonomisch endgültigen Grenzwert klassifiziert werden (Sneath & Sokal, 1973). Die trigonale Matrix besteht aus allen Koeffizienten zwischen zwei Stichproben von biologischen Komponenten. In der klassischen Taxonomie wird ein zweierlei Zahlsystem, wie z.B. {+, -} oder {1, 0}, üblicherweise verwendet, um Testergebnisse qualitativ zu bestimmen. Dementsprechend entwickelten sich bisher verschiedene Formeln für die Koeffizientenabschätzung.

Aus realen Beobachtungen war es aber schwer, zufällige Erscheinungen mittels eines zweierlei Zahlsystems genau zu bestimmen. Dabei befanden sich zahlreiche Zwischenwerte, wie z.B. ′±′.

In dieser Arbeit konnte man mit Hilfe von einem Redox-Indikator Tetrazolium-violett (Fa., Sigma) semi-quantitative Ergebnisse zuverlässig wieder herstellen (Bochner, 1989), wenn das Farbumschlagen ohne jegliches Zellwachstum als ein undefinierbares Testergebnis bewertet wurde. Jedes Testergebnis wurde mit einem Merkmalswert aus dem dreierlei Zahlsystem, {-1, 0, 1},

bewertet, damit der statistische *Korrelationskoeffizient* zwischen zwei unabhängigen Stichproben berechnet wurde, vorausgesetzt, daβ sich biologische Erscheinungen nur unter statistischen Bedingungen ereigneten, sogenannt „zufällig“ und „unabhängig“. Für die Koordinierung von den untersuchten biologischen Komponenten konnte man jeden statistischen *Korrelationskoeffizienten* ($-1 \leq r \leq 1$) sowohl auf eine zweidimensionale Ebene als auch auf einen Dendrogramm schematisch darstellen.

Um die biologischen Komponenten zweidimensional darzustellen, konnte man alle in dieser Arbeit untersuchte Merkmale ins X- und Y-Testfeld beliebig einordnen, wie in der Tabelle 2-3 zu sehen ist. Daraus wurden die untersuchten Merkmale entweder für „taxonomisch relevant″ oder ″stammspezifisch″ gehalten.

Aus dem taxonomisch relevanten Testfeld *X* stellte sich die Mittelwertspalte des *h*ypothetischen *m*ittleren *O*rganismus, $HMO(\bar{X})$, heraus, wie z.B. in der Tabelle 2-5 zu sehen ist. Die Realisierung x'_j war der Mittelwert von allen *j*-Merkmalswerten (Gl.2.9):

$$HMO(\bar{X}) = x'_j = \frac{\sum_{i=1}^{n} a_{ij}}{n}, \quad i, j \in \{1, 2, \cdots, n\} \tag{2.9}$$

Tab. 2-5. Ein Beispiel eines Diagonalfeldes *X*

X **Stamm(*S_i*)** **Merkmal (*X_j*)**	S_1	S_2	•••	S_n	$HMO(\bar{X})$
X_1	1	0	•••	0	$\frac{\sum a_{i1}}{n}$
X_2	0	-1	•••	0	$\frac{\sum a_{i2}}{n}$
•••	•••	•••	•••	•••	•••
X_m	0	1	•••	-1	$\frac{\sum a_{im}}{n}$

Anm.
Diese Matrix besteht aus *n* Teststämmen in der ersten Zeile (S_i, $i = 1,2,\ldots,n$) und *m* Merkmalen in der ersten Spalte (X_j, $j = 1,2, \ldots,m$).
In die letzte Spalte läßt sich der hypothetische mittlere Organismus (HMO) stellen, der mit dem Mittelwert von *n*-Merkmalswerten jeder Zeile berechnet wird.

Auf ähnliche Weise stellte sich das hypothetische Mittel, $HMO(\bar{Y})$, und die Realisierung y'_k aus dem stammspezifischen Testfeld Y heraus (Gl. 2.10):

$$HMO(\bar{Y}) = y'_k = \frac{\sum_{i=1}^{n} b_{ik}}{n}, \quad i,k \in \{1,2,\cdots,n\} \tag{2.10}$$

Ein Zufallsvektor ($S(X_i)$, $HMO(\bar{X})$) vom Umfang n, (x_{i1}, x'_1), (x_{i2}, x'_2), ••• , (x_{in}, x'_n), wurde mit einer Stichprobe, X_i, und dem *h*ypothetischen *m*ittleren *O*rganismus aus Diagonalfeld X zusammengesetzt. Damit wurde die Korrelationskenngröße, sog. der *Korrelationskoeffizient*, berechnet (Gl. 2.11).

$$Korr(X_i) = \frac{\sum_{j=1}^{n}(x_{ij} - \bar{x}_i)(x'_j - \bar{x}')}{\sqrt{\sum_{j=1}^{n}(x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \sum_{j=1}^{n}(x'_j - \bar{x}')^2}} \tag{2.11}$$

Der Nenner der Bruchgleichung sollte keinen Null-Wert ergeben, wenn alle Merkmalswerte von jedem Stamm oder vom hypothetischen mittleren Organismus nicht gleich sind, d.h., mindestens sollte ein unterschiedlicher Wert in jedem Spalt vorhanden sein. Ein Teststamm S_i, der aus einem Paar des *Korrelationskoeffizienten,* $Korr(X_i, Y_i)$, bestand, wurde dann auf eine zweidimensionale Ebene dargestellt, wie z.B. in der Tabelle 2-6. So konnte man einem Paar der *Korrelationskoeffizienten*, $Korr(X_i, Y_i)$, vom Stamm S_i mit dem zweidimensionalen Vektor einen geometrischen Standpunkt auf eine XY-Ebene verordnen. Dabei lagen alle *Korrelationskoeffizienten* zwischen -1 und 1.

Tab. 2-6. Ein Beispiel eines Paares von XY-Koordinaten

***X* Tests**	***S(X$_i$)***	$HMO(\bar{X})$	***Y* Tests**	***S(Y$_i$)***	$HMO(\bar{Y})$
X$_1$	x_{i1}	x'_1	**Y$_1$**	y_{i1}	y'_1
X$_2$	x_{i2}	x'_2	**Y$_2$**	y_{i2}	y'_2
•••	•••	•••	•••	•••	•••
Korr	Korr(X_i)		**Korr**	Korr(Y_i)	

Diese zweidimensionale Darstellung von biologischen Komponenten ermöglichte eine *Multivarianten-Analyse*. Im Vergleich zur ′Cluster′-Analyse gründete sich die zweidimensionale Darstellung von biologischen Komponenten nicht auf die künstliche Gruppierung, sondern jede biologische Komponente wurde auf eine kontinuierliche XY-Ebene als ein Punkt zufällig zugeordnet. Um zahlreiche biologische Komponenten taxonomisch zu untersuchen, oder um die taxonomische Ähnlichkeit zwischen den biologischen Komponenten und Clustern abzuschätzen, war die zweidimensionale Darstellung besser als das Dendrogramm (Austin & Priest, 1986).

2.2.5. Distanz der Vektoren für die Ähnlichkeit

Um in einem Vektorraum Begriffe wie ″Distanz zwischen einzelnen Vektoren oder zwischen Vektorgruppen″ und ″Dispersitätsgröße einer Vektorgruppe″ zu erfassen, mußte man den Vektorraum mit einer zusätzlichen Struktur, nämlich die Metrik, verstehen. Das wurde mit Hilfe des Skalarproduktes geschafft.

2.2.5.1. Distanz zwischen einzelnen Vektoren

Sei V ein Vektorraum. Zwei Vektoren, $x = (a_1, b_1)$ und $y = (a_2, b_2)$, gehören zu dem Vektorraum, $x, y \in V$. Unter der *Norm* $\|x\|$ eines Vektors $x \in V$ versteht man die nicht-negative reelle Zahl $\|x\| \overset{def}{=} \sqrt{x^2} = \sqrt{a_1^{\,2} + b_1^{\,2}}$.

In diesem Vektorraum, deren X-und Y-Achsen zwischen -1 und 1 lagen, betrug der maximale Betrag $2\sqrt{2}$ zwischen zweien Vektoren. Um die Distanz zweier Vektoren zu normieren, konnte man ein Skalarprodukt zwischen den Vektoren $\|x - y\| = \sqrt{(a_1 - a_2)^2 + (b_1 - b_2)^2}$ durch $2\sqrt{2}$ dividieren.

2.2.5.2. Dispersitätsgröße einer geometrischen Gruppe

In einem Vektorraum V seienVektoren, $x_1 = (a_1, b_1)$, $x_2 = (a_2, b_2)$, ••• , $x_n = (a_n, b_n)$, in einem dichten Bereich. Zur Rechnung ihrer Dispersitätsgröβe wurde der arithmetrische Mittelwert M aus den dazu angehörenden x- und y-Koordinaten berechnet (Gl. 2.12).

$$M = \left(\frac{\sum a_i}{n}, \frac{\sum b_i}{n}\right) = (\bar{a}, \bar{b}) \qquad (2.12)$$

Von dem Mittelwert M wurde die Dispersitätsgröβe (D) der Vektoren mit den Standardabweichungen von den x- und y-Koordinaten abgeschätzt (Gl.2.13).

$$\text{Dispersitätsgröβe } (D) = \left(\frac{\sqrt{\sum (a_i - \bar{a})^2}}{n}, \frac{\sqrt{\sum (b_i - \bar{b})^2}}{n}\right) = (\sigma_x, \sigma_y) \qquad (2.13)$$

Ein Verteilungsmuster eines Unterraums W konnte man als die Fläche einer Ellipse auf der XY-Ebene verstehen (Green, 1979). Die Geometrie wurde mit der Dispersitätsgröβe, D, und dem Mittelwert, M, dargestellt (Gl. 2.14).

$$\frac{(x-\bar{a})^2}{\sigma_y{}^2} + \frac{(y-\bar{b})^2}{\sigma_x{}^2} \le 1 \qquad (2.14)$$

2.2.5.3. Distanz zwischen Gruppen

Zwei Unterräume, W_1 und W_2, in einem Vektorraum V lagen außerhalb eines engen Bereiches voneinander entfernt:

$$W_1 = \{x = (a,b) | x_1, x_2, \cdots, x_n \in V\} \text{ und } W_2 = \{y = (a,b) | y_1, y_2, \cdots, y_n \in V\}$$

Wie im Abschnitt (2.2.5.2) erwähnt, lieβen sich dichte Unterräume jeweils mit ihren Mittelwerten (M) und geometrischen Dispersitätsgröβen (D) darstellen (Gl. 2.15).

$$W_1 = \left\{ \bar{a}_1, \bar{b}_1, \sigma_{x1}, \sigma_{y1} \middle| M = (\bar{a}_1, \bar{b}_1), D = (\sigma_{x1}, \sigma_{y1}), \frac{(x-\bar{a}_1)^2}{\sigma_{y1}{}^2} + \frac{(y-\bar{b}_1)^2}{\sigma_{x1}{}^2} \le 1 \right\},$$

$$W_2 = \left\{ \bar{a}_2, \bar{b}_2, \sigma_{x2}, \sigma_{y2} \middle| M = (\bar{a}_2, \bar{b}_2), D = (\sigma_{x2}, \sigma_{y2}), \frac{(x-\bar{a}_2)^2}{\sigma_{y2}{}^2} + \frac{(y-\bar{b}_2)^2}{\sigma_{x2}{}^2} \le 1 \right\} \qquad (2.15)$$

Daraus wurde die Distanz zweier Unterräume mit dem Abstand zwischen ihren Mittelwerten berechnet (Gl. 2.16).

$$\| M_1 - M_2 \| = \sqrt{(\bar{a}_1 - \bar{a}_2)^2 + (\bar{b}_1 - \bar{b}_2)^2} \qquad (2.16)$$

Würden die Unterräume in einem Vektorraum mit den Gleichungen (2.15) und (2.16) geometrisch dargestellt, gäbe es verschiedene Beziehungen zwischen zweien Unterräumen in der Abbildung 2-2.

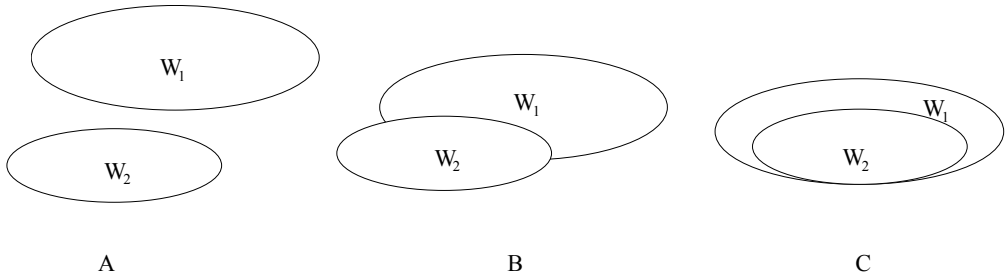


Abb. 2-2 . Verschiedene Beziehungen zweier Unterräume auf einer Ebene.

War die Distanz der Mittelwerte von zweien Unterräumen größer als die Summe ihrer geometrischen Dispersitätsgrößen, wurden die beiden für unterschiedlich gehalten (Abb. 2-3(A), dann $W_1 \cap W_2 = \emptyset$). War die Distanz der Mittelwerte von zweien Unterräumen nicht größer als die Summe ihrer geometrischen Dispersitätsgrößen, lieβen sich die beiden zu einer hypothetischen größeren Gruppe angehören (Abb. 2-3(B), $W_1 \cap W_2 \neq \emptyset$, $W_2 \not\subset W_1$ oder $W_1 \not\subset W_2$). War eine Gruppe eine Teilmenge von einer anderen Gruppe, war die erste eine Subgruppe von der letzten (Abb. 2-3(C), dann $W_2 \subset W_1$).

2.3. pH-Messung

Die Bestimmung des pH-Wertes der Flüssigkeit erfolgte mit einer pH-Einstabmeßkette (Typ pH 539, Fa. WTW, Weilheim). Die Eichung wurde mit Hilfe von technischen Pufferlösungen (TEP) wie pH 4,01, pH 7,00 und pH 10,00 (Fa. WTW) gemacht.

2.4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die qualitative und quantitative Analyse von Substanzgemischen erfolgte mittels einer Umkehrphase-(′reverse-phase′)-HPLC. Als mobile Phase wurde wäßriges Methanol unterschiedlicher Volumen-Zusammensetzung in Gegenwart von 0,085 %(v/v) H_3PO_4 verwendet. Die Flußrate betrug 1 ~ 1,5 ml

min^{-1}. Proben wurden anhand eines mit einer 20 µl Injektionskapillare ausgerüsteten Autosamplers injiziert.

Die Trennsäule enthielt ein Packungsmaterial von LiChrospher® 100-RP8 (LiChroCART® 125-4, Partikelgröße: 5 µm, Fa. Merck, Darmstadt), die mit einer Vorsäule von LiChrospher® 100-RP8, (LiChroCART®4-4, Partikelgröße: 5 µm, Fa. Merck) vor physikalischer Schädigung geschützt wurde. Fließmittel lieβ sich vor dem Gebrauch anhand einer ∅ 0,45µm-regenerierten Zellulosemembran unter Vakuum (350 mbar) filtrieren.

Die HPLC-Anlage (Fa. Thermo Speparation Products, Darmstadt) bestand aus folgenden Komponenten:

Pumpe : Gradientpumpe, SpectraSeries P200
Detektor : UV/VIS Multi-Channel Photodetektor, SpectraSystem UV2000
Integrator : ChromJet
Injektor : 20 µl Injektionskapillare
Autosampler : SpectraSeries AS100

Der Einsatz eines Multikanal-Photodetektors mit Diodenarray ermöglichte die Aufnahme von UV/VIS-Spektren während der chromatographischen Trennung. Damit wurden UV-Spektren zwischen 200 und 360 nm mit einem Intervall von 2 nm aufgenommen.

2.5. Galvanische Messung

Die Sauerstoffszehrung ($-O_2$ nMole ml^{-1} min^{-1} = µM min^{-1}) wurde mittels einer Clark´schen Sauerstoffelektrode (Fa. Biolytik, Bochum) bei 30°C galvanisch gemessen.

Die Sauerstoffaufnahme wurde bevor und nach Zugabe eines Testsubstrates bei einer Konzentration von 1 mM mit ganzen Zellen gemessen. Damit wurde die Differenz zwischen der grundsätzlichen Zellatmung und der Substratatmung gerechnet. Indem eine beobachtete Oxidationsrate (ΔO_2 min^{-1}, pO_2) durch die eingesetzte Biomasse, wie z.B. optische Dichte bei 546nm oder Naßgewicht (mg ml^{-1}), dividiert wurde, wurde die relative Sauerstoffaufnahmerate gerechnet.

2.5.1. Diethylether- und Ethanol-Oxidation

Die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase waren Schlüsselenzyme für den Abbau von aliphatischen Alkylethern. Die beiden Enzyme vom aliphatische Alkylether abbauenden Stamm DEE5151 wurden

nach der Anzucht mit induziert. Die spezifische Enzymaktivität wurde nach einer modifizierten Methode von van der Klei et al. (1990) mittels einer Clark´schen Sauerstoffelektrode jeweils in Gegenwart von Diethylether oder Ethanol bei 30°C quantitativ bestimmt.

Diethylether + O_2 → Ethanol + Acetaldehyd [*O*-Dealkylase]
Ethanol + O_2 → Acetaldehyd + H_2O_2 [Alkohol-Oxidase]
Acetaldehyd + O_2 → Essigsäure + H_2O_2 [Alkohol-Oxidase]

Glutaraldehyd oder Ethylvinylether hemmten die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase bei der Oxidation von Diethylether oder Ethanol mit ganzen Zellen. Wurden die Ruhezellen vom Stamm DEE 5151 mit verschiedenen Konzentrationen an diesen Hemmstoffen versetzt, konnte man die *O*-Dealkylaseaktivität und die Alkohol-Oxidaseaktivität kinetisch untersuchen.

2.5.2. Bestimmung optimalen pH-Wertes

Um die optimalen pH-Werte für die Oxidationen von Diethylether und Ethanol zu bestimmen, wurden die Enzymaktivitäten mit ganzen Zellen in den folgenden Puffern von pH 4 bis 12 bei 30°C untersucht.

pH 4 bis 6 : 50 mM Weinsäure
pH 6 bis 8 : 50 mM Phosphat
pH 8 bis 12: 50 mM Tris/HCl

2.6. Chemikalien

Es wurden handelsübliche p.a. Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Aldrich (Steinheim), Sigma (Deisenhofen), Lancaster (Mühlheim a. Main), Serva (Heidelberg) in analytischer Reinheit verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Anreicherung und Isolierung

Bakterielle Stämme wurden aus verschiedenen Umweltkompartmenten isoliert, und ihre Abbaufähigkeiten für Etherchemikalien wurden untersucht. Die physiologischen und biochemischen Untersuchungen und die taxonomische Klassifizierung wurden unter Abgleich mit den Stammsammlungen der Abteilung biologische Abluftreinigung (ALR) am ISWA sowie unter Verwendung von Stämmen der Fraunhofer Gesellschaft Stuttgart (FhG) durchgeführt. Zum Vergleich wurden einige Stämme von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) verwendet.

Die Hexan-abbauenden Stämme (HXN Stämme), die Styrol-abbauenden Stämme (VLB Stämme u.a.) und die Vergleichsstämme wie z.B. *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens* wurden zum Teile von Dipl.Biol. T. Plaggemeier (Universität Stuttgart), Dipl. Biol. F. Albrecht (Universität Stuttgart) und Frau G. Zelt (ISWA, Universität Stuttgart) freundlicherweise ausgehändigt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme sind in Bezug auf ihre Herkünfte und Anreicherungssubstrate in der Tabelle 3-1 kurz dargestellt.

3.1.1. PAK-abbauende Stämme

Auf dem Weg von der Biodegradation und Biotransformation von schwer abbaubaren Chemikalien tritt manchmal die Wechselanpassung (′cross-acclimation′) auf, durch die Microorganismen eine sich erweiterte Enzymaktivität auf Substratanaloga gewinnen (Schmidt et al., 1993). Außerdem können Microorganismen Etherchemikalien unspezifisch bzw. cooxidativ abbauen, wenn die mit der anderen Bindungsklasse induzierten Enzyme breite Substratspektren haben (Resnick & Gibson, 1993; Hyman et al., 1994; Hur et al., 1997; Sato et al., 1997; Steffan et al., 1997).

Wegen der umfangreichen bzw. unerwarteten Abbauleistungen von Microorganismen, wurden verschiedene PAK-Stämme zum Teile in dieser Arbeit eingeschlossen, um die Abbaubarkeit von ausgewählten Ethern entweder durch enzymatische Wechselanpassung oder durch unspezifische bzw. cooxidative Enzymreaktion zu untersuchen.

Tab. 3-1 . Kurze Beschreibung der verwendeten Stämme, bezüglich ihrer Herkünfte und Anreicherungssubstrate

Reinkultur	Herkunft [1)]	Anreicherung/Anzucht[2)]	Taxonomie [3)]
PHE3112	BS	3 mM Phenanthren	In dieser Arbeit
PHE41	BS		In dieser Arbeit
PHE42	BS		In dieser Arbeit
PHE43	BS		In dieser Arbeit
PHE222	COK		In dieser Arbeit
PHE223	COK		In dieser Arbeit
PHE3	NS		In dieser Arbeit
PHE111	NS		In dieser Arbeit
PHE112	NS		In dieser Arbeit
PHE411	NS		In dieser Arbeit
PHE121	RZ		In dieser Arbeit
AOL301	CLx	0,1 % Anthracenöl [4)]	In dieser Arbeit
AOL302	CLx		In dieser Arbeit
DSM6900	DSM	3 mM Phenanthren	*Sphingomonas yanoikuyae*
DSM7526pale	DSM7526 Variante[5)]		*Sphingomonas paucimobilis*
DSM7526dark			
US1	Pyren^{+}-Reinkultur	Pyren	*Mycobacterium* sp.
S10	Pyren^{+}-Mischkultur	1 ~ 2 mM Pyren	In dieser Arbeit
PYR11	SA		In dieser Arbeit
PYR101	SA		In dieser Arbeit
PYR102	SA		In dieser Arbeit
PYR103	SA		In dieser Arbeit
PYR110	SA		In dieser Arbeit
PYR200	SA		In dieser Arbeit
PYR210	SA		In dieser Arbeit
PYR211	SA		In dieser Arbeit
PYR212	SA		In dieser Arbeit
PYR213	SA		In dieser Arbeit
PYR300	SA		In dieser Arbeit
PYR400	COK		In dieser Arbeit
DPM201	Fluoren^{+}-Mischkultur DPM200	3 mM Fluoren	In dieser Arbeit
DPM202			In dieser Arbeit
DPO210	Dibenzofuran^{+}-Stammsammlung (DPO)	3 mM Dibenzofuran	In dieser Arbeit
DPO320			In dieser Arbeit
DPO340			In dieser Arbeit
DPO360			*Terrabacter* sp.
DPO1361			*Terrabacter* sp.
POP100	BS	0,05 % Eugenol	In dieser Arbeit
BZE101	BS	1~2 mM Dibenzylether	In dieser Arbeit
DPE100	BS	1~2 mM Diphenylether	In dieser Arbeit
***P. putida* 4MP1**	ALR	p-Kresol	*P. putida*
JMP134 [6)]	JMP134 Wildtyp	2,4-Dichlorphenoxyacetat	*Ralstonia eutropha*
CLB250	ALR	2-Chlorbenzoesäure	*P. putida*
BIB7	ALR	Bibenzyl	In dieser Arbeit
CLN200	CLx	2-Chlornaphthalin	In dieser Arbeit
ANC100	NS+RZ	Acenaphthochinon	In dieser Arbeit

PEG100	BS	DiEG [7)]-mono-butylether	In dieser Arbeit
POB310	ALR	3-, 4-Phenoxybenzoesäure	*P. pseudoalcaligenes*
DSM6506	DSM	Naphthalin	*P. fluorescens*
DSM8368	DSM		*P. putida*
PCH201	Mischkultur PCH100	Phenylcyclohexan	In dieser Arbeit
DBP100	Carbazol^{+}-Reinkultur	3 mM Carbazol	*Rhizomonas* sp.
NBA100	Mischkultur WGα	3 mM Anthranilsäure	In dieser Arbeit
DBP200	NS/RZ-Mischung	3 mM Carbazol	In dieser Arbeit
MARC2	BS	Phenol	Referenz m.o.[8)] : Hefe
HXN400	Hexan^{+}-Bioreactor	Hexan-gesättigte Atmosphäre	T. Plaggemeier und in dieser Arbeit
HXN500			
HXN600			
HXN1000			
HXN1100			
HXN1200			
HXN1400			
HXN1500			
HXN1900			
VLB120	Styrol^{+} - Stammsammlung (VLB u.a.)	Styrol-gesättigte Atmosphäre	*Pseudomonas* sp.
VLB130			*Pseudomonas* sp.
VLB140			In dieser Arbeit
VLB160			In dieser Arbeit
NCIB10643			*Pseudomonas* sp.
MLB110			Mycobacteriaceae
MLB120			
ELB120			
M2A	Styrol^{+}-Biofilter		In dieser Arbeit
DOX2	BS	0,1 % 1,4-Dioxan → 1,5 % Minimalagar	In dieser Arbeit
DOX5	BS		In dieser Arbeit
MOR10	BS	0,1 % Morpholin	In dieser Arbeit
DME	SW	0,1 % Methyl-*tert*-butylether → 0,1 % Methanol	In dieser Arbeit
DME2	BS		In dieser Arbeit
DSM1338	DSM		In dieser Arbeit
4MOP100	BS	3 mM 4-Hydroxyanisol	In dieser Arbeit
DEOB100	BS	2 mM 1,4-Diethoxybenzol	In dieser Arbeit
DEOB200	BS		In dieser Arbeit
DMOB200	BS	2 mM 1,4-Dimethoxybenzol	Referenz m.o.[8)] : Pilz
St116	U. Karlson	2-Methoxyphenol	*Rhodococcus rhodochrous*
St117	U. Karlson	Anisol ↔ Phenetol (Wechselanpassung)	
ID90-364	DSM Id. [9)] von St116		
ID90-365A	DSM Id. [9)] von St117 Variante A und B		
ID90-365B			
MOP100	K.Käser		*Rhodococcus* sp.
St127	St117-Variante		In dieser Arbeit
MOP102	MOP100-Variante		In dieser Arbeit
MOB100	BS		In dieser Arbeit
MOB600	BS		In dieser Arbeit
THF100	BS	Tetrahydrofuran ↓↑ Tetrahydropyran ↓↑ Diethylether	In dieser Arbeit
THF102	BS		In dieser Arbeit
THF200	BS		In dieser Arbeit
THF202	BS		In dieser Arbeit
THF400	BS		In dieser Arbeit

DEE5301	BS	0,1 % Diethylether 0,1 %v/v Diethylether	In dieser Arbeit
DEE5302	BS		In dieser Arbeit
DEE5303	BS		In dieser Arbeit
DEE5304	BS		In dieser Arbeit
DEE532	BS		In dieser Arbeit
DEE5331	BS		In dieser Arbeit
DEE5311	BS		In dieser Arbeit
DEE5312	BS		In dieser Arbeit
DEE5313	BS		In dieser Arbeit
DEE5314	BS		In dieser Arbeit
DEE5316	BS		In dieser Arbeit
DEE515	BS		In dieser Arbeit
DEE5151	BS		In dieser Arbeit
PEG601	BS	0,1 % DiEG-mono-butylether → 0,1 % Diethylether	In dieser Arbeit
PEG602	BS		In dieser Arbeit
PEG603	BS		In dieser Arbeit
PEG604	BS		In dieser Arbeit
DBE720	BS	0,1 % Di-n-butylether	In dieser Arbeit
EVE331	DEE5331Dee^{-} [10)]	0,1 % Ethylvinylether 0,1% Toluol	In dieser Arbeit
EVE332			In dieser Arbeit
EVE3041, rot	DEE5304Dee^{-} [10)]	0,1 % Ethylvinylether 0,1% Toluol	In dieser Arbeit
EVE3042, gelb			In dieser Arbeit
EVE305	BS	0,1 % Ethylvinylether 0,1% Toluol	In dieser Arbeit
EVE341, rot	BS		In dieser Arbeit
EVE342, gelb	BS		In dieser Arbeit
EVE314	DEE5314Dee^{-} [10)]	0,1 % Ethylvinylether	In dieser Arbeit
EVE201, rot	DBE720Dee^{-} [10)]	0,1 % Ethylvinylether	In dieser Arbeit
EVE202, gelb			In dieser Arbeit
E. coli	ALR-Stammsammlung (Zelt,G., Uni.Stuttgart)	Komplexmedien (z.B. TSA)	Referenz m.o.[8)]
B. subtilus			
P. putida			
P. aeruginosa			
P. fluorescens			

Anm.

1) Das Probekennzeichen wurde so abgekürzt wie eine Belebtschlammprobe (BS), eine Kokerei-Bodenprobe (COK), eine Bodenprobe aus Neustadt (NS), eine Bodenprobe aus Rositz (RZ), eine Humusprobe aus Schwäbischer Alb (SA), eine Humusprobe aus dem Schwarzwald (SW) und eine mit Chlorbenzolen-kontaminierte Bodenprobe (CLx).
2) Jeder Stamm wurde durch Anreichrung mit einer Chemikalie bei der gegebenen %igen oder Mole Konzentration isoliert. Einige Stämme änderten Wachstumssubstrate (→), oder ergaben eine Wechselanpassung auf die Substratanaloga (↔ oder ↓↑).
3) Die Referenzquellen von den aufgeführten taxonomischen Arbeiten sind in der Tabelle 2-1 des Kapitels 2 ′Material & Methode′ angegeben.
4) Anthracenöl als ein Anreicherungssubstrat wurde von der deutschen Montan-Technologie (DMT) für Rohstoff-Energie-Umwelt geliefert. Eine Grammenge enthielt Naphthalin (11,7 mg), Acenaphthen (26,0 mg), Fluoren (54,4 mg), Phenanthren (119,4 mg), Anthracen (4,2 mg), Fluoranthen (74,4mg), Pyren (41,3 mg), Benz(a)anthracen (1,3 mg), Chrysen (1,1 mg) als die Hauptkomponenten und Benzo(b)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthracen, Benzo(g,h,i)-perylen, Indeno(1,2,3-c,d)pyren als Nebenkomponenten (≤ 0,1 mg) (′Standort′ Institut für Boden- und Umweltanalyse, Ludwigsburg).
5) *S. paucimobilis* DSM7526 änderte sich während der Stammerhaltung und Überimpfung zufällig nach zwei morphologischen und physiologischen Phenotypen, nämlich DSM7526pale und DSM7526dark.

6) Anstelle alten systematischen Namens von *Alcaligenes eutrophus* wurde der neue Name von *Ralstonia eutropha* vorgeschlagen (Yabuuchi et al., 1995).
7) DiEG: Diethylenglykol
8) Als Vergleichsstämme wurden ein *Candida*-artiger Hefestamm MARC2, ein Chrysosporen-bildender Pilzstamm DMOB100, *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas putida* verwendet.
9) ID90-364 und ID90-365 leiteten sich von den Originalstämmen St116 und St117 ab, deren systematischen Namen von der DSM als *Rhodococcus rhodochrous* genannt wurden. Diese Stämme wurden von Dr. U. Karlson (Dänemark) freundlicherweise geliefert. Während der getrennten Stammerhaltung mit Aralkylether wie z.B. Anisol oder Phenetol zeigte der Stamm ID90-365 zufällig eine Wechselanpassung und die morphologische und physiologische Stammveränderung an. Die Stammvarianten wurden mit dem A und dem B unterschiedlich gemacht.
10) Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme (Dee-) verloren spontan ihre ganze Abbaufähigkeit für Ether in engem Zusammenhang mit ihrer Pigmentänderung von orangenfarben nach rot. Die roten Mutantstämme wurden innerhalb der EVE-Stammgruppe eingeordnet. Die Koloniefarbe mancher roten EVE-Stämme änderte sich noch mal nach gelb bei Anwesenheit von Ethylvinylether.

Die Phenanthren-abbauenden Isolate wurden durch Anreicherung mit 3 mM Phenanthren als einziger C/E-Quelle aus verschiedenen Proben isoliert. Die zwei Stämme davon, nämlich AOL301 und AOL302, wurden durch Anreicherung mit 0,1 %(v/v)igem Anthracenöl (Deutscher Montan-Technologie für Rohstoff-Energie-Umwelt, Ludwigsburg) aus einer mit Chlorbenzol-Derivaten kontaminierten Bodenprobe isoliert. Hierzu wurden die zwei bekannten Stämme *Sphingomonas yanoikuyae* DSM6900 (Kahn et al., 1996) und *Sphingomonas paucimobilis* DSM7526 (Mueller et al., 1990) in der Phenanthren-abbauenden Stammgruppe eingeschlossen. Während des Wachstums auf Minimalagarplatten mit 3 mM Phenanthren, wurde der Referenzstamm *S. paucimobilis* DSM7526 als aus zwei phänotypischen Varianten bestehend erkannt. Die beiden Stammvarianten verwerteten noch Fluoranthen als einzige C/E-Quelle so gleich wie der Ausgangsstamm *S. paucimobilis* DSM7526. Die Stämme DSM7526dark und DSM7526pale unterschieden sich voneinander während des Wachstums auf Minimalagarplatten mit Phenanthren. Die Kolonien vom Stamm DSM7526dark sahen ′dunkel (dark)′ aus, und die Kolonien vom Stamm DSM7526pale waren ′hell (pale)′. Der Stamm DSM7526pale wuchs mit Phenanthren schneller als der Stamm DSM7526dark.

Die Stämme AOL301 und AOL302, die aus einer mit Chlorbenzol-Derivaten kontaminierten Bodenprobe von einem ehemaligen Produktionsstandort der chemischen Industrie isoliert wurden, verwerteten hauptsächlich Phenanthren als ein Wachstumssubstrat. Der Stamm AOL301 konnte auch Naphthalin als eine C/E-Quelle verwerten. Phenanthren war der höchste Mengenanteil (119,4 mg) von den im Anthracenöl vorkommenden PAKs (ca. 334 mg pro Gram Anthracenöl, Standort-Institut für Boden- und Umweltanalyse, Ludwigsburg). Daher herrschten die beiden Stämme während des Wachstums mit Anthracenöl in der Probe vor.

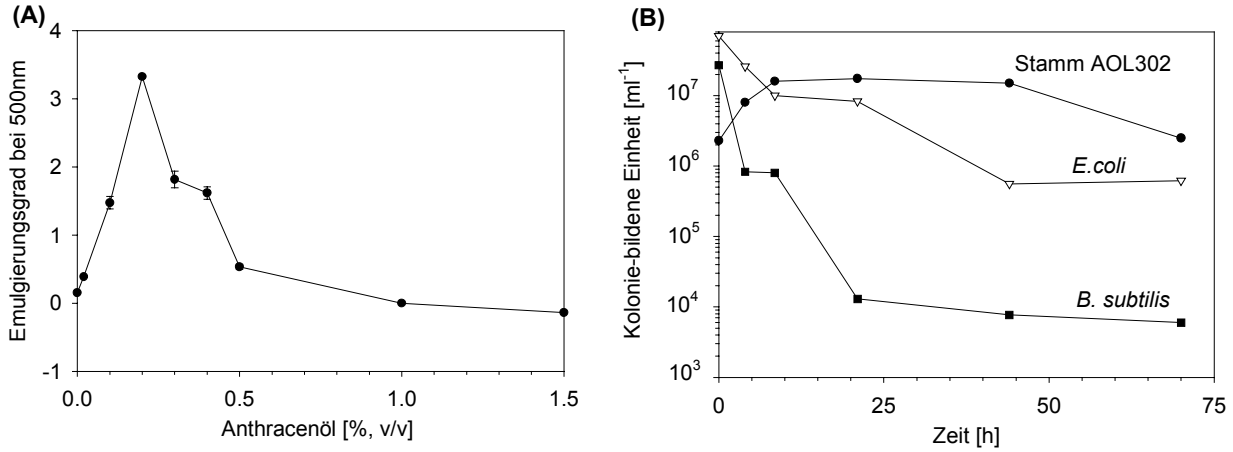


Abb. 3-1. Emulgierungskraft des Anthracenöls mit Zellen und die dadurch bedingte Zelltoxizität: (A) 0,2 %iges Anthracenöl ergab die stärkste Emugierung mit dem Stamm AOL302 (initiale OD_{546nm} = 0,147) ca. 2 Stunden nach Versuchsbeginn bei 30ºC. **(B)** Nach der Zugabe 0,2 %igen Anthracenöls nahmen die Kolonie-bildenden Einheiten von *Bacillus subtilis*(■), *Escherichia coli*(∇) schnell ab, während der KBE-Wert vom Stamm AOL302 (●) zunahm.

Anthracenöl zeigte Emulgierungseffekte auf die Zelle an. Die höchste Zellemulgierung erfolgte mit 0,2 %(v/v)igem Anthracenöl (Abb. 3-1A). Kurz nach der Zugabe 0,2 %igen Anthracenöls nahmen die Kolonie-bildenden Einheiten von den Referenzstämmen, wie z.B. *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*, stark ab, aber der KBE-Wert vom Stamm AOL302 nahm zu (Abb. 3-1B). Die Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* beruhte wahrscheinlich auf die Zellemulgierungskraft des Anthracenöls und die dadurch bedingte Zelltoxizität.

Die anderen Phenanthren-abbauenden Isolate konnten auch meistens Anthracenöl als C/E-Quelle langsam verwerten, aber das Wachstum erschwerte sich in Gegenwart von 0,05 %(v/v)igem oder mehr Anthracenöl. Die Phenanthren-abbauenden Stämme AOL301 und AOL302 nicht nur bauten Phenanthren ab, sondern sie waren auch gegenüber Anthracenöl bis zur hohen Konzentration widerstandsfähig. Damit nutzten die Stämme AOL301 und AOL302 Anthracenöl zu ihrem Vorteil, um sich als Hauptverwerter zu entwickeln.

Vierzehn Pyren-abbauende Stämme wurden in dieser Arbeit isoliert, und ihre Abbaupotentiale wurden untersucht. Davon wurden elf Stämme PYR11, PYR101, PYR102, PYR103, PYR110,

PYR200, PYR210, PYR211, PYR212, PYR213 und PYR300 aus einer Humus-Bodenprobe von Schwäbischer Alb isoliert. Hingegen sind die bekanntesten Pyren-abbauenden Stämme, wie z.B. *Mycobacterium* sp. PYR1, bisher aus PAK- bzw. Petroleum-kontaminierten Proben isoliert worden (Heitkamp et al., 1988a und1988b; Boldrin et al., 1993). So wurde der Stamm PYR400 aus einer Kokerei-Bodenprobe isoliert. Der Stamm *Mycobacterium* sp. US1 und eine Pyren-abbauende Mischkultur FHG/S, woraus die Reinkultur S10 stammte, wurden von der Fraunhofer Gesellschaft Stuttgart freundlicherweise geliefert.

Bisher wurden verschiedene Fluoren bzw. Dibenzofuran-abbauende Stämme (DPM/DPO-Stämme) aus unterschiedlichen Anreicherungsquellen isoliert, und in der Stammsammlung von der Abteilung biologische Abluftreinigung gesammelt. Die Stämme DPO210 und DPO1361 wurden aus einer Wasserprobe vom Rhein (Strubel et al., 1989), und DPO360 und DPM200 aus einer Kokerei-Bodenprobe von Essen (Strubel, 1991), und DPO320 und DPO340 aus einer Belebtschlammprobe des Klärwerkes Stuttgart-Büsnau (Schmid, A. jetzt ETH, Zurich) stammend isoliert.

Der systematische Name vom Stamm DPO1361 wurde einmal durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) als *Brevibacterium* sp. genannt (Strubel et al., 1991). Andererseits haben Schmid et al. (1997) die Stämme DPO360 und DPO1361 als Spezies innerhalb von *Terrabacter* neu eingeordnet.

Der Stamm DPM200 ergab während des Wachstums mit Fluoren zwei unterschiedliche Phenotypen, DPM201 und DPM202.

Zur Gewinnung der Carbazol-abbauenden Mikroorganismen wurde eine Bodenmischung von Neustadt und Rositz mit 3 mM Carbazol angereichert. Daraus wurde der Stamm DBP200 isoliert. Der Carbazol-abbauende Stamm DBP100, dessen 16S-rDNA Teilsequenzierung 98,5 %zige Homologie mit der Gattung *Rhizomonas* ergab (Dohms, 1995), wurde auch in dieser Arbeit eingeschlossen.

Außerdem wurden die Stämme PCH201 und CLN200 aus den entsprechenden Mischkulturen PCH200 und CLN100 rein isoliert. Die Stämme BIB7 und POB310 wurden aus der Stammsammlung in der Abteilung biologische Abluftreinigung am ISWA der Universität Stuttgart entnommen. Diese Reinkulturen besaßen die jeweilige Abbaufähigkeit für Phenylcyclohexan(PCH), 2-Chlor/2-Methylnaphthalin (CLN), Bibenzyl (BIB) und 3-Phenoxybenzoesäure (POB).

Diese Stämme werden in der folgenden numerischen Taxonomie verwendet, und ihre Wachstumsmuster und Abbaufähigkeiten werden mit ausgewählten Chemikalien untersucht.

3.1.2. Phenylether und Benzylether abbauende Stämme

Der Diphenylether-abbauende Stamm DPE100 und eine Dibenzylether-abbauende Mischkultur DBE1, die von H.-J. Feiten (jetzt ETH, Zürich) isoliert worden sind, aus der Stammsammlung der Abteilung ALR entnommen. Zur Isolierung von Reinkulturen wurde die Mischkultur DBE1 mit 2 mM Dibenzylether weiter angereichert. Daraus stammten die Stämme BZE101 und BZE102, die Dibenzylether als einzige C/E-Quelle verwerteten konnten. Ihre Koloniemorphologie unterschied sich auf TSA-Medien deutilich voneinander: Die Kolonien vom Stamm BZE101 waren grün und schleimig, und die Kolonien vom Stamm BZE102 waren grün und glattrandig.

Diese Diphenylether- und Dibenzylether-abbauenden Stämme waren morphologisch und physiologisch ähnlich miteinander. Sie zeigten eigene Substratspezifität auf Diphenylether oder Dibenzylether: Der Stamm DPE100 konnte nur Diphenylether abbauen, während die Stämme BZE101 und BZE102 nur Dibenzylether abgebaut haben.

Wie im Abschnitt 1.2.2 erwähnt, baute der Stamm DPE100 Diphenylether wahrscheinlich durch eine Dioxygenierungsreaktion ab (Engesser et al., 1990; Schmidt et al., 1992a und 1992b; Pfeifer et al., 1993). Biologische Abbauwege von Dibenzylether sind noch unklar, aber hinsichtlich seiner chemischen Abbaumechanismen wurde angenommen, daß eine oxidative Hydroxylierung am Methylen-C-Atom zum Abbau des Benzylethers geschieht (Watanabe et al., 1989).

Benzylphenylether ist die einfachste Modellverbindung für diejenige Etherbindungsklasse, in der eine Benzylgruppe und eine Phenylgruppe etherisch verknüpft werden. Die biologischen Abbauwege sind von hohem Interesse, da Benzylphenylether nicht ohne Grund wichtige Modellsysteme zur Untersuchung des Ligninabbaues sind (McSweeney, 1994). Der Diphenylether-abbauende Stamm DPE100 oder die Dibenzylether-abbauenden Stämme BZE101 und BZE102 bauten jedoch keinen Benzylphenylether ab. In dieser Arbeit wurden verschiedene Proben mit Benzylphenylether angereichert, damit sich Benzylphenylether-abbauende Kulturen erhielten, aber keine untersuchte Probe hatte die Fähigkeit zum Abbau des Benzylphenylethers.

3.1.3. Polyethylenglykol (PEG)-abbauende Stämme

Zur Anreicherung und Isolierung von PEG-abbauenden Mikroorganismen wurden entweder PEG6000 (Polyethylenglykol, M_{av}=6000) und Brij58 (Polyoxyethylen(20)-cetylether) bei einer Konzentration von 0,1 %(w/v) als einzige C/E-Quelle genutzt. Im Rahmen des Screenings wurde eine schnell wachsende Mischkultur aus Belebtschlammproben erhalten, und daraus wurde der Stamm PEG100 isoliert.

Der Stamm PEG100 zeigte ein langsames Wachstum mit 1 %igem PEG6000 oder 1 %igem Brij58. Hingegen wuchs er schnell mit monomerem oder dimerem Glykol, wie z.B. Ethylenglykol, Diethylenglykol oder Diethylenglykol-mono-butylether. Der Stamm PEG100 baute eher kurze Glykole ab, wie z.B. Monomere und Dimere, als hochmolekulare Polyglykole. Würden diese Mono- bzw. Di-Glykole beim Polyglykolabbau durch eine Mischkultur hergestellt, spielte dabei der Stamm PEG100 als ein sekundärer Abbauer eine Rolle. Der Stamm PEG100 wuchs nicht mit Diethylenglykol-di-butylether, der keine Hydroxylgruppe an den beiden terminalen C-Atomen besaß. Der Stamm PEG100 griff wahrscheinlich ein hydroxyliertes terminales C-Atom von niedermolekularen Glykolen primär an.

Zusätzlich wurden die orangenfarbenen Stämme PEG601, PEG602, PEG603 und PEG604 durch Anreicherung mit 1 %igem Brij58 aus derselben Belebtschlammprobe isoliert. Diese orangenfarbenen Stämme konnten weder Polyglykol PEG6000 noch monomeres bzw. dimeres Glykol, wie z.B. Ethylenglykol, Diethylenglykol, Diethylenglykol-mono-butylether und Diethylenglykol–di-butylether, als Substrate verwerten. Daraus wurde angenommen, daß sie nur von Brij 58 (Polyoxyethylen(20)-cetylether) freigesetzte Cetylgruppe als C/E-Quelle verwerteten. Ihre Morphologie und Wachstumsphysiologie waren mit denen von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen ähnlich. So verwerteten diese beiden Stammgruppen charakteristischerweise aliphatische Alkylether, Phenetol und Dibenzylether als einzige C/E-Quelle. Deshalb wurden die Stämme PEG601, PEG602, PEG603 und PEG604 in der PEG-abbauenden Stammgruppe nicht eingeschlossen, sondern in der aliphatische Alkylether-abbauenden Stammgruppe (siehe Abschnitt 3.1.4.3).

3.1.4. Alkylether-abbauende Stämme

Alkylether, die Alkylgrupp(n) einerseits oder beiderseits von der Etherbindung enthielten, wurden bezüglich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften in die folgenden Bindungsklassen aufgegliedert.

i) Aralkylether: Anisol und Phenetol

ii) Cyclische Alkylether: Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, 1,4-Dioxan, und Morpholin

iii) Aliphatische Alkylether: Diethylether und Di-n-butylether (gesättigt und nicht-verzweigt), Ethylvinylether (ungesättigt), Methyl-*tert*-butylether und Isopropylether (verzweigt)

Jede Modellchemikalie wurde zur Anreicherung und Isolierung der abbauenden Mikroorganismen bei einer finalen Konzentration von 0,05 ~ 0,1 %(v/v) als einzige C/E-Quelle genutzt.

3.1.4.1. Aralkylether-abbauende Stämme

Der Stamm *Rhodococcus rhodochrous* St116 wurde von Karlson et al. (1993) als ein Anisol-Abbauer gekennzeichnet, und er induzierte zwei unterschiedliche Cytochrome-P450, nämlich $P450_{RR1}$ und $P450_{RR2}$ je nach der Anzucht mit 2-Ethoxyphenol oder 4-Methoxybenzoesäure. Der Bericht lag vor, daß der andere Stamm *R. rhodochrous* St117 kein Anisol-Abbauer war.

Während des Wachstums mit Aralkylether, wie z.B. Anisol oder Phenetol, ergaben diese Stämme umgekehrte Wachstumsvermögen. So verwertete der Stamm St117 Anisol und Phenetol als einzige C/E-Quelle, aber der Stamm St116 wuchs damit nicht oder nur langsam. Um eine mögliche Stammverwechselung, die sich in der Stammsammlung der Abteilung biologische Abluftreinigung ereignen könnte, auszuschließen, wurden die ursprünglichen Stämme *R. rhodochrous* ID90-364 (St116) und *R. rhodochrous* ID90-365 (St117) von Prof. Dr. U. Karlson (Dänemark) freundlicherweise geliefert, und in dieser Arbeit getrennt untersucht. Daraus wurde festgestellt, daß die verkehrten Wachstumsmuster nicht von den Stammverwechselungen verursacht wurden, sondern daß die morphologischen und physiologischen Stammveränderungen dafür verantwortlich waren. Wurden diese Stämme St117 und ID90-365 auf Minimalagarmedien über luftgesättigtem Aralkylether angezogen, evolvierten sich daraus die Stämme St127 und ID90-365B. Die Stammvarianten St127 und ID90-365B zeigten eine schleimige Koloniemorphologie in Gegenwart von Aralkylether, während die Urstämme St117 und ID90-365 unregelmäßige Kolonieform bildeten.

Der Stamm MOP100 von Käser (1993) zeigte auch eine ähnliche morphologische und physiologische Veränderung während des Wachstums mit Aralkylether. Der Bericht lag vor, daß der Stamm MOP100 ursprünglich kein Anisol-Abbauer war, sondern daß er hauptsächlich in einer Anisol-abbauenden Mischkultur Guajakol abbaute. Guajakol wurde während des Abbaues von Anisol durch eine bakterielle Mischkultur als ein Zwischenmetabolit nachgewiesen. Diese Mischkultur stammte aus einer Belebtschlammprobe des Klärwerks Stuttgart-Büsnau. Während der langfristigen Kultivierung in der Phenetol- bzw. Anisol-gesättigten Atmosphäre, evolvierte sich der Stamm MOP100 als ein Aralkylether-Abbauer.

Tab. 3-2. Der ′TAR′-Wert[1)] der Aralkylether-abbauenden Stämme, die sich bei Anwesenheit von Aralkylether morphologisch und physiologisch verändern.

Testmedien		St116	St117	St127	MOP100	MOP102
TSA [10^8×KBE ml^{-1}] [2)]		21,2±0,6	28,3±2,5	37,4±4,6	60,9±5,1	29,5±9,9
TAR [%] [3)] = (DMM/TSA) ×100	DMM_{MOB}	< 0,0015	0,0012 ~ 0,012	0,017 ~ 0,13	< 0,0030	0,0007 ~ 0,0014
	DMM_{EOB}	< 0,0012	0,018 ~ 0,035	0,056 ~ 0,17	< 0,00001	0,0098 ~ 0,125

Anm :

Der TAR (*T*otal *A*vailable *R*ecovery)-Wert[1)] war ein prozentuales Verhältnis der unter selektiven Bedingungen Kolonie-bildenden Einheit zur unter nicht-selektiven Bedingungen.

Die KBE-Zahl auf Trypticase-Soja-Agar (TSA)-Medien[2)] wurde als die gesamte Lebendzellzahl (100 %) bestimmt. Mit dem TSA-Triplikat wurde der KBE-Wert durchschnittlich bewertet.

Der TAR (%)-Wert[3)] wurde nach der Gleichung (2.1) im Abschnitt 2.1.7.1 berechnet. Das Minimum Wert und das Maximum Wert wurden aus dem Triplikat von Minimalagarplatten in Gegenwart von Aralkylether wie z.B. Anisol (MOB) oder Phenetol (EOB) als einziger C/E-Quelle bestimmt. Jeder Test wurde unter Abgleich mit der negativen Wachstumskontrolle durchgeführt.

Dabei veränderten sich seine Morphologie und Wachstumsphysiologie so ähnlich wie bei den Stämmen St117 und ID90-365. Davon wurde die Stammvariante MOP102 abgeleitet. Diese Stammvariante MOP102 war morphologisch eher mit den oben genannten Stammvarianten St127 und ID90-365B ähnlich, als mit dem Urstamm MOP100. Die Koloniemorphologie von der Stammvariante MOP102 war schleimig, aber der Urstamm MOP100 zeigte eine unregelmäßige Form. Wurde das prozentuale Verhältnis der mit Aralkylether-gewachsenen Koloniezahl gegenüber der auf TSA-Medien ausgezählten Kolonie-bildenden Einheit (KBE) gerechnet, ergaben die evolvierten Stämme St127 und MOP102 höhere ′TAR′-Werte als die Urstämme St117 und MOP100 (Tab. 3-2). Die evolvierten Stämme St127 und MOP102 wuchsen mit Aralkylether besser als die Urstämme. Der niedrige ′TAR′-Wert war eigentlich auf die Zelltoxizität von Aralkylethern zurückzuführen. Je größer der ′TAR′-Wert war, desto besser wuchs der Teststamm mit Aralkylether, d.h., die Stämme St127 und MOP102 paßten sich an Aralkylether um so mehr an.

Actinomyceten vermögen, sich sowohl in Ökosystemen als auch in Laborkulturen morphologisch und physiologisch zu verändern (Locci & Sharples, 1984; Locci, 1988). Insbesondere verändern sie sich häufig während des Stoffwechsels schwer wasserlöslicher Chemikalien wie z.B. Kohlenwasserstoffen (Hommel, 1990). Die morphologische und physiologische Veränderung hat einen Zusammenhang mit ihren biochemischen Änderungen. Aus der Betrachtung unterschiedlicher Morphologie kann man einen physiologischen – i.e. aktiven oder inaktiven – Zustand eines Stammes

erkennen (Goodfellow & Williams, 1983). So gehen *Nocardia*-förmige Bakterien von einem pilzartigen Koloniebild im Hungerzustand beim Übergang zum Wachstum in eine normale von Bakterien geahnte Kolonieform über. Die Tatsache, daß sich bei Anwesenheit von Aralkylether unregelmäßige Kolonieform von den Stämmen St117 und MOP100 nach der schleimigen und glattrandigen Form von den Stammvarianten St127 und MOP102 änderte, zeigte die fundamente Adaptation an toxischen Aralkylethern an. Daher brachten die morphologischen und physiologischen Veränderungen eine Aktivitätsänderung für den Abbau von Aralkylethern in Zusammenhang.

Phenetol hatte eine größere Kraft zur morphologischen und physiologischen Stammveränderung als Anisol. Phenetol vermochte, in der flüssigen Kulturen Zellen zu emulgieren.

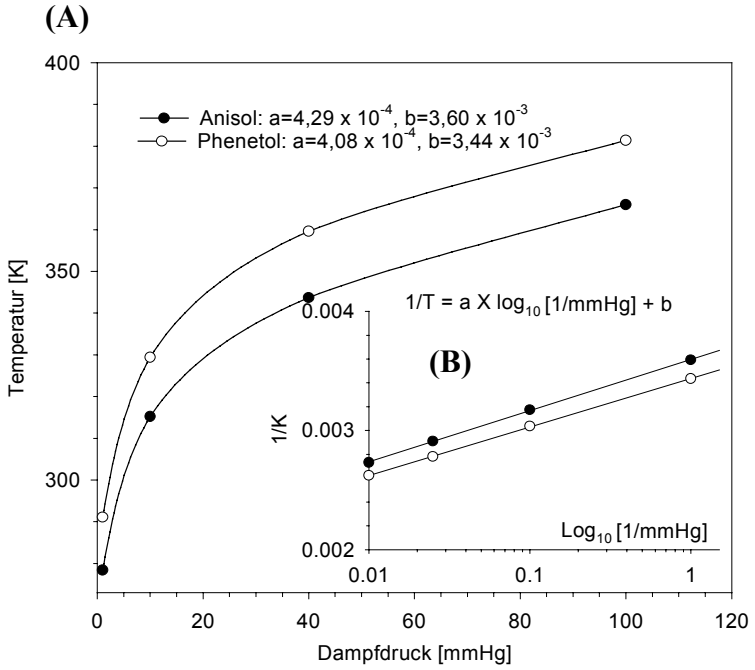


Abb. 3-2. (A) Die Kurven der Dampfdrücke von Anisol und Phenetol vs. die Temperatur [K]. (B) Aus den reziproken Linien ergaben die logarithmischen Dampfdruckswerte eine hohe Geradheit (α < 0,0001) für die Abschätzung von den Konstanten a und b: Die Daten sind aus Weast et al. (1987) entlehnt.

Diese Zellemulgierung beruhte wahrscheinlich auf die geringe Wasserlöslichkeit von Phenetol (ca. 4,70 mM bei Raumtemperatur in H_2O_{bidest}) und auf den niedrigen Dampfdruck. Wurden die Teststämme mit Phenetol angezogen, lag die sich daran angepaßte Zellzahl mehr als bei der Anisol-

Anzucht. Anisol bewirkte hingegen bis zu 10 mM keine Zellemulgierung (Wasserlöslichkeit: ca. 13,60 mM). Henry'sche Dampfdrücke dieser beiden Aralkylether wurden mit der Temperatur [K] nach einer Gleichung (Gl. 3.1) bewertet.

$$\frac{1}{T} = a \times \log_{10}\left(\frac{1}{mmHg}\right) \quad + \quad b \qquad (3.1)$$

Der Kehrwert von Temperatur [T^{-1}] korrelierte signifikant mit dem Logarithmus des Kehrwertes von Dampfdruck [$mmHg^{-1}$] (Abb. 3-2). Damit wurden die Konstanten *a* und *b* abgeschätzt. Die empirischen Daten wurden in ′Handbook of Chemistry and Physics 67th′ (Weast et al., 1987) aufgeführt. Anisol besaß einen Dampfdruck von 4,99 mmHg bei 30°C, wobei der Dampfdruck des Phenetols 2,20 mmHg betrug.

Phenetol war wegen seines Emulgierungsvermögens toxischer als Anisol. Die evolvierten Stämme St127 und MOP102 waren dagegen in gewissem Maße widerstandsfähig, da sich ihre Morphologie (z.B. Membrankomposition) unter diesem Substratstreß geändert hatte. Als ein Beispiel wurde der Stamm MOB600 mit Phenetol angezogen. Wurde in Wasser unlösliches Phenetol mit zehnminutiger Wärmebehandlung bei 55ºC entfernt, nahm die optische Dichte über dem Sättigungsgrad des Phenetols dramatisch ab (Abb. 3-3).

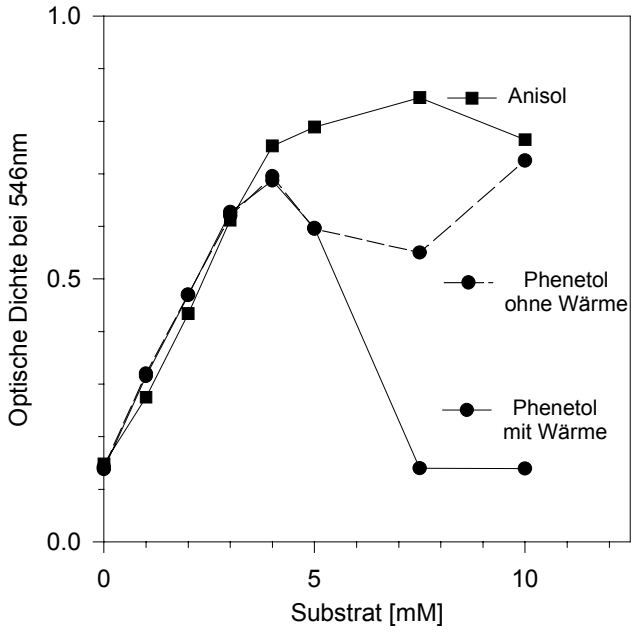


Abb. 3-3. Typische Wachstumsmuster vom Aralkylether-abbauenden Stamm MOB600 bei verschiedenen Konzentrationen an Anisol oder Phenetol: Die initiale optische Dichte betrug 0,175 für Anisol und 0,145 für Phenetol. Die angegebene optische Dichte wurde 48 Stunden nach Versuchsbeginn gemessen. Phenetol-Kulturen wurden ohne oder mit 55°C Wärme 10 Minuten behandelt, ohne/damit sich in Wasser unlösliches Phenetol beseitigte. Anisol bewirkte keine Zellemulgierung bis zu 10 mM.

Zur Isolierung der Aralkylether-abbauende Neustämme wurden Proben mit 0,05 %(v/v)igem Anisol angereichert. Daraus wurden die Stämme MOB100 und MOB600 aus einer Belebtschlammprobe isoliert. Die Morphologie des roten Stammes MOB100 war mit den oben genannten Aralkylether-abbauenden Stämmen ähnlich. Seine morphologische und physiologische Charakteristika änderte sich jedoch während des Stoffwechsels von Aralkylethern nicht.

Der cremefarbene Stamm MOB600 zeigte einen anderen Phänotyp im Vergleich zu den oben genannten Aralkylether-abbauenden Stämmen. Myzelartiger Stamm MOB600 bildete weder Spore noch Substratmyzel, und seine Koloniemorphologie war glattrandig ohne Randstruktur, Fruchtkörper auf Agarmedien. Die Zellen wurden in der späteren Wachstumsphase nicht fragmentiert, wie beim sogenannten Stäbchen/Kokken-Kreislauf (pleomorph) zu sehen ist. Der Stamm MOB600 wuchs nicht (nur langsam) auf Komplexmedien, wie z.B. TSA, NA, und R2A, ohne zusätzliches aromatisches Substrat (z.B. Phenol).

Von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen, die im allgemeinen mit Phenetol wuchsen, verwerteten die zwei Stämme DEE5311 und DEE515 auch Anisol als einzige C/E-Quelle. Auβer diesen zwei Stämmen diente Anisol nicht zum Wachstum für die anderen aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme. Wurden die Aralkylether-abbauenden Stämme, einschließlich der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme DEE5311 und DEE515, mit Anisol oder Phenetol angezogen, ergaben alle ein ähnliches Wachstumsmuster miteinander (Abb. 3-4).

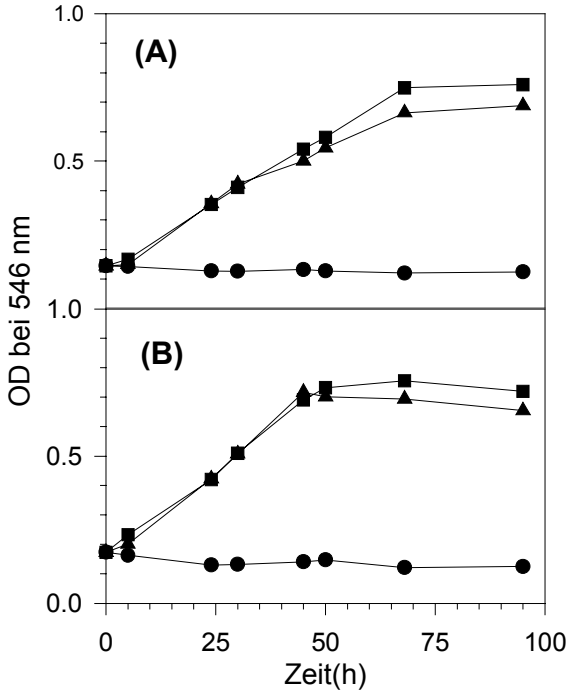


Abb. 3-4. Typische Wachstumsmuster vom Aralkylether-abbauenden Stamm MOB600: Der Stamm MOB600 wurde entweder **(A)** mit Phenetol oder **(B)** Anisol unter der gleichen Testbedingung angezogen, und als Inokulum verwendet. Die Wachstumsversuche wurden in flüssigen Minimalmedien mit 5 mM Phenetol (■) oder 5 mM Anisol (▲) bei 30ºC durchgeführt. Jede negative Wachstumskontrolle (●) wurde unter der gleichen Testbedingung gemacht.

Tab. 3-3. Die Wachstumsparameter und die Hemmkonstante[1)] während des Wachstums von den Aralkylether-abbauenden Stämmen mit toxischem Aralkylether, wie z.B. Anisol oder Phenetol

Substrat	Anisol				Phenetol			
Parameter	μ_{max}	K_S	μ_{max}/K_S	K_{SI}	μ_{max}	K_S	μ_{max}/K_S	K_{SI}
DEE5311	2,66	175	0,015	0,072	0,065	3,79	0,017	5,03
St127	5,14	34,8	0,195	0,059	1,79	53	0,034	0,052
MOP102	0,083	5,17	0,016	5,21	1,50	49,7	0,030	0,051
MOB100	0,41	9,07	0,045	0,62	2,88	61,3	0,047	0,012
MOB600	0,16	11,2	0,014	3,84	0,25	13,4	0,019	1,15

Anm.
Die Wachstumsparameter und die Hemmkonstante[1)] wurden durch eine nicht-lineare Anpassung nach der Gleichung (2.8) abgeschätzt. Die Rechnung began mit der Eingabe der sich nicht-negativ ergebenen μ_{max} , K_S und K_{SI} -Initialwerten, und führte periodisch zur hohen statistischen Signifikanz für alle Wachstumsparameter.

Wurde ihr spezifisches Wachstum bei verschiedenen Konzentrationen an Anisol oder Phenetol untersucht, konnte man erkennen, daß Anisol oder Phenetol eine Substrat-Hemmung bewirkte. Die hemmende Wachstumskurve wurde nach der Gleichung (2.8) im Abschnitt 2.2.3.1 durch eine nicht-lineare Anpassung angepaßt, und die daraus resultierten Wachstumsparameter und Hemmkonstante wurden in der Tabelle 3-3 aufgeführt. War die Substrat-Konzentration genug niedrig ($K_S >> [S]$), ergab sich eine lineare Wachstumsrate, μ_{max}/K_S . Dabei übten Substrate im wesentlichen nur geringe Toxizität aus. Das Wachstum war um so schneller, wenn die lineare Wachstumsrate größer war. Aus diesen Wachstumsversuchen wurde die Hemmkonstante eines toxischen Substrates, K_{SI} , durch eine nicht-lineare Anpassung um so niedriger abgeschätzt, wenn das Substrat aufs Wachstum toxischer einwirkte.

Der Stamm St127 wuchs mit niedriger Konzentration an Anisol schneller (μ_{max}/K_S = 0,195), aber das Wachstum erschwerte sich mit geringer Zunahme des Anisols (K_{SI} = 0,059 mM). Die Stämme MOP102 und MOB600 wuchsen mit Anisol langsam (μ_{max}/K_S = 0,014 ~ 0,016). Trotzdem hatten sie demgegenüber eine hohe Toleranz (K_{SI} = 3,84 ~ 5,21 mM). Der aliphatische Alkylether-abbauende Stamm DEE5311 wuchs langsam mit geringem Anisol oder Phenetol (μ_{max}/K_S = 0,014 ~ 0,017). Anisol hemmte das Wachstum mit zunehmender Konzentration um so stärker ($[K_{SI}]_{Anisol}$ =0,072 mM), aber Phenetol bewirkte darauf eine geringe Hemmung ($[K_{SI}]_{Phenetol}$ = 5,03 mM). Der Stamm MOB600

besaß eine hohe Widerstandfähigkeit gegen die beiden Aralkylether. Daher entwickelte sich dieser Stamm bei einer hohen Konzentration an Aralkylethern als Hauptverwerter.

Zusätzlich wurden Proben mit 1,4-Dimethoxybenzol oder 1,4-Diethoxybenzol angereichert, damit 1,4-dialkoxylierte Benzol/Phenol-abbauende Mikroorganismen isoliert wurden. Diese Bindungsklasse ist von großer Bedeutung zur Erklärung über die aromatische *O*-Methylierungs- und *O*-Demethylierungsreaktionen. Extrazelluläre Lignin-Peroxidase von Weißfäulepilzen katalysiert diese reversiblen Reaktionen mit Di-methoxylierten Benzolen (Valli & Gold, 1991; Hammel, 1992). Ihre Radikale sind noch stabiler als der bekannteste Radikalträger Veratrylalkohol-Kation (Joshi & Gold, 1996), wenn 1,4-Dimethoxybenzol-Derivate beim Ligninabbau mit extrazellulären Lignin-Peroxidasen als diffundierende ″Radikalträger″ fungieren.

Chinone vermögen, in Wasser zu polymerisieren, und die Flüssigkeit zu schwärzen. Damit konnte man einen Umsatz von 1,4-Di-alkoxylierten Benzolen zu *O*-dealkylierten Hydrochinon- bzw. Chinon-Derivaten nicht ohne Grund erkennen.

Wenn der Stamm 4MOP1 mit 4-Methoxyphenol langsam wuchs, wurden Hydrochinon- bzw. Chinon-Derivate nicht oder nur gering detektiert. Die 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden Stämme DEOB100 und DEOB200 bauten 1,4-Diethoxybenzol unvollständig ab, um nur die *O*-Ethylgruppe(n) als einzige C/E-Quelle zu verwerten. Während ihres Wachstums mit 1,4-Diethoxybenzol wurden daher Chinon-Derivate ins Medium ausgeschieden. Die Stämme DEOB100 und DEOB200 setzten auch 1,4-Dimethoxybenzol ohne Wachstum um, wobei eine intensive Schwärzung der Flüssigkeit beobachtet wurde.

Der schwarze Pilzstamm DMOB100 wurde durch Anreicherung mit 1,4-Dimethoxybenzol zusätzlich aus derselben Belebtschlammprobe isoliert. Er verwertete verschiedene alkoxylierte Benzole als einzige C/E-Quelle, wie z.B. 1,4-Dimethoxybenzol, 1,4-Diethoxybenzol und Anisol, nicht aber Phenetol. Dieser Pilzstamm wurde als ein Vergleichsstamm verwendet. Jede Probe wurde bevor der Anreicherung mit Cycloheximid (500 µg ml^{-1}) versetzt, und alle Agarmedien wurden mit Zugabe dieses Agens (50 µg ml^{-1}) vorbereitet, um bekterielle Stämme selektiv zu isolieren. Daher wurde der öffentlich demgegenüber resistente Pilzstamm DMOB100 als ein vermutliches Pathogen gehalten (Collins & Lyne 1984), und bei jedem Versuch mit größter Vorsicht behandelt.

3.1.4.2. Cyclische Alkylether-abbauende Stämme

Der Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran-abbauende Stamm THF400 wurde von H.-J. Feiten (jetzt ETH, Zürich) aus einer Belebtschlammprobe des Klärwerkes Stuttgart-Büsnau isoliert und in dieser

Arbeit untersucht. Der Stamm THF400 verwertete auch Diethylether. Es ist bekannt geworden, daß cyclische Alkylether-Abbauer im allgemeinen Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran und Diethylether als einzige C/E-Quelle verwerten (Bernhardt & Diekmann, 1991; Parales et al., 1994).

Zur Isolierung der cyclische Alkylether-abbauenden Neustämme wurden Proben mit 0,05 % igem Tetrahydrofuran oder Tetrahydropyran angereichert. Dadurch wurden die Stämme THF100, THF102, THF200 und THF202 aus einer Belebtschlammprobe isoliert.

Alle Stämme verwerteten Tetrahydrofuran(THF), Tetrahydropyran(THP) und Diethylether (DEE) als Wachstumssubstrate. Sie verwerteten weder Aralkylether noch die anderen aliphatischen Alkylether mit längeren Kettenlängen wie z.B. Di-n-propylether. Zum Beispiel wurde das typische Wachstumsmuster vom Stamm THF200 mit Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, oder Diethylether untersucht (Abb. 3-5). Der Stamm THF200 verwertete Tetrahydrofuran, Tetrayhdropyran, und Diethylether in ähnlicher Weise. Ähnliche Wachstums/Abbaufähigkeit für Tetrahydrofuran, Tetrayhdropyran, und Diethylether wurde mit dem cyclische Alkylether-abbauenden Stamm *Rhodococcus ruber* 219 nach Bock et al. (1996) bestätigt. Damit wurde gerechnet, daß diese drei Ethersubstrate mit demselben Enzymsystem initial abgebaut werden

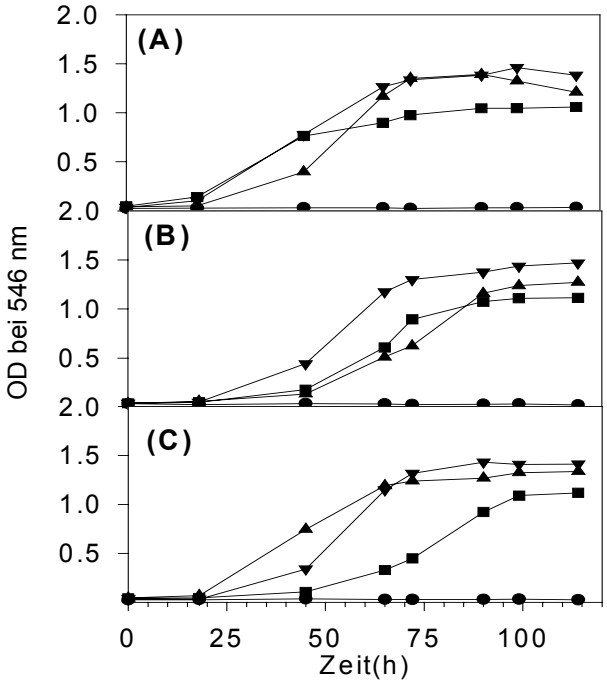


Abb. 3-5. Typische Wachstumsmuster vom Stamm THF200 mit Tetrahydrofuran (15 mM, ▼), Tetrahydropyran (15 mM, ▲) oder Diethylether (15 mM, ■) bei 30ºC: Der Stamm wurde bevor dem Versuch jeweils **(A)** mit Diethylether, **(B)** Tetrahydrofuran , oder **(C)** Tetrahydropyran angezogen, und als Inokulum verwendet. Jeder negative Wachstumskontrolle (●) unter der gleichen Testbedingung gemacht

In der Abbildung 3-6 handelt es sich um die Wachstumsverhalten des Stammes THF100 bei verscheidenen Konzentrationen an Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran und Diethylether. Diese Etherverbindungen wirkten auf die Zelle toxisch ein. Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran bewirkten eine Substrat-Hemmung bei den Wachstumsversuchen mit dem Stamm THF100 in ähnlicher Weise. Im Vergleich dazu war die Zelltoxizität des Diethylethers bis zu 10 mM gering.

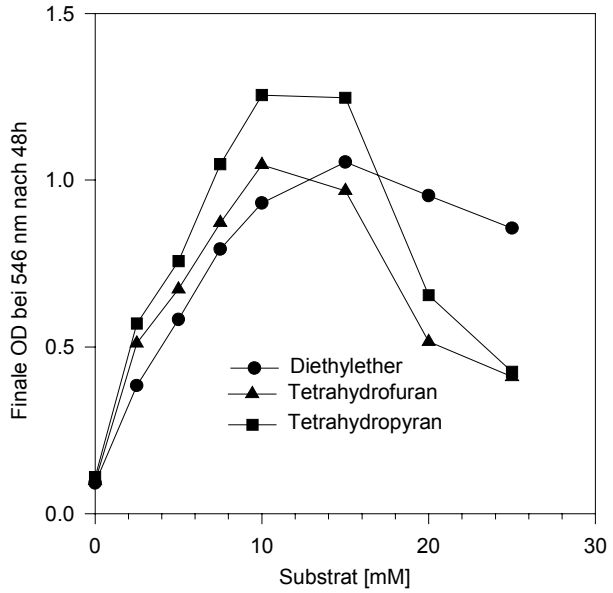


Abb. 3-6. Typische Wachstumsversuche mit dem Stamm THF100 bei verschiedenen Konzentrationen an Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran und Diethylether: Die angegebene optische Dichte wurde 48 Stunden nach Versuchsbeginn gemessen.

In der Tabelle 3-4 geht es ums spezifische Wachstum von den cyclische Alkylether-abbauenden Stämmen mit Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran oder Diethylether. Beim Versuchsbeginn wurde jeder Ether von Null bis 25 mM eingesetzt. Die Wachstumsparameter und die Hemmkonstante wurden durch eine nicht-lineare Anpassung von den spezifischen Wachstumskurven nach der Gleichung (2.6) abgeschätzt. Die lineare Wachstumsrate, μ_{max}/K_S , mit geringem Tetrahydrofuran oder Tetrahydropyran war ähnlich, d.h., die Stämme verwerteten Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran in ähnlicher Weise. Der Stamm THF400 ergab eine langsame Wachstumsrate (μ_{max}/K_S = 0,006 ~ 0,007) für alle getestete Ether. Trotzdem hatte der Stamm THF400 eine hohe Toleranz gegenüber Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran. Daher wuchs er bei einer hohen Konzentration an cyclischen Alkylethern ohne deutliche Hemmung. Die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme ließen sich, bezüglich der linearen Wachstumsrate, μ_{max}/K_S, und Hemmkonstante, K_{SI}, während des Wachstums mit Tetrahydrofuran oder Tetrahydropyran, in die folgenden Gruppen unterteilen:

Tab. 3-4. Die Wachstumsparameter und die Hemmkonstante während des Wachstums von THF-Stämmen mit Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran oder Diethylether

Substrat	Tetrahydrofuran				Tetrahydropyran				Diethylether			
Parameter	μ_{max}	K_S	μ_{max}/K_S	K_{SI}	μ_{max}	K_S	μ_{max}/K_S	K_{SI}	μ_{max}	K_S	μ_{max}/K_S	K_{SI}
THF100	0,141	7,98	0,018	8,30	0,203	13,2	0,015	5,41	0,076	4,02	0,019	5,66
THF102	5,20	396	0,013	0,10	4,74	347	0,014	0,10	1,16	14,9	0,078	0,28
THF200	0,26	16,1	0,016	2,94	0,082	5,33	0,015	31,0	0,068	3,34	0,020	68,1
THF202	3,32	256	0,013	0,097	2,77	227	0,012	0,14	0,064	3,20	0,02	9,88
THF400	0,022	3,91	0,006	n.d.[1)]	0,031	4,74	0,007	65,0	1,73	237	0,007	0,15

Anm.

n.d.: die Hemmkonstante von Tetrahydrofuran, K_{SI}, für den Stamm THF400 wurde bei diesem Wachstumsversuch bis zu 25 mM *n*icht bestimmt.

Subgruppe 1: hohe μ_{max}/K_S- und hohe K_{SI}-Werte (z.B. THF100 und THF200)

Subgruppe 2: hohe μ_{max}/K_S- und niedrige K_{SI}-Werte (z.B. THF102 und THF202)

Subgruppe 3: niedrige μ_{max}/K_S- und hohe K_{SI}-Werte (z.B. THF400)

Die μ_{max}/K_S- und K_{SI}-Werte ergaben sich während des Wachstums mit Diethylether vom Stamm zum Stamm unterschiedlich.

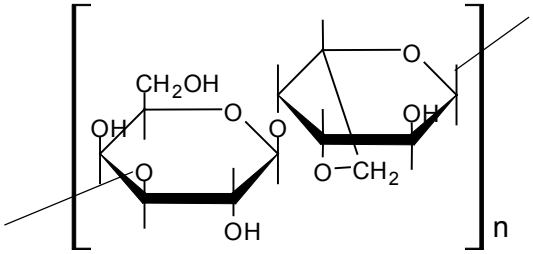
Zusätzlich wurde versucht, die Anreicherung und Isolierung von 1,4-Dioxan- und Morpholin-abbauenden Mikroorganismen zu realisieren.

Einige Studien lagen vor, daß einige cyclische Alkylether-abbauende Stämme auch 1,4-Dioxan verwerteten (Bernhardt & Diekmann, 1991; Parales et al., 1994). Aber in dieser Arbeit wurde kein Abbau von 1,4-Dioxan durch cyclische Alkylether-abbauende bakterielle Kulturen bestätigt. Bock et al. (1996) berichtete, daß *Rhododcoccus ruber* 219 1,4-Dioxan nur cooxidativ abbaute. Obwohl 1,4-Dioxan chemisch mit Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran ähnlich ist, ist die biologische Abbaubarkeit anders, d.h., ein anderes Enzymsystem beteiligt sich am Abbau des 1,4-Dioxans. 1,4-Dioxan ist zum biologischen Abbau in der anderen Bindungsklasse einzuordnen.

Durch Anreicherung mit 0,1 %(v/v)igem 1,4-Dioxan entwickelten sich die Stämme DOX2 und DOX5 als Hauptkomponenten in einer Belebtschlammprobe. Diese Stämme zeigten eine gleitende Beweglichkeiten, und wuchsen mit Agar ohne zusätzliche C/E-Quelle. Aufgrund dieser

charakteristischen Merkmale wurden die beiden gram-negativen Stämme innerhalb der *Cytophaga-Flexibacter* Stammgruppe gekennzeichnet. Agar befindet sich aus zwei Kohlenhydraten. Davon besitzt ein Kohlenhydrat eine intramolekulare Etherbindung (Abb. 3-7). Intramolekulare Etherbindung macht Agar schwer abbaubar. Wenn Mikroorganismen Agar als einzige C/E-Quelle verwerten, wird Agar entweder vollständig durch intramolekulare Etherspaltung oder unvollständig ohne Etherspaltung abgebaut. Im letzten Fall häufen sich Anhydridmoleküle als “dead-end” Produkte an.

Die Stämme DOX2 und DOX5 wuchsen in flüssigen Minimalmedien weder mit 1,4-Dioxan noch mit hoch gereinigter Agarose (Ash < 2%, Sigma). Es war daher unklar, ob diese Stämme 1,4-Dioxan abbauen konnten. Diese Stämme schienen gegenüber 1,4-Dioxan resistant zu sein, da sie sich ans Strukturanalogon Anhydridmolekül gewöhnten .



β-D-Galactopyranosid-1,4-β-L-Galactopyranosid Anhydrid

Abb.3-7. Struktuelle Einheiten des Agars: L(-)-Galactose Anhydrid davon enthält eine intramolekulare Etherbindung zwischen den 3- und 6-C-Atomen

Der Stamm MOR10 wurde durch Anreicherung mit 0,1 %(v/v)igem Morpholin aus derselben Belebtschlammprobe isoliert. Der grüne und schleimige Stamm MOR10 wuchs auf Stickstoff-freien Minimalagarplatten mit 0,1 %(v/v)igem Morpholin. Dieser Stamm ergab kein Wachstum entweder in flüssigen Minimalmedien mit Morpholin als einziger C/E- (mit zusätzlichem NH_4^+/NO_3^--Stickstoff), oder C/N-Quelle (ohne zusätzlichen Stickstoff), oder auf Minimalagarplatten ohne Zusatz von Morpholin. Sein Wachstum erfolgte immer auf festen Agarplatten mit Morpholin als einzige C/N-Quelle. Während der Kultivierung auf Agarplatten wurde große Menge an Exopolymeren hergestellt. Daher war er nur schleimig abzuzentrifugieren (bis 15000 × g). Sein Wachstumsfähigkeit ging innerhalb einer Woche auf Komplexmedien, wie z.B. TSA, NA und R2A-Agarmedien, total verloren, und die Aktivität erhielt sich auf Minimalagarplatten mit 0,1 %igem Morpholin einen Monat.

3.1.4.3. Aliphatische Alkylether-abbauende Stämme

Durch Anreicherung mit 0,1 %igem Diethylether wurden die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme DEE5301, DEE5302, DEE5303, DEE5304, DEE532, DEE5331, DEE5311, DEE5312, DEE5313, DEE5314, DEE5316, DEE515 und DEE5151 aus Belebtschlammproben des Klärwerks Stuttgart-Büsnau erfolgreich isoliert. Ihre Koloniemorphologie wurde auf TSA-Agarplatten unterschiedlich gemacht. Durch Anreicherung mit 0,1 %igem Di-n-butylether wurde der Stamm DBE720 aus einer Belebtschlammprobe zusätzlich isoliert. Wie im Abschnitt 3.1.3 erwähnt, wurden die Stämme PEG601, PEG602, PEG603 und PEG604, die durch Anreicherung mit 0,1 %igem Brij58 (PEG(20)-cetylether) aus einer Belebtschalmmprobe isoliert worden waren, in dieser Stammgruppe eingeschlossen.

Innerhalb der aliphatische Alkylether-abbauenden Stammgruppe wiesen alle Stämme ein ähnliches Wachstumsmuster auf. Alle aliphatische Alkylether-abbauende Stämme verwerteten verschiedene aliphatische Alkylether, wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether, Di-n-heptylether, eine Mischung von 2- und 3-Isoamylether, und Ethyl-*tert*-butylether (ETBE) als einzige C/E-Quelle. Kein aliphatische Alkylether-Abbauer wuchs mit cyclischem Alkylether, wie z.B. Tetrahydrofuran oder Tetrahydropyran. Außer den zwei Stämmen DEE5311 und DEE515 verwerteten die meisten aliphatische Alkylether-abbauende Stämme kein Anisol (siehe Abschnitt 3.1.4.1).

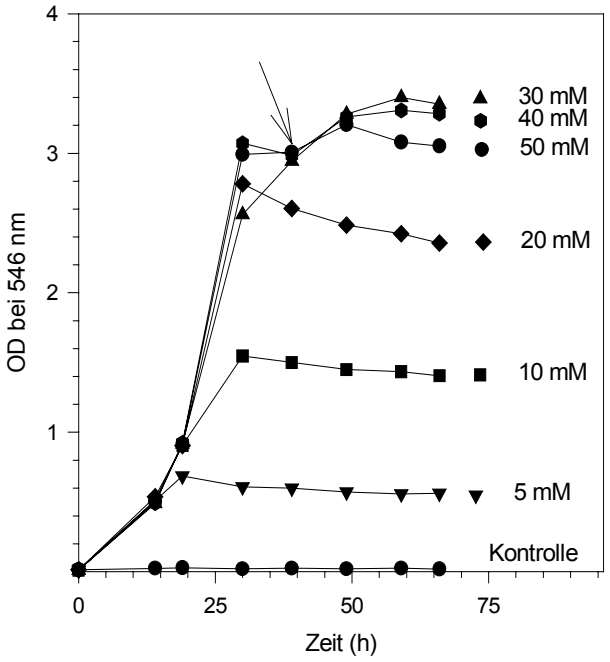


Abb. 3-8. Typische Wachstumsverlauf vom Stamm DEE532 mit verschiedenen Konzentrationen an Diethylether bei 30ºC: Diethylether wurde als einzige C/E-Quelle von Null bis 50 mM eingesetzt. Ca. 40 Stunden nach Versuchsbeginn wurden zugeschlossene Teflon-beschichte Kolbendeckel, worin Diethylether über 30 mM eingesetzt wurde, locker gedreht und quasi 30 min lang offen stehen gelassen (Pfeil), um frische Luft zuzuführen

Aus aufgenommener Substratspektren waren Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran charakteristische Wachstumssubstrate für die cyclische Alkylether-abbauenden Stammgruppe, und Anisol für die Aralkylether-abbauende Stammgruppe, und Di-n-propylether und Dibenzylether für die aliphatische Alkylether-abbauende Stammgruppe. Zum Beispiel wurde das typische Wachstumsverhalten vom Stamm DEE532 mit Diethylether untersucht (Abb. 3-8). Die Biomasse nahm mit der eingesetzten Konzentration an Diethylether bis zu 30 mM proportional zu. Auβerhalb dieser Tendenz trat einem Tag nach Versuchsbeginn ein hemmender Effekt des Diethylethers über 30 mM auf.

In der Tabelle 3-5 geht es ums spezifische Wachstum von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen mit Diethylether. Beim Versuchsbeginn wurde Diethylether von Null bis 25 mM eingesetzt. Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme zeigten eine höhere Toleranz gegenüber Diethylether als die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme (vgl. Tab. 3-4).

Tab. 3-5. Die Wachstumsparameter und die Hemmkonstante während des Wachstums von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen mit Diethylether

Substrat	**Diethylether**			
Parameter	μ_{max}	K_S	μ_{max}/K_S	K_{SI}
DEE5301	0,189	5,29	0,036	n.d.[1)]
DEE5303	0,187	4,00	0,047	n.d.
DEE532	0,203	4,32	0,047	n.d.
DEE5331	0,188	7,65	0,025	n.d.
DEE5312	0,200	4,94	0,040	n.d.
DEE5313	0,188	7,69	0,024	n.d.
DEE5314	0,165	5,62	0,029	n.d.
DEE515	0,180	4,98	0,036	n.d.
DEE5151	0,190	3,88	0,049	n.d.
DEE5316	0,199	3,57	0,056	n.d.
PEG601	0,192	5,97	0,032	n.d.
DBE720	0,176	6,17	0,029	n.d.

Anm.

n.d.[1)] Die Hemmkonstante des Diethylethers, K_{SI}, war bei diesem Versuch bis zu 25 mM nicht abschätzbar

Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme wuchsen mit Diethylether deutlich schneller (t_d = 3 ~ 4 h) als die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme (t_d = 9 ~ 10 h). Obwohl der Stamm THF102 mit geringem Diethylether (K_S >> [S]) schneller wuchs (μ_{max}/K_S = 0,078), erschwerte sich sein Wachstum mit geringer Zunahme des Diethylethers (K_{SI} = 0,28 mM). Hingegen war die Wachstumsrate von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen bei einer hohen Konzentration ([S] > K_S) schnell (μ_{max} = 0,165 ~ 0,203). Wurde dieselbe Belebtschlammprobe mit 0,1 %igem Diethylether (ca. 10 mM) angereichert, entwickelten sich nur die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme als Hauptverwerter. Daran scheinen die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme eine Nebenrolle zu spielen.

In Gegenwart von Diethylether wies die spezifische Wachstumskurve von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen keine Substrat Hemmung (Gl. 2.8) auf, sondern gehorchte einem hyperbolischen Wachstumsmodell (Gl. 2.6).

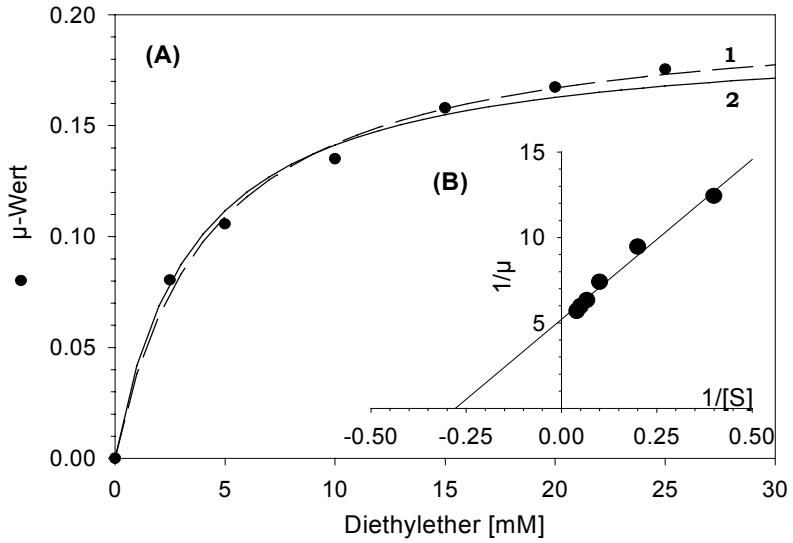


Abb. 3-9. (A) Das spezifische Wachstum vom Stamm DEE532 mit Diethylether und (B) die reziproke Linie nach der Gleichung (2.7) im Kapitel 2.2.3.1): Die realen Meßpunkte in der Abbildung (A) wurden aus den den zwei unterschiedlichen Wachstumsmodellen untersucht, und die daraus resultierten Hyperbeln (1) und (2) wurden mit den entsprechenden μ_{max} - und K_S -Werten nach der Monod-Gleichung dargestellt. Die Wachstumsparameter für die Kurve 1 (……) wurde aus der nicht-linearen Anpassung nach der Gleichung (2.8) abgeschätzt wurden. Die Wachstumsparameter für die Kurve 2 (——) wurden aus der reziproken Linie in der Abbildung (B) berechnet wurden.

Die Hemmkonstante des Diethylethers, K_{SI}, wurde aus der nicht-linearen Anpassung mit der Gleichung (2.8) zu groß (K_{SI}>10000) abgeschätzt. Das Unendliche der Hemmkonstante nähert die Variable, $[S]/K_{SI}$, an den Null-Wert an ($K_{SI} \rightarrow \infty \Rightarrow [S]/K_{SI} \rightarrow 0$). Daher sah die spezifische Wachstumskurve hyperbolisch aus.Aus der reziproken Linie (Gl. 2.7) der spezifischen Wachstumskurve vom Stamm DEE532 her, wurden die μ_{max}- und K_S-Werte jeweils mit 0,192 und 3,59 abgeschätzt (Abb. 3-9B). Vergleichend damit wurden die μ_{max}- und K_S- Werte aus der nicht-linearen Anpassung nach der Gleichung (2.8) jeweils mit 0,203 und 4,32 abgeschätzt. Aus den zwei unterschiedlichen Konstantenabschätzungen resultierten die Hyperbeln (1) und (2) in der Abbildung 3-9(A). Die Kurve (1), deren μ_{max}-und K_S-Werte nach der Gleichung (2.8) abgeschätzt wurden, stellte die realen Meßpunkte besser dar, als die Kurve (2), deren μ_{max}-und K_S-Werte aus der reziproken Linie nach der Gleichung (2.7) abgeschätzt wurden.

Die zu groβe Hemmkonstante des Diethylethers schien für die kinetische Darstellung der spezifischen Wachstumskurve vom Stamm DEE532 keine Wertigkeit zu haben, da die ganze Modellgleichung (2.8) davon gering beeinfluβt war. Trotzdem war der damit abgeschätzte Wert aber zur genauen Darstellung der realen Meßpunkte nicht zu ignorieren. Die spezifische Wachstumsrate, μ, war abhängig im wesentlichen nicht nur von den μ_{max}- und K_S-Werten, sondern auch von der Hemmkonstante des Diethylethers, d.h., Diethylether wirkte auf die Zelle in gewissem Maße toxisch.

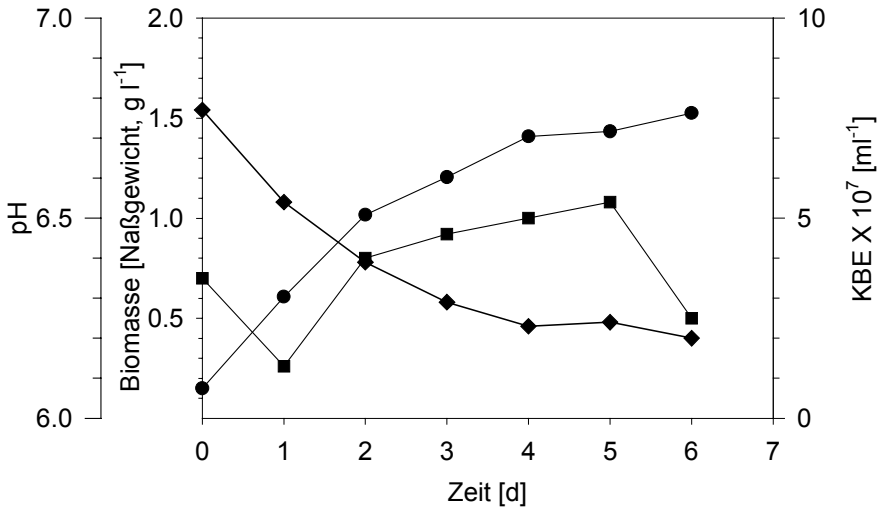


Abb. 3-10. Ein unausgewogenes Verhältnis zwischen der gesamten Biomasse (Naß-gewicht, ●) und der Lebendzellzahl (KBE, ■) während des Wachstums vom Stamm PEG602 mit Diethylether: Diethylether wurde zu einer Konzentrationsdifferenz von 10 mM täglich zugegeben. Je nach der Probenahme wurde der pH-Wert gemessen (▼). Beim Versuchsbeginn war der pH-Wert 6.8.

Andererseits wurde die toxische Wirkung von Diethylether auf die lebenden Zellen vom Stamm PEG602 auf R2A-Agarplatten untersucht, indem die zunehmende Gesamtbiomasse (Naßgewicht g l^{-1}) und die sich vermehrende Lebendzellzahl in Zusammenhang gebracht wurden (Abb. 3-10). Die gesamte Biomasse nahm hyperbolisch zu, aber die Lebendzellzahl war damit nicht proportional. Während des Stoffwechsels von Diethylether erhöhte das schnelles Wachstum kein Abbaupotential der lebenden Zellen. Dabei war die volumetrische Menge an aktiven Enzymen konstant, da die Enzymmenge mit der aktiven Zellzahl unerheblich korreliert. Ähnlich berichtete Tsukamura (1990), daß Mycobakterien auch in flüssigen Dubos-Medien ein unausgewogenes Wachstum aufweisen. Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme vermöchten, während des Stoffwechsels von Diethylether die schnelle Absterberate mit ihrem schnellen Wachstum auszugleichen. Daher scheint die schnelle Wachstumsrate eine Überlebensstrategie von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen in Gegenwart toxischen Diethylethers zu sein.

Während des Stoffwechsels des Diethylethers wurde die Flüssigkeit angesäuert. Die saure Flüssigkeit wirkte wahrscheinlich auf die Zelle in der späteren Wachstumsphase toxisch ein. Diese Vermutung tauchte aus dem typischen Wachstumsverhalten vom Stamm DEE532 wieder auf (Abb.3-8), wobei die optische Dichtezunahme in der stationären Wachstumsphase mit Diethylether von 30 mM bis 50 mM keine Proportionalität hatte. Einem Tag nach Versuchsbeginn nahm die gesamte Biomasse mit Diethylether über 30 mM nicht mehr zu. Wenn Diethylether eine Substrat Hemmung ausübte, würde das Wachstum vom Versuchsbeginn gehemmt. Daher befand sich eine zusätzliche Hemmwirkung in der späteren Wachstumsphase, wie z.B. die Ansäuerung der Flüssigkeit. Eine HPLC-Ion-Exklusion-Säule (Aminex® HPX-87H, 300×7,8 mm, Fa. Bio-RAD, USA) war verwendbar, um organische Säuren wie z.B. Essigsäure (9,3 min), Ameisensäure (8,7 min), Oxalsäure (5,0 min), Glykolsäure (7,6 min) und Glyoxylsäure (5,8 min) bei 210 nm quantitativ zu analysieren. Als Fließmittel wurde 0,01 N H_2SO_4 verwendet (Fließrate; 1 ml min^{-1}). Bevor der Analyse wurden alle Proben mittels einer Ultrafree-CL Membran (Polysulfone, 10000 NMWL, Fa. Millipore, Japan) bei 4ºC, 2000 × g (Fa. Beckman) filtriert. Keine Säuren wurde aber als Folgemetabolite vom Abbau des Diethylethers nachgewiesen. Die Flüssigkeit scheint mit den Abbauprodukten von Diethylether nicht angesäuert zu werden. Vermutlich wurde saure Zellprodukte ausgeschieden, oder alkalische Nährstoffe (z.B. Ammonium) von dem Vorrat völlig verbraucht. Aus diesen Experimenten konnte man erkennen, daß die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme während des Stoffwechsels des Diethylethers entweder auf die Substrat Hemmung des Diethylethers oder die Ansäuerung der Umgebung unbedingt stoßen.

Außerdem wurde es versucht, Cα-verzweigte Alkylether-abbauende Mikroorganismen zu isolieren, indem Proben mit 0,1 %igem Methyl-*tert*-butylether (MTBE) oder Isopropylether angereichert wurden. Diese Etherbindungsklasse wird bei der Herstellung der Benzin-Antiklopfbrennstoffe in den USA breit verwendet. Seit einiger Jahren wird massive Menge an diesen Chemikalien, die sich für human-carcinogen halten, in die Luft freigesetzt. Daher ist der mikrobielle Abbau von großem Interesse.

Isopropylether-abbauende Mikroorganismen wurden aber weder in Reinkulturen noch in Mischkulturen erhalten. Die MTBE-abbauenden Stämme DME und DME2, die mit Methyl-*tert*-butylether als einiger C/E-Quelle langsam wuchsen, wurden jeweils aus einer Humus-Bodenprobe des Schwarzwaldes und einer Humus-Bodenprobe von Schwäbischer Alb isoliert. Die beiden konnten Methanol als einzige C/E-Quelle verwerten, nicht aber *tert*-Butanol. Diese C_1-Verwerter scheinen Methyl-*tert*-butylether unvollständig abzubauen.

3.1.4.4. Spontane Mutation der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme

Durch spotane Genmutation verloren die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme ihre völlige Abbau-/Wachstumsfähigkeit. Die Proportion der defektiven Zellzahl nahm zeitlich zu. Das Mutationsereignis ließ sich mit der Pigmentänderung der orangenfarbenen Wildtyp-Kolonie nach rot auf TSA-Platten erkennen. Die orangenfarbenen Wildtyp-Kolonien wuchsen jedenfalls mit Diethylether, das die roten Kolonien nicht mehr verwerteten.

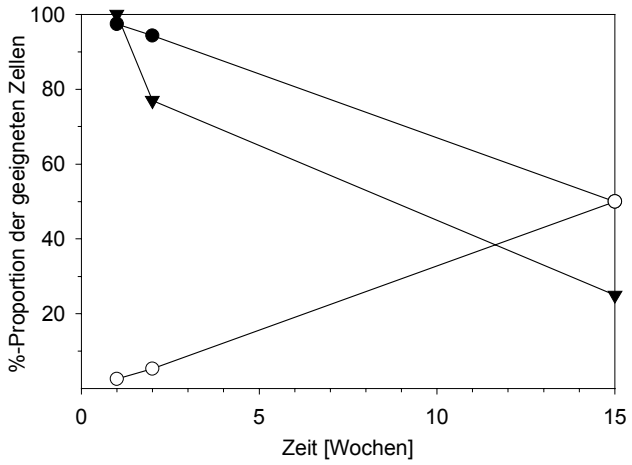


Abb. 3-11. Zeitliche Pigmentänderung vom Stamm PEG602 auf TSA-Medien von orangenfarben (●) nach rot (○), und die Änderung des ′r′-Wertes (▼): Der ′r′-Wert war ein prozentuales Verhältnis der mit Diethylether gewachsenen Koloniezahl zur auf TSA-Platten ausgewählten Koloniezahl.

In der Abbildung 3-11 geht es um die zeitliche Pigmentänderung vom Stamm PEG602 in engem Zusammenhang mit dem Verlust seiner Abbaufähigkeit für Diethylether. Die rote Koloniezahl nahm während der Kultivierung vom Stamm PEG602 auf TSA-Platten mit der Rate von ca. 3,5 % pro Woche zu, und die orangenfarbene Koloniezahl nahm hingegen proportional ab. Die Diethylether-abbauende Koloniezahl korrelierte positiv mit der orangenfarbenen Koloniezahl. Keine rote Kolonie wuchs mit Diethylether bis zur eingesetzten Kolonie-bildenden Einheit von $1{,}3 \times 10^9$ ml^{-1}. Diese Pigmentänderung beruhte daher nicht auf eine morphologische und physiologische Veränderung, sondern auf eine Genmutation. Dadurch verlor die Zelle ihre ganze Abbaufähigkeit für aliphatische Alkylether, Phenetol und Diebenzylether. Damit wurde festgestellt, daß sich dasselbe Enzymsystem am Abbau von aliphatischen Alkylethern, Phenetol und Dibenzylether beteiligt.

Der völlige Verlust ihrer Etherabbaufähigkeit begleitete immer eine unwiderrufliche Pigmentänderung von orangenfarben nach rot. Wurden die Stämme aber in/auf Minimalmedien in Gegenwart von Diethylether angezogen, wurde weder eine Pigmentänderung noch ein Aktivitätsverlust beobachtet. Die Etherabbaufähigkeit war ohne Substratdruck des Diethylethers instabil. Aus der Btrachtung der phänomenologischen Pigmentänderung von orangenfarben nach rot ereignete sich die Genmutation wahrscheinlich zur Folge des Verlustes von einem gelben Faktor (z.B. Flavin-Koenzym ?), der am Etherabbau eine wichtige Rolle spielen konnte.

Die roten Mutantstämme wuchsen mit Ethylvinylether ohne weiteres. Aus aufgenommener Substratspektren (siehe Kapitel 3.2) wurden diese Mutantstämme (Dee^-) zu den ursprünglichen Stämmen (Dee^+) unterschiedlich gemacht, aber sie zeigten eine hohe Ähnlichkeit mit den Ethylvinylether-abbauenden Stämmen EVE305 und EVE341. Die letzten wurden durch Anreicherung mit 0,1%igem Ethylvinylether aus einer Belebtschlammprobe getrennt isoliert. Deshalb wurden die roten Mutantstämme für die weiteren Arbeiten in der Ethylvinylether-abbauende Stammgruppe eingeschlossen. Dementsprechend wurden die roten Mutantstämme EVE331, EVE3041, EVE314 und EVE201 jeweils aus den Originalstämmen DEE5331, DEE5304, DEE5314 und DBE720 hergeleitet. Die Koloniefarbe von den roten Mutantstämmen EVE331, EVE3041, EVE201 und der Ethylvinylether-abbauende Stamm EVE341 änderte sich bei Anwesenheit von Ethylvinylether unwiderruflich nach gelb. Die gelben Mutantstämme EVE332, EVE3042, EVE202 und EVE342 stammten jeweils von den roten Stämmen EVE331, EVE3041, EVE201 und EVE342 ab. Weder ein roter noch gelber Mutantstamm besaß die Abbaufähigkeit für Diethylether.

Andererseits änderte sich die Koloniefarbe von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen von orangenfarben nach gelb ohne Verlust ihrer Abbaufähigkeit. Aus der Pigment-änderungen von orangenfarben nach gelb her, wurde vermutet, daß der widerrufliche Verlust eines roten Pigmentes (z.B. Cartenoid ?) auf die Enzyme zum Etherabbau keine wichtige Einwirkung hat.

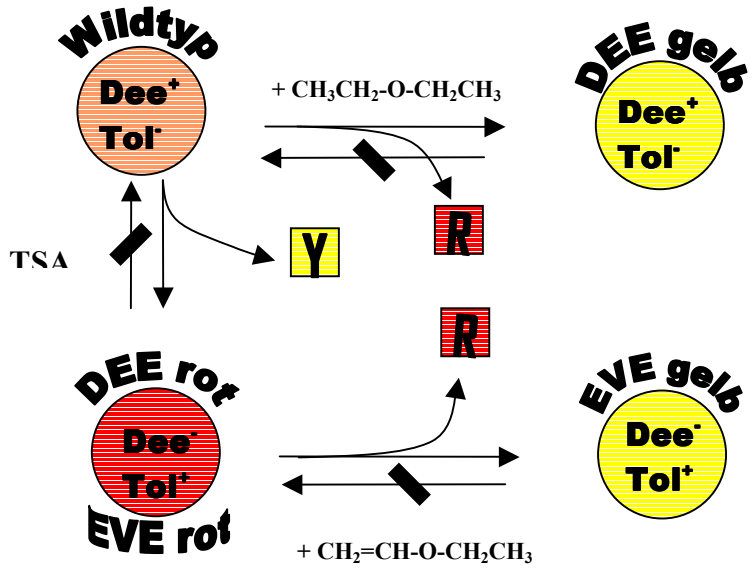


Abb. 3-12. Schematische Darstellung der spontanen Mutationsereignisse von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen in Zusammenhang mit ihrer Pigmentänderungen und Aktivitätsänderungen zum Abbau von Diethylether (Dee) und Toluol(Tol): In der Abbildung zeigten die Pfeile und die unterbrochene Pfeile die unwiderrufliche Richtung der Mutationsereignisse an. Die Pigmentänderung ereignete sich mit dem Verlust eines Farbstoffes, der wie rot [R] oder gelb [Y] in Kasten aus dem Mutationsweg abweichend gezeichnet wurde. Die Koloniefarbe der orangenfarbenen Wildtyp-Stämme änderte sich spontan unwiderruflich nach gelb ohne Änderung ihrer Abbaufähigkeiten für Diethylether und Toluol (DEE-gelb, Dee^+/Tol^-) in Gegenwart von Diethylether. Die Koloniefarbe der orangenfarbenen Wildtyp-Stämme änderte sich auch nach rot (DEE-rot) ohne Substratdruck des Diethylethers wie z.B. auf TSA-Medien. Die roten Mutantstämme verwerteten keinen Diethylether mehr (Dee^-). Ihre Physiologie und Morphologie ist ähnlich mit den Ethylvinylether-abbauenden Stämmen (EVE-rot), die durch getrennte Anreicherung mit Ethylvinylether aus einer Belebtschlammprobe zusätzlich isoliert worden sind. Nach dem Verlust ihrer Etherabbauaktivität gewannen die roten Mutantstämme eine neue Abbaufähigkeit für Toluol (Dee^-/Tol^+). Die roten Mutantstämme änderten sich noch einmal unwiderruflich nach gelb (EVE-gelb) bei Anwesenheit von Ethylvinylether. Die ´EVE-gelben´ Stämme zeigten ein ähnliches Wachstumsmuster mit den ´EVE-roten´ Urstämmen, die keine Abbaufähigkeit für Diethylether besaßen. Die beiden bauten Toluol ab (Dee^-/Tol^+).

Durch zwei unabhängige Genmutationen änderte sich die orangenfarbene Koloniefarbe nach entweder rot oder gelb. In der Abbildung 3-12 wurden Pigmentänderungen der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme in Zusammenhang mit ihren Abbaufähigkeit für Diethylether und Toluol schematisch dargestellt.

Interessant ist, daß einige Mutantstämme EVE331, EVE332, EVE3041 und EVE3042 Toluol als einzige C/E-Quelle verwerteten, während die Urstämme DEE5331 und DEE5304 kein Toluol verwerteten. Die Ethylvinylether-abbauenden Isolate EVE305, EVE341 und EVE342, die eigentlich keine Abbaufähigkeit für Diethylether besaßen, verwerteten Toluol als einzige C/E-Quelle. Vermutlich wurde die Toluol-Abbaufähigkeit während des Vorhandenseins der Etherabbaufähigkeit von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen reprimiert.

Hur et al. (1997) haben andererseits beobachtet, daß der Stamm *Burkholderia cepacia* G4/PR1, wobei eine Toluol-2-Monooxygenase konstitutiv induziert wurde, zufällig Diethylether als einzige C/E-Quelle verwertete. Bevor der Toluol-Anzucht baute der Urstamm kein Diethylether ab. Sie haben behauptet, daß eine induzierbare Toluol-2-Monooxygenase Diethylether stöchiometrisch zu Ethanol und Acetaldehyd abgebaut hat. Aber sie haben während des Stoffwechsels von Toluol oder Diethylether weder die Häufigkeit dieser Erscheinung noch die Stabilität der induzierten Toluol-2-Monooxygenase bestätigt. Wie im Abschnitt 1.2.3 schon erwähnt, beteiligen sich Cytochrome-P450 am Abbau von anästhetischen Ethern (Elliott & Strunin, 1993). Außerdem wurde in dieser Arbeit behauptet, daß die cyclische Alkylether-abbauende Stämme im allgemeinen Diethylether abbauen. Außerhalb der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme können verschiedene Biosysteme am Abbau des Diethylethers eine Rolle spielen. Davon sind die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme einzigartig. Sie besitzen ein spezifisches Enzymsystem, das ein breites Oxidationspotential auf aliphatische Alkylether, Phenetol und Dibenzylether hat.

3.2. Charakterisierung und numerische Klassifizierung

Aus der realen Beobachtung trennte sich eine biologische Erscheinung nicht so genau wie {+, -} oder {0, 1}. Wurden Merkmale mehrmal unabhängig untersucht, war es unmöglich, unter Verwendung dieses zweierlei Zahlsystems ein quantitatives oder statistisches Ergebnis herauszubekommen. Für die qualitative und quantitative Auswertung der realen Beobachtungen war ein Zwischenwert, wie z.B. ′±′, von großer Bedeutung. Tetrazolium-violett (Fa., Sigma) war ein Redox-Indikator, mit dem respiratorische Tests qualitativ und quantitativ durchgeführt wurden (Bochner, 1989). Damit wurden die ′±′-Ergebnisse zuverlässig wieder hergestellt.

Taxonomisch relevante und stammspezifische Merkmale von den Testfeldern X und Y wurden unabhängig untersucht, und jedes Testergebnis wurde unter Verwendung eines dreierlei Zahlsystems, $\{-1, 0, 1\}$, semi-quantitativ bewertet (ANHÄNGEN X und Y). Im dreierlei Zahlsystem war die klassische Koeffizientenabschätzung, wie z.B. ′Simple Match′ (S_{SM}) und Jaccardischen Koeffizienten (S_J), nicht mehr verwendbar, da sich die klassische Taxonomie aufs zweierlei Zahlsystem gründete. Für die Koeffizientenabschätzung zwischen zwei Stichproben, deren Merkmale mittels eines dreierlei Zahlsystems semi-quantitativ bewertet wurden, wurde der statistische Korrelationskoeffizient, Korr[r], berechnet.

Das Testfeld X bestand aus 116 taxonomisch relevanten Merkmalen für die Morphologie und die Wachstumsphysiologie, die mit verschiedenen Kohlenhydraten und Aminosäuren als als einziger C/E- oder C/N-Quelle untersucht wurden. Dazu wurden die Wachstumsvermögen auf Komplexmedien, wie z.B. TSA, NA, R2A-Agarmedium, und die Hydrolaseaktivitäten mit Agar, Casein, Chitin, Gelatine, Pectin, Poly-ß-hydroxybutyrat, lösliche Stärke, Zellulose, oder einer Tween20/80-(1:1, v/v)-Mischung untersucht. Das Testfeld Y bestand aus den stammspezifischen Merkmalen für 119 Chemikalien als einzige C/E- oder C/N-Quelle. Wurden Stickstoffquellen ohne/mit Zusatz 0,1 %(w/v)iger D-Glucose untersucht, wurden manche fehlerhaft positive Ergebnisse im X-Testfeld, einschließlichi der Testskontrolle, erzeugt. Deshalb wurden diese Tests von dieser taxonomischen Arbeit ausgeschlossen.

Für die statistische Konfidenzabschätzung jedes taxonomischen Merkmales wurden 13 Stämme aus dem X-Testfeld und 15 Stämme aus dem Y-Testfeld zufällig ausgewählt, und jeder Stamm wurde zweimal unabhängig getestet. Die Konfidenzabschätzung erfolgte mit der prozentualen Proportion von den gleichen Testergebnissen, {(+,+), (±, ±), (-,-)}, gegenüber der gesamten Testzahl, 105 fürs X-Testfeld und 119 fürs Y-Testfeld. Das durchschnittliche Konfidenzniveau von den X- und Y-Tests war jeweils 94,7 % (X, n = 13) und 98,8 % (Y, n = 15) mit den Standardabweichungen von 0,4 % und 0,3 %. Die Ergebnisse für die stammspezifischen Abbaupotentiale im Y-Testfeld waren mehr zuverlässig und wiederherstellbar.

3.2.1. Numerische 2D-Gruppenanalyse der verwendeten Stämme

Aus den Ergebnissen in den X- und Y-Testfeldern wurde der hypothetische mittlere Organismus (HMO(X), HMO(Y)) berechnet, damit jedes Paar von Korrelationskoeffizienten (Korr(X), Korr(Y)) zwischen dem Teststamm und dem HMO abgeschätzt wurde.

Wurden der Phenol-abbauende *Candida*-ähnliche Hefestamm MARC2 und der 1,4-Dimethoxybenzol-abbauende Chrysosporen-bildende Pilzstamm DMOB100 als taxonomische Referenstämme gegenüber Bakterien verwendet, entfernten sie sich weit von der bakteriellen Zuordnung.

In der Abbildung 3-13 wurden die Teststämme bezüglich ihrer Abbaupotentialen beliebig zugeordnet. Aus den (x, y)-Koordinaten jeder Stammgruppe wurden der Mittelpunkt, $(\bar{X}, \bar{Y})$ und die Dispersitätsgröße, (σ_x, σ_y), berechnet (Tab. 3-6), vorausgesetzt, daß die n-Einzelteile auf die XY-Ebene normal-verteilt waren.

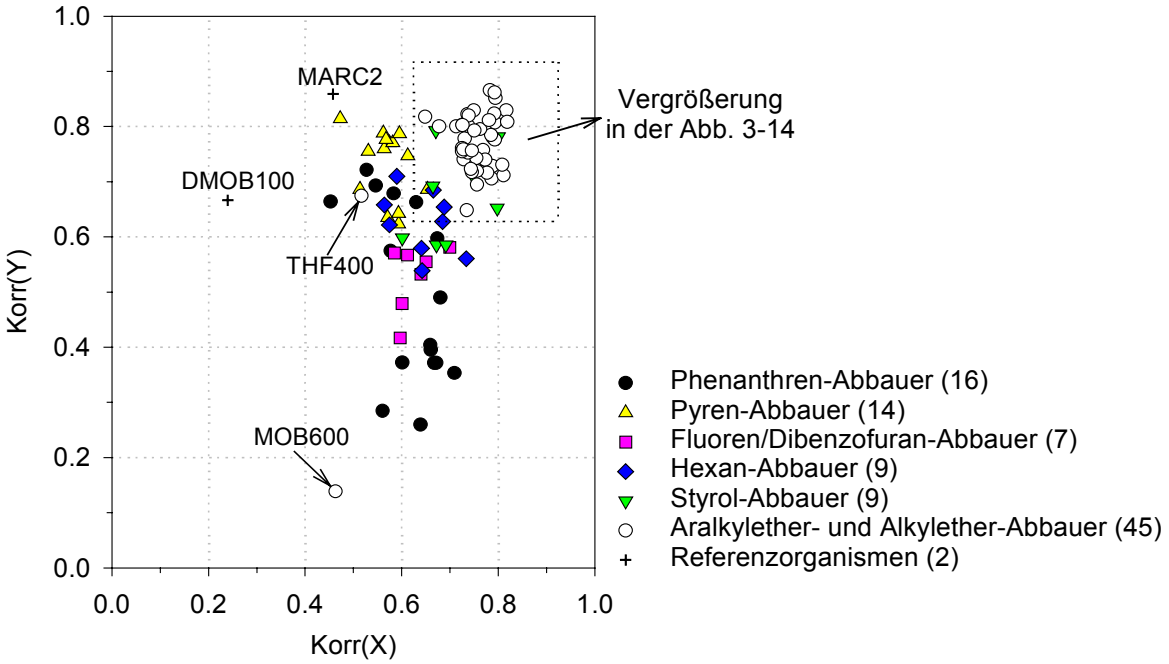


Abb. 3-13. Zweidimensionale Analyse der untersuchten Stämme. Jeder Stamm wurde mit dem Paar der Korrelationskoeffizienten (Korr(X), Korr(Y)) auf der XY-Ebene dargestellt. In diesem Versuch wurden zwei Pilzstämme DMOB100 und MARC2 als Referenzorganismen gegenüber den Bakterien verwendet.

Tab. 3-6. Mittelpunkte und die Dispersitätsgrößen der bezüglich der Abbaufähigkeit eingeordneten Stammgruppen in der Abbildung 3-13

Stammgruppe (N) [1]		Mittelpunkt [2]		Dispersitätsgröße [3]	
		$\bar{X}$	$\bar{Y}$	σ_X	σ_Y
Phenanthren-Abbauer (16)		0,615	0,493	0,067	0,154
Pyren-Abbauer (14)		0,570	0,732	0,042	0,061
Fluoren/Dibenzofuran-Abbauer (7)		0,626	0,529	0,037	0,056
Hexan-Abbauer (9)		0,643	0,626	0,054	0,054
Styrol-Abbauer (9)		0,711	0,682	0,064	0,077
Aralkylether-Abbauer	***Rhodococcus*-ähnlich (11)**	0,757	0,795	0,048	0,057
	MOB600 (1)	0,463	0,138	-	-
THF-Stämme	***Rhodococcus*-ähnlich (4)**	0,730	0,803	0,019	0,018
	THF400 (1)	0,517	0,674	-	-
Aliphatische Alkylether-Abbauer (18)		0,760	0,737	0,028	0,030
EVE-Stämme (10)		0,816	0,829	0,032	0,020

Anm.

1) Die Stammzahl einer Gruppe wurde in der Parenthese eingetragen
2) Mittelpunkte, $(\bar{X}, \bar{Y})$,wurden mit dem Mittelwert von den (x, y)-Koordinaten einer Stammgruppe berechnet.
3) Dispersitätegröße, (σ_X, σ_Y), bedeutet die jeweilige Standardabweichung von den (x, y)-Koordinaten.

Aus der Dispersitätsgröße jeder Stammgruppe, deren Einzelteile mit ihren spezialen Abbaufähigkeiten als ′Spezial-Mikroorganismen′ gekennzeichnet wurden, wurde die Gültigkeit für die beliebige Stammgruppierung nach dem folgenden Kriterium geprüft:

Die Dispersitätsgröße war klein, wenn die Einzelteile einer Stammgruppe phenetisch miteinander ähnlich waren.

Einige Stammguppen, wie z.B. die Pyren-Abbauer, die Fluoren- bzw. Dibenzofuran-Abbauer, die Alkylether-Abbauer, wurden jeweils in einer engen Zone zugeordnet. Die Einzelteile solcher Stammgruppen ergaben eine hohe Ähnlichkeit untereinander, und ihre stammspezifische Abbaufähigkeit war für die beliebige Stammgruppierung gültig. Auβerhalb dieser Tendenz wurden die Stämme THF400 und MOB600 von den anderen cyclische Alkylether- oder Aralkylether-abbauenden Stammgruppen entfernt zugeordnet. Cyclische Alkylether oder Aralkylether wurden nicht durch taxonomisch oder stammspezifisch ähnliche Mikroorganismen, sondern durch verschiedene

Mikroorganismen abgebaut. So wurden Aralkylether, wie z.B. Anisol, 1,4-Diethoxybenzol und 1,4-Dimethoxybenzol, auch vom Pilzstamm DMOB100 abgebaut. Auβer den Stämmen THF400 und MOB600 wurden die anderen Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme in einer engen Zone zugeordnet, ohne bezüglich ihrer unterschiedlichen Abbaufähigkeiten für Aralkylether, cyclische Alkylether und aliphatische Alkylether aufgegliedert zu werden.

Im Vergleich dazu verteilten sich die Styrol-Abbauer und die Phenanthren-Abbauer breit. Die Einzelteile zeigten eine wenige Ähnlichkeit untereinander. Bisher wurden die Phenanthren- oder Styrol-abbauenden Stämme aus verschiedenen Orten isoliert, und diese Abbaufähigkeiten befanden sich in verschiedenen bakteriellen und pilzartigen Stämmen (Sutherland et al., 1995). Biologische Komponenten dieser Stammgruppen wären verschieden, wenn Styrol oder Phenanthren via verschiedene Mechanismen abgebaut würde, wie z.B. durch initiale Monooxygenierung oder Dioxygenierung. Demgegenüber war die dichte Dispersität von den Pyren-abbauenden Stämmen vorschriftswidrig. Aromatische Ringe des Pyrens sind mehr kondensiert, und die chemische Ionisierungsenergie ist niedriger als Styrol und Phenanthren. Trotzdem ist der biologische Abbau von Pyren schwerer als Styrol und Phenanthren. Aus den Studien über den biologischen Abbau polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs) her, wird es seit langem bekannt gemacht, daß die chemischen und physikalischen Eigenschaften von PAKs nicht nur die biologische Abbaubarkeit, sondern auch die wahrscheinlichsten Abbauwege vorher festlegen. Die Abbaubarkeit polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und die abbauenden Mikroorganismen werden um so mehr mit den chemischen und physikalischen Eigenschaften (z.B. Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Ionisierungspotential, usw.) beschränkt, je mehr der PAK kondensiert und hochmolekular ist (Gibson & Subramanian, 1984; Bossert & Bartha, 1986; Sutherland et al., 1995).

Ein anderes Beispiel war die Hexan-abbauende (HXN) Stammgruppe, deren Stämme alle aus einem langfristig Hexan-beaufschlagten Bioreaktor in der Abteilung ALR, ISWA der Universität Stuttgart isoliert wurden. Die Dispersitätsgröße von den Hexan-Abbauern war kleiner als die von den Styrol-Abbauern. Jedoch waren die ersten taxonomisch noch verschiedener als die letzten. Daher beruhte die kleine Dispersität von der Hexan-abbauenden Stammgruppe auf die taxonomische Ähnlichkeit von den Einzelteilen nicht. Unter Streßbedingungen herrschten die Hexan-abbauenden Mikroorganismen, die ähnliche Substratspektren miteinander besaßen, in der ganzen Biozönose vor (i.e. Zonierung).

Hexan bzw. flüchtige n-Alkane werden durch verschiedene Biosysteme abgebaut. Der biologische Abbau von n-Alkanen wird unter Bildung von 1-Alkanol durch eine Monooxygenierung am

terminalen C-Atom eingeleitet. Das bekannteste Beispiel ist die sogenannte Alkan-ω/β-Oxidation von Hexadecan. Diese Abbauaktivitäten befinden sich in verschiedenen Arten von Bakterien, Hefen und Pilzen überall in der Natur (Britton, 1984; Watkinson & Morgan, 1990; Bossert & Compeau, 1995).

n-Alkane lösen sich ins Wasser schwer (z.B. n-Hexan: 12,3 mg l^{-1}). Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Wasserlöslichkeit ab (z.B. n-Hexadecan: $5{,}2 \times 10^{-5}$ mg l^{-1}), während die Schmelz- und Siedepunkte zunehmen. Damit werden n-Alkane bezüglich ihrer physikalischen Zustände in drei Gruppen untergeteilt: gasförmige ($C_1 \sim C_4$), leicht flüchtige n-Alkane ($C_5 \sim C_8$) und höhere n-Alkane ($\geq C_9$). Die Kettenlänge der n-Alkane bestimmt nicht nur ihre chemische und physikalische Eigenschaften, sondern auch ihr biologisches Abbaumuster: z.B. werden die Aktivitäten mancher Abbauenzyme, die sich an der Alkanmonoxidation beteiligen, auf die Kettenlänge von n-Alkanen begrenzt. Schwer wasserlösliche und flüchtige n-Alkane wie z.B. Hexan wirken auf die Zelle toxisch ein. Durch lipophile Aggression beschädigen sie Membrantransportsysteme und Enzymsysteme (Gill & Ratledge, 1972; Witholt et al., 1990 und 1992). Vor der lipophil bezogenen Toxizität flüchtiger Alkane fungiert die wäβrige Flüssigkeit und Schicht um die Zelle herum als ein Schutzwall, wie z.B. in Trickling-Filtern und Biowäschern. Der lipophile Zellangriff bzw. Phasentransfer erschwert sich mit zunehmender Kettenlänge von n-Alkanen, aber die wäβrige Flüssigkeit und Schicht ist gegen gasförmige Alkanen wenig schützend wegen ihrer hohen Wasserlöslichkeit. Es ist unklar, daß Oberfläche-aktive Substanzen (′Biosurfactant′) während des Abbaues von gasförmigen bzw. leicht flüchtigen Alkanen hergestellt werden. Oberflächeaktive Substanzen werden häufig während des Stoffwechsels höherer Alkane in der späteren Wachstumsphase (Idiophase) hergestellt, um die Absorptionsrate zu beschleunigen (Hommel, 1990).

Die Tatsache, daß taxonomisch verschiedene Hexan-abbauende Stämme in enger Zone eingeordnet wurden, war darauf zurückzuführen, daß die ganze Biozönose im geschlossenen Habitat langfristig n-Hexan erleideten. Für die enge Zonierung von den biologischen Komponenten waren die technischen Bedingungen zum langen Betrieb dieses Reaktorsystems, wie z.B. Volumenkonzentration, Retentionszeit, usw., als abiotische Faktoren wichtig.

Wurden Spezial-Mikroorganismen mit den taxonomisch relevanten und stammspezifischen Merkmalen zweidimensional dargestellt, resultierte eine dichte Zonierung nicht nur aus der taxonomischen Ähnlichkeit, sondern auch aus der organischen Zusammensetzung der biotischen und abiotischen Komponenten in einem Ökosystem. So scheint die Gesamtheit eines Ökosystems größer als die Summe der individuellen Bestandteile zu sein (Allen 1988).

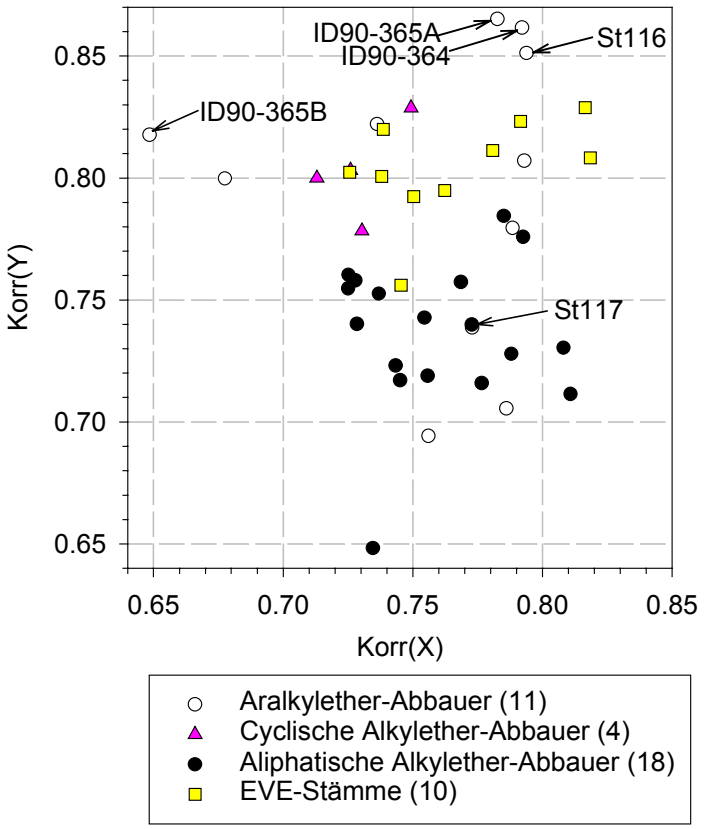


Abb. 3-14. Ausschnitt aus der Abbildung 3-13 für die Betonung der Stammgruppen von den Aralkylether-, cyclische Alkylether- und aliphatische Alkylether-Abbauern sowie von den EVE-Stämmen: In den EVE-Stämmen wurden die mangelhaften Mutantstämme (Dee$^-$) von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen eingeschlossen (siehe Abschnitt 3.1.4.4)

Sowohl die meisten Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme als auch die EVE-Stämme wurden in einer engen Zone zugeordnet, wozu die *Rhodococcus* Stämme St116, St117, ID90-364, ID90-365A und ID90-365B zugeordnet wurden. Diese enge Zonierung ergab sich nicht nur aus der ökologischen Allgemeinheit, sondern auch aus der taxonomischen Ähnlichkeit mit der Gattung *Rhodococcus*. Die enge Zone wurde in der Abbildung 3-14 vergrößert, um die dazu gehörenden Einzelteile bezüglich ihrer stammspezifischen Abbaufähigkeit für Aralkylether, cyclische Alkylether, und aliphatische Alkylether ins Detail zu bringen. Davon wurden die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme und die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme voneinander getrennt. Die

EVE-Stämme scheinen dazwischen zu liegen. Die Aralkylether-abbauenden Stämme wurden auf der Ebene breit zugeordnet, woran die Alkylether-abbauenden Stämme und die EVE-Stämme teilnahmen. Als einzige C/E-Quelle zwangen Aralkylether (z.B. Anisol, Phenetol sowie 1,4-Diethoxybenzol), cyclische Alkylether (z.B. Tetrahydrofuran, und Tetrahydropyran) und aliphatische Alkylether (z.B. Diethylether) die mikrobiellen Abbauer dazu, eine enge Zonierung innerhalb von *Rhodococcus* zu schaffen.

Bisherige Studien bestätigten, daβ die Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Mikroorganismen meistens innerhalb von *Rhodococcus* oder engem Taxa unter der Supergruppe Actinomyceten eingeordnet wurden (Bernhardt & Diekmann, 1991; Karlson et al., 1993; Parales et al., 1994).

Aus der zweidimensionalen Analyse wurden die zwei Stämme THF400 und MOB600 von der *Rhodococcus* Stammgruppe entfernt zugeordnet. Mehrere Studien sind vonnöten, um diese Einzelteile biochemisch und taxonomisch weiter zu untersuchen.

3.2.2. Die Cluster-Analyse der Gram-negativen Stämme

Für die ′Cluster′-Analyse wurden 105 taxonomische Merkmale aus dem Testfeld X und zusätzlich 28 stammspezifische Merkmale aus dem Testfeld Y (Tab. 3-7) ausgewählt, damit 45 Gram-negative nicht-Sporen-bildende Stäbchen taxonomisch untersucht wurden. Andere Merkmale vom Testfeld Y wurden wegen ihrer Ungebräuchlichkeit in der allgemeinen Taxonomie von der ′Cluster′-Analyse ausgeschlossen.

Tab. 3-7. Zur numerischen Klassifizierung verwendete Merkmale vom Testfeld Y

Charakteristika		Chemikalien
C/E-Quelle	Alkohol	Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Pentanol, Isopropanol, ±2-Butanol, ±2-Pentanol, 1,4-Butandiol, 2-Methyl-1-butanol, 3-Methyl-1-butanol, Glycerol, Ethylenglykol, Diethylenglykol, Phenol, Benzylalkohol
	Keton/Aldehyd	Aceton, Benzylaldehyd
	Ester	Essigsäureethylester, Essigsäurevinylester
	Alkan	Hexadecan, Pristan
C/N-Quelle		Mono-ethanolamin, Acetamid, Acrylamid, Imidazol, 2-Aminobenzoesäure, 4-Aminobenzoesäure

Die Testergebnisse wurden mittels eines dreierlei Zahlsystems, {-1, 0, 1}, bewertet. Die Cluster wurden in der trigonalen Matrix analysiert, wobei jeder Korrelationskoeffizient ($-1 \leq r \leq 1$) zwischen zwei Stichproben aufgeführt wurde (Tab. 3-8). Jeder Cluster wurde unter Abgleich mit den taxonomisch anerkannten Referenzorganismen (z.B. DSM-Stämme) analysiert, um sich in die taxonomische Gruppe einzuordnen. Die Gattung wurde bei einem taxonomischen Grenzwert [*r*] von 0,6 auf dem Dendrogramm dargestellt (Abb.3-15).

Die Stämme DOX2 und DOX5, die durch Anreicherung mit 1,4-Dioxan aus einer Belebtschlammprobe isoliert wurden, wurden in die *Cytophaga-Flexibacter*-Stammgruppe eingeordnet, ohne weitere Verwendung der taxonomisch anerkannten Referenzorganismen nach dem Wissen ihrer determinativen Merkmale, wie z.B. gleitende Beweglichkeit und Agar-Abbaufähigkeit.

Die Stämme DPE100, BZE101, PHE42, PHE41 und PHE43 lieβen sich der *Sphingomonas* ähnlichen Stämme unter α-Proteobakterien erscheinen, wozu der *Rhizomonas* Stamm DBP100 und der *Sphingomonas* Stamm DSM6900 angehörten.

Manche Isolate zeigten eine Ähnlichkeit mit der *Pseudomonas putida* Domäne, wozu *P. putida* DSM8368, *P. putida* CLB250 und *Pseudomonas* sp. VLB120 angehörten. Dazu gehörten der Phenylcyclohexan-abbauende Stamm PCH201, der Eugenol (4-Allyl-2-methoxy- phenol)-abbauende Stamm POP100, der PEG-abbauende Stamm PEG100, der *para*-Kresol-abbauende Stamm *P. putida* 4MP1, drei Styrol-abbauende Stämme M2A, VLB120 und VLB130, zwei Hexan-abbauende Stämme HXN400 und HXN1100, neun Phenanthren-abbauende Stämme PHE3, PHE223, PHE121, PHE411, PHE222, PHE111, AOL301, AOL302 und PHE112, und der Carbazol-abbauende Stamm DBP200 an.

Der Bibenzyl-abbauende Stamm BIB7 lag nahe beim Stamm JMP134, dessen alte taxonomische Name von *Alcaligenes eutrophus* nach *Ralstonia eutropha* innerhalb der gleichen rRNA-homologen *Pseudomonas* Gruppe II unter β-Proteobakterien erneuert wurde (Yabuuchi et al., 1995).

Der rote Stamm DME, der durch Anreichrung mit Methyl-*tert*-butylether aus einer Humus-Bodenprobe isoliert wurde, hat eine hohe Ähnlichkeit mit *Methylobacterium extorquens* DSM1338 ergeben. Der farblose C_1-Verwerter DME2 war von der *Methylobacterium* Domäne weit entfernt.

In der Abbildung 3-15 wurden 13 Phenanthren-abbauende Isolate zu drei taxonomischen Gruppen aufgeteilt. Die beweglichen Stämme PHE222, PHE223, PHE3, PHE111, PHE112, PHE121, AOL301 und AOL302 gehörten zu *Pseudomonas* an. Die farblosen unbeweglichen langfädigen Stämme PHE41, PHE42 und PHE43 wurden in die *Sphingomonas*-ähnliche Stammgruppe unter α-Proteobakterien eingeordnet. Der gelbe unbewegliche langfädige Stamm PHE3112 konnte nicht taxonomisch eingeordnet werden.

Tab. 3-8. Die Cluster-Analyse von 45 Gram-negativen nicht-Sporen-bildenden Stäbchen

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1.MOR10																																												
2.DOX2	0,47																																											
3.DOX5	0,46	0,87																																										
4.DPE100	0,44	0,48	0,51																																									
5.BZE101	0,56	0,47	0,5	0,81																																								
6.DSM6900	0,46	0,52	0,5	0,71	0,74																																							
7.PHE42	0,18	0,49	0,4	0,5	0,42	0,66																																						
8.PHE41	0,18	0,37	0,34	0,52	0,41	0,62	0,82																																					
9.PHE43	0,22	0,3	0,3	0,42	0,32	0,5	0,71	0,85																																				
10.DBP100	0,26	0,35	0,31	0,5	0,43	0,53	0,59	0,59	0,55																																			
11.PCH201	-0	0,3	0,25	0,4	0,3	0,46	0,59	0,56	0,41	0,59																																		
12.POP100	0,03	0,33	0,32	0,44	0,33	0,45	0,54	0,5	0,37	0,57	0,81																																	
13.CLB250	0,09	0,35	0,33	0,43	0,41	0,55	0,56	0,51	0,38	0,58	0,73	0,81																																
14.PEG100	0,18	0,37	0,33	0,47	0,44	0,59	0,6	0,55	0,42	0,56	0,71	0,79	0,91																															
15.P.putida 4MP1	0,12	0,35	0,31	0,48	0,43	0,54	0,51	0,49	0,37	0,48	0,63	0,72	0,87	0,86																														
16.M2A	0,06	0,28	0,33	0,34	0,32	0,53	0,57	0,51	0,36	0,52	0,66	0,71	0,82	0,79	0,77																													
17.VLB120	0,13	0,35	0,36	0,34	0,4	0,46	0,53	0,41	0,29	0,45	0,6	0,65	0,74	0,74	0,69	0,86																												
18.VLB130	0,13	0,34	0,35	0,37	0,4	0,46	0,51	0,41	0,3	0,45	0,63	0,69	0,74	0,72	0,71	0,85	0,97																											
19.HXN1100	0,06	0,3	0,27	0,31	0,28	0,43	0,5	0,43	0,33	0,49	0,61	0,64	0,64	0,63	0,65	0,77	0,75	0,77																										
20.HXN400	0,05	0,28	0,25	0,33	0,24	0,4	0,47	0,41	0,35	0,52	0,6	0,69	0,65	0,62	0,58	0,75	0,71	0,74	0,78																									
21.DSM8368	0,06	0,31	0,32	0,43	0,42	0,49	0,52	0,44	0,31	0,58	0,67	0,69	0,79	0,73	0,76	0,81	0,71	0,73	0,7	0,69																								
22.PHE3	0,1	0,3	0,32	0,4	0,4	0,49	0,5	0,41	0,28	0,5	0,57	0,63	0,69	0,65	0,65	0,72	0,76	0,76	0,69	0,64	0,7																							
23.PHE223	0,16	0,35	0,37	0,39	0,42	0,46	0,5	0,38	0,24	0,42	0,49	0,54	0,61	0,63	0,61	0,61	0,7	0,7	0,61	0,57	0,59	0,86																						
24.PHE121	0,16	0,36	0,35	0,34	0,39	0,45	0,49	0,36	0,2	0,34	0,44	0,5	0,59	0,62	0,63	0,61	0,68	0,68	0,6	0,53	0,6	0,84	0,95																					
25.PHE411	0,15	0,33	0,27	0,3	0,36	0,43	0,46	0,34	0,18	0,35	0,45	0,49	0,57	0,61	0,62	0,62	0,66	0,66	0,62	0,54	0,59	0,83	0,92	0,93																				
26.PHE222	0,17	0,36	0,33	0,32	0,38	0,47	0,54	0,37	0,22	0,41	0,43	0,46	0,54	0,54	0,56	0,56	0,66	0,65	0,61	0,55	0,57	0,79	0,88	0,88	0,87																			
27.PHE111	0,11	0,33	0,33	0,33	0,37	0,43	0,45	0,34	0,2	0,29	0,39	0,41	0,51	0,54	0,53	0,55	0,62	0,59	0,55	0,5	0,57	0,74	0,85	0,85	0,82	0,81																		
28.AOL302	0,18	0,39	0,37	0,32	0,38	0,44	0,44	0,32	0,16	0,27	0,41	0,44	0,55	0,54	0,53	0,56	0,61	0,62	0,53	0,47	0,55	0,69	0,8	0,82	0,77	0,77	0,85																	
29.AOL301	0,11	0,37	0,35	0,38	0,39	0,52	0,59	0,52	0,39	0,5	0,52	0,57	0,68	0,67	0,64	0,68	0,7	0,68	0,64	0,6	0,65	0,82	0,79	0,8	0,78	0,75	0,77	0,79																
30.PHE112	0,07	0,31	0,31	0,36	0,33	0,57	0,55	0,54	0,41	0,42	0,5	0,56	0,62	0,65	0,62	0,67	0,62	0,59	0,61	0,57	0,59	0,76	0,74	0,74	0,72	0,66	0,83	0,71	0,82															
31.DBP200	0,18	0,31	0,33	0,35	0,34	0,4	0,47	0,43	0,3	0,53	0,49	0,55	0,6	0,61	0,58	0,56	0,56	0,56	0,56	0,54	0,67	0,74	0,77	0,79	0,77	0,71	0,71	0,65	0,74	0,7														
32.BIB7	0,06	0,26	0,27	0,41	0,31	0,45	0,57	0,56	0,4	0,52	0,71	0,72	0,71	0,7	0,65	0,61	0,54	0,59	0,66	0,58	0,65	0,57	0,5	0,48	0,48	0,48	0,44	0,51	0,61	0,53	0,55													
33.JMP134	-0	0,13	0,1	0,28	0,24	0,41	0,47	0,46	0,37	0,43	0,74	0,67	0,68	0,69	0,67	0,61	0,57	0,58	0,56	0,54	0,57	0,49	0,45	0,44	0,43	0,42	0,37	0,32	0,42	0,52	0,42	0,6												
34.NCIB10643	0,09	0,31	0,32	0,4	0,38	0,47	0,51	0,44	0,35	0,47	0,64	0,69	0,63	0,64	0,6	0,67	0,68	0,68	0,67	0,66	0,63	0,69	0,67	0,61	0,64	0,56	0,53	0,51	0,6	0,58	0,5	0,58	0,55											
35.POB310	0,24	0,46	0,45	0,5	0,5	0,54	0,44	0,4	0,31	0,44	0,54	0,61	0,68	0,68	0,69	0,5	0,56	0,56	0,47	0,43	0,57	0,5	0,5	0,46	0,49	0,52	0,39	0,44	0,52	0,43	0,39	0,55	0,48	0,58										
36.DSM6506	0,14	0,29	0,28	0,41	0,41	0,52	0,49	0,46	0,38	0,42	0,44	0,48	0,57	0,61	0,57	0,57	0,59	0,56	0,57	0,45	0,6	0,61	0,55	0,56	0,54	0,62	0,6	0,62	0,71	0,65	0,53	0,53	0,4	0,5	0,54									
37.4MOP1	0,31	0,39	0,39	0,47	0,59	0,55	0,31	0,25	0,19	0,31	0,37	0,4	0,5	0,46	0,51	0,49	0,47	0,46	0,48	0,39	0,53	0,45	0,37	0,38	0,33	0,35	0,44	0,45	0,45	0,44	0,38	0,44	0,32	0,44	0,38	0,47								
38.DSM7526pale	0,14	0,36	0,35	0,45	0,44	0,45	0,57	0,41	0,36	0,34	0,41	0,46	0,46	0,45	0,47	0,49	0,5	0,56	0,53	0,46	0,55	0,62	0,59	0,58	0,53	0,55	0,55	0,59	0,52	0,47	0,45	0,52	0,33	0,55	0,4	0,43	0,37							
39.DSM7526dark	0,31	0,45	0,49	0,44	0,42	0,42	0,49	0,43	0,46	0,4	0,35	0,35	0,36	0,36	0,36	0,36	0,38	0,39	0,35	0,3	0,37	0,39	0,41	0,39	0,28	0,32	0,37	0,43	0,41	0,37	0,31	0,26	0,24	0,4	0,33	0,26	0,23	0,6						
40.CLN200	0,2	0,32	0,29	0,36	0,39	0,31	0,37	0,3	0,22	0,45	0,45	0,48	0,46	0,41	0,37	0,41	0,46	0,48	0,5	0,41	0,44	0,43	0,48	0,4	0,4	0,44	0,4	0,42	0,36	0,32	0,44	0,43	0,34	0,49	0,38	0,39	0,33	0,43	0,45					
41.PHE3112	0,19	0,31	0,28	0,42	0,42	0,53	0,61	0,57	0,48	0,51	0,53	0,54	0,48	0,48	0,48	0,51	0,47	0,48	0,55	0,48	0,47	0,41	0,33	0,26	0,29	0,33	0,26	0,25	0,43	0,43	0,33	0,48	0,39	0,49	0,4	0,4	0,32	0,35	0,37	0,43				
42.HXN1400	0,23	0,31	0,31	0,39	0,29	0,48	0,54	0,43	0,41	0,43	0,42	0,49	0,54	0,52	0,49	0,52	0,49	0,51	0,55	0,59	0,54	0,47	0,42	0,39	0,44	0,38	0,32	0,28	0,43	0,43	0,42	0,47	0,42	0,55	0,48	0,33	0,34	0,4	0,23	0,28	0,46			
43.DME2	0,29	0,26	0,25	0,33	0,25	0,28	0,44	0,44	0,49	0,39	0,4	0,39	0,29	0,35	0,24	0,26	0,35	0,37	0,28	0,3	0,27	0,27	0,24	0,21	0,19	0,23	0,16	0,17	0,26	0,25	0,2	0,4	0,43	0,35	0,38	0,26	0,08	0,31	0,43	0,26	0,32	0,45		
44.DME	0,28	0,25	0,25	0,26	0,27	0,41	0,4	0,45	0,41	0,46	0,36	0,34	0,32	0,38	0,29	0,36	0,42	0,44	0,42	0,37	0,33	0,4	0,34	0,32	0,32	0,35	0,28	0,26	0,32	0,37	0,29	0,39	0,39	0,44	0,37	0,35	0,18	0,34	0,37	0,22	0,38	0,38	0,6	
45.DSM1338	0,22	0,32	0,29	0,31	0,28	0,41	0,45	0,47	0,44	0,48	0,41	0,38	0,32	0,38	0,32	0,37	0,42	0,46	0,43	0,37	0,35	0,41	0,37	0,34	0,34	0,37	0,28	0,27	0,33	0,37	0,29	0,42	0,41	0,49	0,4	0,35	0,19	0,41	0,42	0,27	0,42	0,38	0,6	0,92

Korr [r]

- 0,6 ~ 0,7
- 0,7 ~ 0,8
- 0,8 ~ 0,9
- > 0,9

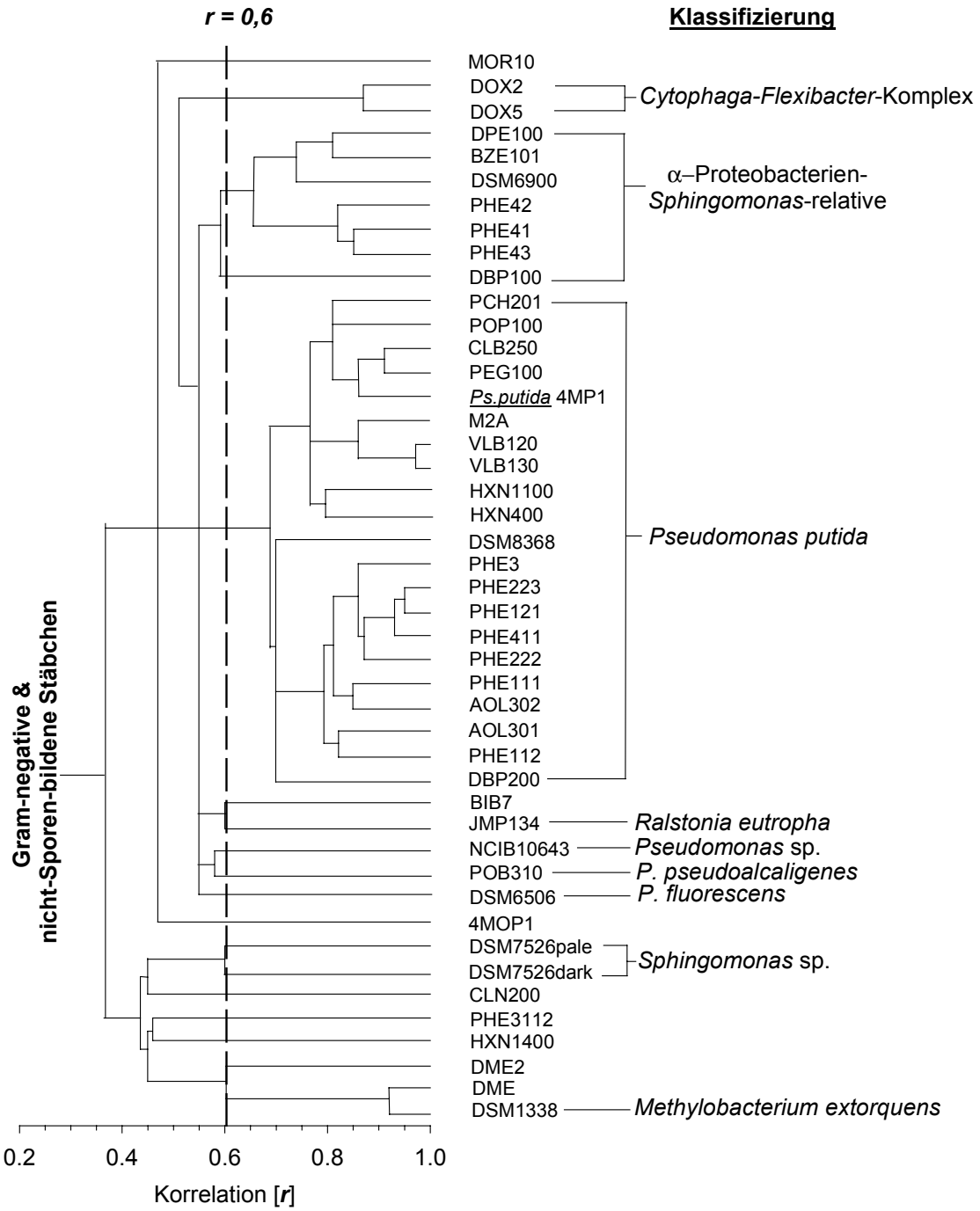


Abb. 3-15. Schematische Darstellung (Dendrogramm) zur numerischen Klassifizierung von 45 Gram-negativen nicht-Sporen-bildenden Stäbchen bei einem taxonomischen Grenzwert [*r*] von 0,6

Aus diesem Versuch scheinen weitere taxonomische Studien über die Stämme *Pseudomonas* sp. NCIB10643, *P. pseudoalcaligenes* POB310 und *P. fluorescens* DSM6506 nötig zu sein, da ihre Cluster von der *Pseudomonas* Domäne weit entfernt sind.

In der Tabelle 3-9 wurden die Charakteristika von 16 Phenanthren-abbauenden Stämmen zur Differenzierung dargestellt. Alle Phenanthren-Isolate und Referenzstämme wurden nach den folgenden Testergebnissen als Gram-negativ bestimmt: positiv für den 3 %(w/v)igen KOH-Test, positiv für die L-Alanin-Aminopeptidase, und negativ für die Gramfärbung.

Die Stämme PHE3112, PHE41, PHE42 und PHE43, die aus einer Belebtschlammprobe des Klärwerks Stuttgart-Büsnau isoliert wurden, bildeten punktförmige (< ∅ 1 mm), halbkugelige und glattrandige Kolonien auf TSA-Medien, und zeigten unbewegliche, langfädige (Länge: 10 ~ 30 µm), schlanke (ca. ∅ 0,4 µm) und pleomorphe Zellen unter Mikroskopierung. Sie bildeten häufig zarte Zellklumpen außerhalb ihrer Wachstumsoptima.

Der Stamm PHE3112 wuchs nicht oder nur langsam (Verdoppelungszeit, $t_d \approx 23$ h) auf nährstoffreichen Komplexmedien, wie z.B. TSA, NA und R2A-Agarplatten. Obwohl er auf Komplexmedien einmal wuchs, ergab er manchmal kein Wachstum in/auf den frischen Minimalmedien mit Phenanthren als einzige C/E-Quelle. Die *Pseudomonas* Stämme PHE222, PHE223, PHE3, PHE111, PHE112, PHE411 und PHE121, die aus einer Kokereibodenprobe und zwei PAK-belasteten Bodenproben von Neustadt und Rositz stammten, zeigten eine ähnliche Morphologie: die Koloniemorphologie war kreisförmig (∅ 1 ~ 2 mm), halbkugelig und glattrandig. Die Zellmorphologie war bewegliche Stäbchen (∅ 0,5 ~ 0,6 µm, Länge: 2 ~ 5 µm). Die *Pseudomonas* Stämme AOL301 und AOL302, die aus einer mit Chlorbenzolen kontaminierten Bodenprobe isoliert wurden, waren morphologisch und physiologisch mit den oben erwähnten *Pseudomonas* Stämmen PHE222 u.a. ähnlich. Wenn die Stämme AOL301 und AOL302 Phenanthren abbauten, ließ sich eine stark braune Farbe in der Flüssigkeit erkennen.

Die Stämme DSM7526pale und DSM7526dark, die während des Wachstums auf Minimalmedien mit Phenanthren vom Urstamm *Sphingomonas paucimobilis* DSM7526 (Mueller et al., 1990) hergeleitet wurden, wurden von der *Sphingomonas*-ähnlichen Stammgruppe, wozu andere Stämme wie DPE100, BZE101, DSM6900, PHE41, PHE42, PHE43, und DBP100 angehörten, weit entfernt zugeordnet. Vermutlich waren die zwei Phenanthren-abbauenden Stämme DSM7526pale und DSM7526dark keine morphologische und physiologische Stammvarianten vom Stamm DSM7526, sondern sie waren taxonomisch voneinander unterschiedlich. Trotzdem zeigten die beiden Stämme die ursprünglichen Abbaupotentiale auf Phenanthren und Fluoranthen an, die der Urstamm DSM7526 hatte.

Tab. 3-9. Die Charakteristika zur Differenzierung der Phenanthren-abbauenden Stämme

Test / Stamm		PHE3112	PHE41	PHE42	PHE43	PHE222	PHE223	PHE3	PHE111	PHE112	PHE411	PHE121	AOL301	AOL302	DSM6900	DSM7526pale	DSM7526dark
C/E-Quelle [1]																	
Ethinylethylether		+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	-
3,4-Dihydro-2H-pyran		-	±	-	±	-	-	-	-	+	-	-	±	-	+	-	-
2,3-Dihydrofuran		-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
2,3-Epoxy-1-propanol		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Methanol		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Ethylenglykol		-	±	-	±	-	-	-	-	+	-	-	-	-	±	-	-
n-Heptan		-	+	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceton		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ethylacetat		+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
Vinylacetat		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Benzylalkohol		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Toluol		-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylol		-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2-Methoxybiphenyl		-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4-Methoxybiphenyl		-	-	+	-	-	-	-	-	±	-	-	+	-	-	-	-
Naphthalin		-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
1-Methoxynaphthalin		-	±	±	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Methoxynaphthalin		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2-Methylnaphthalin		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Fluoranthen		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Acetamid (C/N-Quelle)		-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	+	-
Hydrolyse	Gelatine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Grambestimmung		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Koloniefarbe [2]		Y	-	-	-	-	-	(Y)	-	-	-	-	-	-	G	G	G
Zellmorphologie [3]		S,P	S,P	S,P	S,P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Wachstums optima (R2A)	% NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0
	T °C	25	30	30	30	30	30	25	25	25	30	30	30	30	25	30	30
	pH	6,5	7,0	7,0	7,5	8,5	7,5	5,5	5,5	5,5	5,5	6,5	6,5	5,5	5,5	7,0	6,5
	t_d (h)	23	4	4	4,1	6,4	4	4	4	4,3	4,3	4,1	4,5	4,1	4,2	4,1	4
Katalase		++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+
Oxidase		-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	+	-	+	-	++	++

Anm.

1) + : Wachstum größer 50 % als die Negativkontrolle (ca. ΔOD > 0,05 mit ∅ 20mm Teströhrchen)
   ± : Kein Wachstum, sondern einen positiven Farbumschlag nach 24 Stunden mit Tetrazolium-violett
   - : Weder Wachstum noch Farbumschlag

2) Koloniefarbe : - : farblos, G: grün bzw. hell-grün, Y, (Y): (hell) gelb

3) Zellmorphologie : S: Stäbchen, P: pleomorph in der langfädigen Form (Länge > 10 ~ 30 µm)

Diese taxonomischen Arbeiten stimmten mit den Ergebnisse von den handelsüblichen API-NE- und Biolog-GN-Schnelltests gut überein, wenn die Stämme PEG100, DPE100 und BZE101 jeweils zweimal unabhängig untersucht wurden (Tab. 3-10).

Tab. 3-10. Ergebnisse von handelsüblichen API-NE-Tests zur schnellen Identifizierung und Differenzierung der bakteriellen Isolate PEG100, DPE100 und BZE101

Stamm	NO_3/NO_2-Reduktion	Indol-Test	Glucose (Säure)	Arginin	Urease	Esculinhydrolyse	Gelatinehydrolyse	PNPG-ß-glucosidase	Glucose (C/E)	Arabinose (C/E)	Mannose (C/E)	Mannitol (C/E)	N-Acetyl-glucoasmin	Maltose (C/E)	Gluconat (C/E)	Caprat (C/E)	Adipat (C/E)	Malat (C/E)	Citrat (C/E)	Phenylacetat (C/E)	Cytochrom-Oxidase	Ergebnisse (%SIM)
PEG100	-	-	+	+	±	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	*P. putida* (99,9)
DPE100	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	*S. paucimobilis* (99,9)
BZE101	-	-	-	-	-	+	-	±	+	+	+	-	-	+	±	-	-	-	+	-	-	*S. paucimobilis* (95,3)

Anm.

1) Die Gram-negative Stämme PEG100, DPE100 und BZE 101 wurden jeweils zweimal unabhängig getestet, und die Testergebnisse wurden (+) für zweimal positiv, (±) für einmal positiv und einmal negativ, oder (-) für zweimal negativ bewertet

2) Die prozentuale Ähnlichkeit (%SIM) wurde anhand einer Software, APILAB Plus (v. 3.3.3), vom Hersteller mit dem Mittelwert von zweimaligen Testergebnissen abgeschätzt

Einige Stämme wie MOR10, BIB7, 4MOP1, CLN200, PHE3112, HXN1400 und DME2 wurden in dieser Arbeit nicht erfolgreich klassifiziert.

3.2.3. Die Cluster-Analyse der Gram-positiven pleomorphen Stämme

Auf ähnliche Weise, wie oben in Abschnitt (3.2.2) beschrieben, wurden die Gram-positiven nicht-Sporen-bildenden pleomorphen Isolate taxonomisch untersucht. Um die Taxonomie aufs Detail zu bringen, wurden die dazu angehörenden Stämme bezüglich ihrer stammspezifischen Abbaupotentiale auf Pyren, Fluoren bzw. Dibenzofuran, Hexan, Styrol und Alkylether aufgeteilt.

3.2.3.1. Pyren-abbauende Stämme

Die Cluster von 13 Pyren-abbauenden Isolaten, dem *Mycobacterium* Stamm US1, zwei *Rhodococcus* Stämmen St116 und St117 und zwei *Terrabacter* Stämmen DPO360 und DPO1361 wurden dadurch analysiert, daß jeder Korrelationskoeffizient [*r*] mit der höchsten Rangfolge in die trigonale Matrix aufgeführt wurde (Tab. 3-11).

Tab. 3-11. Cluster-Analyse von 14 Pyren-abbauenden Stämmen, zwei *Terrabacter* Stämmen DPO360 und DPO1361, und zwei *Rhodococcus* Stämmen St116 und St117

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1.S10																	
2.US1	0,82																
3.PYR400	0,76	0,83															
4.PYR101	0,64	0,72	0,76														
5.PYR11	0,69	0,73	0,7	0,95													
6.PYR300	0,75	0,69	0,72	0,93	0,95												
7.PYR103	0,62	0,71	0,74	0,95	0,92	0,9											
8.PYR200	0,65	0,65	0,67	0,82	0,84	0,89	0,88										
9.PYR210	0,66	0,67	0,7	0,85	0,85	0,88	0,83	0,87									
10.PYR211	0,64	0,62	0,59	0,79	0,84	0,84	0,75	0,8	0,85								
11.PYR110	0,69	0,64	0,66	0,84	0,87	0,89	0,79	0,81	0,8	0,83							
12.PYR212	0,61	0,62	0,66	0,87	0,86	0,89	0,83	0,8	0,84	0,78	0,82						
13.PYR102	0,63	0,59	0,62	0,83	0,84	0,87	0,78	0,76	0,79	0,77	0,78	0,79					
14.PYR213	0,62	0,58	0,5	0,64	0,66	0,72	0,6	0,73	0,74	0,75	0,69	0,64	0,76				
15.St116	0,61	0,55	0,59	0,65	0,64	0,69	0,61	0,63	0,61	0,6	0,61	0,59	0,6	0,55			
16.St117	0,57	0,59	0,52	0,58	0,63	0,6	0,55	0,54	0,54	0,53	0,52	0,47	0,51	0,42	0,76		
17.DPO1361	0,39	0,35	0,38	0,33	0,34	0,37	0,33	0,37	0,36	0,29	0,28	0,28	0,31	0,28	0,5	0,43	
18.DPO360	0,45	0,45	0,44	0,42	0,41	0,45	0,42	0,4	0,4	0,3	0,35	0,35	0,39	0,31	0,43	0,41	0,79

Korr [*r*]

0,6 ~ 0,7

0,7 ~ 0,8

0,8 ~ 0,9

> 0,9

Die resultierenden Cluster wurden auf dem Dendrogramm mit dem taxonomischen Grenzwert [*r*] von 0,6 dargestellt (Abb. 3-16). Alle 13 Pyren-abbauende Isolate gehörten der Gattung *Mycobacterium* an. Dementsprechend ergaben alle Pyren-abbauende Stämme positive Ergebnisse für die Säurefestigkeit, die nach der Ziehl-Neelsen-Färbung untersucht wurde. Aus bisherigen Studien über den Pyrenabbau wurden Mykobakterien als Hauptverwerter erkannt. Außerdem haben Walter et al. (1991) einmal berichtet, daß der *Rhodococcus* Stamm auch daran beteiligt ist.

Der Pyrenabbau wurde wahrscheinlich durch bakterielle Kulturen, die eine hohe Ähnlichkeit mit Mykobakterien hatte, durchgeführt. Pyren schien auf die ganzen Populationen in der Natur selektiv zu wirken, d.h., solange Pyren als einzige C/E-Quelle genutzt wird, herreschen Pyren-abbauende Mykobakterien in ganzen vor.

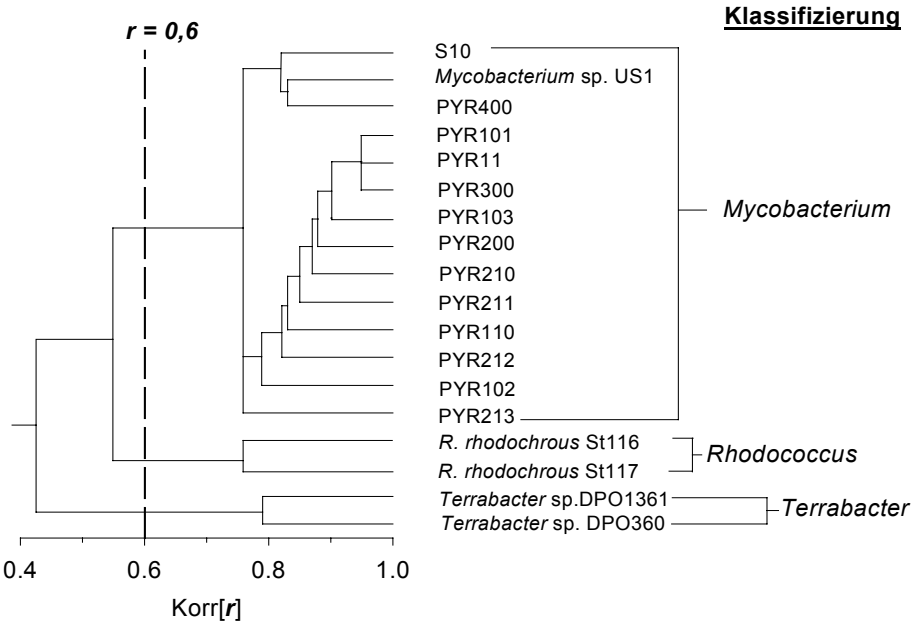


Abb. 3-16. Schematische Darstellung der bakteriellen Clustern von 14 Pyren-abbauenden Stämmen, zwei *Terrabacter*-Stämmen DPO360 und DPO1361, und zwei *Rhodococcus*-Stämmen St116 und St117 mit einem taxonomischen Grenzwert [*r*] von 0,6

In der Tabelle 3-12 wurden die Charakteristika der 14 Pyren-abbauenden Stämme zur Differenzierung dargestellt: Alle Pyren-abbauende Stämme waren Gram-positiv. Die Stämme US1, PYR103, PYR200, PYR210 und PYR400 ergaben jedoch eine leicht positive Reaktion für den 3 %(w/v)igen KOH-Test. Die leicht KOH-positiven Stämme bildeten alle gelbe, glattrandige und halbkugelige Kolonien auf TSA-Medien. Hingegen zeigten die anderen KOH-negativen Stämme unregelmäßige und rauhe Koloniemorphologie darauf.

Alle Stämme konnten auch Phenanthren zum Wachstum verwerten. Die Pyren-abbauenden Mykobakterien wuchsen sehr langsam mit Phenanthren (Verdoppelungs-zeit, t_d = 10 ~ 27 h). Daher entwickelte sich der Pyren-abbauende Stamm PYR400 während der Anreicherung einer Kokerei-Bodenprobe mit Phenanthren nicht als Hauptkomponente. Damit herrschten die Phenanthren-abbauenden Stämme PHE222 und PHE223 als Hauptverwerter in der Probe vor (siehe Abschnitt 3.1.1).

Tab. 3-12. Die Charakteristika zur Differenzierung der Pyren-abbauenden Stämme

Test / C/E-Quelle [1]		S10	US1	PYR11	PYR101	PYR102	PYR103	PYR110	PYR200	PYR210	PYR211	PYR212	PYR213	PYR300	PYR400
Ethinylethylether		±	+	+	-	+	+	-	+	±	-	+	-	±	+
Di-n-pentylether		+	+	-	-	-	-	-	+	-	±	-	-	-	+
3,4-Dihydro-2H-pyran		-	-	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	+	-
2,3-Dihydrofuran		-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
2,3-Epoxy-1-propanol		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Methanol		-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Glycerol		-	+	+	+	+	+	±	+	-	-	+	-	±	+
Ethylenglykol		-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
1,2-Epoxyoctan		-	-	-	-	-	-	±	-	+	-	-	-	+	-
Aceton		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Vinylacetat		±	±	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Phenol		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluol		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthracen		±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenanthren		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluoranthen		+	+	+	+	±	+	±	+	±	±	-	±	±	+
Acetamid (C/N-Quelle)		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
Hydrolyse	Casein	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Gelatine	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pectin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Grambestimmung [2]		+	±	+	+	+	±	+	±	±	+	+	+	+	±
Koloniefarbe [3]		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	(Y)
Ziehl-Neelsen-Färbung		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Zellmorphologie [4]		KP	KP	SKP	SKP	SP	SKP	SKP	SP	KP	SKP	SKP	KP	KP	SKP
Wachstums optima (R2A)	% NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T °C	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	pH	7,0	7,5	7,0	7,0	7,0	7,5	7,0	8,5	9,5	8,5	8,5	7,5	6,5	7,0
	t_d (h)	17	12	25	12	20	12	20	10	10	21	27	12	20	18
Katalase		+++	+++	++	+	+	++	+	++	++	+	+	++	++	-
Oxidase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anm.

1) + : Wachstum größer 50 % als die Negativkontrolle (ca. ΔOD > 0,05 mit ∅ 20mm Teströhrchen)
± : Kein Wachstum, sondern einen positiven Farbumschlag nach 24 Stunden mit Tetrazolium-violett
- : Weder Wachstum noch Farbumschlag

2) Grambestimmung : +: gram-positiv, ±: gram-variabel, -: gram-negativ

3) Koloniefarbe : Y, (Y): (hell) gelb

4) Zellmorphologie : SKP : Stäbchen/Kokken-Kreislauf (pleomorph), SP oder KP: Stäbchen- oder Kokken-dominierend pleomorph

In diesem Fall war Phenanthren kein selektives Substrat für die Pyren-abbauenden Mykobakterien, sondern für die Phenanthren-abbauenden Pseudomonaden. Im Vorhandensein der letzten Komponenten spielten die ersten am Abbau von Phenanthren eine Nebenrolle.

Die meisten *Mycobacterium* Stämme ergaben nach Zutropfen 2 %igen Wasserstoffperoxids ein positives Ergebnis für die Katalase, aber der Stamm PYR400 besaß keine Katalase. Der Stamm PYR400 wurde innerhalb der T-Klasse von Mykobakterien, die gegenüber Isoniazid resistent waren, versuchsweise eingeordnet (Wayne & Diaz, 1982).

3.2.3.2. Fluoren- und Dibenzofuran-abbauende Stämme

Trotz ihrer unterschiedlichen Herkünften ergaben die DPM/DPO-Stämme eine ähnliche Morphologie und Wachstumsphysiologie untereinander.

Die taxonomischen Arbeiten von den Stämmen DPO360 und DPO1361 wurden von Schmid et al. (1997) durch 16S-rDNA Sequenzierung teilweise gemacht, aber die anderen Stämme DPM201, DPM202, DPO210 und DPO340 wurden noch nicht taxonomisch untersucht.

Tab. 3-13. Cluster-Analyse von 7 DPM/DPO-Stämmen, einschließlich der *Terrabacter* Stämmen DPO360 und DPO1361, drei *Mycobacterium* Stämmen US1, PYR101 und PYR213, und zwei *Rhodococcus* Stämmen St116 und St117

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.PYR213											
2.PYR101	0,64										
3.US1	0,62	0,64									
4.St116	0,55	0,65	0,61								
5.St117	0,42	0,58	0,57	0,76							
6.DPO340	0,29	0,45	0,52	0,48	0,52						
7.DPM202	0,23	0,44	0,41	0,45	0,5	0,69					
8.DPO320	0,23	0,38	0,39	0,48	0,5	0,62	0,69				
9.DPM201	0,3	0,24	0,4	0,46	0,35	0,56	0,67	0,73			
10.DPO210	0,3	0,35	0,48	0,56	0,41	0,57	0,57	0,6	0,77		
11.DPO1361	0,28	0,33	0,39	0,5	0,43	0,63	0,64	0,7	0,7	0,7	
12.DPO360	0,31	0,42	0,45	0,43	0,41	0,65	0,68	0,64	0,56	0,54	0,79

Korr [r]

> 0,7

0,6 ~ 0,7

In der Tabelle 3-13 geht es um die Cluster-Analyse von sieben DPM/DPO-Stämmen, einschließlich der *Terrabacter*-Stämmen DPO360 und DPO1361, und drei *Mycobacterium* Stämmen US1, PYR101 und PYR213, und zwei *Rhodococcus* Stämmen St116 und St117. Die Cluster wurden auf dem Dendrogramm bei einem taxonomischen Grenzwert [*r*] von 0,6 dargestellt (Abb. 3-17).

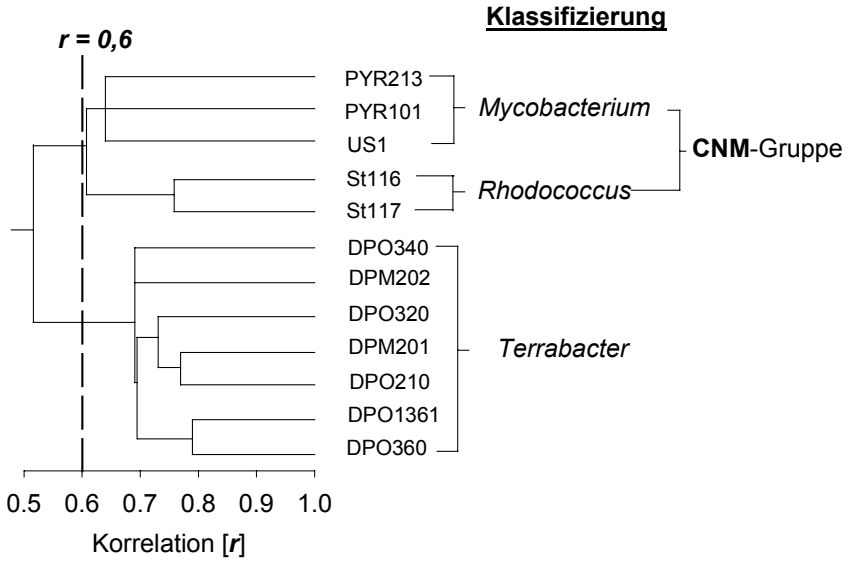


Abb. 3-17. Schematische Darstellung der bakteriellen Cluster, die aus der Cluster-Analyse in der Tabelle 3-12 resultierten: Die CNM-Gruppe bestand aus Mykolsäure-haltigen *Corynebacterium, Nocardia, Mycobacterium* und *Rhodococcus* Stämmen

Die DPM/DPO-Stämme zeigten eine hohe Homologie miteinander. Alle DPM/DPO-Stämme wurden innerhalb von *Terrabacter* eingeordnet. Die Cluster von drei Mykobakterien und zwei Rhodokokken wurde unter Begriffsverwendung der CNM-Gruppe innerhalb der taxonomischen Grenze (r = 0,6) zugeordnet.

In der Tabelle 3-14 handelte sich um die Differenzierung der DPM/DPO-Stämme, die alle morphologisch and physiologisch ähnlich waren. Sie bildeten kreme, kreisförmige (∅ 2~3 mm), konvexe und glattrandige Kolonien auf TSA-Medien, und zeigten gram-positive, pleomorphe und nicht-Sporen-bildende Nocardiaformen (Länge: 3 ~ 4 µm) unter Mikroskopierung. Alle Stämme zeigten eine starke Katalaseaktivität an.

Fluoren und Biphenyl dienten zum Wachstum für alle, einschließlich der Stämme DPM201 und DPM202, die kein Dibenzofuran abbauten. Die Stämme DPM201 und DPM202 zeigten ihre Wachstumsoptima bei pH 7,0, während die DPO- Stämme dazu unterschiedlich bei pH 9,5 optimal gewachsen haben.

Tab. 3-14. Die Charakteristika zur Differenzierung der DPM/DPO-Stämme

Test / C/E-Quelle [1] \ Stamm		DPM201	DPM202	DPO210	DPO320	DPO340	DPO360	DPO1361
3,4-Dihydro-2H-pyran		+	±	±	-	-	-	-
2,3-Dihydrofuran		+	-	+	±	-	±	±
2,3-Epoxy-1-propanol		+	-	-	-	-	-	-
Ethylenglykol		-	-	+	-	-	-	-
Phenol		+	+	+	±	-	+	+
2-Methoxyphenol		-	-	+	-	-	-	-
Benzaldehyd		+	+	+	+	+	-	+
Dibenzofuran		±	±	±	+	+	+	+
D-Xylose		-	-	+	-	-	-	-
Galactose		+	-	+	+	+	+	+
Maltose		+	-	+	+	±	±	+
Milchsäure		+	-	+	+	-	-	+
Succinat		+	-	-	-	-	-	-
Fumarat		-	-	+	-	-	-	+
DL-Alanin (C/N-Quelle)		+	-	+	+	±	-	±
L-Asparagin		+	-	+	-	-	-	±
L-Glutamat		+	-	+	-	-	-	±
Glycin		+	-	+	-	-	-	±
L-Prolin		+	-	+	-	-	-	±
L-Serin		+	-	±	-	-	-	±
L-Leucin		+	+	+	+	-	-	±
Acetamid		+	±	±	+	-	-	±
Gelatine-Hydrolyse		+	+	+	-	-	-	-
Grambestimmung		+	+	+	+	+	+	+
Koloniefarbe [2]		K	K	K	K	K	K	K
Zellmorphologie [3]		SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
Wachstums-optima (R2A)	% NaCl	0	0	0	0,5	0	0	0
	T °C	30	30	30	35	35	35	35
	pH	7,0	7,0	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
	t_d (h)	5	7	4	4	5	4	4
Katalase		+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Oxidase		-	-	-	-	-	-	-

Anm.

1) +: Wachstum größer 50 % als die Negativkontrolle (ca. ΔOD > 0,05 mit ∅ 20mm Teströhrchen)

±: Kein Wachstum, sondern einen positiven Farbumschlag nach 24 Stunden mit Tetrazolium-violett

-: Kein Wachstum und kein Farbumschlag

2) Koloniefarbe: K: cremefarben

3) Zellmorphologie: SP: Stäbchen-dominierend pleomorph

Die Abbaufähigkeit für Dibenzofuran war für die Taxonomie von den DPO-Stämmen nicht determinativ, d.h., damit ließen sich alle der Gattung *Terrabacter* nicht erscheinen. Dazu gehörten zwei DPM-Stämme DPM201 und DPM202 zu dieser taxonomischen Gruppe an, ohne jeglichen Abbau von Dibenzofuran. Ein Bericht lag vor, daß der *Sphingomonas* Stamm auch Dibenzofuran abbauen kann (Wittich et al., 1992). Ein individueller Merkmal, wie z.B. der Abbau von Dibenzofuran, scheint nicht notwendig (*determinativ*) für die Taxonomie zu sein, d.h., alle zur *Terrabacter* Gruppe angehörenden Stämme verwerten Dibenzofuran nicht, das zwar durch andere taxonomische Stammgruppen abgebaut werden kann.

Auf ähnliche Weise hielt sich die Pyren-Abbaufähigkeit nicht für determinativ zur Identifizierung von Mykobakterien oder engen Taxa. Die Pyren-abbauenden Stämme ergaben trotzdem eine hohe Ähnlichkeit mit Mykobakterien (siehe Abschnitt 3.2.3.1). Daher war die Pyren-Abbaufähigkeit keine notwendige Bedingung für die Taxonomie von Mykobakterien, sondern eine hinreichende Bedingung. Es gibt jedoch determinative Merkmale, die nach dem Wissen von bisherigen taxonomischen Arbeiten vor anderen Merkmalen in der allgemein anerkannten Taxonomie Priorität haben. Auf diesem Grund wurden die Stämme DOX2 und DOX5, hinsichtlich ihrer Agar-Abbaufähigkeit und gleitenden Beweglichkeit, in der *Cytophaga-Flexibacter* Stammgruppe eingeschlossen. Ähnlich war die Säurefestigkeit ein erhebliches Merkmal von Mykolsäure-haltigen Bakterien, insbesondere von Mykobakterien.

3.2.3.3. Alkylether-abbauende Stämme u.a.

Wie in der Abbildung 3-13 zu sehen ist, haben 43 Aralkylether- und Alkylether-abbauende Stämme, ausschlißlich der Stämme THF400 und MOB600, eine hohe Ähnlichkeit ergeben. Alle Stämme wurden aus einer räumlich gleichen Belebungsanlage des Klärwerks Stuttgart-Büsnau isoliert. Die 43 Stämme zeigten eine ähnliche Zellmorphologie miteinander. Sie bildeten während des Stäbchen/Kokken-Kreislaufes (pleomorph) unregelmäßige Kolonien auf Agarmedien. Die Zelldicke betrug 0,6 bis 1 µm.

Für die Cluster-Analyse von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämmen wurden drei *Mycobacterium*-Stämme US1, PYR101 und PYR213, zwei *Terrabacter* Stämme DPO360 und DPM202, und sechs Hexan-abbauende Gram-positive pleomorphe Stämme HXN500, HXN600, HXN1000, HXN1200, HXN1500, HXN1900, und fünf Styrol-abbauende Gram-positive pleomorphe Stämme VLB140, VLB160, MLB110, MLB120 und ELB120, und der Pilzstammes DMOB100 als Referenzstämme in dieser taxonomischen Arbeit eingeschlossen. Jeder Korrelationskoeffizient wurde mit der höchsten Rangfolge in die trigonale Matrix analysiert (Tab. 3-15). Die daraus resultierten Cluster wurden auf dem Dendrogramm bei einem taxonomischen Grenzwert [*r*] von 0,6 dargestellt (Abb. 3-18). Dabei ließ sich der Pilzstamm DMOB100 von den bakteriellen Domänen weit entfernen .

Der cyclische Alkylether-abbauende Stamm THF400 und der Aralkylether-abbauende Stamm MOB600 wurden von der CNM- bzw. *Rhodococcus* Stammgruppe, wozu die meisten Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme zugeordnet wurden, deutlich unterschiedlich gemacht. Die beiden Stämme waren myzelige Actinomyceten. Der Stamm THF400 bildete keine Pigmente auf TSA-Medien, und deformierte Agaroberfläche. Er bildete gewöhnlich Zellaggregate in flüssigen Kulturen. Der Stamm MOB600 wuchs in der glattrandigen, halbkugeligen und cremefarbenen Kolonieform auf Agarplatten, ohne myzelige Struktur unter der Agaroberfläche zu bilden. Er bildete keine Zellaggregate in flüssigen Kulturen, obwohl die Zellmorphologie unter Mikroskopierung würzelförmig war.

Außer den Stämmen THF400, MOB600 und DEE515, ließen sich die meisten Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme *Rhodococcus* erscheinen, wozu die *Rhodococcus* Stämme St116, St117, ID90-364, ID90-365A und ID90-365B zugeordnet wurden. Alle *Rhodococcus* Stämme zeigten gelbe, orangenfarbene, oder rote Koloniefarbe auf TSA-Medien. Der Stamm DEE515, der sowohl Anisol als auch aliphatische Alkylether (z.B. Diethylether und Di-n-propylether) als einzige C/E-Quelle verwertete, ließ sich beim taxonomischen Grenzwert von *Rhodococcus* nahe liegen.

Die farblosen bzw. weißen Hexan-abbauenden Stämme wurden beim taxonomischen Grenzwert von 0,6 in die zwei unterschiedlichen Gruppen aufgeteilt, nämlich die Hexan-abbauenden CNM-Gruppen A und B. Vier Stämme, die zur Hexan-abbauenden Gruppe A angehörten, waren ähnlich mit *Mycobacterium* innerhalb der *Mycobacterium-Rhodococcus* Stammgruppe. Die anderen zwei Stämme von der Gruppe B waren von der *Mycobacterium-Rhodococcus* Stammgruppe weit entfernt.

API-Coryne-Tests wurden handelsüblicherweise verwendet, um *Rhodococcus* Stämme unter Abgleich mit dem Typstamm *Rhodococcus equi* schnell zu bestimmen. Die untersuchten Alkylether-abbauenden Stämme ergaben eine hohe Ähnlichkeit mit *Rhodococcus equi* (22 Stämme, n = 36, $[\%SIM]_{\min}^{\max}$ = 92,0 ~ 99,0). Hingegen entsprach die jeweilige Taxonomie von den Stämmen THF400 und MOB600 mit *Brevibacterium* sp. (n = 2, $[\%SIM]_{Mean}$ = 92,9) und *Corynebacterium* sp. (n = 2, $[\%SIM]_{Mean}$ = 98,9).

Weder die Cluster-Analyse noch die API-Coryne-Schnelltests brachten die Taxonomie von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen in Zusammenhang mit ihren unterschiedlichen Abbaupotentialen ins Detail. Vier cyclische Alkylether-abbauende Stämme THF100, THF102, THF200 und THF202 ergaben eine hohe Ähnlichkeit bei einer hohen Korrelationenkoeffizienten [r] über 0,9 miteinander.

Tab. 3-15. Die Cluster-Analyse von 61 pleomorphen nicht-Sporen-bildenden Gram-positiven Stämmen. Dazu wurden drei *Mycobacterium* Stämme US1, PYR101 und PYR213, und zwei *Terrabacter* Stämme DPO360 und DPM202, und sechs *Rhodococcus* Stämme St116, St117, St127, ID90-364, ID90-365A und ID90-365B eingeschlossen: Als Vergleichsstamm wurde der Pilzstamm DMOB100 verwendet.

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
1.THF200																																																															
2.THF202	0,98																																																														
3.THF102	0,97	0,95																																																													
4.THF100	0,96	0,94	0,97																																																												
5.MOB100	0,87	0,87	0,85	0,84																																																												
6.DEE5313	0,84	0,85	0,81	0,8	0,88																																																											
7.DEE5312	0,77	0,79	0,77	0,74	0,83	0,89																																																										
8.DEE5314	0,79	0,81	0,79	0,76	0,81	0,84	0,89																																																								
9.DEE5311	0,82	0,83	0,79	0,78	0,86	0,84	0,84	0,82																																																							
10.EVE331	0,78	0,78	0,74	0,73	0,82	0,79	0,82	0,8	0,86																																																						
11.DBE720	0,75	0,76	0,74	0,73	0,85	0,84	0,82	0,77	0,81	0,85																																																					
12.DEE5303	0,75	0,75	0,74	0,73	0,76	0,83	0,79	0,74	0,8	0,81	0,84																																																					
13.DEE5302	0,75	0,74	0,74	0,73	0,76	0,81	0,8	0,75	0,8	0,85	0,82	0,95																																																				
14.DEE5304	0,81	0,81	0,8	0,79	0,81	0,85	0,81	0,75	0,78	0,78	0,83	0,87	0,97																																																				
15.PEG602	0,8	0,8	0,8	0,79	0,81	0,81	0,78	0,73	0,78	0,78	0,77	0,83	0,81	0,91																																																				
16.PEG601	0,77	0,78	0,76	0,75	0,79	0,79	0,78	0,73	0,76	0,76	0,8	0,82	0,82	0,89	0,94																																																			
17.PEG604	0,74	0,74	0,73	0,72	0,75	0,78	0,75	0,7	0,77	0,8	0,8	0,92	0,92	0,83	0,83	0,83																																																			
18.DEE532	0,75	0,73	0,76	0,75	0,78	0,81	0,81	0,72	0,81	0,8	0,79	0,87	0,87	0,79	0,75	0,72	0,86																																																			
19.PEG603	0,69	0,69	0,69	0,68	0,7	0,75	0,73	0,71	0,74	0,76	0,78	0,93	0,92	0,83	0,78	0,8	0,63	0,84																																																		
20.DEE5301	0,71	0,7	0,7	0,7	0,71	0,74	0,77	0,71	0,75	0,78	0,8	0,92	0,92	0,84	0,76	0,78	0,84	0,83	0,86																																																	
21.DEE5331	0,68	0,68	0,68	0,67	0,75	0,76	0,77	0,71	0,77	0,8	0,83	0,89	0,87	0,79	0,74	0,75	0,84	0,81	0,83	0,84																																																	
22.EVE332	0,73	0,71	0,71	0,71	0,85	0,75	0,78	0,7	0,8	0,81	0,77	0,74	0,78	0,78	0,8	0,78	0,73	0,74	0,69	0,72	0,79																																																	
23.EVE305	0,77	0,74	0,75	0,76	0,77	0,75	0,77	0,75	0,8	0,83	0,74	0,77	0,81	0,81	0,8	0,76	0,73	0,76	0,72	0,76	0,76	0,84																																																
24.MLB110	0,81	0,79	0,8	0,8	0,8	0,8	0,78	0,72	0,81	0,77	0,8	0,77	0,78	0,83	0,86	0,82	0,79	0,77	0,71	0,75	0,7	0,77	0,81																																																
25.EVE341	0,72	0,72	0,73	0,71	0,76	0,72	0,76	0,73	0,76	0,78	0,7	0,74	0,78	0,78	0,8	0,77	0,76	0,72	0,69	0,73	0,67	0,78	0,78	0,81																																																
26.EVE3042	0,74	0,71	0,72	0,73	0,77	0,72	0,74	0,69	0,73	0,75	0,68	0,76	0,77	0,81	0,87	0,81	0,76	0,72	0,7	0,73	0,67	0,79	0,78	0,78	0,89																																																
27.DEE5316	0,74	0,72	0,74	0,75	0,79	0,77	0,79	0,78	0,74	0,77	0,77	0,77	0,78	0,83	0,75	0,74	0,72	0,8	0,73	0,8	0,75	0,79	0,76	0,73	0,78	0,8																																																
28.DEE5151	0,78	0,8	0,76	0,75	0,83	0,84	0,79	0,77	0,81	0,81	0,76	0,82	0,82	0,8	0,8	0,78	0,83	0,83	0,76	0,78	0,75	0,74	0,69	0,75	0,77	0,77	0,81																																																
29.St127	0,77	0,79	0,76	0,75	0,83	0,8	0,81	0,79	0,85	0,81	0,74	0,74	0,77	0,76	0,79	0,78	0,77	0,74	0,69	0,71	0,73	0,81	0,72	0,75	0,8	0,79	0,8	0,86																																																
30.MOP100	0,8	0,81	0,79	0,76	0,82	0,75	0,75	0,76	0,8	0,72	0,67	0,68	0,68	0,7	0,73	0,72	0,7	0,67	0,63	0,64	0,66	0,72	0,65	0,73	0,72	0,71	0,71	0,8	0,86																																																
31.St117	0,78	0,78	0,75	0,73	0,86	0,79	0,77	0,78	0,82	0,75	0,76	0,67	0,68	0,7	0,75	0,73	0,7	0,7	0,63	0,63	0,63	0,73	0,7	0,77	0,76	0,72	0,7	0,79	0,85	0,88																																															
32.ID90-365A	0,76	0,79	0,73	0,72	0,85	0,74	0,74	0,73	0,72	0,79	0,74	0,68	0,71	0,73	0,77	0,75	0,7	0,66	0,62	0,65	0,66	0,76	0,72	0,72	0,76	0,75	0,74	0,76	0,84	0,83	0,87																																															
33.ID90-364	0,81	0,83	0,78	0,76	0,86	0,79	0,73	0,75	0,8	0,77	0,74	0,69	0,68	0,74	0,76	0,72	0,67	0,66	0,63	0,63	0,72	0,75	0,71	0,69	0,68	0,67	0,68	0,73	0,82	0,83	0,83	0,89																																															
34.St116	0,72	0,73	0,71	0,68	0,76	0,72	0,69	0,71	0,77	0,78	0,68	0,72	0,75	0,65	0,64	0,62	0,69	0,72	0,66	0,67	0,74	0,73	0,69	0,61	0,64	0,63	0,66	0,76	0,79	0,79	0,76	0,8	0,83																																															
35.MOP102	0,79	0,79	0,77	0,75	0,77	0,67	0,83	0,65	0,72	0,7	0,61	0,6	0,63	0,62	0,65	0,63	0,6	0,59	0,55	0,56	0,62	0,69	0,67	0,64	0,65	0,64	0,61	0,68	0,76	0,87	0,77	0,8	0,79	0,77																																															
36.VLB160	0,73	0,75	0,72	0,71	0,77	0,68	0,7	0,68	0,74	0,79	0,71	0,69	0,71	0,67	0,69	0,68	0,71	0,71	0,64	0,66	0,7	0,74	0,66	0,73	0,76	0,73	0,68	0,77	0,79	0,8	0,74	0,79	0,76	0,75	0,77																																															
37.VLB140	0,8	0,79	0,79	0,8	0,83	0,76	0,69	0,75	0,73	0,72	0,73	0,65	0,65	0,71	0,74	0,71	0,67	0,66	0,59	0,63	0,61	0,69	0,73	0,84	0,71	0,71	0,7	0,74	0,73	0,75	0,77	0,76	0,74	0,63	0,69	0,79																																															
38.ID90-365B	0,68	0,7	0,67	0,67	0,75	0,62	0,58	0,63	0,64	0,66	0,63	0,55	0,58	0,61	0,66	0,61	0,57	0,52	0,52	0,52	0,52	0,62	0,62	0,68	0,67	0,65	0,61	0,64	0,73	0,72	0,78	0,82	0,77	0,67	0,7	0,65	0,74																																															
39.EVE3041	0,63	0,63	0,65	0,63	0,7	0,72	0,7	0,66	0,73	0,71	0,7	0,75	0,76	0,72	0,69	0,67	0,72	0,76	0,68	0,7	0,69	0,73	0,75	0,75	0,84	0,8	0,73	0,71	0,72	0,62	0,69	0,68	0,59	0,61	0,6	0,69	0,66	0,61																																															
40.EVE201	0,69	0,69	0,71	0,69	0,72	0,75	0,77	0,72	0,78	0,72	0,7	0,72	0,75	0,74	0,69	0,66	0,68	0,75	0,66	0,72	0,68	0,74	0,71	0,72	0,73	0,72	0,72	0,66	0,75	0,68	0,69	0,67	0,71	0,67	0,62	0,67	0,63	0,59	0,75																																															
41.EVE202	0,62	0,62	0,65	0,62	0,66	0,69	0,63	0,62	0,66	0,75	0,68	0,73	0,73	0,64	0,67	0,67	0,71	0,75	0,67	0,68	0,73	0,68	0,67	0,61	0,62	0,6	0,66	0,7	0,68	0,59	0,6	0,64	0,64	0,67	0,59	0,69	0,64	0,52	0,68	0,72																																														
42.EVE314	0,69	0,71	0,67	0,65	0,78	0,71	0,66	0,67	0,74	0,77	0,66	0,69	0,7	0,63	0,62	0,64	0,69	0,71	0,66	0,63	0,74	0,65	0,6	0,58	0,71	0,65	0,62	0,76	0,73	0,72	0,69	0,71	0,78	0,75	0,67	0,78	0,66	0,58	0,65	0,73	0,74																																														
43.DEOB100	0,59	0,6	0,56	0,54	0,67	0,63	0,63	0,65	0,72	0,69	0,59	0,62	0,64	0,51	0,55	0,54	0,63	0,65	0,58	0,56	0,65	0,63	0,63	0,59	0,63	0,59	0,59	0,68	0,71	0,63	0,71	0,67	0,64	0,72	0,59	0,65	0,59	0,57	0,66	0,62	0,67	0,75																																														
44.DEOB200	0,58	0,56	0,56	0,6	0,57	0,55	0,53	0,55	0,64	0,62	0,53	0,57	0,59	0,51	0,54	0,47	0,55	0,62	0,55	0,53	0,63	0,6	0,64	0,51	0,52	0,56	0,52	0,54	0,56	0,52	0,59	0,56	0,63	0,67	0,52	0,54	0,49	0,5	0,56	0,64	0,7	0,64	0,79																																														
45.ELB120	0,6	0,62	0,59	0,59	0,62	0,65	0,63	0,59	0,72	0,72	0,65	0,72	0,75	0,67	0,7	0,67	0,74	0,71	0,71	0,67	0,73	0,69	0,69	0,76	0,67	0,66	0,6	0,67	0,66	0,6	0,61	0,6	0,58	0,66	0,54	0,7	0,62	0,54	0,68	0,66	0,7	0,65	0,78	0,75																																														
46.EVE342	0,61	0,62	0,6	0,6	0,66	0,66	0,68	0,62	0,66	0,72	0,64	0,77	0,78	0,72	0,72	0,7	0,75	0,75	0,76	0,72	0,77	0,69	0,73	0,66	0,74	0,74	0,71	0,73	0,69	0,64	0,66	0,7	0,64	0,63	0,61	0,67	0,59	0,55	0,73	0,71	0,67	0,66	0,74	0,68	0,77																																														
47.MLB120	0,59	0,6	0,6	0,6	0,6	0,61	0,57	0,56	0,57	0,56	0,52	0,61	0,62	0,58	0,6	0,58	0,6	0,6	0,55	0,57	0,59	0,57	0,66	0,69	0,59	0,58	0,56	0,63	0,63	0,55	0,58	0,6	0,57	0,55	0,55	0,63	0,68	0,54	0,62	0,58	0,64	0,54	0,65	0,57	0,65	0,66																																														
48.DEE515	0,82	0,83	0,79	0,78	0,78	0,82	0,73	0,71	0,84	0,78	0,79	0,77	0,77	0,75	0,7	0,7	0,75	0,81	0,72	0,72	0,72	0,66	0,73	0,76	0,65	0,62	0,68	0,82	0,7	0,69	0,73	0,65	0,69	0,72	0,69	0,66	0,68	0,6	0,65	0,63	0,62	0,66	0,64	0,59	0,68	0,61	0,58																																													
49.US1	0,59	0,59	0,6	0,64	0,59	0,54	0,56	0,54	0,58	0,52	0,49	0,49	0,55	0,58	0,54	0,51	0,49	0,6	0,48	0,53	0,51	0,6	0,52	0,62	0,54	0,57	0,65	0,56	0,62	0,6	0,57	0,59	0,61	0,61	0,51	0,6	0,6	0,55	0,55	0,63	0,49	0,49	0,51	0,56	0,58	0,5	0,52	0,55																																												
50.PYR101	0,55	0,58	0,57	0,55	0,61	0,53	0,53	0,58	0,54	0,51	0,52	0,46	0,46	0,53	0,49	0,49	0,44	0,49	0,44	0,46	0,51	0,5	0,45	0,48	0,45	0,41	0,56	0,57	0,59	0,62	0,58	0,66	0,72	0,65	0,57	0,56	0,53	0,55	0,39	0,52	0,43	0,54	0,43	0,41	0,38	0,39	0,39	0,5	0,64																																											
51.PYR213	0,41	0,43	0,43	0,42	0,36	0,42	0,37	0,46	0,46	0,48	0,36	0,43	0,45	0,42	0,37	0,32	0,36	0,44	0,41	0,41	0,41	0,34	0,38	0,41	0,38	0,39	0,44	0,47	0,42	0,45	0,42	0,43	0,47	0,55	0,43	0,53	0,4	0,4	0,43	0,53	0,51	0,5	0,5	0,59	0,53	0,46	0,42	0,48	0,62	0,64																																										
52.HXN1500	0,44	0,46	0,43	0,47	0,43	0,49	0,49	0,43	0,48	0,56	0,48	0,52	0,54	0,49	0,44	0,47	0,49	0,53	0,45	0,53	0,56	0,48	0,46	0,52	0,46	0,44	0,52	0,6	0,5	0,47	0,41	0,51	0,51	0,57	0,44	0,56	0,49	0,4	0,47	0,53	0,61	0,57	0,52	0,51	0,56	0,56	0,49	0,5	0,64	0,54	0,6																																									
53.HXN1900	0,37	0,4	0,35	0,38	0,38	0,4	0,37	0,31	0,41	0,4	0,38	0,41	0,41	0,43	0,43	0,47	0,39	0,43	0,39	0,38	0,51	0,39	0,36	0,43	0,33	0,36	0,41	0,47	0,41	0,39	0,32	0,42	0,44	0,4	0,44	0,45	0,39	0,31	0,36	0,3	0,44	0,44	0,37	0,31	0,45	0,49	0,4	0,41	0,5	0,47	0,37	0,67																																									
54.HXN500	0,47	0,51	0,46	0,48	0,47	0,49	0,45	0,46	0,48	0,45	0,39	0,49	0,49	0,49	0,45	0,49	0,44	0,52	0,48	0,47	0,52	0,4	0,43	0,43	0,38	0,39	0,49	0,55	0,45	0,45	0,41	0,44	0,5	0,48	0,46	0,44	0,44	0,36	0,41	0,4	0,51	0,53	0,44	0,42	0,44	0,52	0,46	0,49	0,59	0,52	0,46	0,59	0,82																																								
55.HXN600	0,49	0,52	0,47	0,5	0,53	0,54	0,52	0,46	0,51	0,52	0,53	0,51	0,51	0,56	0,58	0,62	0,52	0,5	0,49	0,44	0,56	0,51	0,44	0,52	0,5	0,51	0,49	0,58	0,6	0,53	0,5	0,61	0,62	0,51	0,48	0,57	0,51	0,48	0,46	0,45	0,49	0,55	0,45	0,38	0,51	0,48	0,42	0,48	0,59	0,6	0,38	0,67	0,8	0,69																																								
56.HXN1000	0,54	0,54	0,55	0,58	0,49	0,48	0,46	0,51	0,57	0,56	0,47	0,55	0,56	0,48	0,48	0,49	0,52	0,57	0,54	0,55	0,6	0,48	0,52	0,56	0,5	0,49	0,45	0,51	0,49	0,51	0,45	0,41	0,51	0,5	0,47	0,59	0,57	0,43	0,51	0,57	0,62	0,67	0,59	0,65	0,67	0,59	0,57	0,5	0,58	0,4	0,57	0,63	0,53	0,59	0,52																																							
57.HXN1200	0,43	0,45	0,42	0,46	0,43	0,46	0,41	0,39	0,48	0,5	0,44	0,5	0,5	0,44	0,38	0,37	0,41	0,5	0,45	0,49	0,54	0,45	0,39	0,38	0,33	0,39	0,45	0,49	0,42	0,4	0,33	0,38	0,46	0,49	0,43	0,51	0,41	0,33	0,42	0,48	0,56	0,53	0,48	0,56	0,55	0,52	0,42	0,5	0,57	0,4	0,58	0,67	0,56	0,54	0,51	0,64																																						
58.THF400	0,48	0,46	0,48	0,52	0,47	0,41	0,47	0,45	0,43	0,46	0,4	0,44	0,47	0,45	0,46	0,45	0,42	0,47	0,42	0,47	0,49	0,5	0,49	0,47	0,47	0,5	0,54	0,52	0,49	0,47	0,38	0,42	0,39	0,39	0,51	0,47	0,54	0,4	0,44	0,39	0,47	0,37	0,34	0,34	0,36	0,52	0,5	0,43	0,5	0,29	0,23	0,5	0,53	0,54	0,46	0,5	0,44																																						
59.DPM202	0,47	0,48	0,47	0,46	0,55	0,44	0,43	0,48	0,39	0,44	0,47	0,43	0,45	0,45	0,5	0,53	0,45	0,39	0,46	0,46	0,45	0,5	0,4	0,45	0,47	0,46	0,54	0,53	0,54	0,51	0,5	0,59	0,51	0,45	0,48	0,52	0,56	0,53	0,39	0,37	0,49	0,46	0,41	0,27	0,36	0,43	0,43	0,36	0,41	0,44	0,23	0,37	0,35	0,4	0,42	0,31	0,33	0,45																																						
60.DPO360	0,4	0,4	0,4	0,4	0,42	0,39	0,45	0,54	0,36	0,44	0,41	0,33	0,39	0,41	0,38	0,39	0,31	0,37	0,37	0,39	0,38	0,38	0,44	0,37	0,39	0,39	0,5	0,41	0,43	0,37	0,41	0,47	0,44	0,43	0,38	0,4	0,49	0,4	0,31	0,33	0,39	0,35	0,36	0,32	0,32	0,38	0,38	0,36	0,45	0,42	0,31	0,35	0,29	0,37	0,39	0,3	0,34	0,4	0,68																																						
61.MOB600	0,47	0,45	0,49	0,44	0,5	0,46	0,42	0,43	0,46	0,42	0,42	0,38	0,39	0,44	0,43	0,35	0,4	0,48	0,33	0,37	0,39	0,44	0,44	0,44	0,44	0,38	0,48	0,43	0,44	0,43	0,5	0,44	0,46	0,43	0,39	0,34	0,43	0,44	0,4	0,41	0,37	0,36	0,35	0,31	0,31	0,33	0,31	0,44	0,41	0,31	0,23	0,2	0,21	0,32	0,25	0,21	0,14	0,31	0,36	0,32																																				
62.DMOB100	0,26	0,24	0,25	0,26	0,3	0,27	0,29	0,25	0,24	0,26	0,23	0,26	0,3	0,25	0,24	0,25	0,29	0,33	0,24	0,3	0,22	0,27	0,3	0,35	0,36	0,33	0,29	0,32	0,26	0,2	0,28	0,32	0,24	0,29	0,25	0,32	0,29	0,26	0,37	0,29	0,19	0,25	0,25	0,22	0,29	0,27	0,4	0,33	0,27	0,3	0,25	0,28	0,15	0,18	0,24	0,16	0,13	0,3	0,16	0,14	0,19	

Korr [*r*]

- > 0.9
- 0.8 ~ 0.9
- 0.7 ~ 0.8
- 0.6 ~ 0.7

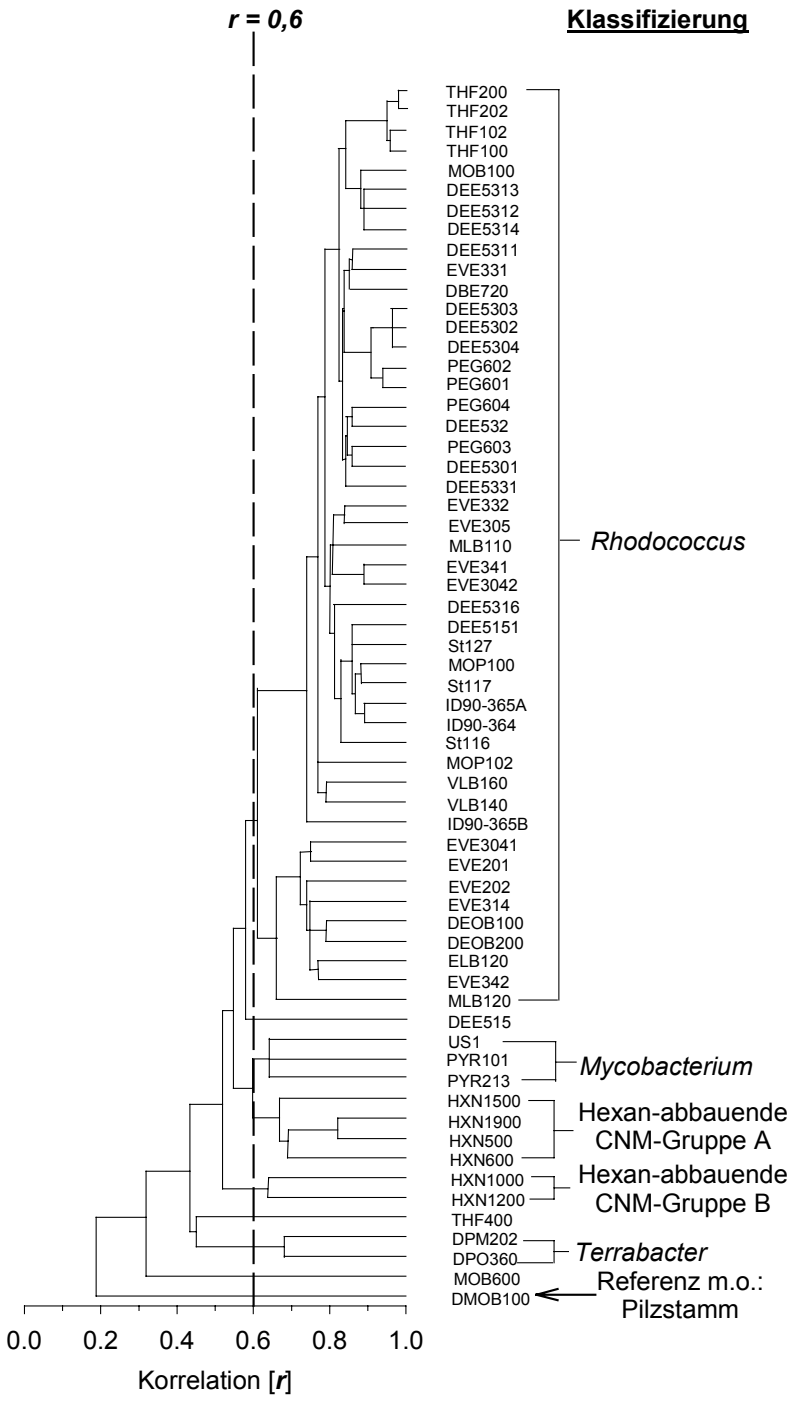


Abb. 3-18. Taxonomische Darstellung von den Stammgruppen, die aus der Cluster-Analyse von 61 pleomorphen nicht-Sporen-bildenden Gram-positiven Bakterien in der Tabelle 3-15 resultierten: Die CNM-Guppe bestand aus Mykolsäure-haltigen *Corynebacterium, Nocardia, Mycobac-terium,* und *Rhodococcus* Stämmen. Als Referenzstamm wurde der Pilzstamm DMOB100 verwendet

Die cyclische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme scheinen durch Anreicherung mit cyclischem Alkylether aus einem Wild-Typstamm in einer Belebtschlammprobe abgeleitet zu werden.

Die Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme ließen sich anhand der Empfindlichkeitstests gegenüber antibiotischen Hemmstoffen, wie z.B. Antibiotika, Lysozym, und Kaliumtellurit, weiter unterteilen (Tab. 3-16). Alle untersuchte Aralkylether- und Alkylether-abbauende *Rhodococcus* Stämme waren gegenüber Kanamycin (30 µg) und Rifampicin (30 µg) empfindlich. Die meisten Stämme waren gegenüber Nalidixinsäure (30 µg) resistent. Die Empfindlichkeitsmuster gegenüber Chloramphenicol (30 µg) und Penicillin (10 µg) machten die Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme bezüglich ihrer Abbaupotentiale voneinander unterschiedlich. Anstelle des Penicillins zeigte Carbenicillin (100 µg) gegen die Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme eine ähnliche Empfindlichkeit an.

i) Außer dem taxonomisch unterschiedlichen Stamm MOB600 waren die Aralkylether-abbauenden Stämme *Rhodococcus* sp. St116, St117, MOP100, und MOP102 gegenüber Chloramphenicol (30 µg) empfindlich, aber gegen Penicillin (10 µg) resistent. Der Stamm MOB600 ergab hingegen die Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol.

ii) Alle cyclische Alkylether-abbauende Stämme waren gegenüber den beiden Antibiotika empfindlich.

iii) Aliphatische Alkylether-abbauende Stämme waren gegenüber Chloramphenicol resistent, aber gegenüber Penicillin empfindlich.

<u>Aralkylether-abbauende Stämme</u>

In der Tabelle 3-17 wurden die Charakteristika zur Differenzierung von den Aralkylether-abbauenden Stämmen, einschließlich der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen DEE5311 und DEE515, dargestellt. Alle Stämme verwerteten charakteristischerweise Anisol und Phenetol als einzige C/E-Quelle. Hierbei war Phenetol ein gemeinsames Substrat zur Charakterisierung von den beiden Aralkylether- und aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen.

Aus aufgenommener Substratspektren und wachstumsphysiologischer Merkmalen wurden die Aralkylether-abbauenden Stämme in die folgenden Subgruppen aufgeteilt:

Tab. 3-16. Die Empfindlichkeitstests[1)] gegenüber antibiotischen Hemmstoffen zur Differenzierung der Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme

Hemmstoff [2)] / Stamm [3)]	AMP 10µg	CAR 100µg	CMP 30µg	CHM 50µg	EMB 10µg	KAN 30µg	NAL 30µg	PEN 10µg	POL 30µg	RIF 30µg	SUL 100µg	STR 10µg	TET 10µg	C-F-C	C-N	Lysozym 10µg	$KTeO_4$ 37,5µg
St116	±	-	±	-	n.u.	+	-	-	±	+	n.u.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
St117	±	-	+	-	n.u.	+	-	-	±	+	n.u.	+	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
MOP100	-	-	+	-	n.u.	+	-	-	±	+	n.u.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
MOP102	±	±	+	-	n.u.	+	-	-	±	+	n.u.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
MOB600	+	+	+	-	n.u.	+	-	+	±	+	n.u.	±	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
THF100	+	+	+	-	n.u.	+	-	+	±	+	n.u.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
THF200	+	+	+	-	n.u.	+	-	+	±	+	n.u.	-	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
THF400	+	+	+	-	n.u.	+	-	+	±	+	n.u.	-	±	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
DEE 5301	+	+	-	-	+	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	+	-
DEE5302	+	+	-	-	+	+	-	+	±	+	+	-	+	+	+	±	-
DEE 5303	+	+	-	-	-	+	-	+	±	+	-	-	+	+	+	+	-
DEE 5304	+	+	-	-	±	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	+	-
DEE 532	±	+	-	-	-	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	±	-
DEE 5331	+	+	-	-	-	+	-	+	±	+	±	-	±	+	+	±	-
DEE 5311	+	+	-	-	-	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	±	-
DEE 5312	+	+	-	-	-	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	+	-
DEE 5313	+	+	-	-	±	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	-	-
DEE 5314	+	+	-	-	+	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	±	-
DEE 5316	+	+	-	-	-	+	-	+	±	+	±	-	+	+	+	±	-
DEE 515	+	+	-	-	±	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	±	-
DEE 5151	+	+	-	-	±	+	-	+	±	+	+	-	+	+	+	+	-
PEG 601	+	+	-	-	+	+	-	+	±	+	+	-	+	+	+	±	-
PEG 602	±	+	-	-	-	+	-	+	-	+	±	-	±	+	+	±	-
PEG 603	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
PEG 604	+	+	-	-	±	+	±	+	±	+	±	-	+	+	+	±	-
DBE 720	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	±	+	+	-	-
P. putida	-	±	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Anm.

1) Die Empfindlichkeit wurde anhand der Messung jeder Hemmzone als empfindlich (> ∅ 18mm, +), leicht beeinflußbar (< ∅ 18mm, ±) oder widrig (-) beurteilt. n.u. *n*icht *u*ntersucht

2) **C-F-C**, Oxoid *Pseudomonas* C-F-C (10 µg Cetrimide + 10 µg Fucidin + 50 µg Cephaloridine); **C-N**, Oxoid *Pseudomonas* C-N (200 µg Cetrimide + 15 µg Nalidixinsäure)

3) Als Referenzstamm wurde *Pseudomonas putida* verwendet.

Tab. 3-17. Die Charakteristika zur Differenzierung der Aralkylether-abbauenden Stämme

Stamm		DEOB100	DEOB200	St116	St117	St127	ID90-364	ID90-365A	ID90-365B	MOP100	MOP102	MOB100	MOB600	DEE5311	DEE515
Diethylether		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1-Alkohole (C_2 ~C_5)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Glycerin		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	+
Hexadecan		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Aceton		-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	+	-	+	+
Benzol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Phenol		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Methoxyphenol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+
3-Methoxyphenol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Anisol		-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Phenetol		-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Styrol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Toluol		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1,4-Diethoxybenzol		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dibenzylether		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Biphenyl		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Acetamid (C/N-Quelle)		+	±	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Pectin-Hydrolyse		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Grambestimmung		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koloniefarbe [1)]		O/R	O/R	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	O/R	C	O/R	O/R
Ziehl-Neelsen-Färbung		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zellmorphologie [2)]		S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	M	S/K	S/K
Wachstums optima (R2A)	% NaCl	0,5	0	0,5	1	1	0,5	0,5	0	0	0	2	1	1	2
	T °C	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	35
	pH	7,0	7,5	7,0	9,5	7,0	6,5	7,0	7,0	9,5	9,5	7,5	7,0	7,5	7,0
	t_d (h)	4,5	3,8	4,2	4,3	3,8	4,2	4,5	3,3	3,9	4	4,6	15	6	7,8
Katalase		+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+++
Oxidase		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anm.
1) Koloniefarbe : O/R: orangenfarben bzw. rot, (R): cremefarben bzw. hell rot, C: cremefarben
2) Zellmorphologie : S/K: Stäbchen/Kokken-Kreislauf (pleomorph), M: myzelartig

Subgruppe 1: Die 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden Stämme DEOB100 und DEOB200 verwerteten charakteristischerweise 1,4-Diethoxybenzol als einzige C/E-Quelle. Der Stamm DEOB100 verwertete auch Phenol im Vergleich zum Stamm DEOB200.

Subgruppe 2: Die Aralkylether-abbauenden Stämme St117, St127, MOP100, und MOP102 ergaben eine morphologische und physiologische Veränderung nach der Anzucht mit Anisol oder Phenetol. Die Stämme MOP100 und MOP102 wurden unter Berücksichtigung ihrer positiven Testergebnisse für Acetamid als einzige C/N-Quelle und die Pectin-Hydrolase deutlich von den Stämmen St 117 und St127 unterschiedlich gemacht.

Subgruppe 3: Der Stamm MOB100 zeigte eher eine morphologische Ähnlichkeit mit den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen wie z.B. DEE5311 und DEE515. Der Stamm MOB100 konnte weder aliphatische Alkylether noch Dibenzylether als einzige C/E-Quelle verwerten.

Subgruppe 4: Die zwei aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme DEE5311 und DEE515 scheinen eher in der aliphatische Alkylether-abbauedenen Stammgruppe zugeordnet zu werden. Dazu konnten sie ungewöhnlich Anisol als einzige C/E-Quelle verwerten. Diese Charaktere ließen die beiden Stämme in der Zwischenlage von den Aralkylether- und aliphatische Alkylether-abbauedenen Stammgruppen liegen (vgl. Tab. 3-19).

Der Stamm MOB600 war zwar taxonomisch und physiologisch außerhalb von *Rhodococcus* weit entfernt. Der Stamm MOB600 verwertete verschiedene Benzole/Phenole als einzige C/E-Quelle, wie z.B. Benzol, Styrol, Toluol, 2-Methoxyphenol (Guajakol), 3-Methoxyphenol, *o/m/p*-Kresole, und Biphenyl. Interessant war, daß dieser Stamm 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol verwertete, während die anderen *Rhodococcus* Stämme nur 2-Methoxyphenol von mono-hydroxylierten Anisolen verwerteten. Der Stamm MOB600 verwertete hingegen wenige Kohlenhydrate oder Aminosäuren als einzige C/E- oder C/N-Quelle. So verwertete er weder n-Alkohole (C_2 ~ C_5) noch Hexadecan, während die meisten *Rhodococcus* Stämme verschiedene Alkohole und Hexadecan als Wachstumssubstrate verwerteten.

<u>Cyclische Alkylether-abbauende Stämme</u>

In der Tabelle 3-18 geht es um die Charakteristika zur Differenzierung der cyclische Alkylether-abbauenden Stämme.

Tab. 3-18. Die Charakteristika zur Differenzierung der cyclische Alkylether-abbauenden Stämme

Stamm		THF100	THF102	THF200	THF202	THF400
Diethylether		+	+	+	+	+
Di-n-propylether		-	-	-	-	-
Di-n-pentylether		-	-	-	±	±
Tetrahydrofuran		+	+	+	+	+
Tetrahydropyran		±	+	+	±	+
Glycerin		-	-	-	-	+
Hexadecan		+	+	+	+	-
Phenol		-	+	+	+	-
2-Methoxyphenol		+	+	+	+	-
Phenetol		-	-	-	-	-
Dibenzylether		-	-	-	-	-
Grambestimmung		+	+	+	+	+
Kolonienfarbe [1)]		O/R	O/R	O/R	O/R	W
Ziehl-Neelsen-Färbung		-	-	-	-	-
Zellmorphologie [2)]		S/K	S/K	S/K	S/K	M
Wachstums optima (R2A)	**% NaCl**	0,5	0	0	0	0
	T °C	30	30	30	30	30
	pH	8,5	7,5	7,5	8,5	8,5
	t_d (h)	11	9,5	8,7	15	31
Katalase		+++	++	++	+++	+++
Oxidase		-	-	-	-	-

Anm.
1) Koloniefarbe : O/R: orangenfarben bzw. rot, W: weiß
2) Zellmorphologie : S/K: Stäbchen/Kokken-Kreislauf (pleomorph), M: myzelartig

Der Stamm THF400 wurde taxonomisch von den anderen unterschiedlich gemacht. Er wuchs nicht mit Glycerin, Hexadecan, oder 2-Methoxyphenol im Gegensatz zu den anderen *Rhodococcus* Stämmen. Außerdem ergab er eine lange Verdopplungszeit (t_d = 31 h) in R2A-flüssigen Medien als die anderen *Rhodococcus* Stämme (t_d = 8,7 ~ 15 h).

Die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme konnten charakteristischerweise Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran und Diethylether als einzige C/E-Quelle verwerten, nicht aber Di-n-propylether, Phenetol oder Dibenzylether. Sowohl Diethylether als auch Di-n-propylether, Phenetol und Dibenzylether dienten im allgemeinen als Wachtumssubstrate für die aliphatische Alkylether-

abbauenden Stämme, die keine Abbaufähigkeit für cyclische Alkylether dabei hatten (vgl. Tab. 3-19). So war Diethylether ein allgemeines Substrat für die beiden cyclische und aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme. Im Vergleich zur Wachstumsfähigkeit wurden die beiden Diethylether-Verwertern mit der jeweiligen spezifischen Wachstumsrate, μ, bei einer Konzentration von 5 mM an Diethylether aus den Tabellen 3-4 und 3-5 unterschiedlich gemacht. Die cyclische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme (n = 4) wuschen mit Diethylether langsamer (μ = 0,045 ~ 0,092, μ_{av} = 0,062) als die aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme (n = 12, μ = 0,074 ~ 0,116, μ_{av} = 0,093).

Der Cluter von den cyclische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen ergab eine hohe Ähnlichkeit bei einem taxonomischen Grenzwert über 0,9 miteinander. Daher wurde vermutet, daß sich diese Stämme ursprünglich aus derselben Spezies abgeleitet haben. Wie im Abschnitt 3.1.4.2 erwähnt, wurden die cyclische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme in Bezug auf die Substrat Hemmkonstante, K_{SI}, gegenüber cyclische Alkylether, wie z.B. Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran, in die folgenden zwei Subgruppen aufgeteilt.

Subgruppe 1: Die Stämme THF100 und THF200 besaßen eine höhere Toleranz gegen cyclische Alkylether ($[K_{SI}]_{THF}$ = 2,94 ~ 8,30 mM, $[K_{SI}]_{THP}$ = 5,41 ~ 31 mM).

Subgruppe 2: Im Vergleich dazu waren die Stämme THF102 und THF202 demgegenüber anfällig ($[K_{SI}]_{THF}$ = 0,097 ~ 0,1 mM, $[K_{SI}]_{THP}$ = 0,1 ~ 0,142 mM).

Die Stämme THF100 und THF200 spielten wegen ihrer hohen Widerstandsfähigkeit am Abbau von cyclischen Alkylethern eine Hauptrolle. Wenn sich die Stämme nach der Adaptation auf cyclische Alkylether morphologisch und physiologisch veränderten, würden die hoch widerstandsfähigen Stämme THF100 und THF200 jeweils von den demgegenüber anfälligen Stämmen THF102 und THF202 hergeleitet.

Aliphatische Alkylether-abbauende Stämme

Wie in der Abbildung 3-16 zu sehen ist, lieβen sich alle aliphatische Alkylether-abbauende Stämme zu *Rhodococcus* angehören. Sie zeigten eine morphologische und physiologische Ähnlichkeit miteinander, wie z.B. einen Stäbchen/Kokken-Kreislauf, eine gelbe/orangenfarbene/rote Koloniefarbe, positive Reaktionen für die Katalase, und negative Reaktionen für die Oxidase. Manche Stämme ergaben spontane Koloniefarbeänderungen. Die Farbe änderte sich einmal unwiderruflich

von orangenfarben (Wildtyp) nach rot unter Begleitung des völligen Verlustes ihrer Etherabbauaktivitäten, und zu anderem von orangenfarben nach gelb ohne Verlust der Abbaufähigkeit (siehe Abschnitt 3.1.4.4).

In der Tabelle 3-19 geht es um die Charakteristika zur Differenzierung der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme. Sie besaßen ein breites Substratspektrum nicht nur an aliphatischen Alkylethern, wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether, Di-n-heptylether, n-Butyl-methylether, n-Butylethylether, Ethyl-*tert*-butylether, und einer Mischung von 2-/3-Isoamylether, sondern auch an Alkoholen, wie z.B. Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Pentanol, 2- und 3-Isoamylalkohol.

Sie verwerteten auch im allgemeinen Phenetol und Dibenzylether als einzige C/E-Quelle, aber weder Dimethylether, Isopropylether, Methyl-*tert*-butylether, noch Methanol. Aus aufgenommener Substratspektren wurde hypothetisch postuliert, daß

das Abbauenzymsystem der aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme ein nicht-substituiertes Methylen-Cα-Atom neben dem Sauerstoffatom, das aliphatische Alkylether, Phenetol und Dibenzylether im allgemeinen besitzt, initial angreift

mit der folgenden Ausnahme, daß

ein Methylen-Cα-Atom von cyclischen Alkylethern, wie z.B. Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, 1,4-Dioxan und Morpholin, damit nicht attackiert wird.

Während des Wachstums mit Anisol oder 2-Chlorethylethylether ließen sich die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme in die folgenden 4 Subgruppen unterteilen:

Subgruppe 1: Die meisten Stämme wuchsen weder mit Anisol noch 2-Chlorethylethylether

Subgruppe 2: Der Stamm DEE5311 wuchs mit Anisol, nicht aber mit 2-Chlorethylethylether

Subgruppe 3: Der Stamm DEE5151 wuchs mit 2-Chlorethylethylether, nicht aber mit Anisol

Subgruppe 4: Der Stamm DEE515 wuchs sowohl mit 2-Chlorethylethylether als auch Anisol

Tab. 3-19. Die Charakteristika zur Differenzierung der aliphatischen Alkylether-abbauenden Stämme

Stamm		DEE5301	DEE5302	DEE5303	DEE5304	DEE532	DEE5331	DEE5311	DEE5312	DEE5313	DEE5314	DEE5316	DEE515	DEE5151	PEG601	PEG602	PEG603	PEG604	DBE720
Aliphatische Alkylether [1]		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isopropylether		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
±)Butyl-2,3-glycidylether		-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2-Chlorethylethylether		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Aceton		+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Vinylacetat		+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Anisol		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phenetol		+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+
Eugenol		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Benzylaldehyd		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Dibenzylether		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanin als C/N-Quelle		+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
L-Asparagin als C/N-Quelle		+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
L-Glutamat als C/N-Quelle		+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
L-Phenylalanin als C/N-Quelle		±	±	±	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
L-Prolin als C/N-Quelle		-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
L-Valin als C/N-Quelle		-	+	+	±	±	+	+	+	+	+	-	±	-	+	+	+	+	+
Gramfärbung		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koloniefarbe [2] (TSA-Medium)		O	O/R	O	O/R	O/R	O/R	O	O	O/Y	O/Y	O	O	O/Y	O/R	O/R	O	O/R	O/R
Ziehl-Neelsen-Färbung		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zellmorphologie [3]		S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K	S/K
Wachstums-optima (R2A)	% NaCl	0	1	0	0	0	0	1	2	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1
	T °C	30	30	30	35	35	30	30	30	30	25	35	35	35	25	30	30	25	25
	PH	9,5	9,5	7,5	7,0	9,5	7,5	7,5	9,5	7,0	7,0	6,5	7,0	8,5	7,5	7,5	9,5	7,5	7,0
	t_d (h)	4,4	4	3,3	5,1	2,9	4,2	7,8	4,6	11	5,4	4,9	6	3,7	4,2	3,9	4	4,1	7,6

Anm.

1) Alle Stämme verwerten aliphatische Alkylether mit verschiedenen Kettenlängen, wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether, Di-n-heptylether, 2,3-Isoamylether, n-Butylmethylether, n-Butylethylether.

2) O/Y: Pigmentänderung von orangenfarben (Wildtyp) nach gelb; O/R: Pigmentänderung von orangenfarben nach rot

3) S/K: Stäbchen/Kokken-Kreislauf

Die Stämme DEE5151 und DEE515, die mit 2-Chlorethylethylether langsam wuchsen, verwerteten weder 2-Chlorethanol noch 2-Chloracetaldehyd als einzige C/E-Quelle, die als Folgeprodukte vom Abbau des 2-Chlorethylethylethers erwartet wurden. Wahrscheinlich bauten diese Stämme 2-Chlorethylethylether unvollständig ab. 2-Chlorethanol und 2-Chloracetaldehyd wurden unter Beteiligung einer Alkohol/Aldehyd-Oxidase weiter zu 2-Chloressigsäure oxidiert. Für den weiteren Abbau von 2-Chloressigsäure war eine spezifische Dehalogenase unbedingt nötig. Ohne 2-Chloressigsäure in der Zellkultur abgebaut würde, wirkte sie auf die Zelle toxisch ein. Die Stämme DEE5151 und DEE515 scheinen dagegen in gewissem Maße widerstandsfähig zu sein.

Die Stämme DEE5311 und DEE515 verwerteten Anisol als einzige C/E-Quelle. Diese Stämme wiesen zwei unterschiedliche Wachstumsmuster von den beiden Aralkylether- und aliphatische Alkylether-abbauenden Stammgruppen auf. Daraus wurden zwei hypothetische Abbauwege von Anisol vorgestellt. Würde der oxidative Abbau von Anisol durch eine *O*-Demethylierungsreaktion eingeleitet, entstand daraus Phenol als Folgemetabolit. Würde Anisol andererseits durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion am Kernring initial oxidiert, bildete sich 2-Methoxyphenol als Folgemetabolit (Käser, 1993). Alle in dieser Arbeit untersuchte *Rhodococcus* Stämme verwerteten Phenol und 2-Methoxyphenol als einzige C/E-Quelle. Die Tatsache, daß die anderen aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme kein Anisol verwerteten, bedeutete, daß weder *O*-Dealkylasesystem noch 2-Monooxygenasesystem damit bewerkstelligt war.

Anhand aufgenommener Subtratspektren und Wachstumsmuster war es jedoch schwer festzustellen, ob das hypothetische *O*-Dealkylasesystem, das ein nicht-substituiertes aliphatisches Methylen-Cα-Atom neben dem Sauerstoffatom anzugreifen vermöchte, auch ein terminales O-Methyl-C-Atom des Anisols attackieren könnte. Eine ähnliche Frage wurde mit dem anderen Beispiel gestellt, daß die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme im allgemeinen Ethyl-*tert*-butylether als einzige C/E-Quelle verwerteten, nicht aber Methyl-*tert*-butylether.

3.3. Ruhezellenversuche

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war bakterielle Abbaumechanismen von Aralkylethern, cyclischen und aliphatischen Alkylethern mit ausgewählten Modellsystemen zu untersuchen, um Erkenntnisse über die primäre Oxidaseaktivität zu haben. Für biokatalysierten organischen Abbau werden üblicherweise Ruhezellen (oder Hungerzellen) eingesetzt, die eine geeignete Oxygenaseaktivität exprimieren (Faber, 1995). Das erleichert besonders die Regenerierung von Koenzymen mit eigenen Enzymsystemen. Die Zellmembran und die Zellwand vermöchten dazu, die Absorptionsrate von schwer wasserlöslichen Chemikalien in die Zelle zu beschleunigen. Die Oxidationspotentiale der Ruhezellen sind oft größer, als bei gereinigten und regenerierten Enzymsystemen (Sugimori et al., 1995). Die Präparation der letzten ist manchmal in Laborbedingungen vorschriftwidrig. Allerdings treten auch Probleme beim Ruhezellenversuch auf, wie z.B. die Fehlinduktion bzw. der Aktivitätsverlust günstiger Enzyme, die Produktion bzw. der Abbau von Nebenprodukten. Zur Verminderung dieser Probleme wurden Teststämme mit geeignetem Substrat bis zur optischen Dichte (OD_{546}) von 2 ~ 3 kultiviert, und in der spät-logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert. Die Zellpaste wurde in 50 mM Phosphat Puffer (pH 7,2 ~ 7,4) suspendiert, und bei 30°C 2 ~ 4 Stunden geschüttelt, damit übriges Substrat beseitigt wurde. Nach der anderen Zentrifugierung erhielten sich die Hungerzellen bei –30°C einen Monat lang aktiv.

Die Oxidationsmuster wurden anhand einer sauerstoffempfindlichen Clark'schen Elektrode untersucht, damit die Sauerstoffzehrung galvanisch quantifiziert wurde. Wenn eine Testchemikalie eine signifikante Sauerstoffzehrung verursachte, wurde das als Indiz für eine enzymatische Oxygenierung gewertet. Wenn eine zusätzliche Chemikalie in Gegenwart von geeignetem Substrat die Oxidationsrate deutlich verlangsamte, wirkte die zusätzliche Chemikalie auf die primäre Oxidase hemmend. Es war schwer, alle Substratatmungen als produktive Enzymreaktionen anzusehen, weil unproduktive Fehloxidationen auch aus dem Ruhezellenversuch resultieren könnten (Bünz & Cook, 1993).

Die ′reversed-phase′-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP8-HPLC) wurde zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von aromatischen Substanzen üblicherweise verwendet. Ausgangsmateriale und die Folgemetabolite wurden anhand jeder Eichgerade konzentrationsmäβig bestimmt, wenn ihre Retentionszeiten und UV-Spektren mit authentischen Chemikalien vergleichbar waren. Um schwer wasserlösliche Chemikalien gänzlich zu lösen, und um in der Zelle absorbierte Chemikalien zu extrahieren, wurde jede Probe mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt, und die Flüssigkeit wurde dann nach der Abzentrifugierung analysiert.

Für die qualitative Dünnschichtechromatographie war eine handelsübliche RP18-F_{254S}-DC-Platte (5×7,5 cm, Fa. Merck) verwendbar. Proben wurden zweimal mit dem gleichen Volumen Diethylether extrahiert. Die Konzentrate wurden auf eine RP18- DC-Platte eingeengt, und dann mit 60 %igem Methanol entwickelt. Die getrennten Banden wurden unter einer UV-Lampe bei 254 nm sichtbar gemacht, um ihre Rf-Werte mit authentischen Chemikalien vergleichen zu lassen.

3.3.1. Die 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden Stämme

Die zwei 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden Stämme DEOB100 und DEOB200 bauten 1,4-Diethoxybenzol langsam ab. Die Stämme wurden mit mehrmaligen Zugaben von 0,05 %igem (v/v) Ethanol in Gegenwart von 1,4-Diethoxybenzol (2 ~ 3 mM) bis zu optischer Dichte (OD_{546}) von 2 ~ 3 kultiviert. Die Induktion einer 1,4-Diethoxybenzol-Oxidase ließ sich durch Bräunung der Zellkulturen erkennen.

Tab. 3-20. Retentionszeiten und UV-Spektren von Testchemikalien, die anhand einer RP8-HPLC mit 50%igem (v/v) Methanol-Fließmittel (0,085 % H_3PO_4, Fließrate: 1 ml min^{-1}) analysiert wurden

Chemikalien	RT [1)] [Min]	UV-Spektrum [2)] (200 ~ 360 nm) Maxima	Minima	Schulter
2-Hydroxyanisol	2,66	276	247	218
3-Hydroxyanisol	2,64	274	247	219
4-Hydroxyansiol	2,34	225, 288	212, 252	
2-Ethoxyphenol	3,74	276	248	218
4-Ethoxyphenol	3,20	225, 289	211, 252	
Hydrochinon	1,48	223, 291	215, 252	
1,2,4-Trihydroxybenzol	1,36	206, 223, 288	216, 255	
1,2-Dimethoxybenzol	4,12	226, 275	215, 248	
1,3-Dimethoxybenzol	6,57	275	247	220
1,4-Dimethoxybenzol	5,60	226, 288	211, 252	
1,4-Diethoxybenzol	13,70	227, 288	212, 252	

Anm.

1) 20 µl Probe wurde anhand eines Autosamplers in die RP8-HPLC-Trennsäule eingespritzt. Authentische Chemikalien wurden bei einer Konzentration von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM analysiert, damit die relative Retentionszeit mit dem mittleren Wert abgeschätzt wurde.
2) Die UV-Spektren wurden mittels eines mit Diodenarray ausgerüsteten Multikanal-Photodetektors zwischen 200 und 360 nm mit dem Wellenlängeintervall von 2 nm aufgenommen.

Zusätzlich wurden der Stamm DEOB100, der Phenol als einzige C/E-Quelle verwertete, nach der Anzucht mit Phenol, und der Gram-negative Stamm 4MOP1, der mit 4-Methoxyphenol wuchs, nach der Anzucht mit 4-Methoxyphenol untersucht.

Jedes Umsatzmuster wurde anhand einer analytischen RP8-HPLC mit ausgewählten Testchemikalien untersucht. In der Tabelle 3-20 wurden die Retentionszeiten und UV-Spektren zwischen 200 und 360 nm von den verwendeten Testchemikalien und ihren *O*-dealkylierten bzw. hydroxylierten Produkten aufgeführt. Indem jede authentische Chemikalie bei einer Konzentration von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM unter der gleichen Bedingung analysiert wurde, erhielt sich die Eichgerade. Je 1 mM Testchemikalie wurden mit Ruhezellen in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,2) eingesetzt. Die optische Dichte (OD_{546}) von den Stämmen DEOB100, DEOB200 und 4MOP1 war am Anfang des Versuches jeweils 2,0, 5,0 und 3,0.

Der Stamm 4MOP1 baute täglich 0,3 mMole l^{-1} 4-Methoxyphenol ab, ohne Folgemetabolite, wie z.B. 1,4-Hydrochinon und Chinone, zu bilden.

Der Stamm DEOB100 ergab je nach der Anzucht mit Phenol oder 1,4-Diethoxyphenol ein ähnliches Umsatzmuster. Er setzte 1,4-Diethoxybenzol und 1,4-Dimethoxybenzol jeweils zu 4-Ethoxyphenol (RT: 3,20 min), 4-Methoxyphenol (RT: 2,34 min) um.

Tab. 3-21. Relative Aktivitäten[1)] von den Stämmen DEOB100, DEOB200 und 4MOP1 zum Umsatz von alkoxylierten Phenolen und Benzolen

Stamm	4MOP1	DEOB100		DEOB200
Anzuchtsubstrat [2)]	4-MOP	Phenol	DEOB	DEOB
Testchemikalien [1 mM]				
1,2-Dimethoxybenzol	-	-	-	-
1,3-Dimethoxybenzol	-	-	0,032	0,035
1,4-Dimethoxybenzol	-	0,15	0,083	0,15
1,4-Diethoxybenzol	-	0,31	0,59	0,21
2-Methoxyphenol	-	1,09	1,73	0,79
3-Methoxyphenol	-	0,14	0,088	-
4-Methoxyphenol	0,30	0,056	0,11	-

Anm.

1) Die relative Umsatzrate (mMole l^{-1} d^{-1}) wurde dadurch untersucht, daβ die sich ergebene Abbaurate einheitlich mit der eingesetzten Biomasse (OD_{546} =1,0) umgerechnet wurde.
2) 4-MOP = 4-Methoxyphenol, DEOB = 1,4-Diethoxybenzol mit zusätzlichem Ethanol

Vom Umsatz des 1,3-Dimethoxybenzols war aber kein 3-Methoxyphenol (RT: 2,64 min) nachweisbar, weil der Stamm DEOB100 3-Methoxyphenol schneller (0,088 ~ 0,14 mMole l^{-1} d^{-1}) umsetzte, als 1,3-Dimethoxybenzol (0,032 mMole l^{-1} d^{-1}).

Der Stamm DEOB200 setzte auch 1,4-Diethoxybenzol, 1,3-Dimethoxybenzol und 1,4-Dimethoxybenzol jeweils zu 4-Ethoxyphenol, 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol um (Tab. 3-21).

2-Methoxyphenol wurde von den beiden Stämmen DEOB100 und DEOB200 schnell umgesetzt (0,79 ~ 1,73 mMole l^{-1} d^{-1}). Die Abbauenzyme für 2-Methoxyphenol schienen ohne Zusammenhang mit den Abbauaktivitäten für 1,3- bzw. 1,4-dialkoxylierte Benzole konstitutiv zu sein, weil kein 2-Methoxyphenol vom Abbau der 1,3- bzw. 1,4-Di-alkoxylierten Benzole produziert wurde. 2-Methoxyphenol (Guajakol) ist ein *O*-dealkyliertes Produkt vom Abbau des 1,2-Dimethoxybenzols (Sutherland, 1986). Kein in dieser Arbeit untersuchter Stamm baute 1,2-Dimethoxybenzol ab.

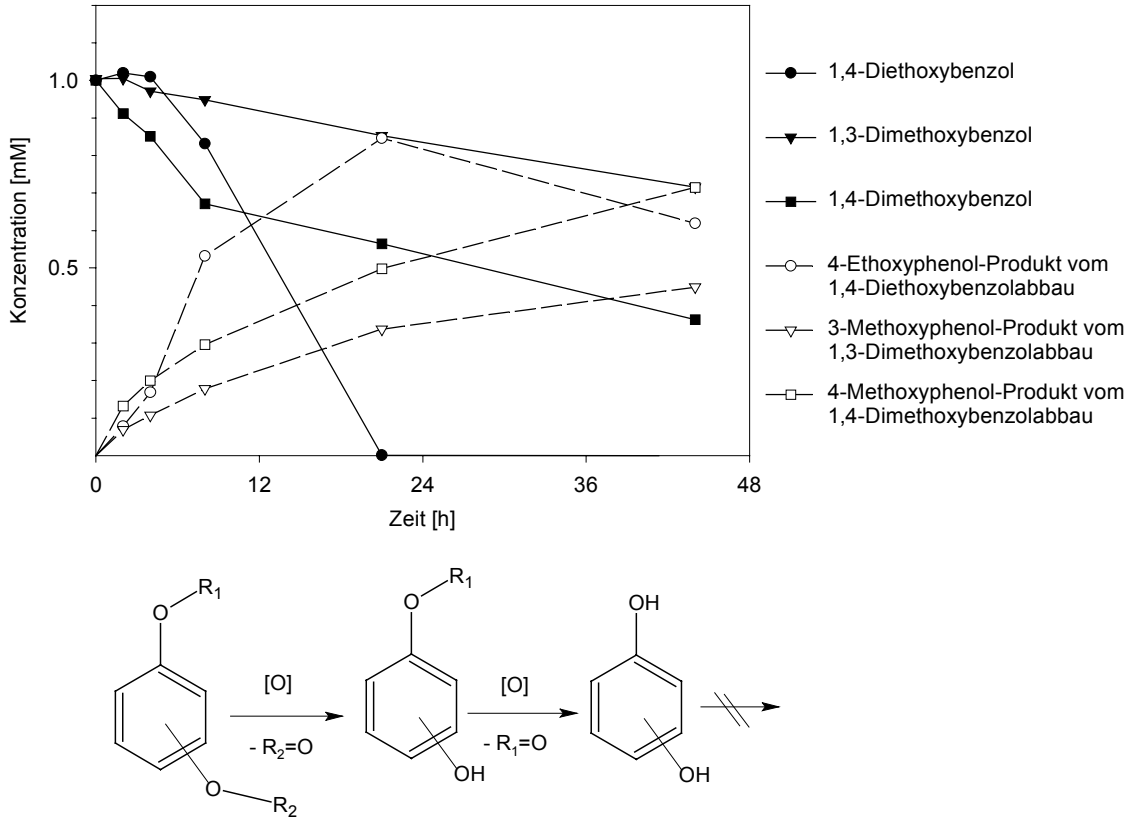


Abb. 3-19. *O*-Dealkylierungsreaktionen für den Abbau von 1,3- bzw. 1,4-dialkoxylierten Benzolen durch den Stamm DEOB200 (OD_{546} = 5,0): Der Teststamm wurde in Gegenwart von 1,4-Diethoxybenzol mit Ethanol angezogen.

Aus der Abbildung 3-19 konnte man erkennen, daß der Stamm DEOB200 durch eine *O*-Dealkylierungsreaktion 1,4-Diethoxybenzol via 4-Ethoxyphenol abgebaut hat. 4-Ethoxyphenol wurde weiter mineralisiert. Damit wurden auch 1,3-Dimethoxybenzol und 1,4-Dimethoxybenzol jeweils zu 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol umgestzt, aber 3- oder 4-methoxyliertes Phenol schien nicht weiter abgebaut zu werden. Im Gegensatz dazu konnte der Stamm DEOB100 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol weiter abbauen.

3.3.2. Die Aralkylether-abbauenden Stämme

Zur Untersuchung verschiedender Abbauwege von Aralkylethern wurden der Stamm *Rhodococcus rhodochrous* St127, der aliphatische Alkylether-abbauende *Rhodococcus* Stamm DEE5311 und der unbekannte Actinomycete MOB600 ausgewählt.

Alle drei Stämme bauten charakteristischerweise Anisol und Phenetol ab. Dazu baute der Stamm DEE5311 aliphatische Alkylether und Dibenzylether ab, und der Stamm MOB600 degradierte verschiedene aromatische Chemikalien wie z.B. Benzol, Toluol, Styrol, *o/m/p*-Kresole, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol und Biphenyl. Davon baute kein Stamm Di-methoxyliertes Benzol ab, wie z.B. 1,2-Dimethoxybenzol, 1,3-Dimethoxybenzol, oder 1,4-Dimethoxybenzol.

In der Tabelle 3-22 werden um die Retentionszeiten und UV-Spektren von den verwendeten Chemikalien aufgeführt, die mittels einer mit Diodenarray ausgerüsteten RP8-HPLC analysiert wurden. Schwer wasserlösliche Aralkylether, wie z.B. 1,2-Dimethoxybenzol, 1,3-Dimethoxybenzol, 1,4-Dimethoxybenzol und 1,2-Methylendioxybenzol, wurden am Anfang des Versuches bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Sonst wurde je 3 mM Phenol, Anisol, Phenetol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, 4-Methoxyphenol, oder Toluol als Testsubstrat genutzt. Zur quantitativen Bestimmung wurde die Eichgerade jeder Testchemikalie mit der Konzentrationsskala von 0,1 bis 1 mM gemacht.

Aus der RP8-HPLC-Analyse ergaben 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol keinen großen Unterschied zwischen ihren Retentionszeiten oder UV-Spektren. 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol wurden daher auf einer Dünnschichtechromatographie unterschiedlich gemacht. Wäßrige Proben wurden zweimal mit dem gleichen Volumen Diethylether extrahiert, und die Konzentrate, die sich in geringes Volumen Diethylether lösten, wurden auf eine Kieselgel-RP18-F_{254S}-Dünnschichtechromatographie (5×7,5 cm, Fa. Merck) eingeengt. Indem sich DC-Platten mit 60 %igem (v/v) Methanol (0,085 % H_3PO_4) entwickelten, unterschieden sich 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol unter einer UV-Lampe bei 254 nm mit dem jeweiligen Rf-Wert von 0,49 und 0,57.

Tab. 3-22. Retentionszeiten und UV-Spektren von Testchemikalien, die anhand einer RP8-HPLC mit 50%igem (v/v) Methanol-Fließmittel (0,085 % H_3PO_4, Fließrate: 1 ml min^{-1}) analysiert wurden

Chemikalien	RT [Min]	UV-Spektrum (200 ~ 360 nm) Maxima	Minima	Schulter
Phenol	2,58	213, 271	207, 240	
Anisol	5,61	219, 271	208, 240	
Phenetol	8,65	220, 271	209, 241	
2-Methoxyphenol	2,66	276	247	218
3-Methoxyphenol	2,64	274	247	219
4-Methoxyphenol	2,34	225, 288	212, 252	
***Ortho*-Kresol**	3,79	273	242	213
***Meta*-Kresol**	3,64	274	244	215
***Para*-Kresol**	3,70	223, 279	210, 246	
2-Ethoxyphenol	3,74	276	248	218
3-Methoxybrenzkatechin	1,88	268	252	219
2-Methoxyhydrochinon	1,52	290	255	222
1,2-Dimethoxybenzol	4,12	226, 275	215, 248	
1,3-Dimethoxybenzol	6,57	275	247	220
1,4-Dimethoxybenzol	5,60	226, 288	211, 252	
1,2-Methylendioxybenzol	5,55	232, 282	221, 252	
3,4-Methylendioxyphenol	2,54	235, 295	227, 259	

Anm.

1) 20 µl Probe wurde anhand eines Autosamplers in die RP8-HPLC-Trennsäule eingespritzt. Authentische Chemikalien wurden bei einer Konzentration von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM analysiert, damit die relative Retentionszeit mit dem mittleren Wert abgeschätzt wurde.
2) Die UV-Spektren wurden mittels eines mit Diodenarray ausgerüsteten Multikanal-Photodetektors zwischen 200 und 360 nm mit dem Wellenlängeintervall von 2 nm aufgenommen.

Relative Umsatzrate von Anisol, Phenetol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, oder 4-Methoxyphenol wurde mit ganzen Zellen von den Stämmen St127, DEE5311 und MOB600 untersucht (Tab. 3-23). Die Initialaktivität jedes Stammes für den Abbau von Anisol und Phenetol scheint von dem Anzuchtsubstrat abhängig zu sein. Der Stamm St127 setzte nur nach der Anzucht mit Anisol oder Phenetol Aralkylether schnell um. Im Vergelich dazu setzte der Stamm DEE5311 nicht nur nach der Anzucht mit Aralkylether oder Phenol Aralkylether um, sondern Anisol, Phenetol und 2-Methoxyphenol wurden auch nach der Diethylether-Anzucht schnell umgesetzt. Der Stamm MOB600 konnte nach der Toluol-Anzucht Aralkylether abbauen. Seine Abbaufähigkeiten wurden semi-konstitutiv induziert, oder mehere Enzymsysteme beteiligten sich am Abbau von Aralkylethern.

Tab. 3-23. Der Umsatz[1)] [mMole l^{-1} d^{-1}] von Anisol, Phenetol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol mit ganzen Zellen von den Aralkylether-abbauenden Stämmen St127, DEE5311 und MOB600

Stamm	Anzuchtsubstrat	Testchemikalien [2)] (am Anfang 3mM)				
		Anisol	Phenetol	2-MOP	3-MOP	4-MOP
St127	Phenol	0,2	0,2	0,7	0,1	< 0,1
	Anisol	2,3	3,5	3,7	0,4	0,3
	Phenetol	0,3	0,2	3,0	0,1	< 0,1
DEE5311	Diethylether	4,6	7,7	3,4	-	-
	Phenol	2,7	6,3	4,5	3,6	2,1
	Anisol	8,8	7,6	4,6	0,2	0,8
	Phenetol	6,2	1,30	2,8	0,1	0,4
MOB600	Phenol	6,9	1,3	11,3	17,3	< 0,1
	Toluol	3,6	3,5	3,6	11,3	-
	Anisol	15,9	12,7	10,6	35,8	0,5
	Phenetol	11,9	16,0	2,1	35,7	-

Anm.

1) Die relative Umsatzrate wurde dadurch abgeschätzt, daβ die sich mit einem Testsubstrat ergebene Abbaurate einheitlich mit der eingesetzten Biomasse (OD_{546} = 1.0) umgerechnet wurde.
2) 2-, 3-, 4-MOP = 2-, 3-, 4-Methoxyphenol

3.3.2.1. Umsatz- und Oxidationsmuster des Stammes St127

Nach der Anzucht mit Anisol setzte der Stamm St127 Phenetol schneller (3,5 mMole l^{-1} d^{-1}) als Anisol (2,3 mMole l^{-1} d^{-1}) um. Wurden die Folgemetabolite vom Abbau des Anisols unter Verwendung authentischer Chemikalien analysiert, wurde nur 2-Methoxyphenol als ein temporäres Metabolit nachgewiesen, das anhand einer RP8-HPLC eine Retentionszeit von 2,66 min und auf einer DC-Platte einen Rf-Wert von 0,49 ergab. Vom Abbau von Phenetol wurde aber kein äquivalentes Folgemetabolit, wie z.B. 2-Ethoxyphenol detektiert (Abb. 3-20).

Wie in der Tabelle 3-23 zu erkennen ist, setzten die Stämme St127 und DEE5311 2-Methoxyphenol jedenfalls schneller als 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol um. Ähnliches Umsatzmuster wurde nach der Anzucht mit Phenol aufgewiesen. Die Abbauaktivität für 2-Methoxyphenol schien (semi)-konstitutiv induziert zu werden, wie bei den 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden Stämmen DEOB100 und DEOB200 erwähnt.

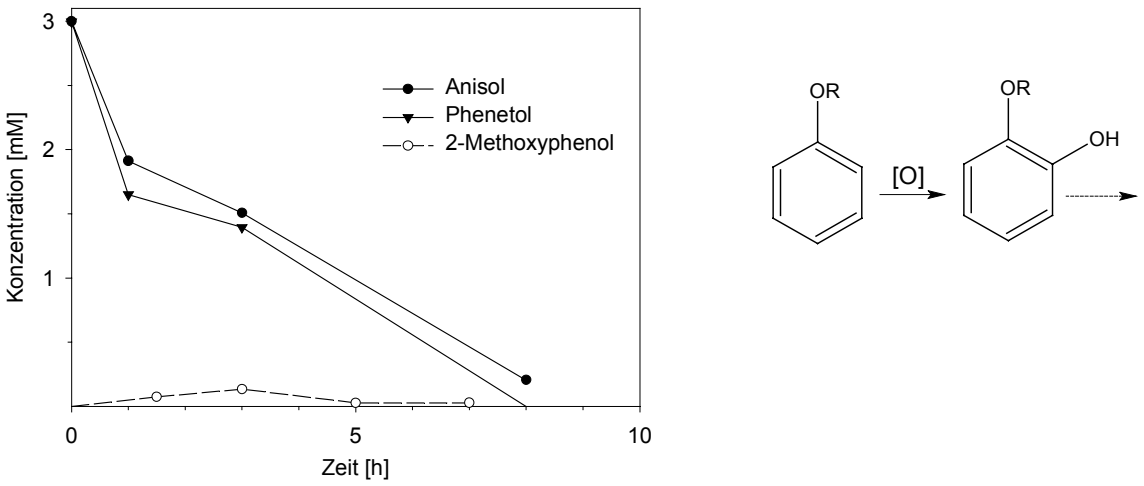
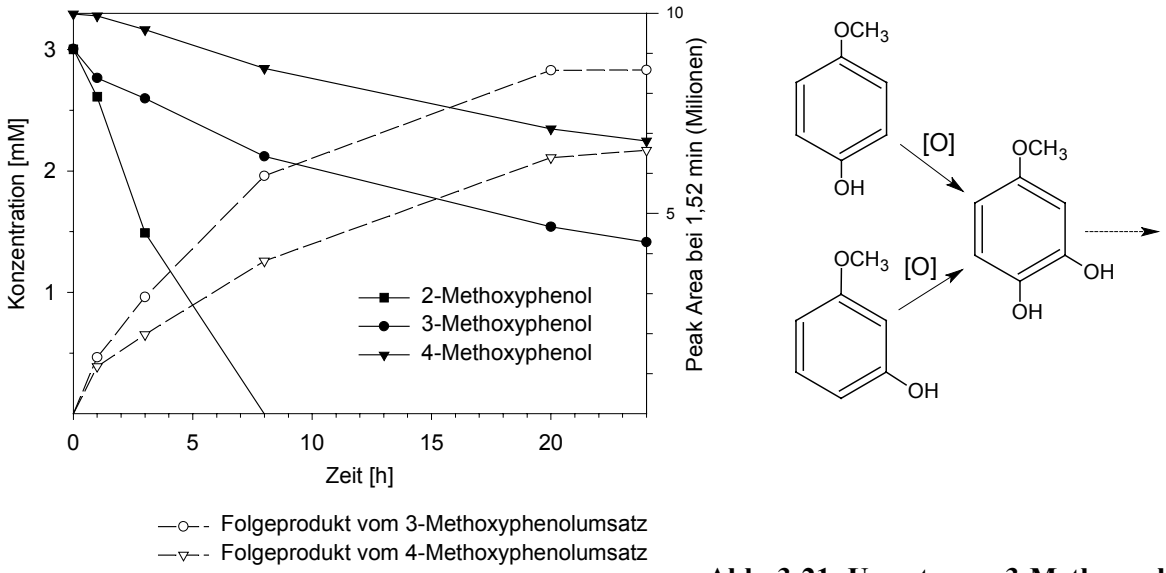


Abb. 3-20. Postulierte 2-Monooxygenierungen von Anisol und Phenetol durch den Stamm St127: Der Teststamm wurde mit Anisol angezogen, und die optische Dichte von Ruhezellen betrug am Anfang des Versuches 3,7 im 50 mM Phosphat Puffer (pH 7,2). Geringe Menge an 2-Methoxyphenol wurde vom Abbau des Anisols nachgewiesen (R = Methyl, Guajakol).

Wurde 3-Methoxyphenol oder 4-Methoxyphenol mit ganzen Zellen umgesetzt, stellte der Stamm St127 ′dead-end′-Produkte her, deren roten Farbe sich in der Flüssigkeit erkennen ließ (Abb. 3-21A). Die beiden Produkte ergaben anhand einer mit Diodenarray ausgerüsteten RP-HPLC dieselbe Retentionszeit (1,52 min) und dasselbe UV-Spektrum zwischen 200 und 360 nm. Ihre Maximum Peaks lagen bei 226 nm und 273 ~ 274 nm (schwach) und das Minimum Peak bei 260 ~ 261 nm (Abb. 3-21B). Damit war keine authentische Chemikalie, wie z.B. Hydrochinon, Resorcinol, 3-Methoxybrenzkatechin, oder 2-Methoxyhydrochinon, identisch. Vermutlich war das ′dead-end′-Produkt ein 4-Methoxybrenzkatechin-Derivat. Weil kein 4-Methoxybrenzkatechin handelsüblich verwendbar gemacht wurde, wurde die Produktion des vermutlichen 4-Methoxybrenzkatechins während des Stoffwechsels von 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol nur mit der zunehmenden Tendenz von integriertem ′Peak-Area′ ermittelt (Abb. 3-21). Der Stamm St127 schien kein 4-Methoxybrenzkatechin abzubauen. Dieses Derivat wurde vermutlich schnell zu anderen autoxidiert.

Die Oxidationsmuster vom Stamm St127 wurden je nach der Anzucht mit Phenol, Anisol oder Phenetol untersucht (Tab. 3-24). Nach der Anzucht mit Phenol wurde keine Oxidation für Anisol, Phenetol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, und 4-Methoxyphenol nachgewiesen. Die mit Anisol angezogenen Zellen besaßen jedenfalls höhere Oxidationspotentiale auf Aralkylether als die mit Phenetol angezogenen Zellen.

(A)



(B)

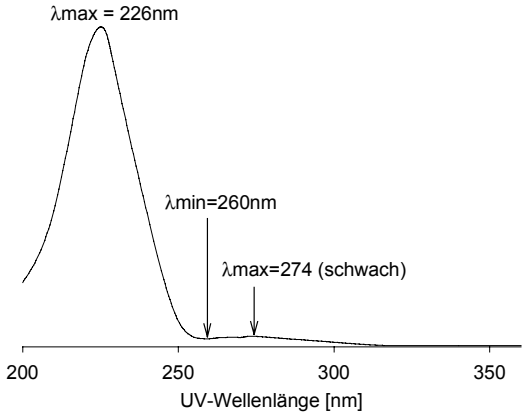


Abb. 3-21. Umsatz von 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol zu vermutlichem ′dead-end′-Produkt 4-Methoxybrenzkatechin durch den Stamm St127: Der Teststamm wurde mit Anisol angezogen, und die optische Dichte von den Ruhezellen betrug am Anfang des Versuches 3,7 im 50 mM Phosphat Puffer (pH 7,2). Das ′dead-end′-Produkt wurde **(A)** anhand einer RP8-HPLC bei der Retentionszeit von 1,52 min detektiert, wobei das UV-Spektrum zwischen 200 und 360 nm mit einem Diodenarray aufgenommen wurde (vgl. Abb. 3-23)

Tab. 3-24. Relative Sauerstoffaufnahmerate [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} = 1] von Ruhezellen des Stammes St127 je nach der Anzucht mit Phenol, Anisol oder Phenetol

Testchemikalien (1 mM)	Anzuchtsubstrat		
	Phenol	Anisol	Phenetol
Phenol	4	12,5	3,2
Anisol	-	5,4	< 1
Phenetol	-	8,0	< 1
2-Methoxyphenol	-	9,8	2,6
3-Methoxyphenol	-	1,8	-
4-Methoxyphenol	-	1,8	-

Anm.
—, nicht detektierbar im Vergleich zur grundsätzlichen Zellatmung

3.3.2.2. Umsatz- und Oxidationsmuster des Stammes DEE5311

Der aliphatische Alkylether-abbauende Stamm DEE5311 baute charakteristischerweise aliphatische Alkylether, Anisol, Phenetol und Dibenzylether ab. Davon diente Anisol im allgemeinen zum Wachstum für die Aralkylether-abbauenden Stämme, nicht aber für die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme. Der Stamm DEE5311 schien daher zwei unterschiedliche Enzymsysteme zum Abbau von aliphatischen Alkylethern und Aralkylethern zu besitzen. Je nach der Anzucht mit Diethylether, Phenol, Anisol, oder Phenetol zeigte er unterschiedliche Oxidationsmuster an (Tab. 3-25).

Die Diethylether-Anzucht war von den anderen unterschiedlich: Die mit Diethylether angezogenen Zellen oxidierten Diethylether, Phenetol und Dibenzylether, aber weder Phenol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, 4-Methoxyphenol, Brenzkatechin, noch 3-Methoxybrenzkatechin. Die mit einem aromatischen Substrat angezogenen Zellen oxidierten hingegen weder Diethylether noch Dibenzylether. Die Oxidationspotentiale auf Aralkylether erhöhten sich jedenfalls nach der Anzucht mit Ansiol oder Phenetol. In diesem Fall ergaben die mit Anisol angezogenen Zellen damit eine schnelle Umsatzrate von Aralkylethern als die mit Phenetol angezogenen Zellen. Der Stamm DEE5311 besaß keine Dioxygenase zur Ringspaltung von 3-Methoxybrenzkatechin.

Tab.3-25. Relative Sauerstoffaufnahmerate [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} = 1] von Ruhezellen des Stammes DEE5311 je nach der Anzucht mit Diethylether, Phenol, Anisol, oder Phenetol

Testchemikalien (1 mM)	Anzuchtsubstrat			
	Diethylether	Phenol	Anisol	Phenetol
Diethylether	35,9	-	-	-
Phenol	-	71,3	43,9	7,6
Anisol	< 1	-	7,0	5,2
Phenetol	10,3	4,6	19,3	9,1
2-Methoxyphenol	-	19,5	18,4	17,7
3-Methoxyphenol	-	25,1	7,0	-
4-Methoxyphenol	-	15,4	8,8	-
Dibenzylether	17,3	-	-	-
Brenzkatechin	-	214	102	77,2
3-Methoxybrenzkatechin	-	26,2	2,6	-

Anm.
—, nicht detektierbar im Vergleich zur grundsätzlichen Zellatmung

Aus den Tabellen 3-24 und 3-25 zeigten die Stämme St127 und DEE5311 ähnliche Oxidationspotentiale auf 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol miteinander. Die beiden oxidierten 2-Methoxyphenol schneller als 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol. Die Oxidationsraten von 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol waren ähnlich miteinander. Die mit Phenol angezogenen Zellen oxidierten besonders Phenol, Brenzkatechin, 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol schnell, aber 2-Methoxyphenol, Phenetol, oder Anisol wurde damit langsam oder nicht oxidiert. Daraus wurde angenommen, daß eine Phenol-Hydroxylase vom Stamm DEE5311 verschiedene Aralkylether, wie z.B. 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol, unproduktiv oxidierte.

Nach der Anzucht mit Diethylether setzte der Stamm DEE5311 Anisol und Phenetol durch eine *O*-Dealkylierungsreaktion an der *O*-Alkylgruppe zu Phenol um (Abb. 3-22). 3 ~ 5 Stunden nach dem Versuchsbeginn wurden aber Anisol und Phenetol durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion am Kern jeweils zu 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol umgesetzt. Das 2-Monooxygenasesystem vom Stamm DEE5311 wurde nur in Gegenwart von Aralkylether induziert.

Die Tatsache, daß die meisten aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme kein Anisol verwerteten, beruhte wahrscheinlich auf die fehlende Induktion vom 2-Monooxygenasesystem. Wäre die *O*-Dealkylaseaktivität konstitutiv oder mit Anisol induzierbar, wächsten alle aliphatische Alkylether-abbauende Stämme mit Anisol, obwohl sie keine vom Anisolabbau freigesetzte Methylgruppe als einzige C/E-Quelle verwerten konnten. Damit entstand Phenol vom Abbau von Aralkylethern. Phenol war ein gewöhnliches Substrat für alle. In der Tabelle 3-25 geht es darum, daß die *O*-Dealkylase weder konstitutiv noch mit Anisol induzierbar ist.

Im Vergleich dazu hatten der Stamm DEE5311 und ebenso der Stamm DEE515 ein anderes Enzymsystem, nämlich die 2-Monooxygenase, zum Abbau von Aralkylethern. So konnten sie damit Anisol via 2-Methoxyphenol abbauen. In diesem Versuch war aber es unklar, ob Phenetol fürs *O*-Dealkylasesystem als Inducer fungiert. Trotzdem wurde aus der Betrachtung aufgenommener Sustratspektren hypothetisch postuliert, daß diejenigen Ether, die das *O*-Dealkylasesystem von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen induzieren, im allgemeinen die folgende chemische Eigenschaft haben:

eine nicht-substituierte Methylengruppe an der Cα-Position neben dem Sauerstoffatom.

Damit wurde gerechnet, daß Phenetol in der Zwischenlage liegt, um entweder eine *O*-Dealkylase oder eine 2-Monooxygenase vom Stamm DEE5311 zu induzieren.

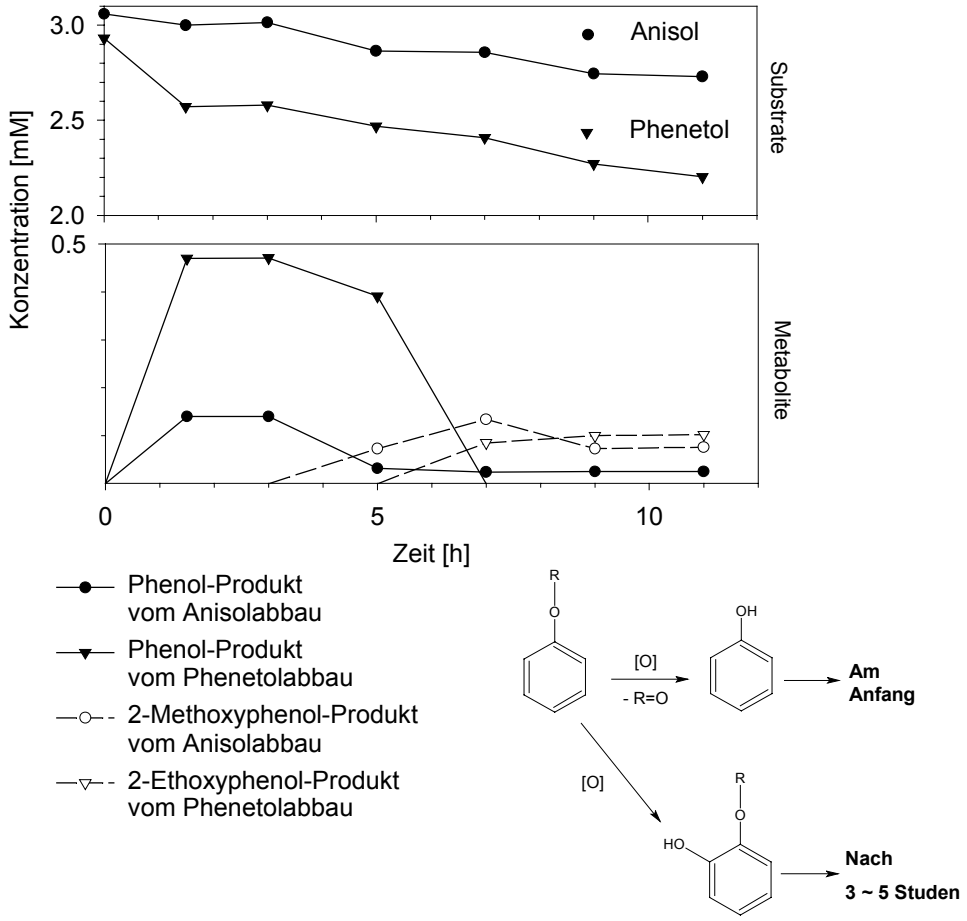


Abb. 3-22. Postulierte Abbauwege von Anisol und Phenetol durch den Stamm DEE5311(OD_{546} = 2,2) nach der Anzucht mit Diethylether: 3 ~ 5 Stunden nach dem Versuchsbeginn entstanden 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol als Hauptintermediate anstelle des am Anfang entstehenden Phenols.

Interessant war, daß die mit Diethylether angezogenen (induzierten) Zellen am Anfang des Versuches Anisol *O*-demethylierten. Die hypothetische *O*-Dealkylase katalysierte auch eine Hydroxylierungsreaktion am *terminalen O-Methyl-C-Atom*.

3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol wurden besonders nach der Anzucht mit Phenol schnell umgesetzt (Abb. 3-23). Die Umsatzraten von 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol waren hingegen nach der Anzucht mit Diethylether oder Aralkylether nur langsam (Tab. 3-23).

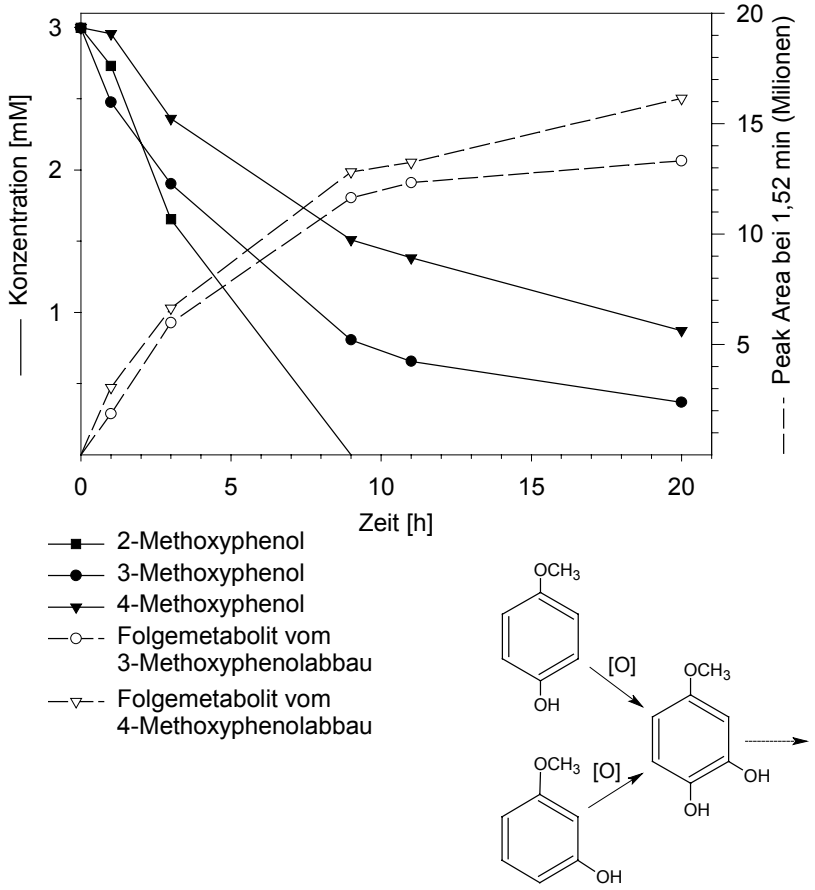


Abb. 3-23. Der Abbau des 2-Methoxyphenols und der Umsatz von 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol zu vermutlichem ′dead-end′-Produkt 4-Methoxybrenzkatechin durch den Stamm DEE5311 (OD_{546} = 2,4): Der Teststamm wurde mit Phenol angezogen. Die Produktion von vermutlichem 4-Methoxybrenzkatechin wurde anhand einer RP8-HPLC mit 50 %igem Methanol-Fließmittel (0,085 % H_3PO_4, Fließrate: 1 ml min^{-1}) bei der Retentionszeit von 1,52 min bestimmt (vgl. Abb. 3-21)

Die beiden Abbauprodukte zeigten dieselbe Retentionszeit von 1,52 min und dasselbe UV-Spektrum zwischen 200 und 360 nm (λ_{max} = 226, 273 ~ 274 (schwach), λ_{min} = 260 ~ 261) an. Das war mit vermutlichem 4-Methoxybrenzkatechin identisch (siehe Abb. 3-21). Hiermit wurde bestätigt, daß 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol nicht durch spezifische Enzymreaktionen zu vermutlichem 4-Methoxybrenzkatechin umgesetzt wurden, sondern daß sich eine Phenol-Oxidase, die eine breite Substratspektrum an verschiedenen Phenolen hatte, daran beteiligte.

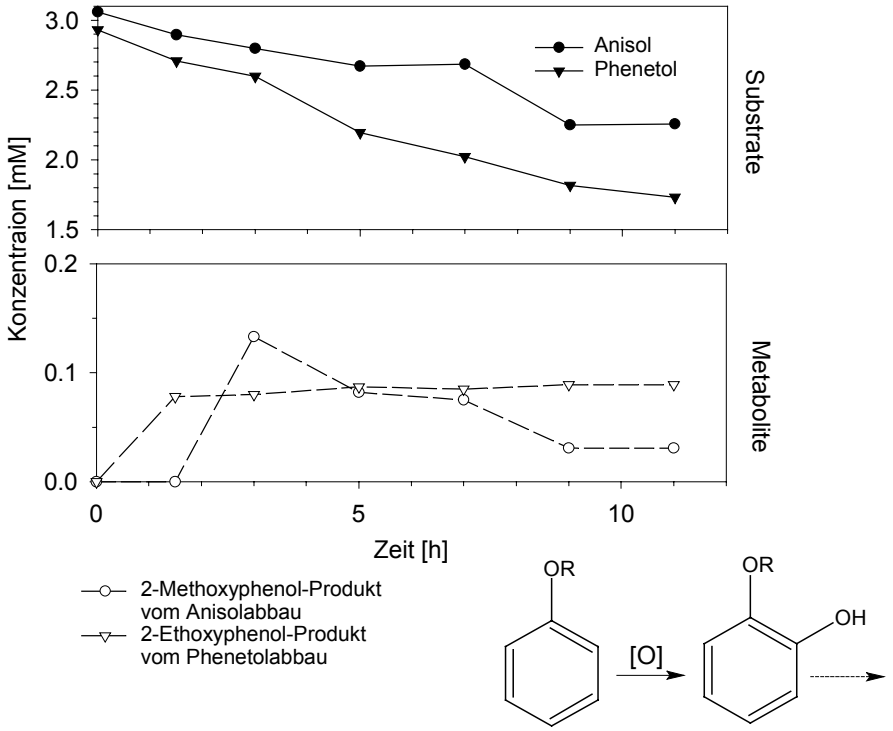


Abb. 3-24. Postulierte Abbauwege von Anisol und Phenetol durch den Stamm DEE5311 (OD_{546} = 1,9) nach der Anzucht mit Phenetol: Anisol und Phenetol wurden durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion jeweils zu 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol umgesetzt.

Nach der Anzucht mit Aralkylether setzte der Stamm DEE5311 Anisol und Phenetol jeweils zu 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol um (Abb. 3-24). Damit wurde angeschlossen, daß sowohl der Aralkylether-abbauende Stamm St127 als auch der aliphatische Alkylether-abbauende Stamm DEE5311 bevorzugt durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion Aralkylether abbauen. Daraus wurde angenommen, daß ein *O*-Dealkylasesystem zum Abbau von Phenetol ungünstiger ist, als ein 2-Monooxygenasesystem. Im Prinzip ist die O-Arylbindung wegen der Konjugation zwischen *p*-Orbitalen des Sauerstoffatoms und aromatischen π-Elektronen stärker als die O-Alkylbindung. Daher geschieht die *O*-Dealkylierungsreaktion mit Aralkylethern bevorzugt an der O-Alkylbindung so ähnlich wie die *O*-Dealkylierungen von 1,3- bzw. 1,4-Di-alkoxylierten Benzolen durch die Stämme DEOB100 und DEOB200. Wird aber Aralkylether durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion am

Kern hydroxyliert, behindert sich die *O*-Dealkylierung, sondern die *ipso*-Substitution an der O-Arylbindung ist der *O*-Dealkylierung vorzuziehen (Ohe et al., 1994).

3.3.2.3. Umsatz- und Oxidationsmuster des Stammes MOB600

Die Oxidationsmuster vom Stamm MOB600 wurden je nach der Anzucht mit Phenol, Toluol, Anisol oder Phenetol galvanish untersucht (Tab. 3-26). Die ganze Oxidationskapazität für Anisol, Phenetol und 1,2-Methylendioxybenzol erhöhte sich deutlich nach der Anzucht mit Anisol oder Phenetol. Er oxidierte Phenol, Toluol, 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol, *o/m/p*-Kresole und Brenzkatechine schnell ohne Bezug auf Anzuchtsubstrate. 4-Methoxyphenol wurde hingegen nicht oder nur langsam oxidiert.

Im Vergleich zu den *Rhodococcus* Stämmen St127 und DEE5311 vermochte der Stamm MOB600 dazu, nach der Anzucht mit Aralkylether sowohl Aralkylether, wie z.B. Anisol, Phenetol, 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol, als auch Toluol und 1,2-Methylendioxybenzol zu oxidieren.

Tab. 3-26. Relative Sauerstoffaufnahmerate [nMole ml^{-1} min^{-1} per OD_{546} = 1,0] von Ruhezellen des Stammes MOB600 je nach der Anzucht mit Phenol, Toluol, Anisol, oder Phenetol

Testchemikalien (1 mM)	Anzuchtsubstrat			
	Phenol	**Toluol**	**Anisol**	**Phenetol**
Phenol	62,8	173	228	97,6
Toluol	n.u.	43,7	181	120
Anisol	8,0	11,3	72,8	75,9
Phenetol	-	1,4	55,4	60
2-Methoxyphenol	80,3	158	225	44,6
3-Methoxyphenol	67,2	138	152	49,4
4-Methoxyphenol	12,4	29,6	8,7	-
***ortho*-Kresol**	54,0	183	183	65,1
***meta*-Kresol**	22,6	110	143	38,6
***para*-Kresol**	62	144	155	48,2
Brenzkatechin	536	1200	514	286
3-Methylbrenzkatechin	228	511	480	228
3-Methoxybrenzkatechin	145	294	181	142
1,2-Methylendioxybenzol	6,6	-	125	35

Anm.
—: nicht detektierbar im Vergleich zur grundsätzlichen Zellatmung, n.u., *n*icht *u*ntersucht

Der Stamm MOB600 oxidierte 3-Methoxyphenol schneller als 2-Methoxyphenol. Damit wurden Brenzkatechin, 3-Methylbrenzkatechin und 3-Methoxybrenzkatechin durch extradiolisch arbeitende Dioxygenierung abgebaut. Diese *meta*-spaltende Dioxygenaseaktivität ließ sich Sekunden nach Testbeginn anhand der Tautomerie enolischer Produkte mit der gelben Farbe in der Flüssigkeit schnell erkennen. 1,2-Methylendioxybenzol wurde zu einem ′dead-end′-Produkt umgesetzt (Abb. 3-25). Handelsübliches 3,4-Methylendioxyphenol ergab anhand einer mit Diodenarray ausgerüsteten RP8-HPLC dieselbe Retentionszeit von 2,54 min und dasselbe UV-Spektrum (λ_{max} = 235 nm, 295 nm; λ_{min} = 227 nm, 259 nm) mit dem ′dead-end′-Produkt. Die Umsatzrate von 1,2-Methylendioxybenzol verlangsamte sich nach 30 ~ 60 Minuten vom Versuchsbeginn. Wahrscheinlich bewirkte 3,4-Methylendioxyphenol eine Produktehemmung auf die initiale Oxidase.

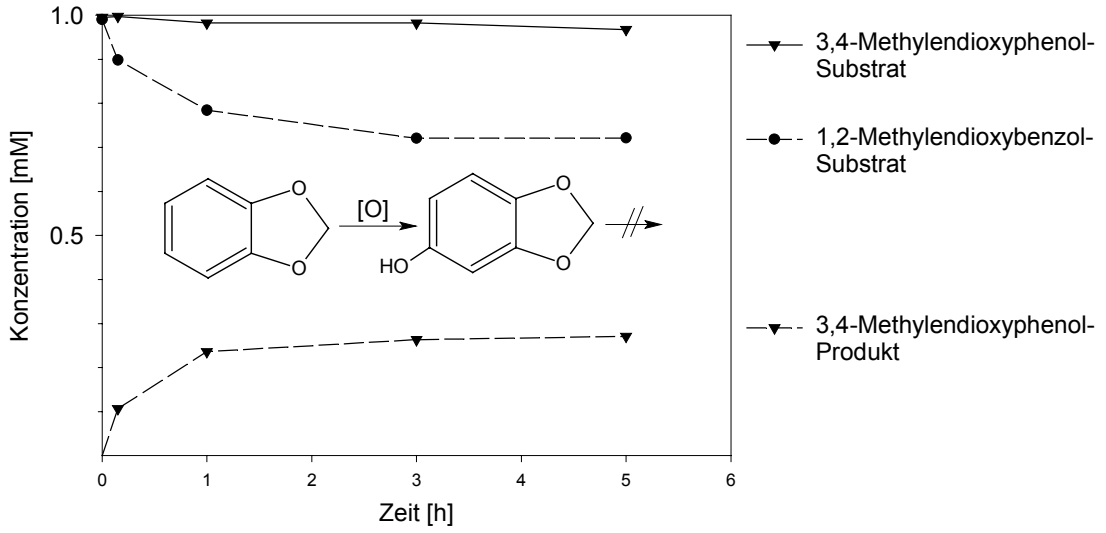


Abb. 3-25. Die Biotransformation des 1,2-Methylendioxybenzols zu einem ′dead-end′-Produkt 3,4-Methylendioxyphenol durch den Stamm MOB600 (OD_{546} = 1,1): Die Transformation von 1,2-Methylendioxybenzol zu 3,4-Methylendioxyphenol wies eine Produktehemmung auf.

Während des Abbaues von Anisol und Phenetol wurden jeweils 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol als Folgemetabolite detektiert (Abb. 3-26). Er wuchs aber mit 2-Ethoxyphenol nicht, während Phenetol ohne weiteres zum Wachstum diente. Damit wurde gerechnet, daß der Stamm MOB600 eigentlich nicht über 2-Ethoxyphenol Phenetol abbaute. 2-Methoxyphenol und 2-

Ethoxyphenol wurden nicht enzymatisch hergestellt, wenn Aralkylether-Dihydrodiole spontan dehydratisiert wurden (Resnick & Gibson, 1993). In diesem Versuch wurde aber kein Schlüsselmetabolit, wie z.B. 3-Methoxyphenol, 3-Methoxybrenzkatechin, Anisol-dihydrodiol, oder Phenetol-dihydrodiol, für die Dioxygenierungsreaktion nachgewiesen.

2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol wurden dann über ein temporäres Metabolit abgebaut. Das temporäre Metabolit ergab dieselbe Retentionszeit von 1,88 min und dasselbe UV-Spektrum (λmax = 268 nm, λmin = 252 nm, Schulter = 219 nm) mit authentischem 3-Methoxybrenzkatechin (Abb. 3-27).

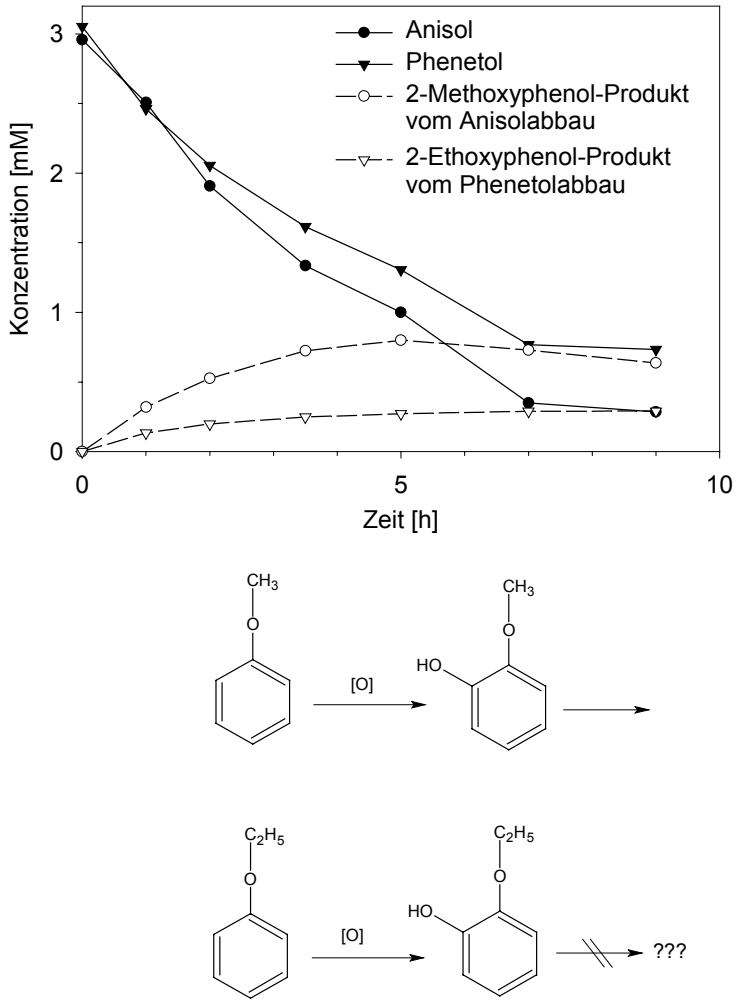


Abb. 3-26. Umsatzmuster vom Stamm MOB600 (OD_{546} = 1,2) mit Anisol oder Phenetol: Die Ruhezellen wurden nach der Anzucht mit Anisol geerntet. 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol wurden unter Abgleich mit authentischen Chemikalien auf einer RP18-DC als Intermediate nachgewiesen. Kein 2-Ethoxyphenol dient aber zum Wachstum vom Stamm MOB600.

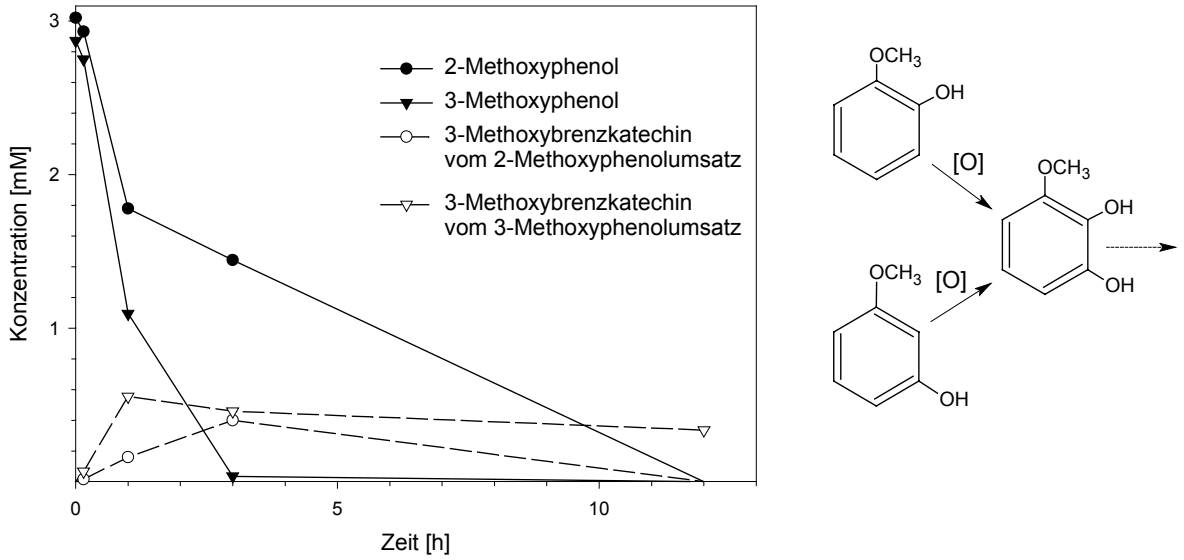


Abb. 3-27. Umsatzverläufe von 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol zu 3-Methoxybrenzkatechin durch den Stamm MOB600 (OD_{546} = 2,5): Der Stamm MOB600 wurde mit Phenol angezogen. Aus der RP8-HPLC-Analyse wurde 3-Methoxybrenzkatechin als ein temporäres Intermediat nachgewiesen.

Der Stamm MOB600 setzte weder 3-Methoxyphenol noch 4-Methoxyphenol zu vermutlichem 4-Methoxybrenzkatechin um. Er besaß dafür keine Phenol-Hydroxylase, um eine breite Substratspektrum an Phenolen zu haben.

Der Stamm MOB600 hatte nach der Anzucht mit phenolischem Substrat verschiedene Monooxygenasen dabei, um 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol, die durch spontane Dehydratisierungsreaktion mit Anisol-2,3,-dihydrodiol gebildet wurden, jeweils zu 3-Methoxybrenzkatechin zu oxidieren. Dann wurde 3-Methoxybrenzkatechin extradiolisch abgespalten

Zusammenfassend damit wurde hypothetisch postuliert, daß der Stamm MOB600 unter Bildung von 3-Alkoxybrenzkatechin Aralkylether abbaut, und daß ein 2,3-Dioxygenasesystem möglicherweise für die Initialoxidation von Aralkylethern verantwortlich war. Daraus könnten Aralkylether-2,3-dihydrodiole entstehen, die entweder durch spontane Dehydratisierung zu 2- bzw. 3-Alkoxyphenolen oder durch enzymatische Dehydrierung zu 3-Alkoxybrenzkatechinen umgesetzt wurden.

3.3.3. Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme

Die Stämme DEE5151 und DEE515 bauten charakteristischerweise aliphatische Alkylether, Phenetol und Dibenzylether ab. Dazu konnten sie 2-Chlorethylethylether abbauen, aber weder 2-Chlorethanol, 2-Chloracetaldehyd, noch 2-Chloressigsäure als C/E-Quelle verwerten. Sie bauten daher 2-Chlorethylethylether unvollständig ab, ohne halogenierte Ethylgruppe als C/E-Quelle zu verwerten. Davon zeigte der Stamm DEE515 zwei unterschiedliche Abbaumuster sowohl mit aliphatischen Alkylethern als auch mit Aralkylethern an, wie beim Stamm DEE5311 erwähnt. Daher nahm sich der Stamm DEE5151 zum Abbaumuster, um die Abbaumechanismen von aliphatischen Alkylethern und Dibenzylether zu untersuchen.

3.3.3.1. Oxidationsaktivitäten für aliphatische Alkylether und Alkohole

Dimethylether ist die einfachste Verbindung von symmetrischen aliphatischen Alkylethern, aber das diente nicht zum Wachstum für die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme. Das nächst einfache Diethylether vertrat deshalb diese Bindungsklasse.

Der Abbau wurde nur während des Stoffwechsels von Diethylether bewerkstelligt. Die hypothetische *O*-Dealkylase war mit Diethylether induzierbar (Abb. 3-28). In Gegenwart von Ethanol oder D-Glucose als einzige C/E-Quelle, nahm die Abbauaktivität für Diethylether schnell ab. Die relative Sauerstoffaufnahmerate nahm nach einem Tag vom Versuchsbeginn allmählich ab. Darüber wurden möglicherweise zwei Ursachen im Abschnitt 3.1.4.3 erwähnt. Einerseits befand sich ein unausgewogenes Verhältnis beim Wachstumversuch mit Diethylether. Dabei nahm die Proportion der lebenden Zellzahl in der ganzen Biomasse zeitlich ab. Die zweite war, daß die Aktivität von der Zelle bzw. Abbauenzymen wegen der Flüssigkeitsansäuerung in der späteren Wachstumsphase erniedrigt wurde. Die Sauerstoffzehrung von ganzen Zellen mit Diethylether erreichte das Maximum bei ca. pH 7,8 und 30°C (Abb. 3-29).

Die relative Sauerstoffaufnahmerate stand in engem Zusammenhang mit dem aufgenommenen Substratspektrum. So oxidierte der Stamm DEE5151 verschiedene aliphatische Alkylether wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether, Di-n-heptylether sowie Phenetol und Dibenzylether (Tab. 3-27). Er konnte weder Dimethylether, Diphenylether, Benzylphenylether, Isopropylether, noch Methyl-*tert*-butylether oxidieren, die zum Wachstum nicht dienten.

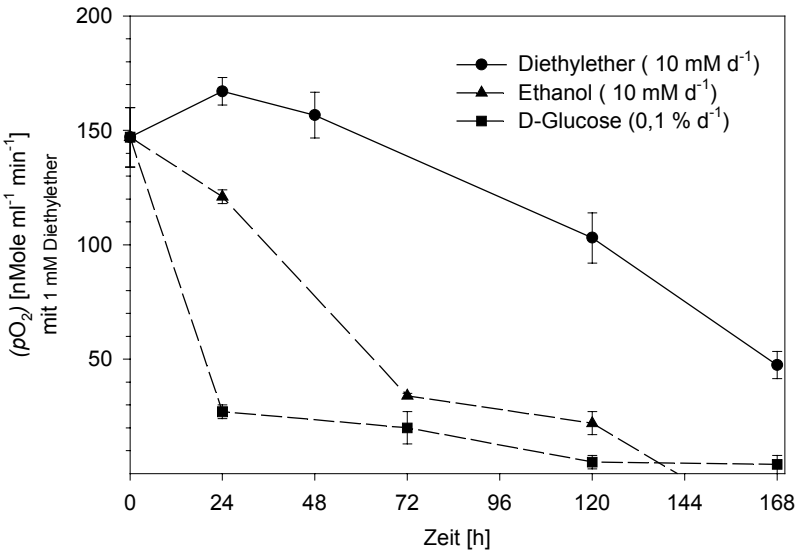


Abb. 3-28. Relative Sauerstoffaufnahmerate (nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} = 1) vom Stamm DEE5151 mit 1 mM Diethylether: Jede Zellkultur wurde mit täglicher Zugabe von Diethylether, Ethanol, oder D-Glucose semi-kontinuierlich inkubiert. Für die Messung der Sauerstoffaufnahme mit ganzen Zellen wurde 100 ml Portion jeder Zellkultur abzentrifugiert. Die Zellpaste wurde in dem gleichen Volumen 50 mM Phosphat Puffer (pH 7,2) suspendiert, und 2 Stunden lang bei 30°C geschüttelt. Die Hungerzellen wurden nach der anderen Abzentrifugierung geerntet.

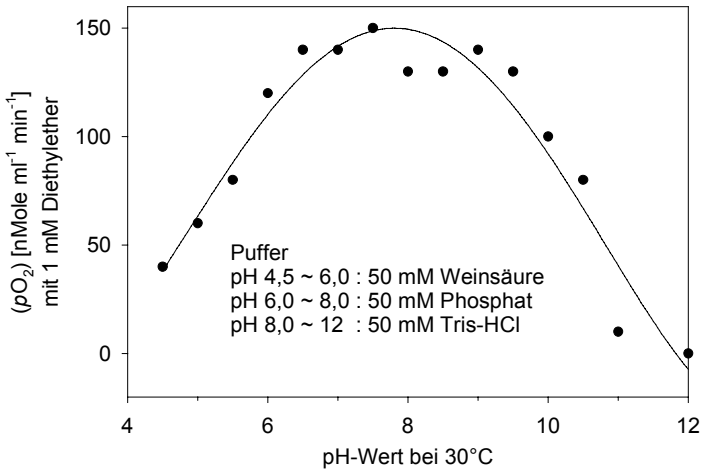


Abb. 3-29. pH-Optimum zur Oxidation des Diethylethers mit ganzen Zellen (OD_{546} = 1) bei 30°C: Die Hungerzellen wurde nach der Anzucht mit Diethylether geerntet, wie in der Abbildung 3-28 beschrieben.

Ethylvinylether und 2-Ethoxyphenol waren gute Wachstumssubstrate für alle untersuchte *Rhodococcus* Stämme, aber der Stamm DEE5151 oxidierte nach der Anzucht mit Diethylether nichts davon.

Obwohl Ethylvinylether ein Substratanalogon von Diethylether ist, scheint es nicht spezifisch abgebaut zu werden. Manche getestete Stämme verwerteten Ethylvinylether als einzige C/E-Quelle, ohne eine *O*-Dealkylase zu exprimieren. Vermutlich geschah der Abbau von Ethylvinylether eher unproduktiv oder nicht-enzymatisch an der Vinyldoppelbindung.

Tab. 3-27. Typische Oxidationsmuster [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546}=1] vom Stamm DEE5151 und sein Wachstumsvermögen mit verschiedenen Ethern

Testchemikalien [1)]	C/E-Quelle [2)]	pO_2 [nMole $ml^{-1}min^{-1}$] [3)]
Dimethylether	-	-
Diethylether	+++	147
Ethylvinylether	++	2,3
Di-n-propylether	++	94,6
Di-n-butylether	+	65,8
Di-n-pentylether	+	19,7
Di-n-hexylether	±	1,9
Di-n-heptylether	+	12,7
2-Chlorethylethylether	±	108
2-Bromethylethylether	-	96,8
Isopropylether	-	-
Methyl-*tert*-butylether	-	-
Phenetol	++	19,6
2-Ethoxyphenol	+++	-
Dibenzylether	+	15,3
Benzylphenylether	-	-
Diphenylether	-	-

Anm.

1) Die Konzentration an Testchemikalien betrug 3 ~ 5 mM zum Wachstumsversuch. Zur Sauerstoffaufnahmemessung wurden Testchemikalien bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt.
2) +++: sehr gutes Wachstum, ++: gutes Wachstum, +: Wachstum, ±: vermutliches Wachstum, —: kein Wachstum im Vergleich zur negativen Wachstumskontrolle
3) Zur Bestimmung der relativen Sauerstoffaufnahme [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} =1] wurden die mit Diethylether angezogenen Ruhezellen getestet.

Wie im Abschnitt 3.3.2.2 erwähnt, kam 2-Ethoxyphenol vom durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion eingeleiteten Abbau des Phenetols vor. Die *O*-Dealkylierungsreaktion an der Ethylgruppe von 2-Ethoxyphenol wird durch eine nahe liegende *ortho*-Hydroxylgruppe verhindert. Da war keine *O*-Dealkylase von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen an der oxidativen *O*-Dealkylierung von 2-Ethoxyphenol beteiligt.

2-Halogenierte Ethylethylether wurden so schnell wie Di-n-propylether oxidiert. 2-Halogenierte Ethylethylether dienten jedoch zum Wachstum nicht für alle. Davon freigesetzte 2-halogenierte Ethylgruppe war ohne Dehalogenaseaktivität schwer abbaubar, und wirkte auf die Zelle toxisch ein.

Die Sauerstoffaufnahme von Ruhezellen neigte dazu, mit zunehmender Kettenlänge aliphatischer Alkylether von Diethylether bis Di-n-hexylether abzunehmen. Di-n-heptylether wurde aber abseits dieser Tendenz schneller oxidiert, als Di-n-hexylether. In Übereinstimmung damit verwertete der Stamm DEE5151 Di-n-heptylether schneller als Di-n-hexylether. Vermutlich wurde lange Alkylkette von symmetrischen n-Alkylethern nicht nur am *O*-Methylen-Cα-Atom hydroxyliert, sondern auch am anderen C-Atom, wie z.B. am terminalen C-Atom.

Die mit Diethylether angezogenen Ruhezellen ergaben auch eine schwache Sauerstoffaufnahme mit n-Alkanen. Die relative Sauerstoffaufnahmerate war ohne jeglichen Zusammenhang mit der Kettenlänge der n-Alkane von n-Pentan (C_5) bis n-Octadecan (C_{18}) konstant (Tab. 3-28). Die relative Sauerstoffaufnahmerate betrug durchschnittlich 8 nMole ml^{-1} min^{-1}, und ca. 5,9 % im Vergleich zur Oxidation von Diethylether (100 %).

Tab. 3-28. Relative Sauerstoffaufnahmeraten vom Stamm DEE5151 (OD_{546}=1) mit n-Alkanen (C_N) im Vergleich zur 100 %igen Rate mit Diethylether

Testchemikalien [1 mM]	Diethyl-ether	n-Alkane (C_N, N: C-Atomzahl)										
		C_5	C_6	C_7	C_8	C_{10}	C_{13}	C_{14}	C_{15}	C_{16}	C_{17}	C_{18}
***PO_2* [nMole ml^{-1} min^{-1}]**	137	7,0	10,0	10,0	8,0	4,3	10,4	7,1	9,4	4,4	10,0	8,4
%-*p*O_2	100	5,1	7,3	7,3	5,8	3,1	7,6	5,2	6,9	3,2	7,3	6,1

Anm.
Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme wurden die mit Diethylether angezogenen Ruhezellen verwendet. Die relative Sauerstoffaufnahmerate von ganzen Zellen [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} =1] wurde dadurch nach der Abstraktion der grunsätzlichen Zellatmung von der Substratatmung berechnet, indem die beobachtete Sauerstoffaufnahme einheitlich mit der eingesetzten Biomasse (OD_{546} =1,0) umgerechnet wurde.

Symmetrische n-Alkane sind hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften mit aliphatischen Alkylethern ähnlich (Hauptmann, 1986). Ungerade n-Alkane, wie z.B. Pentan, Heptan, Nonan, Undecan, Tridecan, und Petadecan, halten sich für äquivalent zu symmetrischen n-Alkylethern, wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether, und Di-n-heptylether. Für die spezifische Oxidation symmetrischer n-Alkylether wurde die unproduktive Oxidation mit der Alkanoxidation ersetzt. Die Oxidationsrate von n-Alkanen hielt sich für unproduktiv.

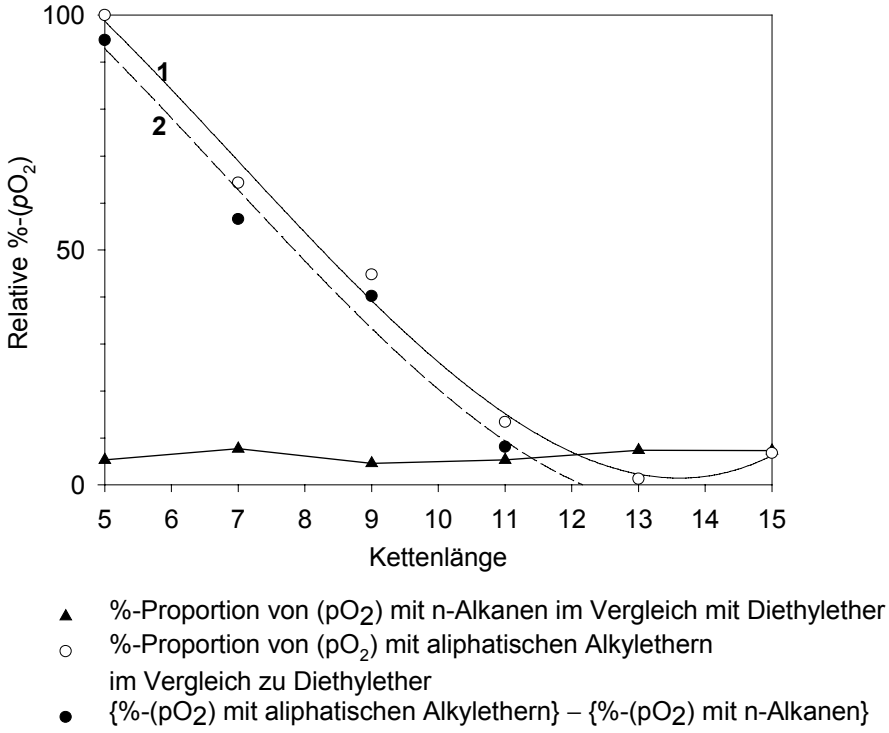


Abb. 3-30. Verhältnisse zwischen den produktiven und unproduktiven Oxidationsaktivitäten vom Stamm DEE5151 mit zunehmender Kettenlänge von symmetrischen n-Alkylethern: Der Stamm wurde bevor dem Versuch mit Diethylether angezogen. Die Kurve 2 (…), die für die spezifische *O*-Dealkylaseaktivität verantwortlich war, wurde dadurch dargestellt, indem unproduktive Sauerstoffaufnahmerate mit n-Alkan aus dem beobachteten Wert mit dem äquivalenten symmetrischen n-Alkylether (Kurve 1, —) abstrahiert wurde.

In diesem Versuch wurde weder Dimethylether noch Cα-verzweigte Alkylether (z.B. Isopropylether) eingeschlossen, da sie dieser Tendenz nicht folgten. Die spezifische *O*-Dealkylaseaktivität von ganzen Zellen für symmetrische n-Alkylether, wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether, und Di-n-heptylether, wurde nach der Gleichung (3.2) abgeschätzt.

$$\Delta(pO_2)_{C_{2m}-O} = (pO_2)_{C_{2m}-O} - (pO_2)_{C_{2m+1}} \qquad (3.2)$$

In der beobachteten Sauerstoffaufnahme, pO_2, mit einem symmetrischen n-Alkylether wurden die spezifische Enzymaktivität und die unproduktive Zellatmung summiert, vorausgesetzt, daß die mit n-(2*m*+1)-Alkan angeregte Zellatmung für die unproduktive Oxidation von Di-n-(2*m*)-Alkylether gleichwertig ist. Wurden die sich mit n-Alkanen ergebenen Sauerstoffaufnahmeraten von den mit symmetrischen Alkylethern beobacheten Werten abstrahiert, wurden die spezifischen Enzymaktivitäten für die Oxidationen symmetrischer n-Alkylether mit dem prozentualen Verhältnis berechnet (Abb. 3-30). Dabei ergab die mit Di-hexylether oder Di-n-heptylether angeregte Sauerstoffaufnahme keinen Unterschied mit den unproduktiven Oxidationsraten von n-Alkanen. Di-n-hexylether oder Di-n-heptylether scheint nicht durch spezifische *O*-Dealkylierungsreaktion an der *O*-Methylengruppe abgebaut zu werden.

Es war aber unklar, wie die Zelle mit n-Alkanen eine konstante Sauerstoffaufnahme zeigte, und ob n-Alkane eventuelle unproduktiv oxidiert wurden. Lipophile Chemikalien bewirken manchmal eine Konformationsänderung der Zellmembran, und erhöhen eine grundsätzliche Zellatmung (Houslay & Stanley, 1982). Daher wäre die unproduktive Sauerstoffaufnahme mit n-Alkanen nicht auf die enzymatische Oxidation zurückzuführen. Im wesentlichen verwerteten die alipahtische Alkylether-abbauenden Stämme kein flüchtiges n-Alkan als einzige C/E-Quelle, wie z.B. n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, oder n-Octan.

Halogenierte aliphatische Alkylether dienten zum Wachstum nicht für alle aliphatische Alkylether-abbauende Stämme. Der Stamm DEE5151 konnte 2-Chlorethylethylether als einzige C/E-Quelle langsam verwerten. Nach der Anzucht mit Diethylether konnte er verschiedene halogenierte Diethylether-Derivate so schnell wie Di-n-propylether oxidieren (Tab. 3-29).

Einseitig-halogenierte Ethylether, wie z.B. 2-Bromethylethylether, 2-Chlorethylethylether und ±1,2-Dichlorethylethylether, wurden so schnell wie Di-n-propylether oxidiert. Im Vergleich dazu wurden beiderseitig-halogenierte Ethylether, wie z.B. Bis-(bromethyl)-ether und Bis-(chlorethyl)-ether, langsamer als einseitig-halogenierte Ethylether oxidiert. Die Oxidationsrate von Bis-(bromethyl)-ether und Bis-(chlorethyl)-ether war ähnlich miteinander. 2-Chlorethylphenylether wurde aber nicht or nur langsam oxidiert.

Tab. 3-29. Oxidationsmuster[1)] vom Stamm DEE5151 und sein Wachstumsvermögen[2)] mit Diethylether, Phenetol, und verschiedenen halogenierten Ethern

Testchemikalien [1 mM]	Diethylether	Phenetol	2-Chlorethylethylether	2-Bromethylethylether	± 1,2-Dichlorethylethylether	Bis-(2-Chlorethyl)-ether	Bis-(2-Bromethyl)-ether	2-Chlorethylphenylether
***pO_2* [nMole ml^{-1} min^{-1}]**	135	17	106	98	98	34	38	< 1
C/E-Quelle	+++	++	±	-	-	-	-	-

Anm.

1) Für die Sauerstoffaufnahmemessung wurden Testchemikalien bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die relative Sauerstoffaufnahmerate von ganzen Zellen [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} =1] wurde dadurch nach der Abstraktion der grunsätzlichen Zellatmung von der Substratatmung abgeschätzt, indem die beobachtete Sauerstoffaufnahme einheitlich mit der eingesetzten Biomasse (OD_{546} =1,0) umgerechnet wurde.
2) Die Konzentration jeder Testchemikalie betrug 3 ~ 5 mM beim Wachstumsversuch. +++: sehr gutes Wachstum, ++: gutes Wachstum, +: Wachstum, ±: vermutliches Wachstum, —: kein Wachstum im Vergleich zur negativen Wachstumskontrolle.

Daraus folgte, daß Ethylether mit mehreren halogenierten Ethylgruppen um so schwerer oxidiert wurden. Die hypothetische *O*-Dealkylase schien aliphatische Alkylether an der nicht-halogenierten Ethylgruppe primär zu oxidieren. Halogenatom neigt wegen seiner negativen Polarität dazu, Elektronen an sich heranzuziehen. Dadurch wird die Elektronendichte am *O*-Methylen-Cα-Atom in der halogenierten Ethylgruppe erniedrigt. Damit wurde gerechnet, daß die hypothetische *O*-Dealkylase bevorzugt ein *O*-Methylen-Cα-Atom mit einer hohen Elektronendichte attackiert.

Der Stamm DEE5151 besaß auch nach der Anzucht mit Diethylether hohe Oxidationspotentiale auf Alkohole und Glykole (Tab. 3-30). Außerhalb von Methanol verwertete er die meisten eingesetzten primären Alkohole als C/E-Quelle. Methanol wurde langsamer oxidiert als die anderen primären Alkohole. Glycerol wurde nur langsam oxidiert. Weder *tert*-Butanol noch Phenol wurde mit ganzen Zellen oxidiert.

Das Maximum Oxidationsrate lag zwischen Ethanol und 1-Propanol. Ethanol wurde am Maximum bei ca. pH 7,7 und 30ºC oxidiert (Abb. 3-31). Die Zelle oxidierte Ethanol unter der ähnlichen Bedingung für die Oxidation von Diethylether (vgl. Abb. 3-29).

Tab. 3-30. Oxidationsmuster[1)] vom Stamm DEE5151 mit Alkoholen und Glykolen

Testchemikalien (1 mM)	Diethylether	Alkohole								Glykole							Cyclohexanol	Benzylalkohol	Glycerol
		Methanol	Ethanol	1-Propanol	1-Butanol	± 2-Methyl-1-butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	2-Propanol	Ethylenglykol	1,3-Proandiol	1,2-Butandiol	1,4-Butandiol	*threo*-2,3-Butandiol	*erythro*-2,3-Butandiol	Diethylenglykol			
pO₂ **[nMole ml^{-1} min^{-1}]**	137	21	113	117	92	90	85	90	75	72	74	76	75	69	66	41	64,5	64	10

Anm.
Für die Sauerstoffaufnahmemessung wurden Testchemikalien bei einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Die relative Sauerstoffaufnahmerate von ganzen Zellen [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} =1] wurde dadurch nach der Abstraktion der grunsätzlichen Zellatmung von der Substratatmung abgeschätzt, indem die beobachtete Sauerstoffaufnahme einheitlich mit der eingesetzten Biomasse (OD_{546} =1,0) umgerechnet wurde.

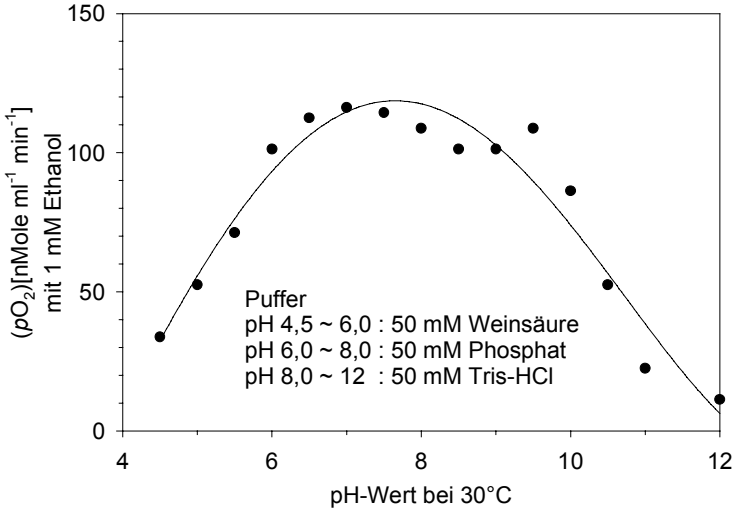


Abb. 3-31. pH-Optimum zur Oxidation von Ethanol mit ganzen Zellen (OD_{546} = 1) bei 30°C: Die Hungerzellen wurden nach der Anzucht mit Diethylether geerntet.

Die anderen primären Alkohole, wie z.B. 1-Butanol, 1-Pentanol, 1-Hexanol, und ±2-Methyl-1-butanol (2-Amylalkohol), wurden in ähnlicher Weise oxidiert. Außerhalb aliphatischer Alkohole wurden Benzylalkohol und Cyclohexanol so schnell wie 2-Propanol oxidiert. Sowohl sekundäre Alkohole, wie z.B. 2-Propanol und Cyclohexanol, als auch Monoglykole, wie z.B. Ethylenglykol, 1,3-Propandiol, 1,2-Butandiol, 1,4-Butandiol, *threo*-2,3-Butandiol und *erythro*-2,3-Butandiol, ergaben eine ähnliche Oxidationsrate, die im Vergleich zur 100 %igen Ethanol-Oxidation ca. 63 % betrug.

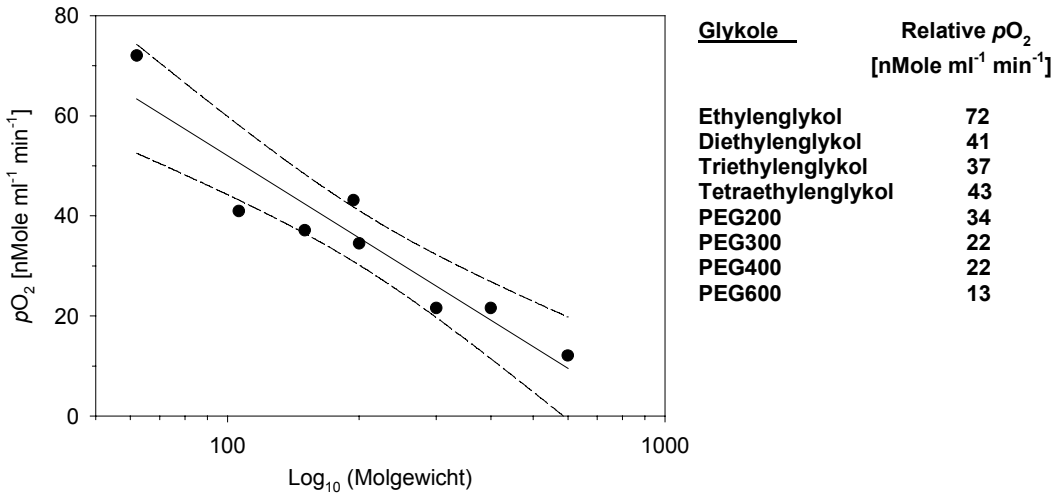


Abb. 3-32. Oxidationstendenz von Glykolen mit ganzen Zellen vom Stamm DEE5151: Die Hungerzellen wurden nach der Anzucht mit Diethylether geerntet. Die Oxidationskurve korrelierte negativ mit dem Logarithmus der Molekülmasse von Glykolen bei einer statistischen Konfidenz von 95%

Die Oxidationsrate neigte dazu, mit zunehmender Kettenlänge von verschiedenen Glykolen wie z. B. Ethylenglykolen (-O-(CH_2CH_2-O)$_n$-) abzunehmen. Die Oxidationsrate korrelierte negativ mit Logarithmus der Molekülmasse von Glykolen (Abb. 3-32).

Kein einfaches Glykol, wie z.B. Ethylenglykol oder Diethylenglykol, diente zum Wachstum für die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme. Wahrscheinlich oxidierte die hypothetische Alkohol-Oxidase Glykole an der terminalen Hydroxylgruppe zu Aldehyden und Carbonsäuren, ohne die Kettenlänge abzukürzen.

Wie Kawai (1985) behauptet hat, benötigte die Zelle ein zusätzliches Enzymsystem, die sogenannte *O*-Decarboxymethylase, um die Folgeprodukte, wie z.B. Glykolsäure, weiter abzubauen (siehe Abb. 1-2B in Kapitel 1). Die Induktion der Alkohol-Oxidase war nicht konstitutiv, sondern diese Enzymaktivität war nur mit Diethylether oder Ethanol bewerkstelligt (Abb. 3-33). Wurde Diethylether durch eine *O*-Dealkylierungsreaktion stöchiometrisch zu Acetaldehyd und Ethanol umgesetzt, könnte die Alkohol-Oxidase tatsächlich nicht mit Diethylether, sondern mit den Abbauprodukten von Diethylether, wie z.B. mit Ethanol, induziert werden.

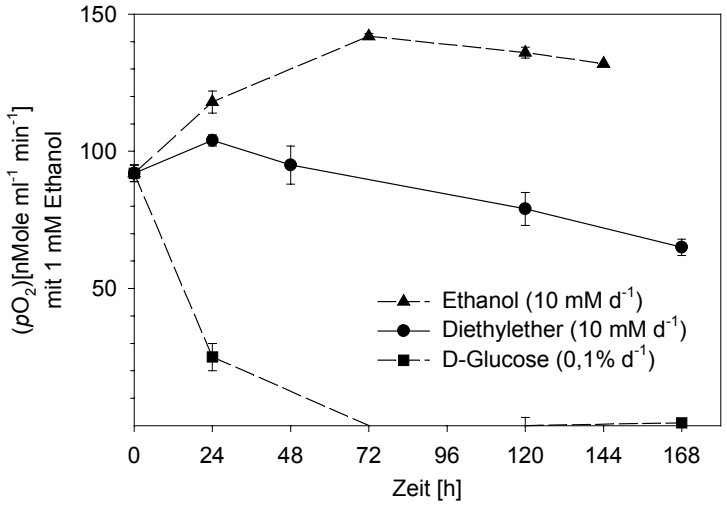


Abb. 3-33. Relative Oxidationsrate [nMole ml^{-1} min^{-1}] von Ethanol während des Wachstunsverlaufes vom Stamm DEE5151: Jede Zellkultur wurde mit täglicher Zugabe von Diethylether, Ethanol, oder D-Glucose semi-kontinuierlich inkubiert. Für die Messung der Sauerstoffaufnahme mit ganzen Zellen (OD_{546} = 1) wurde 100 ml Portion jeder Zellkultur abzentrifugiert. Die Zellpaste wurde in 50mM Phosphat Puffer (pH 7,2) suspendiert, und 2 Stunden lang bei 30°C geschüttelt. Die Hungerzellen wurden nach der anderen Abzentrifugierung geerntet.

3.3.3.2. Spezifische Hemmungen von der *O*-Dealkylase und der Alkohol-Oxidase zur kinetischen Untersuchung

Aus der Bertachtung der Oxidationspotentiale vom Stamm DEE5151 auf verschiedene Ether und Alkohole her, wurde hypothetisch postuliert, daß zwei Schlüsselenzyme, nämlich die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase, am Abbau der Etherchemikalien eine Hauptrolle spielen. In dieser Arbeit ergab sich jedoch keine Enzymaktivität direkt nach dem Zellausschluß mit verschiedenen Mothoden, wie z.B. mit dem French-Press, der Ultrasonikation, dem osmotischen Druckgefälle gegen 20%ige Saccharose, oder mit der Chlorform-Extraktion bei Ab-/Anwesenheit von Detergens (z.B. 1%igem Deoxycholat oder Triton X-100). Die beiden Enzymaktivitäten von der *O*-Dealkylase und der Alkohol-Oxidase gingen aus der Zelle sogar unter anoxischen Bedingungen schnell verloren.

Verschiedene Hemmstoffe wurden mit ganzen Zellen galvanisch untersucht, um die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase spezifisch zu hemmen (Tab. 3-31). Daraus fand man, daß Glutaraldehyd und Ethylvinylether die beiden *O*-Dealkylase und Alkohol-Oxidase spezifisch hemmten.

Tab. 3-31. Die untersuchten Chemikalien[1)] zur spezifischen Hemmung von der *O*-Dealkylase oder der Alkohol-Oxidase vom Stamm DEE5151

Klasse[2)]	Chemikalien[3)]
Schwermetall-Ionen	Arsenit, Kadmium, Kobalt, Quecksilver, Nickel, Selenium
Metallchelator	Oxalat, Milchsäure, Fumarat, Succinat, Zitronensäure, EDTA, 1,10-Phenanthroin,
Hemmstoffe gegen Cytochrome	Azid, Cyanid, Kohlenmonoxid
Ether als Analoga[4)]	Ethylvinylether, Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, 2,3-Dihydro-furan, 2,5-Dihydrofuran, 3,4-Dihydro-2H-pyran, Furan
Aldehyde	Formaldehyd, Glyoxal, Glutaraldehyd

Anm.

1) Die Hemmwirkung einer zusätzlichen Chemikalie auf die hypothetische *O*-Dealkylase oder Alkohol-Oxidase wurde jeweils in Gegenwart von 1 mM Diethylether oder 1 mM Ethanol untersucht.
2) Die verwendeten Chemikalien wurden nach ihren chemischen Eigenschaften und bekannten biochemischen Hemmwirkungen in 5 Klassen beliebig eingeordnet.
3) Bevor Zugabe von 1 mM Diethylether oder 1 mM Ethanol zeigte die mit 1 mM Hemmstoff 5 min versetzten Ruhezellen die grundsätzliche Zellatmung. Wenn eine zugegebene Chemikalie auf die *O*-Dealkylase oder die Alkohol-Oxidase signifikant hemmend wirkte, wurde sie erst als einen vermutlichen Hemmstoff gehalten. Bei verschiedenen Konzentrationen an diesem vermutlichen Hemmstoff wurde die spezifische Oxidationsrate von Diethylether oder Ethanol bestimmt, um ihre spezifische Hemmwirkung festzustellen.
4) Als Hemmstoffe sollten struktuelle Analoga sollten mit ganzen Zellen vom Teststamm nicht (nur wenig) oxidiert werden (siehe Tab. 3-33)

In der ′steady-state′ Enzymkinetik geht es oft um die hyperbolische oder sigmoide Enzymreaktion (Wong, 1965). Ein-Substrat-Reaktion weist eine hyperbolische Gestalt mit zunehmender Konzentration an Substrat [*S*] auf. Diese Reaktionskurve wird mit den zwei kinetischen Konstanten, sog. dem Maximum Reaktionsgeschwindigkeit, V_{max}, und der Michaelis-Menten Konstanten, K_M, nach der Gleichung (3.3) hyperbolisch dargestellt (Price & Stevens, 1989).

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \qquad (3.3)$$

Wenn ein allosterisches Enzym, das normalerweise aus mehreren Untereinheiten besteht, mit dem Substrat reagiert, weist die Reaktionskurve keine hyperbolische, sondern eine sigmoide Gestalt auf. Die sigmoide Reaktion beruht auf die kooperative (allosterische) Wechselwirkung zwischen den *n*-Untereinheiten. Diese kooperative Wechselwirkung wird mit dem Koeffizienten, *h*, dessen Größe

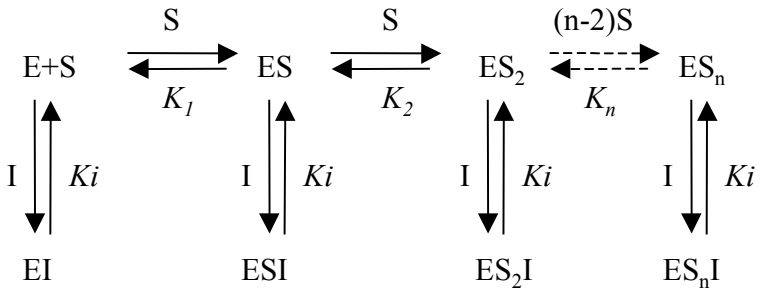
normalerweise über Eins und niedriger als die Unterheitszahl (n) liegt ($1 < h < n$), nach der Gleichung (3.4) kinetisch dargestellt, (Hill et al., 1977).

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]^h}{K \quad + [S]^h} \qquad (3.4)$$

Aus den Modellgleichungen (3.3) und (3.4) werden bisher verschiedene kinetische Modellgleichungen abgeleitet, um reale Enzymreaktionen so genau wie möglich darzustellen. Weil in dieser Arbeit aber keine zellfreie Enzymaktivität von der *O*-Dealkylase oder der Alkohol-Oxidase hergestellt wurde, sollte die Enzymkinetik mit ganzen Zellen bis zu einem gewissen Grad spekulativ sein.

Die Zelle galt als ein Komplexsystem, das unzählbare zusammenwirkende Komponenten enthielt. Wegen des Mangels an Vorkenntnissen über die Enzymstruktur, wurde vorausgesetzt, daß ein Enzym aus n-Untereinheiten besteht, und daß jede Enzymfraktion, K_n (n = 1, 2, 3, …), zum Substrat eigene Affinität hat. In der ganzen Reaktion erhält sich die initial gegebene Enzymmenge, $[E]_0$, konstant. Nur wenn die Enzymreaktion eine hyperbolische Gestalt aufwies, könnte man annehmen, daß jede Untereinheit die gleiche Affinität ohne allosterische Wechselwirkung hat. In diesem Fall sollte die Enzymreaktion der Ein-Substrat-Reaktion folgen ($h = 1$).

Unter den Voraussetzungen wurde die Enzymreaktion mit dem Substrat [S] in Gegenwart eines Hemmstoffes [I] im folgenden Schema dargestellt, wobei die Hemmkonstante, K_i, für jeden Enzym-Substrat-Komplex, ES_i (i = 0,1,2, …,n), gleichwertig war.



Tab. 3-32. Modellgleichungen[1)], mit denen die mit ganzen Zellen untersuchten Ezymreaktionen bei Anwesenheit eines Inhibitors kinetisch dargestellt wurden

Gestalt	Hemmungstyp[1)]	Parameter in Gegenwart eines Inhibitors				Gleichungen[2)]
		V_{max}	K	V_{max}/K	h	
Hyperbolisch	Kompetitiv	konstant	zunimmt	abnimmt	1	$v=\frac{V_{max}\times[S]}{K_M(1+\frac{[I]}{K_{Ei}})+[S]}$ Gl. (3.6)
	Nicht-kompetitiv	abnimmt	konstant	abnimmt	1	$v=\frac{V_{max}\times[S]}{K_M(1+\frac{[I]}{K_{Ei}})+[S](1+\frac{[I]}{K_i})}$ Gl. (3.7)
	Unkompetitiv	abnimmt	abnimmt	konstant	1	$v=\frac{V_{max}\times[S]}{K_M+[S](1+\frac{[I]}{K_i})}$ Gl. (3.8)
	Gemischt	variabel			1	$v=\frac{V_{max}\times[S]^h}{K(1+\frac{[I]}{K_i})^n+[S]^h(1+\frac{[I]}{K_i})}$ Gl.(3.5)
Sigmoid	Negative Kooperativität	variabel			< 1	
	Positive Kooperativität	variabel			> 1	

Anm.

1) Aus diesen Hemmungstypen gilt die Bindung eines Hemmstoffes am Enzym für reversibel

2) v, spezifische Reaktionsgeschwindigkeit; V_{max}, Maximum Reaktionsgeschwindigkeit; K_M, Michaelis-Menten-Konstante; K, Reaktionskonstante; K_I, Hemmkonstante eines Hemmstoffes; $[S]$, Substratkonzentration; $[I]$, Inhibitorkonzentration; h, Hill-Koeffizient

Demzufolge wurde die kinetische Gleichung (3.5) zur Darstellung einer Enzymreaktion von ganzen Zellen bei Ab-/Anwesenheit eines Inhibitors modelliert.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]^h}{K(1+\frac{[I]}{K_i})^n + [S]^h(1+\frac{[I]}{K_i})} \qquad (3.5)$$

wobei die Reaktionskonstante, K, entweder die Michaelis-Menten-Konstante, K_M, in der Ein-Substrat-Reaktion (wenn $h = 1$) oder den Gleichgewichtskoeffizienten zwischen den aktiven und inaktiven Formen eines allosterischen Enzymes (wenn $h \neq 1$) meinte.

Der rechtsseitige Wert $(1+[I]/K_i)$ im Nenner bedeutet ursprünglich die Hemmung vom Enzym-Substrat-Komplex, [ES], in nicht- bzw. unkompetitiver Weise, wodurch sich das Maximum Reaktionsgeschwindigkeit, V_{max}, erniedrigt (Cornish-Bowden, 1974). Der linksseitige Wert $(1+[I]/K_i)^n$ im Nenner zeigt die Hemmwirkung eines Inhibitors auf einen allosterischen Enzym an (Spain, 1982).

Nach dem hypothetischen Symmetriemodell zeigt jeder Enzym-Substrat-Komplex, ES_i (i = 1,2,…,n), von einem allosterischen Enzym in Gegenwart eines Inhibitors eine negative Affinität zum Substrat (Stryer, 1990). In der Ein-Substrat-Reaktion zeigt hingegen der Enzym keine allosterische Wechselwirkung an. Deshalb liegt die Faktorzahl, n, bei Null oder Eins. Wenn die Faktorzahl Eins ist, ist der linksseitige Wert, $(1+[I]/K_{Ei})$, dasselbe im Hemmeffekt auf die erste Enzymfraktion [E], die mit Substrat nicht gebunden ist (Price & Stevens, 1989).

Zusammenfassend damit werden verschiedene kinetische Modellgleichungen, die aus der Gleichung (3.5) abgeleitet werden, in der Tabelle 3-32 tabellarisiert.

3.3.3.3. Hemmwirkung des Glutaraldehydes auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase

Die Enzymaktivitäten von ganzen Zellen für die Oxidation von Diethylether und Ethanol nahmen in Gegenwart von Glutaraldehyd (Pentandial) stark ab.

Glutaraldehyd wurde mit ganzen Zellen bis zu 30 µM hyperbolisch oxidiert. Die Oxidationsrate nahm aber ab, wenn die Konzentration an Glutaraldehyd über 30 µM betrug. Die Oxidationskurve wies eine typische Substrat-Hemmung nach der Gleichung (2.8) auf (Abb. 3-34). Daraus wurde die Hemmkonstante (K_{SI}) des Glutaraldehydes mit 72 µM abgeschätzt. Glutaraldehyd ist ein Membranfixiermittel, das in der Mikroskopie oder in der Membrankristallographie üblich verwendet wird. Damit werden Membranproteine ohne Änderung der quaternären Strukturen stabilisiert (Tranum-Jensen, 1988).

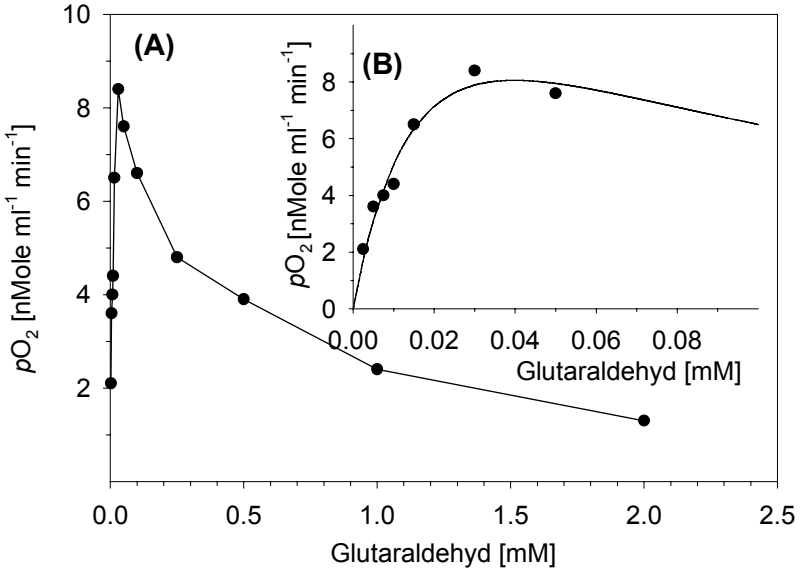


Abb. 3-34. (A) Hemmwirkung des Glutaraldehydes von 2,5 µM bis 2,0 mM. (B) Die Vergrößerung eines Ausschnittes von Null bis 100 µM Glutaraldehyd: Die Oxidationskurve wurde mit der Hemmkonstante von 72 µM nach dem Substrat-Hemmungsmodell (Gl. 2.8) bestens dargestellt.

Ähnlich wirksamer Stoff, wie z.B Formaldehyd oder Glyoxal, hemmte aber weder O-Dealkylase noch Alkohol-Oxidase bis zu 10 mM. Die Hemmwirkungen des Glutaraldehydes auf die O-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase schienen daher spezifisch zu sein.

Die hyperbolischen Diethylether-Oxidationskurven wurden bei Ab-/Anwesenheit von Glutaraldehyd mit der Gleichung (3.3) angepaßt (Abb. 3-35). Ohne Glutaraldehyd betrugen das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{\max}$, und der Halbsättigungsgrad, K_m, jeweils 148 nMole ml^{-1} min^{-1} und 7,81 µM. Mit zunehmender Konzentration an Glutaraldehyd nahm der Halbsättigungsgrad um so mehr zu, wobei das Maximum Oxidationsrate konstant aussah. Die Hemmwirkung des Glutaraldehydes auf die *O*-Dealkylase schien kompetitiv zu sein. Zur kinetischen Darstellung dieser kompetitiven Hemmung wurde die kinetische Modellgleichung (3.9) aus der Gleichung (3.6) modifiziert.

$$pO_2 = \frac{(pO_2)_{\max}[S]}{K_M\left[1+\frac{[I]}{K_{Ei}}\right]+[S]} \qquad (3.9)$$

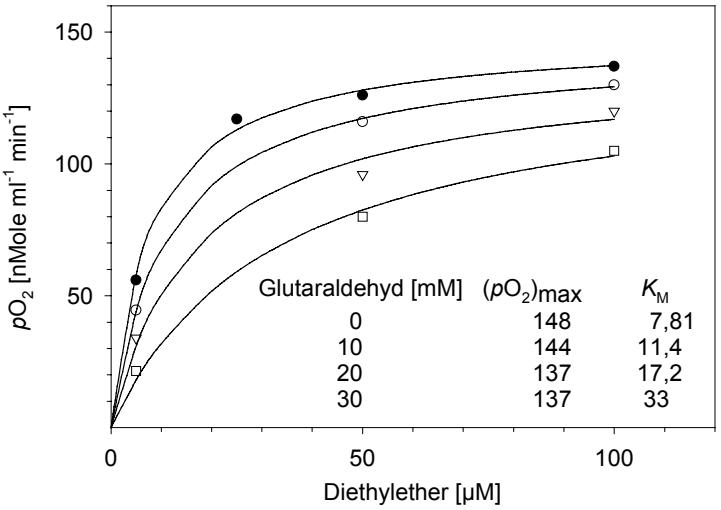


Abb.3-35. Hemmwirkung des Glutaraldehydes auf die hypothetische *O*-Dealkylase bei der Oxidation von Diethylether mit ganzen Zellen (OD_{546} = 1): Bei einer Konzentration von Null, 10, 20 und 30µM an Glutaraldehyd wurden die Diethylether-Oxidationskurven nach der Modellgleichung (3.3) mit dem Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, und der Michaelis-Menten Konstanten , K_M, dargestellt.

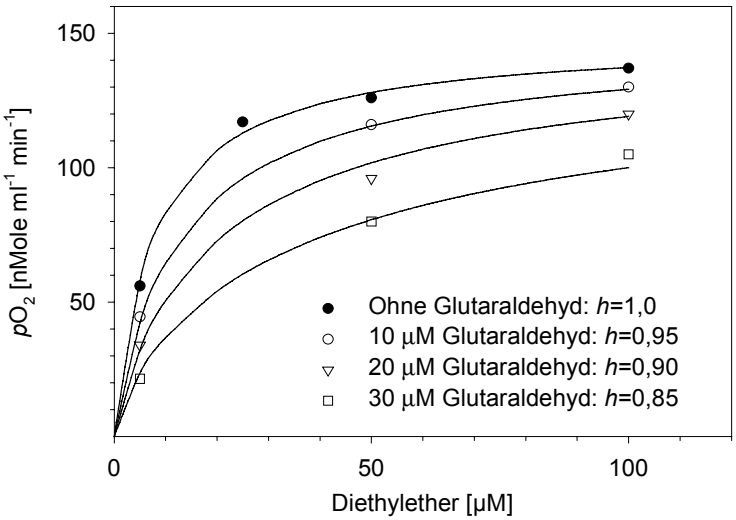


Abb. 3-36. Nicht-lineare Anpassungen der Diethylether-Oxidationskurven mit der Gleichung (3.10) bei Ab-/Anwesenheit von Glutaraldehyd: Aus der nicht-linearen Anpassung wurden die kinetischen Konstanten, $(pO_2)_{max}$, K, und K_i, jeweils mit 148 nMole ml^{-1} min^{-1}, 17,81, und 20,8 µM abgeschätzt.

Die realen Messungen wurden aber mit dem kompetitiven Hemmungsmodell (Gl. 3.9) nicht genau dargestellt. Wurde der Koeffizient, *h*, wie in einer allosterischen Reaktion, in die Gleichung (3.10) eingeführt, wurden die Diethylether-Oxidationskurven durch nicht-lineare Anpassung am besten dargestellt. Die Hemmwirkung des Glutaraldehydes auf die *O*-Dealkylase wurde mit der Hemmkonstante, K_i, von 20,8 µM abgeschätzt (Abb. 3-36).

$$pO_2 = \frac{(pO_2)_{\max}[S]^h}{K\left[1+\frac{[I]}{Ki}\right]+[S]^h} \qquad (3.10)$$

Das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, und die Reaktionskonstante, *K*, wurden jeweils mit 148 nM ml^{-1} min^{-1} und 17,81 abgeschätzt. Aus der nicht-linearen Anpassung fand man, daß Glutaraldehyd auf die *O*-Dealkylase eine negative Kooperativität bewirkte. Der Koeffizient, *h*, nahm mit zunehmendem Glutaraldehyd negativ proportional ab. Ohne Glutaraldehyd war aber die Oxidationskurve von Diethylether genau so hyperbolisch ($h = 1$). Vermutlich hemmte Glutaraldehyd keine *O*-Dealkylase am Aktivzentrum kompetitiv, sondern verursachte eine Konformationsänderung von der *O*-Dealkylase. Dadurch erniedrigte sich die Enzymaffinität zum Diethylether erheblich.

Die Ethanol-Oxidation durch ganze Zellen folgte dem sigmoiden Modell (Gl. 3.11). Die Alkohol-Oxidase zeigte eine allosterische Wechselwirkung mit zunehmender Konzentration an Ethanol [*S*] an (Abb. 3-37).

$$pO_2 = \frac{(pO_2)_{\max} \times [S]^h}{K \quad +[S]^h} \qquad (3.11)$$

Nach der Modellgleichung (3.11) wurden das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max,}$ und der Koeffizient, *h*, bei Abwesenheit von Glutaraldehyd jeweils mit 138 nMole ml^{-1} min^{-1} und 1,35 abgeschätzt. Der Koeffizient, *h*, stieg mit zunehmendem Glutaraldehyd ungewöhnlich an, d.h., die allosterische Wechselwirkung der Alkohol-Oxidase war bei Anwesenheit von Glutaraldehyd größer als bei der Abwesenheit. Die Alkohol-Oxidase könnte aus mindestens vier Untereinheiten (Tetramer) bestehen, da der Koeffizient, *h*, normalerweise kleiner als die Untereinheitszahl des allosterischen Enzymes liegt.

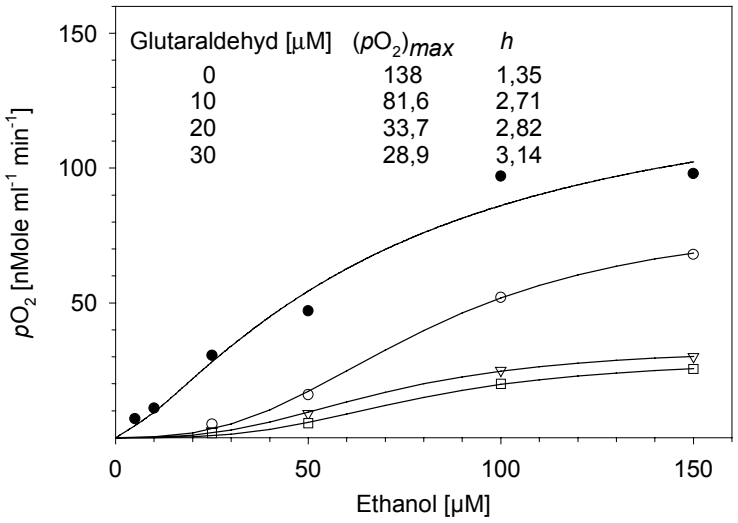


Abb.3-37. Hemmwirkung des Glutaraldehydes auf die hypothetische Alkohol-Oxidase bei der Oxidation von Ethanol mit ganzen Zellen (OD_{546}=1): Bei einer Konzentration von Null, 10, 20 und 30 µM an Glutaraldehyd wurden die angegebenen kinetischen Konstanten $(pO_2)_{max}$, und *h* jeweils nach der Modellgleichung (3.11) berechnet.

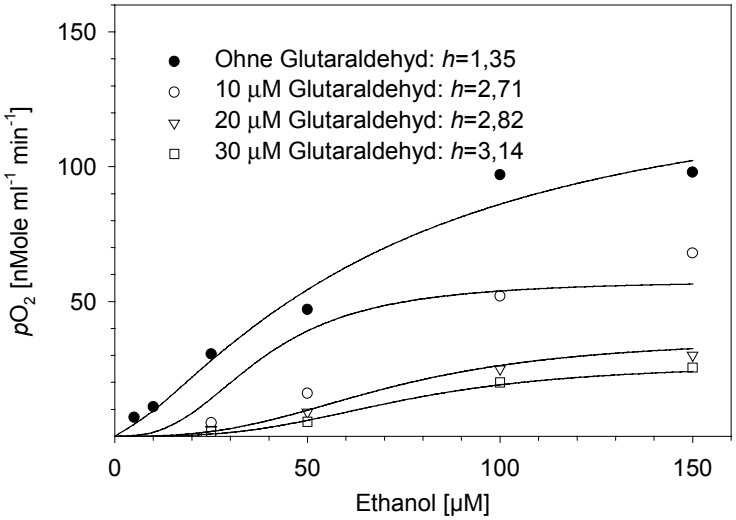


Abb.3-38. Nicht-lineare Anpassungen der Ethanol-Oxidationskurven mit der Gleichung (3.12) bei Ab-/Anwesenheit von Glutaraldehyd: Aus der nicht-linearen Anpassung wurden die kinetischen Konstanten, $(pO_2)_{max}$, *K*, und K_i, sowie die Faktorzahl, *n*, jeweils mit 138 nMole ml^{-1} min^{-1}, 302, 7,2 µM und 5,77 abgeschätzt.

Geringes Glutaraldehyd (10 µM) war genug, um das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, zu erniedrigen, und um hingegen die Reaktionskonstante, *K*, zu erhöhen. Damit setzte Glutaraldehyd die Enzymaffinität zum Ethanol stark herab. Aus dem abnormalen Hemmungstyp wurde vermutet, daß Glutaraldehyd die Alkohol-Oxidase nicht allosterisch hemmt, sondern daß es sich ans Aktivzentrum von der Alkohol-Oxidase binden kann, um die Alkohol-Oxidase irreversibel zu hemmen. Es wurde aber unklar, ob Glutaraldehyd durch irreversible Bindung am Aktivzentrum die Alkohol-Oxidase inaktiviert.

Die realen Meβpunkte wurden mit der komplexen Modellgleichung (Gl. 3.12) bestens dargestellt, wobei die Ergänzung von der Faktorzahl, *n*, die Hemmwirkung des Glutaraldehydes auf die allosterische Alkohol-Oxidase klar machte.

$$pO_2 = \frac{(pO_2)_{\max}[S]^h}{K\ (1+\frac{[I]}{K_i})^n + [S]^h(1+\frac{[I]}{K_i})} \qquad (3.12)$$

Wurden die Ethanol-Oxidationskurven nach der Modellgleichung (3.12) dargestellt, betrugen die Hemmkonstante des Glutaraldehydes, K_i, das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, und die Reaktionskonstante, *K*, jeweils 7,2 µM, 138 nMole ml^{-1} min^{-1} und 302 abgeschätzt. In diesem Vesuch weichte die in Gegewart von 10 µM Glutaraldehyd untersuchte Ethanol-Oxidationskurve aus der nicht-linearen Anpassung mit den oben genannten kinetischen Parametern ab (Abb. 3-38). Nach der allosterischen Wechselwirkung von der Alkohol-Oxidase wurde die Faktorzahl, *n*, mit 5,77 abgeschätzt. Vorausgesetzt, daß sich Glutaraldehyd an jeder Untereinheit von der Alkohol-Oxidase spezifisch binden kann, wird die Alkohol-Oxidase vermutlich aus sechs Untereinheiten zusammengesetzt (Hexamer).

3.3.3.4. Hemmwirkung des Ethylvinylethers auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase

Ethylvinylether ist ein Strukturanalogon von Diethylether. Nach der Anzucht mit Diethylether oxidierte der Stamm DEE5151 keinen Ethylvinylether. Keine *O*-Dealkylase beteiligte sich am Abbau von Ethylvinylether.

Ethylvinylether hemmte nicht nur die *O*-Dealkylase, sondern auch reprimierte die Induktion trotz des Vorhandenseins von Diethylether in Kuturmedien (Abb. 3-39A). Der Stamm DEE5151 wuchs mit einem Gemisch von Diethylether und Ethylvinylether (1:1, v/v) so ähnlich wie nur mit Ethylvinylether. Wäre die lineare Wachstumsrate generell auf die lineare Abbaurate von Substrat

zurückzuführen, würde Ethylvinylether linear abgebaut. Es wurde vermutet, daß der primäre Abbau von Ethylvinylether nicht enzymatisch geschah.

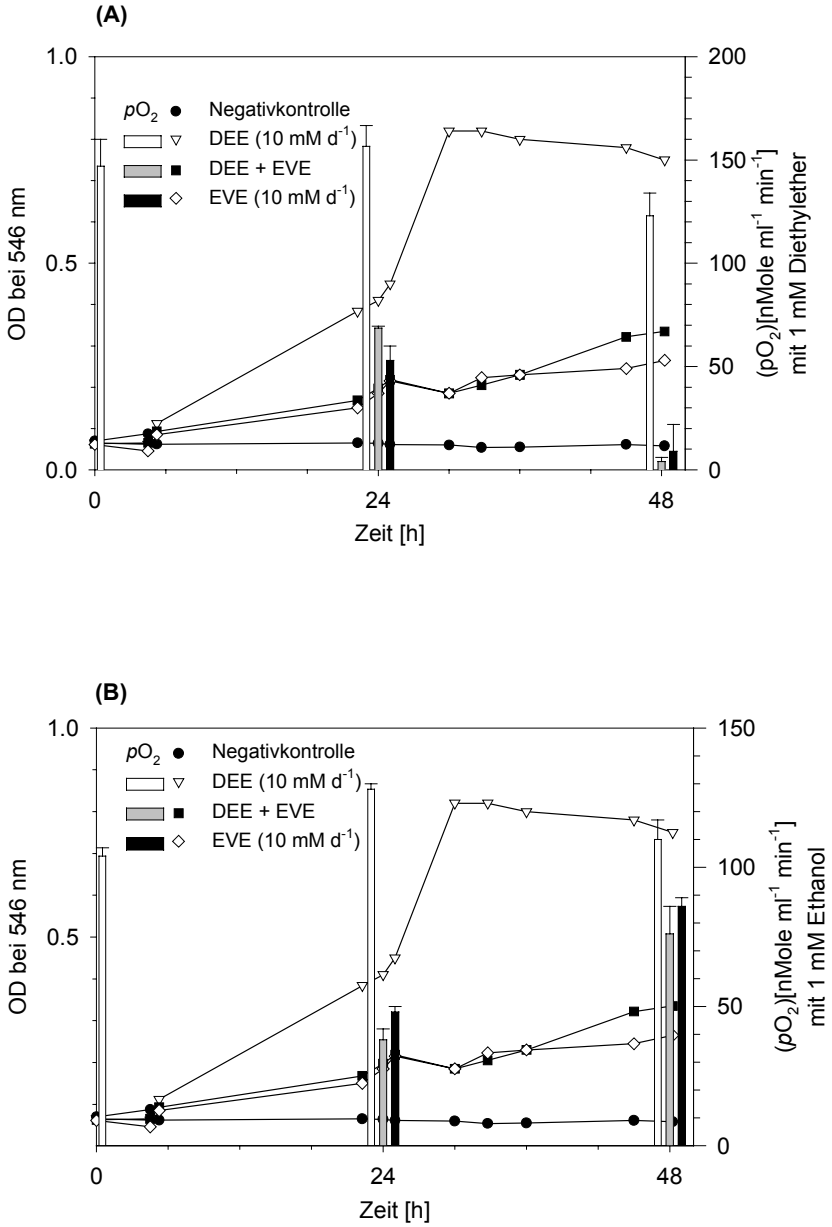


Abb. 3-39. Hemmende Effekte des Ethylvinylethers auf (A) die O-Dealkylase und (B) die Alkohol-Oxidase vom Stamm DEE5151 während der Wachstumsläufe (Linien) mit Diethylether (DEE) oder/und Ethylvinylether (EVE): 100 ml Portion jeder Zellkutur wurde am Anfang, 24 und 48 Stunden nach Versuchsbeginn auf Probe genommen. Die Sauerstoffaufnahme (Tafeln) wurde jeweils in Gegenwart von **(A)** 1 mM Diethylether oder **(B)** 1 mM Ethanol mit ganzen Zellen untersucht.

Während des Stoffwechsels von Ethylvinylether nahm auch die mit Diethylether induzierte Alkohol-Oxidaseaktivität stark ab, aber diese Enzymaktivität stieg wieder an, wenn sich die *O*-Dealkylaseaktivität in der Zellkultur gut erniedrigte (Abb. 3-39B). Ethylvinylether scheint direkt keine Alkohol-Oxidase zu hemmen, d.h., die Hemmwirkung des Ethylvinylethers auf die Alkohol-Oxidase wurde vermutlich aus der Hemmung (z.B. Konformationsänderung) der benachbarten *O*-Dealkylase hervorgebracht. Daher hemmte Ethylvinylether die *O*-Dealkylase direkt, und die Alkohol-Oxidase indirekt.

2,3-Dihydrofuran übte auch eine ähnliche Hemmwirkung auf die beiden Enzyme aus (Tab. 3-33). Ethylvinylether und 2,3-Dihydrofuran besitzen eine chemisch ähnliche Eigenschaft für eine Cα-Cβ-Doppelbindung neben dem Sauerstoffatom. Ihre spezifische Hemmeffekte auf die *O*-Dealkylase sind wahrscheinlich in Zusammenhang mit dieser chemischen Eigenschaft.

Tab.3-33. Hemmwirkung von Substratanaloga[1)] auf die hypothetische *O*-Dealkylase bei der Oxidation von Diethylether mit ganzen Zellen

Testbedingung: Diethylether [1 mM] ohne oder 5 min nach Zugabe eines Analogons bei einer Konzentration von 1 mM	Diethylether	Diethylether + Analoga [2)]						
		Ethylvinylether	2,3-Dihydrofuran	2,5-Dihydrofuran	3,4-Dihydropyran	Furan	Tetrahydrofuran	Tetrahydropyran
pO_2 [nMole ml^{-1} min^{-1}] [3)]	113	5	11	107	114	111	110	113

Anm.

1) Die verwendeten Substratanaloga alleine ergaben keine (nur wenige) initiale Sauerstoffaufnahme mit ganzen Zellen.
2) Testzellen wurden bevor Zugabe des Diethylethers mit einem Analogon (1 mM) 5 Minuten versetzt.
3) Bevor Zugabe des Diethylethers wurde die initiale Sauerstoffaufnahme der mit einem Analogon 5 Min. versetzten Zellen als die grundsätzliche Zellatmung bestimmt. Die Substratatmung wurde mit der Zugabe von 1 mM Diethylether bestimmt. Die relative Sauerstoffaufnahme wurde dadurch abgeschätzt, daß die beobachte Sauerstoffzehrung einheitlich mit der eingesetzten Biomasse (OD_{546} = 1) umgerechnet wurde.

Ähnlich wie Ethylvinylether und 2,3-Dihydrofuran besitzt 3,4-Dihydro-2H-pyran eine Cα-Cβ-Doppelbindung neben dem Sauerstoffatom, aber es hemmte keine *O*-Dealkylase. Vermutlich hatte die *O*-Dealkylase keine Affinität zum 3,4-Dihydro-2H-pyran. Furan, das zwei Cα-Cβ-Doppelbindungen beiderseits vom Sauerstoffatom besaß, übte auch keinen Einfluß auf die *O*-Dealkylase aus. Die Cα-Cβ-Doppelbindungen verliehen ihm wahrscheinlich andere chemische Bindungscharaktere durch aromatische Konjugation von π-Elektronen. Andere getestete struktuelle Analoga, wie z.B. 2,5-Dihydrofuran, Tetrahydrofuran, und Tetrahydropyran, übten jedenfalls keine Hemmwirkung auf die *O*-Dealkylase aus.

Davon war Ethylvinylether für die spezifischen Hemmungen von der *O*-Dealkylase und der Alkohol-Oxidase sehr wirksam, und seine Hemmwirkung ist von besonderem Interesse wegen struktueller Ähnlichkeit mit Diethylether. Im Vergleich zu Glutaraldehyd bewirkte Ethylvinylether die anderen Hemmwirkungen auf die beiden Enzyme.

In Gegenwart von Ethylvinylether sah die Kinetik für die Oxidation von Diethylether mit ganzen Zellen gemischt aus. Ethylvinylether erniedrigte das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, und erhöhte hingegen den Halbsättigungsgrad, K_M (Abb. 3-40). Aus der abnormalen Enzymkinetik wurde vermutet, daß Ethylvinylether die *O*-Dealkylase irreversibel inaktivierte.

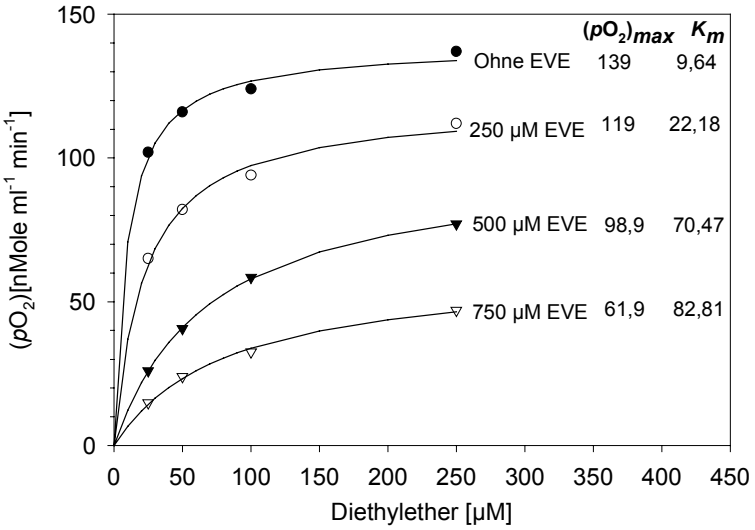


Abb. 3-40. Hemmwirkung des Ethylvinylethers (EVE) auf die hypothetische *O*-Dealkylase bei der Oxidation von Diethylether mit ganzen Zellen (OD_{546}=1): Die angegebenen kinetischen Konstanten, $(pO_2)_{max}$ und K_m, wurden jeweils bei einer Konzentration von Null, 250, 500 und 750 µM an Ethylvinylether nach der Gleichung (3.3) abgeschätzt.

Um die Hemmwirkung des Ethylvinylethers auf die *O*-Dealkylaseaktivität darzustellen, wurde die Modellgleichung (3.13) aus der Gleichung (3.5) modifiziert.

$$pO_2 = \frac{(pO_2)_{\max}[S]}{K\ (1+\frac{[I]}{K_i})^n + [S](1+\frac{[I]}{K_i})} \qquad (3.13)$$

Aus der nicht-linearen Anpassung von den Diethylether-Oxidationskurven wurden das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, und die dimensionslose Reaktionskonstante, K, jeweils mit 139 nMole ml^{-1} min^{-1} und 9,64 abgeschätzt. Wurden damit die Faktorzahl, n, und die Hemmkonstante, K_i, jeweils mit 5,64 und 1113 µM abgeschätzt, wurden die realen Meβpunkte bei jeder Konzentration von Null, 250, 500 und 750 µM an Glutaraldehyd mit dem kinetischen Modell (Gl. 3.13) bestens dargestellt (Abb. 3-41).

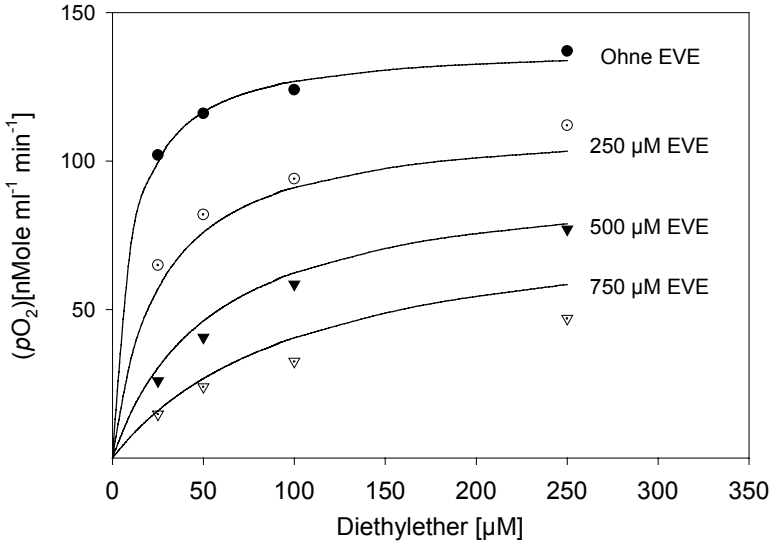


Abb. 3-41. Nicht-lineare Anpassungen der Diethylether-Oxidationskurven mit der Gleichung (3.13) bei Ab-/Anwesenheit von Ethylvinylether (EVE): Die besten Anpassungen ergaben sich mit den jeweiligen kinetischen Konstanten, $(pO_2)_{max}$, K, K_i, und n, von 139 nMole ml^{-1} min^{-1}, 9,64, 1113 µM und 5,64.

Die *O*-Dealkylaseaktivität wies keine allosterische Wechselwirkung für die Oxidation von Diethylether bei Ab-/Anwesenheit von Ethylvinylether auf, d.h., Ethylvinylether wirkte darauf nicht allosterisch, während Glutaraldehyd für Oxidation von Diethylether eine negative Kooperativität (h < 1) aufwies (vgl. Abschnitt 3.3.3.3). Vermutlich ging die sich in Gegenwart von Glutaraldehyd ergebene negative Kooperativität nicht aus der allosterischen Wechselwirkung von der *O*-Dealkylase hervor, sondern aus der Konformationsänderung der in der Zelle benachbarten Zellkomponenten, wie z.B. die Alkohol-Oxidase, die Glutaraldehyd direkt hemmte bzw. inaktivierte. Das setzte endlich die Affinität von der *O*-Dealkylase zum Diethylether mittelbar herab.

Bei Ab-/Anwesenheit von Ethylvinylether wiesen die Ethanol-Oxidationskurven, die nach der Gleichung (3.5) dargestellt wurden, jedenfalls eine sigmoide Gestalt auf. Das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, war konstant, aber die Reaktionskonstante, K, und die sogenannte Hill-Konstante, h, erniedrigten sich in Gegenwart von Ethylvinylether. Ethylvinylether beteiligte sich mittelbar daran, die Enzymaffinität zum Ethanol herabzusetzen (Abb. 3-42).

Die realen Meβpunkte wurden nach dem kompetitive Hemmungstyp (Gl. 3.10) bestens dargestellt (Abb. 3-43). Die Hemmkonstante, K_i, das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, und der Koeffizient, h, jeweils mit 55,7 µM, 75,4 nMole ml^{-1} min^{-1} und 2,34 abgeschätzt.

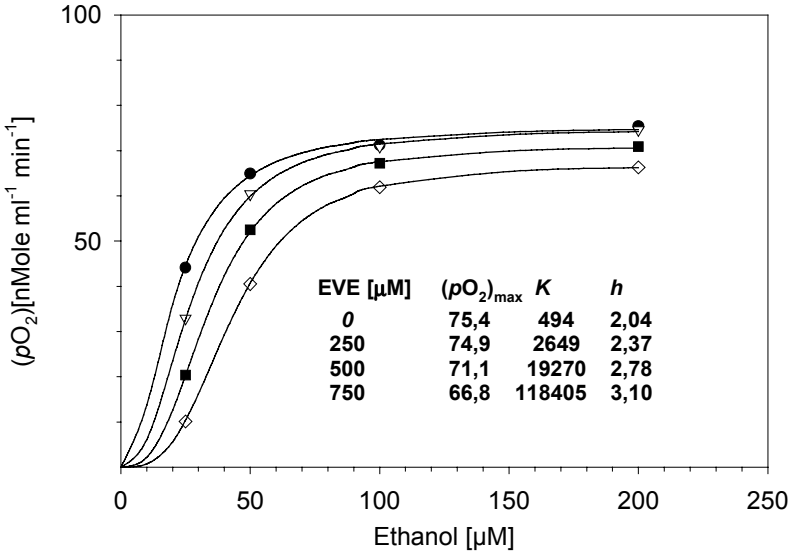


Abb. 3-42. Hemmwirkung des Ethylvinylethers (EVE) auf die hypothetische Alkohol-Oxidase bei der Oxidation von Ethanol mit ganzen Zellen (OD_{546}=1): Die angegebenen kinetischen Konstanten, $(pO_2)_{max}$, K, und h, wurden nach der Gleichung (3.5) abgeschätzt.

Dabei machte sich der Koeffizient, *h*, nach der allosterischen Wechselwirkung von der Alkohol-Oxidase unveränderlich, d.h., kein Ethylvinylether bindete sich direkt ans Enzymmolekül, sondern erniedrigte nur die Enzymaffinität zum Ethanol. In diesem Fall ergab sich die beste Anpassung von den Ethanol-Oxidationskurven mit der Reaktionskonstante, *K*, von 494.

Diese Hemmeffekte des Ethylvinylethers auf die Alkohol-Oxidase waren mit denen von Glutaraldehyd vergleichbar (vgl. Abb. 3-38). Glutaraldehyd beschleunigte die allosterische Wechselwirkung von der Alkohol-Oxidase, nicht aber Ethylvinylether. Glutaraldehyd erniedrigte das Maximum Oxidationsrate von Ethanol, wenn das vermutlich den Enzym irreversibel inaktivierte. Hingegen ergab Ethylvinylether keine Änderung vom Maximum Oxidationsrate.

Um die Tatsache, daß eine spezifische Hemmung eines Enzymes in der Zelle aufs andere Enzym eine Negativität ausübte, zu erklären, sollte die beiden *O*-Dealkylase und Alkohol-Oxidase nahe beieinder liegen. Damit wurde gerechnet, daß die *O*-Dealkylase von der mit Glutaraldehyd bedingte Konformationsänderung der benachbarten Alkohol-Oxidase beeinflußt war. Umgekehrt übte die mit Ethylvinylether bedingte Konformationsänderung von der *O*-Dealkylase auf die Alkohol-Oxidase einen mittelbaren Einfluß aus.

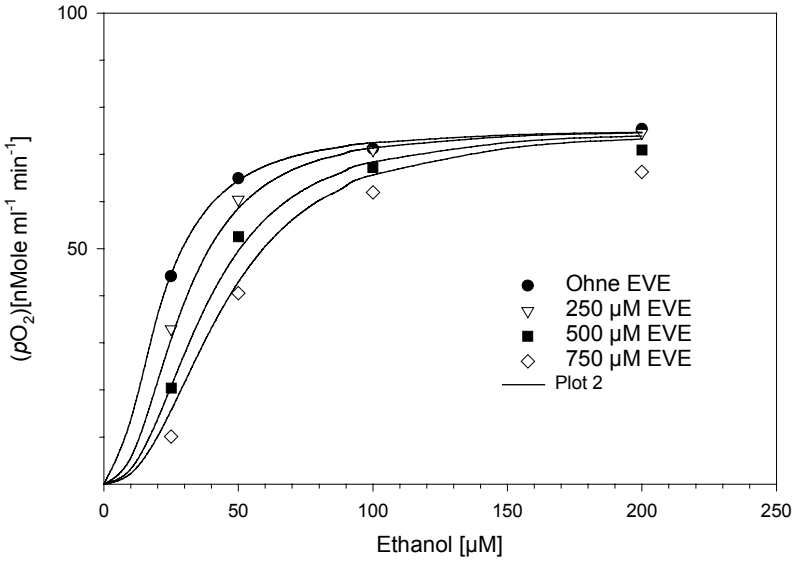


Abb. 3-43. Nicht-lineare Anpassungen der Ethanol-Oxidationskurven mit der Gleichung (3.10) bei Ab-/Anwesenheit von Ethylvinylether (EVE): Die besten Anpassungen ergaben sich mit den jeweiligen kinetischen Konstanten, $(pO_2)_{max}$, *K*, K_i, und *h*, von 75,4 nMole ml^{-1} min^{-1}, 494, 55,7 µM und 2,34.

3.3.4. Der Abbau von Dibenzylether

Dibenzylether wurde nicht nur von den aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen, sondern auch von *Sphingomonas* Stämmen BZE101 und BZE102 abgebaut. Dibenzylether war eine ausgezeichnete Modellchemikalie zur Erklärung der Abbaumechanismen von aliphatischen Alkylethern, die einerseits oder beiderseits nicht-substituierte(s) *O*-Methylen-Cα-Atom(e) besitzen. Der Abbau von Dibenzylether durch den ausgewählten Stamm DEE5151 basierte auf sein breites Substratspektrum an alipahtischen Alkylethern, Phenetol und Dibenzylether. Im Vergleich dazu konnten die Stämme BZE101 und BZE102 nur Dibenzylether abbauen. Sie verwerteten weder aliphatische Alkylether noch Phenetol. Daraus ging hervor, daß die beiden *Rhodococcus* und *Sphingomonas* Stammgruppen zum Abbau des Dibenzylethers voneinander unterschiedliche Enzymsysteme besitzen.

In diesem Versuch wurden die Abbaumechanismen von Dibenzylether mit den beiden Abbaumustern vergleichend untersucht. Zur RP8-HPLC-Untersuchung wurden zwei Fließmittel wie 50%iges und 70%iges wäßriges Methanol entsprechend der Wasserlöslichkeit von den untersuchten Chemikalien verwendet (Tab. 3-34).

Tab. 3-34. Retentionszeiten der verwendeten Testchemikalien, die anhand einer RP8-HPLC nach ihrer Wasserlöslichkeit mit zwei unterschiedlichen Fließmitteln analysiert wurden

Chemikalien	RT [Min]	Wasserlöslichkeit [mM] [1)]	Fließmittel ($1,5\ ml\ min^{-1}$)
Na-Benzoesäure	2,85	n.u.	50%iges (v/v) Methanol
Benzylaldehyd	2,71	n.u.	+ 0,085% H_3PO_4
Benzylalkohol	2,14	n.u.	
Dibenzylether	3,34	0,23	70%iges(v/v) Methanol
Diphenylether	3,75	0,075	+ 0,085% H_3PO_4
Benzylphenylether	3,56	0,16	

Anm.
Wasserlöslichkeiten von Dibenzylether, Diphenylether und Benzylphenylether wurden bestimmt, wenn die Chemikalien bei Raumtemperatur in Wasser gesättigt wurden. Jede gesättigte Lösung wurde anhand einer RP8-HPLC mit 70 %igem Methanol (+0,085% H_3PO_4) dreimal unabhängig analysiert. Mit dem Mittelwert von den dreimaligen Messungen wurde die relative Retentionszeit abgeschätzt. Um die Umsatzrate von Testchemikalien und die Produktionsrate von Abbauprodukten zu bestimmen, wurde die Konzentrationsskala von 0,05, 0,1 und 0,2 mM geeicht.
n.u., nicht untersucht

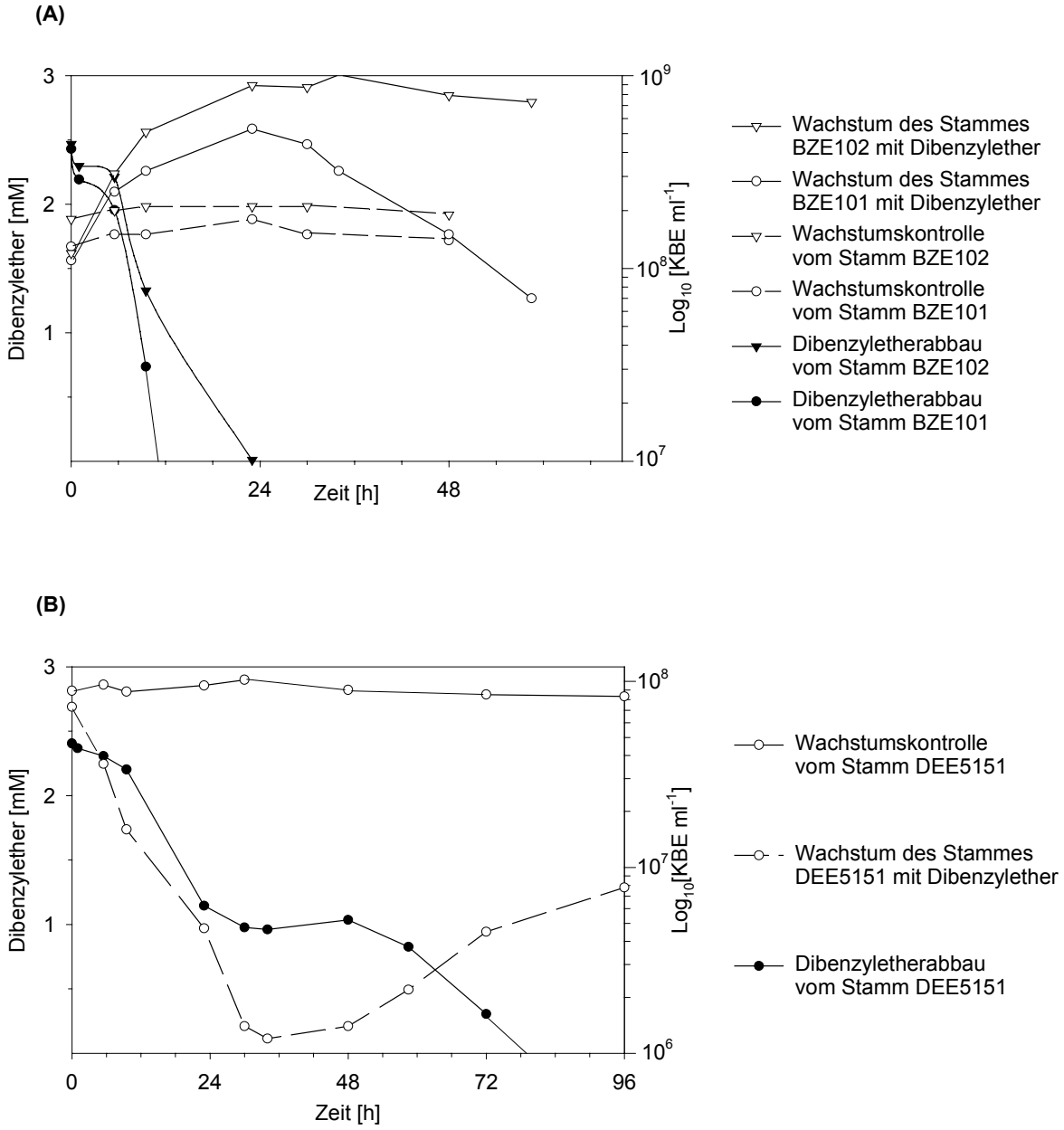


Abb. 3-44. Wachstumsläufe von den Stämmen (A) BZE101, BZE102, und (B) DEE5151 während des Abbaues von Dibenzylether: Bevor dem Versuch wurden die *Sphingomonas* Stämme BZE101 und BZE102 mit Dibenzylether angezogen, und der *Rhodococcus* Stamm DEE5151 wurde mit Diethylether angezogen

Handelsübliches Dibenzylether war mit Benzylalkohol verunreinigt. Zur Entfernung verunreinigtes Bezylalkohols wurde Dibenzylether mit alkalischem Wasser (0,01 N NaOH) im Verhältnis, 1 : 5 (v/v), versetzt, und die Wasserphase wurde nach der Phasentrennung dekantiert. Übriges Wasser in gereinigtem Dibenzylether wurde mittels getrockneten Natrium-Sulfates entfernt. Die Reinheit von Dibenzylether wurde anhand einer RP8-HPLC geprüft.

Der Stamm BZE101 wuchs mit Dibenzylether so ähnlich wie der Stamm BZE102 (Abb. 3-44A). Diese Stämme bauten Dibenzylether wahrscheinlich mit einem ähnlichen Enzymsystem ab. Der Stamm DEE5151, der bevor dem Versuch mit Diethylether angezogen wurde, wuchs am Anfang mit Dibenzylether nicht, und sogar nahm die lebende Zellzahl (KBE) schnell ab. Trotzdem konnte er Dibenzylether schnell umsetzen (Abb. 3-44B). Der Stamm DEE5151 erreichte einem Tag nach dem Versuchsbeginn eine Lag-Phase, wobei sich weder KBE-Wert noch Konzentration an Dibenzylether änderte. 3 Tagen nach Versuchsbeginn stieg der KBE-Wert wieder an, und Dibenzylether wurde weiter abgebaut.

Dibenzylether löste sich schwer ins Wasser (0,23 mM), und zeigte eine starke Zellemulgierung mit der eingesetzten Konzentration von 2,5 mM. Am Anfang des Versuches bewirkte Dibenzylether eine liphophil bezogenen Toxizität auf die Zelle. Aber die mit Diethylether induzierten Enzymsysteme (i.e. die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase) waren noch aktiv zum Abbau von Dibenzylether. In der Lag-Phase scheint neue Enzyme zur Verwertung von Dibenzylether und den Folgemetaboliten, wie z.B. Benzoesäure, induziert zu werden.

Die beiden Stämme BZE101 und BZE102 bauten Dibenzylether über Benzoesäure ab. Benzoesäure wurde vom Abbau des Dibenzylethers stöchiometrisch im Verhältnis, 2 : 1, hergestellt. Nur geringe Menge an Benzylalkohol wurde beim Stamm BZE102 detektiert (Abb. 3-45A).

Der Satmm DEE5151 baute Dibenzylether auch stöchiometrisch zu Benzoesäure ab, aber die Abbaurate verlangsamte sich, solange die aktive Zellzahl abnahm (Abb. 3-45B). Daraus folgte, daß

Dibenzylether durch eine Hydroxylierungsreaktion an einer O-Methylengruppe abgespalten wurde.

Alle drei Stämme konnten weder Diphenylether noch Benzylphenylether umsetzen. Diphenylether besitzt keine Methylengruppe als eine initial anzugreifende Stelle. Es ist bekannt geworden, daß der Abbau von Diphenylether durch eine Dioxygenierungsreaktion eingeleitet wird (siehe Abb. 1-3B und C in Kapitel 1.2.2). Benzylphenylether besaß eine mittlere Wasserlöslichkeit (0,16 mM) zwischen Diphenylether (0,075 mM) und Dibenzylether (0,23 mM). Seine Struktur sah entweder mit Diphenylether oder Dibenzylether ähnlich aus.

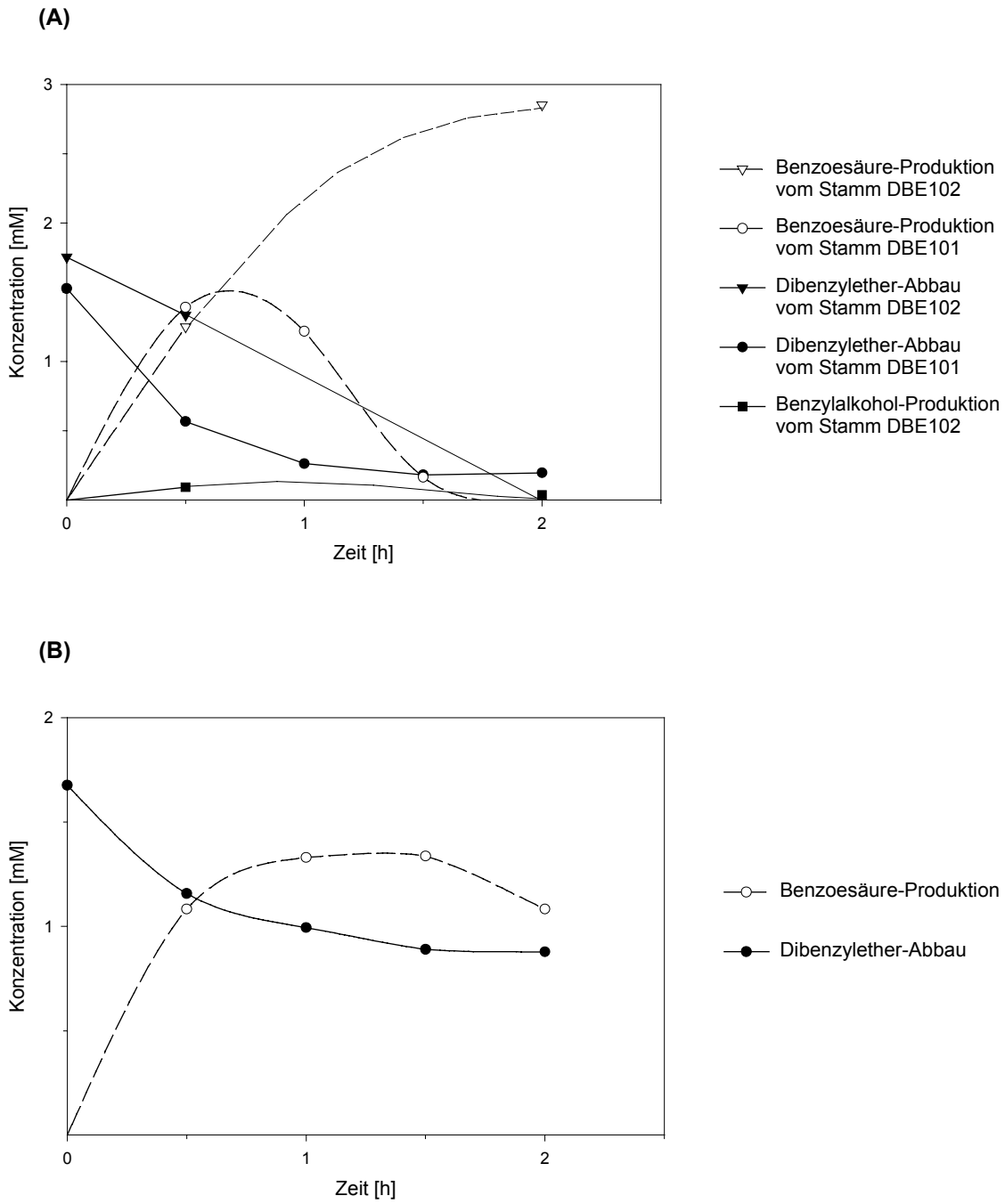


Abb. 3-45. Der stöchiometrische Umsatz des Dibenzylethers zu Benzoesäure (A) mit den Stämmen BZE101 (OD_{546}=4,3), BZE102 (OD_{546}=8,3), oder (B) DEE5151 (OD_{546} = 13,6): Bevor dem Versuch wurden die Stämme BZE101 und BZE102 mit Dibenzylether angezogen, und der Stamm DEE5151 wurde mit Diethylether angezogen.

Aber kein Benzylphenylether wurde entweder durch die Dibenzylether-abbauenden Stämme oder durch den Diphenylether-abbauenden Stamm DPE100 abgebaut. Benzylphenylether scheint, hinsichtlich seiner chemischen Eigenschaften, zwischen Dibenzylether und Diphenylether zu liegen, aber die biologische Abbaubarkeit war davon unterschiedlich.

In der Tabelle 3-35 werden die Oxidaseaktivitäten vom *Rhodococcus* Stamm DEE5151 zu den *Sphingomonas* Stämmen BZE101 und BZE102 unterschiedlich gemacht. Daraus fand man auch, daß der mit Diethylether angezogene Stamm DEE5151 zum mit Dibenzylether angezogenen ein unterschiedliches Oxidationsmuster aufwies. Die Stämme BZE101 und BZE102 oxidierten Dibenzylether und die Folgemetabolite wie z.B. Benzylalkohol und Benzoesäure, nicht aber Diethylether. Im Vergleich dazu konnte der Stamm DEE5151 je nach der Anzucht mit Dibenzylether oder Diethylether sowohl Dibenzylether als auch Diethylether oxidieren. Der mit Dibenzylether angezogene Stamm DEE5151 oxidierte dazu Benzoesäure, die durch den mit Diethylether angezogenen Stamm nicht oxidiert wurde. Zusammenfassend damit wurde festgestellt, daß der mit Diethylether angezogene Stamm DEE5151 eigentlich keine Enzymaktivität zur Oxidation von Benzoesäure dabei hatte. Er stellte daher am Anfang vom Abbau des Dibenzylethers nur Benzoesäure stöchiometrisch her, solange aus der Etherspaltung entstandene Benzylalkohol und Benzylaldehyd mit der Diethylether-induzierten Alkohol-Oxidase weiter zu Benzoesäure oxidiert wurden. Um Dibenzylether als einzige C/E-Quelle zu verwerten, benötigte der Stamm DEE5151 neue Enzyme, die Benzoesäure weiter mineralisieren.

Tab. 3-35. Unterschiedliche Oxidaseaktivitäten[1)] von den Stämmen BZE101, BZE102 und DEE5151 je nach der Anzucht mit Dibenzylether oder Diethylether[2)]

Stamm	BZE 101	BZE 102	DEE 5151	DEE 5151
Testchemikalien [1 mM]	Anzuchtsubstrat			
	Dibenzylether			Diethylether
Diethylether	-	-	36	73
Dibenzylether	85	79	33	33
Benzoesäure	45	46	29	-
Benzylalkohol	52	124	63	152

Anm.

1) Die Oxidaseaktivitäten von Ruhezellen [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} =1] wurde anhand einer Clark'schen Sauerstoffelektrode gemessen.
2) Für die Sauerstoffaufnahmemessung wurden Hungerzellen von den Stämmen BZE101 und BZE102 nach der Anzucht mit 2 mM Dibenzylether geerntet. Der Stamm DEE5151 wurde mit 2 mM Dibenzylether oder Diethylether angezogen.

Die Tatsache, daß der mit Dibenzylether-angezogene Stamm DEE5151 die *O*-Delakylaseaktivität für Diethylether weiter besaß, bestätigte, daß

Diethylether und Dibenzylether mit derselben O-Dealkylase initial oxidiert wurden.

Alle Stämme oxidierten Benzylalkohol schneller als Benzoesäure. Benzylalkohol und Benzylaldehyd bildeten sich stöchiometrisch nach der spontanen Spaltung des instabilen Halbacetals, das durch eine Hydroxylierungsreaktion am *O*-Methylen-Cα-Atom des Dibenzylethers hergestellt wurde. Wurden die beiden Intermediate mit der Diethylether- bzw. Dibenzylether-induzierten Alkohol/Aldehyd-Oxidase oxidiert, wurde nur Benzoesäure offensichtlich während des Abbaues von Dibenzylether mit ganzen Zellen als Hauptmetabolit nachgewiesen.

3.3.5. Die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme

Die meisten cyclische Alkylether-abbauenden Stämme, außer dem Stamm THF400, ließen sich zu *Rhodococcus* angehören. Sie alle bauten charakteristischerweise Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran und Diethylether ab. Davon diente Diethylether auch im allgemeinen zum Wachstum für die aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme. Um die Enzymaktivitäten für die primäre Oxidation von Diethylether vergleichbar zu machen, wurden die Stämme THF100, THF400 und DEE5151 als unterschiedliche Abbaumuster ausgewählt.

Aus der Tabelle 3-36 erkannte man, daß die Stämme THF100 und THF400 nach der Anzucht mit Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, oder Diethylether alle diese Ether oxidierten. Nach der Anzucht mit Diethylether oxidierte der Stamm DEE5151 aber nur Diethylether. Obwohl die Stämme THF100 und THF400 Diethylether abbauten, oxidierten sie weder die anderen aliphatischen n-Alkylether mit längerer Kettenlänge, wie z.B. Di-n-propylether, Phenetol, noch Dibenzylether, die alle der Stamm DEE5151 nach der Anzucht mit Diethylether oxidieren konnte. Der Stamm DEE5151 oxidierte Diethylether ca. 20 ~ 200 mal schneller als die Stämme THF100 und THF400. Außerdem konnten die Stämme THF100 und THF400 weder Alkohole noch Glykole oxidieren, die durch den Stamm DEE5151 schnell oxidiert wurden.

2,3-Dihydrofuran oder Ethylvinylether, das auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase vom Stamm DEE5151 hemmend wirkte, hatte keinen Einfluß auf die primäre Oxidase, die sogenannte THF-Hydroxylase, von den cyclische Alkylether-abbauenden Stämmen THF100 und THF400. 2,3-Dihydrofuran wurde mit den Stämmen THF100 und THF400 oxidiert, nicht aber Ethylvinylether. Der Stamm DEE5151 konnte weder 2,3-Dihydrofuran noch Ethylvinylether oxidieren.

Tab. 3-36. Unterschiedliche Oxidaseaktivitäten der cyclische Alkylether-abbauenden Stämme THF100 und THF400 im Vergleich zum aliphatische Alkylether-abbauenden Stamm DEE5151

Stamm	THF100			THF400			DEE5151
Testchemikalien	Anzuchtsubstrat						
[1 mM]	DEE	THF	THP	DEE	THF	THP	DEE
Diethylether (DEE)	2,6	2,4	1,6	3,9	0,4	2,9	76
Di-n-propylether	-	-	-	-	-	-	48
Tetrahydrofuran (THF)	2,0	6,1	2,2	4,9	9,7	2,0	-
Tetrahydropyran (THP)	0,8	0,3	1,8	4,8	1,1	2,6	-
2,3-Dihydrofuran	6,2	4,4	5,4	9,3	4,3	5,3	-
Ethylvinylether	-	-	-	-	-	-	-
1,4-Dioxan	-	-	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	-	-	-	-	15
Ethanol	-	-	-	-	-	-	71

Anm.
Die Oxidaseaktivitäten von Ruhezellen [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546} =1] wurde anhand einer Clark'schen Sauerstoffelektrode gemessen.
Für die Sauerstoffaufnahmemessung wurden Hungerzellen von den Stämmen THF100 und THF400 je nach der Anzucht mit Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran, oder Diethylether geerntet. Dafür wurde der Stamm DEE5151 mit Diethylether angezogen.

Nach der Anzucht mit Tetrahydrofuran wiesen die Stämme THF100 und THF400 zum Stamm DEE5151 unterschiedliche Oxidationsmuster mit den halogenierten und verzweigten Etherverbindungen auf (Tab. 3-37). Vergleichend mit der Tabelle 3-30 besagte die Tabelle 3-37, daß die Stämme THF100 und THF400 ±1,2-Dichlorethylethylether und verzweigte Etherverbindungen, wie z.B. Ethyl-*tert*-butylether und Isopropylether, schneller oxidierten, als Diethylether. Im Gegensatz dazu konnte der Stamm DEE5151 keine Cα-verzweigte Etherverbindung oxidieren.

Der Stamm DEE5151 zeigte das höchste Oxidationspotential auf Diethylether, und dann nahm die Oxidationsrate in der Reihefolge von 2-Brom-/2-Chlorethylethylether und Bis-(2-bromethyl)-/ Bis-(2-chlorethyl)-ether ab. Im Vergleich dazu ergaben die Stämme THF100 und THF400 einen großen Unterschied dazu. Die Oxidationsrate nahm in der Reihefolge von Tetrahydrofuran, 2-halogenierten Ethylethern, Bis-2-halogenierten Ethylethern und Diethylether ab.

Aus diesen unterschiedlichen Oxidationsmustern wurde festgestellt, daß sich dasselbe primäre Oxidasesystem von den cyclische Alkylether-abbauenden Stämme, sog. die THF-Hydroxylase, am Abbau von Tetrahydrofuran, Tetrahydropyran und Diethylether beteiligt, und daß das Enzymsystem

zur *O*-Dealkylase vom Stamm DEE5151 unterschiedlich ist, obwohl die beiden Enzyme dieselbe Position (i.e. *O*-Methylen-Cα-Atom) von Diethylether initial angreifen.

Tab. 3-37. Oxidationspotentiale von den Stämmen THF100 und THF400 auf Tetrahydrofuran, Diethylether, halogenierte Ethylether, und Cα-verzweigte Alkylether

Stamm	THF100	THF400
Testchemikalien [1 mM]	**Tetrahydrofuran-Anzucht**	
Tetrahydrofuran	9,1	14
Diethylether	0,3	1,7
2-Bromethylethylether	2,0	0,9
2-Chlorethylethylether	2,2	2,6
± 1,2-Dichlorethylethylether	2,3	13,7
Bis-(2-bromethyl)-ether	1,7	1,5
Bis-(2-chlorethyl)-ether	1,8	0,6
Ethyl-*tert*-butylether	4,1	4,5
Isopropylether	1,4	4,4

Anm.

Die Oxidaseaktivitäten von Ruhezellen [nMole ml^{-1} min^{-1} pro OD_{546}=1] wurde anhand einer Clark'schen Sauerstoffelektrode gemessen.

Für die Sauerstoffaufnahmemessung wurden die Hungerzellen von den Stämmen THF100 und THF400 nach der Anzucht mit Tetrahydrofuran geerntet.

4. Diskussion

4.1. Fragestellungen

> ″Pollution control is a good business practice which a nation can not afford to neglect. … Deterioration may occur to a level that is intolerable to flora and fauna and cost the people and the government more than the industry produces. A nation must not sacrifice its customs and desirable environment to short-term economic advantage″ (Borup & Middlebrooks, 1987)

Ziel der umwelttechnischen Anwendungen von Biodegradation und Biotransformation ist die Elimination von umwelt- und gesundheitsschädigenden Chemikalien. Nach der Beseitigung schädlicher Chemikalien wäre es zu erwarten, daß die geschädigte Umwelt in den ursprünglichen Zustand zurückgeführt bzw. vor der weiteren Kontamination geschützt wird.

Die Elimination von Schadstoffen wird nach den folgenden drei Naturgesetzen durchgeführt: die Volatilisierung, die Sorption und die Degradation. Die Volatilisierung und die Sorption sind von physikalisch-chemischer Natur. Demnach werden Schadstoffe, aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften wie z.B. Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Molekülmasse, usw., thermodynamisch eliminiert. Biologische Komponenten, wie z.B. lipophile Außen- bzw. Plasmamembran und biologische Oberflächeaktive Substanzen, beteiligen sich an der Sorption von hydrophoben Kohlenstoffen (Zhang & Miller, 1994). Die Volatilisierung verursacht oft andere Umwelt- bzw. Gesundheitsprobleme, wenn in die Luft freigesetzte Schadstoffe unter Tageslicht einmal radikale Substanzen (z.B. Ozon) bilden, und zum anderen die Stratosphäre zerstören. Die Sorption ist auch keine Vorschrift zur vollständigen Beseitigung von Schadstoffen. Wenn sich Schadstoffe ins kleinräumige Kompartiment anhäufen, wird die Gefährdung von Menschen und Umwelt verstärkt. Die natürliche Nahrungskette ist besonders dafür verantworltich, um geringe Schadstoffe mittels kontaminierter Nahrungsmittel in den Menschenkörper mehr tausendfach zu akkumulieren (Boyles, 1980).

Die Degradation ist nicht nur von physikalisch-chemischer Natur, wie z.B. die Sonneneinstrahlung, die Verbrennung, die Autoxidation, die Hydrierung, und die geophysikalische Zersetzung, sondern auch von biologischer Natur, sogenannt die biokatalytischen Reaktionen. Physikalisch-chemischer Abbau ereignet sich unspezifisch. Daraus entstehen manchmal toxische Abbauprodukte, wie z.B. Epoxide, Peroxide, Arenoxide, Ozon, Dioxine, und Furane. Damit geraten Umwelt und Mensch

heutzutage in die große Gefahr. Der biologische Abbau hat hingegen den Vorteil, daß Enzymreaktionen unter milderen Bedingungen substratspezifisch und stereospezifisch verlaufen. Die durch enzymatische Reaktion abgeleiteten Metabolite, die bis zu CO_2 und H_2O weiter mineralisiert werden, halten sich nicht mehr für schwer abbaubar. Am Abbau von schwer abbaubaren Chemikalien spielen auch die Cooxidation, das Cometabolismus, und das mikrobielle Konsortium in der Natur eine erhebliche Rolle. Die Abbaurate ist daher oft in der natürlichen Bedingung schneller als in der Laborbedingung. Der Abbau welcher Chemikalie konnte bisher nur durch Mischkulturen demonstriert werden.

Trotz einiger Beschränkungen ist die Erhaltung von Reinkulturen für die Abbaustudien absolut notwendig, um den Horizont an Möglichkeiten für die Eliminierung schwer abbaubarer Chemikalien immer wieder zu erweitern. Zum Beispiel widerlegte der Pyren-abbauende Stamm *Mycobacterium* sp. eine alte Vermutung, daß vier oder mehr hoch-kondensierte PAKs gegen den biologischen Abbau beständig waren (Heitkamp et al., 1988a und 1988b). Manche Enzymaktivitäten werden durch Genmanipulation technisch optimiert.

Der Einsatz und die Überwachung von Spezial-Mikroorganismen sind von besonderem Interesse in der angewandten Mikrobiologie. Die Anwendung von Spezial-Mikroorganismen wurde bisher in der Petrochemieindustrie intensiv geforscht, um altes bzw. ausgesickertes Öl biologisch abzubauen. Es war aber schwer, eingesetzte Spezial-Mikroorganismen in natürlichen Bedingungen ansässig zu machen. Daher wurden nur wenige Modelle bei den Feldversuchen erfolgreich gemacht (Hegeman, 1985). Dart und Stretton (1980) äußerten sich über die Aspekte für die Anwendung von Spezial-Mikroorganismen:

> ″However, micro-organisms can play a role, both advantageous and disadvantageous, to man and his activities. They may be pollutants themselves and cause diseases, or they may cause pollution if their presence is encouraged. In many industrial and engineering processes, … , the engineer may not immediately recognize the process he has designed … on the microbiological aspects of the subject and not the processing aspects″

Die Untersuchungen und die Anwendungen von speziell gezüchteten Mikroorganismen sind unvermeidbar, solange sich biotische und abiotische Komponenten in der Biosphäre ungleichmäßig verteilen. Die Arten und die Aktivitäten von Spezial-Mikroorganismen sind von Ort zu Ort und von Zeit zu Zeit verschieden. Ziel des Einsatzes von Spezial-Mikroorganismen ist einmal die Zeit bis zum

Maximum Eliminationsrate zu verkürzen, und zum anderen die Eliminationsleistung zu erhöhen. Einer der wichtigsten Faktoren, die den Einsatz von Spezial-Mikroorganismen nachdenklich machen, ist der sukzessive Prozeβ von Populationen zwischen dem Fremden und dem Autochthonen. Nach Odum (1969) neigen die Hauptkomponenten ein Klimax zu erreichen. Andererseits lagen Bormann und Likens (1979) vor, daß das Klimax von Zeit zu Zeit zwischen dem Fremden und dem Autochthonen kreist. Connell und Slatyer (1977) haben drei sukzessive Wege vorgestellt, um eine vorgefaßte Meinung über das Verhalten von angewandten Spezial-Mikroorganismen zu haben.

i) Fazilitätsweg (′facilitation′), auf dem vorhandene Spezies einen sukzessiven Weg für die nachkommenden Spezies vorher festlegen.

ii) Toleranzweg (′tolerance′), auf dem nachkommende Spezies, die es vor Hunger aushalten können, den Hungerzustand zu ihrem Vorteil ausnützen.

iii) Hemmungsweg (′inhibition′), auf dem vorhandene Spezies auf die nachkommenden Spezies hemmend wirken.

Der Fazilitätsweg befindet sich in natürlichen bzw. künstlichen Ökosystemen überall, wo die Aktivitäten von der erst siedelten Mikroflora die nächstfolgenden Populationen begrenzen. Werden schwer abbaubare PAKs oder Makromoleküle durch eine Population primär umgesetzt, dienen die Abbauprodukte zum Wachstum für die anderen. Zum Beispiel wurde eine PAK-belastete Bodenprobe aus Neustadt in der ehemaligen DDR seit Oktober 1995 mit Acenaphthen angereichert. Davon erhielt sich eine Acenaphthen-abbauende Mischkultur, aber keine Acenaphthen-abbauende Reinkultur wurde davon gewonnen. Der Stamm ANC100 war eine Hauptkomponente. Er baute kein Acenaphthen ab, sondern Acenaphthochinon und Naphthalin-1,8-dicarbonsäure (Anhydrid, Fa., Aldrich), die als Folgemetabolite vom Abbau des Acenaphthens hergestellt wurden (Schocken & Gibson, 1984; Selifonov et al., 1998). Könnte die primäre Population kein Abbauprodukt, wie z.B. Acenaphthochinon oder Naphthalin-1,8-dicarbonsäure weiter abbauen, herrschte sie nicht als Hauptverwerter vor, sondern die nächst kommenden Populationen (z.B. ANC100) entwickelten sich damit als Hauptkomponente in der Biozönose.

Beim Nährstoffsmangel tritt oft der Toleranzweg auf. Zum Beispiel herrschen Fäulepilze während des Mangels an C- bzw. N-Quellen im Humus vor. Antibiotika-herstellende Mikroorganismen haben gegenüber den empfindlichen Populationen den Vorteile, daß sie im ganzen Habitat vorherrschen. Sie

fungieren oft als Antagonisten im Ökosystem gegen die Konkurrenten (Frankland, 1981; Wicklow, 1981).

Schwer wasserlösliche bzw. flüchtige Chemikalien greifen lipophile Zellbestandteile, wie z.B. die Plasmamembran an. Toxische Chemikalien stoßen die demgegenüber empfindlichen Mikroorganismen aus der Artengemeinschaft aus. Indem einige Mikroorganismen die Zusammensetzungen von Zellkomponenten (z.B. Zellmembran) ändern, verhindert sich der Zugang von toxischen Substanzen. Aralkylether, wie z.B. Anisol (Methoxybenzol) und Phenetol (Ethoxybenzol), wirken sowohl generell auf allgemeine als auch auf degradative Vertreter toxisch ein. Die Stämme St117 und MOP100 entwickelten demgegenüber neue Kolonieformen. Die morphologisch veränderten Stämme St127 und MOP102 besaßen bessere Fähigkeiten zum Abbau von Aralkylethern. Diese morphologischen und physiologischen Veränderungen bedeuten eine fundamentale Adaptation an toxischen Aralkylethern. Das gilt besonders für Phenetol.

Die Stabilität von einer Spezial-Stammgruppe oder ihrer Spezialaktivität kommt nach den folgenden Kriterien in Betracht.

i) Je mehr die dazugehörigen Einzelteile taxonomisch und räumlich verschieden sind (Diversität),

ii) Je weniger die abzubauende Chemikalie und die Abbauprodukte auf die Zelle toxisch einwirken (Toxizität),

iii) Je weniger sich die Stammveränderungen und die Genmutationen ereignen (Variation & Mutation),

desto größer ist die Stabilität.

Ziel dieser Arbeit war es, die leicht flüchtige Ether-abbauenden Mikroorganismen aus verschiedenen Umweltkompartimenten zu isolieren, und ihre stammspezifische Abbaupotentiale zu untersuchen. Dazu war es beabsichtigt, diese Mikroorganismen zur Eliminierung von umweltpromatischen Etherverbindungen anzuwenden. Etherverbindungen wurden hinsichtlich ihrer chemischen Strukturen in acht Bindungsklassen aufgegliedert, wie Glykole, aliphatische Alkylether, Epoxide, cyclische Alkylether, Aralkylether, Diarylether, Benzylether, und Benzylphenylether. Große Menge an diesen Bindungklassen wurde bisher aus verschiedenen Emissionsquellen freigesetzt, aber die biologischen Abbaustudien wurden selten gemacht. Diese Arbeit berücksichtigte besonders die Abbauer und die Abbaumechanismen von aliphatischen Alkylethern (z.B. Diethylether und Di-n-

propylether), cyclischen Alkylethern (z.B. Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran), und Aralkylethern (z.B. Anisol und Phenetol).

Dazu wurden kinetische Untersuchungen für die spezifische Wachstumsrate, den Halbsättigungsgrad eines Substrates, die Verdoppelungszeit, die Hemmkonstante eines Substrates, und die Oxidations- bzw. Umsatzrate mit den ausgewählten Modellsystemen durchgeführt, um die späteren Anwendungen von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämmen z.B. zur biologischen Abluftreinigung zu verwirklichen.

4.2. Numerische Taxonomie

Die Taxonomie (Klassifizierung) basiert auf das Newtonsche Paradigma. Damit wird die Gesamtheit aus den maschinellen Funktionen von Einzelteilen zusammengesetzt. Biologische Erscheinung soll ein maßgebliches Merkmal in der Taxonomie sein. Daraus versteht man ein Ökosystem in kausalem Zusammenhang mit der Taxonomie von den Einzelteilen.

Das reale Ökosystem ändert sich immer. Neue Mechanismen, Komponenten und Interaktionen erscheinen und verschwinden immer. Es ist schwer, dynamische Änderungen und organische Zusammensetzungen von den biologischen Komponenten nach dem determinativen Modell darzustellen. Daher sollen sich die Einzelteile von einem Ökosystem sowohl taxonomisch als auch in organischem Zusammenhang mit den biotischen und abiotischen Komponenten verständlich machen (Allen, 1988). Im realen Ökosystem sind die einzelnen Komponenten durcheinander gemischt vorhanden, und sie zeigen eine kontinuierliche Komplexität an. Wird das reale Ökosystem mit einer ′typischen Erscheinung (Merkmal)′ untersucht, ergibt jede Komponente dafür ein Testergebnis. Typische Erscheinungen vereinfachen die Realität und die Komplexität im ganzen Ökosystem, um die biologischen Komponenten in Bezug auf taxonomisch relevante oder stammpezifische Merkmale zu kennzeichnen. Es ist im wesentlichen schwer, ein ganzes Ökosystem mit solchen typischen Erscheinungen zu bestimmen. Daher sind die biologischen Indikator verwendbar. Sie besitzen eine ′typische′ bzw. ′charakteristische′ Eigenschaft, mit der sich die biologischen Indikator in einem Ökosystem schnell erkennen lassen. Die Isolierung und die Stammbehandlung von Reinkulturen sind ein grundsätzliches Dilemma in der Mikrobiologie, um das Vorhandensein der biologischen Indikator nachzuprüfen. Die Stammerhaltungen beschränken sich auf die Kultivierbarkeit und die Mehrheit, obwohl das Ökosystem artverschiedene Minderheiten oder unkultivierbare Komponenten enthält (Atlas, 1986).

Der neue systematische Name wird nur durch die Veröffentlichung auf der ′International Journal of Systematic Bacteriology′ autorisiert. Bevor der Autorisierung wird auch der alte Name häufig

akzeptiert. Ein Beispiel ist der Stamm JMP134, der umfangreiche Abbaupotentiale auf schwer abbaubare Chemikalien wie 2,4-D, chlor- und alkyl-substituierte Phenole besitzt. Der systematische Name wurde von *Alcaligenes eutrophus* nach *Ralstonia eutropha* geändert (Yabuuchi et al., 1995). Im Jahr 1997 wurde der alte Name *Alcaligenes eutrophus* noch häufiger verwendet (Filer & Harker, 1997; Sassanella et al., 1997; Valenzuela et al., 1997), als der neue Name *Ralstonia eutropha* (Schenzle et al., 1997).

Numerische Taxonomie gründet sich auf phenetische Erscheinungen von den untersuchten Stämmen. Die physiologischen und enzymatischen Aktivitäten können sich durch eine Genmutation ändern, aber alle Genmutationen begleiten physiologische bzw. enzymatische Änderungen nicht. Die Zellzustände verändern sich auch ohne Genmutation unter Streßbedingungen. Stammänderungen gehen aus der Zusammenwirkung von den zwei Faktoren hervor (Ferguson, 1980).

Es gibt noch keine allgemein anerkannte Methode in der numerischen Taxonomie. Die ′Food′-Mikrobiologie und die medizinische Mikrobiologie entwickeln eigene Methoden zur schnellen Erkennung von Spezial-Mikroorganismen oder Pathogenen. Die Fachleute halten die angewandte Taxonomie für sinnvoll, aber meiste natürliche Taxa sind in den angewandten Fachbereichen nicht inbegriffen (Austin & Priest, 1986).

Zur Ähnlichkeitsabschätzung werden alle mögliche Merkmale von Mikroorganismen untersucht. Vorausgesetzt, daß alle untersuchte Merkmale eine gleiche Wichtigkeit (Wertigkeit) haben, führt jeder Test zum quantitativen oder qualitativen Ergebnis. In der klassischen Taxonomie ist ein zweierlei Zahlsystem, wie z.B. {+, -} oder {1, 0}, zur Auswertung von Testergebnissen üblich. Taxonomische Gruppierung (Cluster) schließt sich dann innerhalb eines taxonomischen Grenzwertes an. Taxonomische Ähnlichkeit zwischen den Stämmen ist aus der Cluster-Analyse in der trigonalen Matrix abschätzbar (Sneath & Sokal, 1973).

Testergebnisse werden mit dem zweierlei Zahlsystem qualitativ bewertet. Wird jedes Merkmal mehrmals unabhängig oder (semi)-quantitativ untersucht, ist die Auswertung der zwischenliegenden Testergebnisse, wie z.B. ±, vonnöten. Tetrazolium-violett (Fa., Sigma) ist ein Hilfsmittel, das mit respiratorischen Tests (semi)-quantitative ′±′-Ergebnisse zuverlässig macht (Bochner, 1989). Die Anwendung dieses Redox-Indikators ist aber mit den kultivierbaren Reinkulturen unter aeroben Bedingungen begrenzt (Gribbon & Barer, 1995; Smalla et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, taxonomisch relevante Merkmale (z.B. Morphologie und Physiologie) und stammspezifische Merkmale (z.B. Abbaupotentiale für Xenobiotika) mit dem dreierlei Zahlsystem, {-1, 0, 1}, zu semi-quantifizieren. Der statistische *Korrelationskoeffizient, r,* wurde zur Ähnlichkeitsabschätzung entweder zwischen zwei Teststämmen oder zwischen jedem Stamm und dem hypothetischen mittleren Organismus (HMO) berechnet. Vorausgesetzt, daß sich

biologische Erscheinungen „zufällig“ und „unabhängig“ ereignen, erfüllt jede Koeffizienten-abschätzung eine statistische Bedingung. Biologische Komponenten wurden entweder mittels der zweidimensionalen Koordinierung jedes (x, y)-Paars von Korrelationskoeffizienten auf der XY-Ebene, $\{\mathrm{Korr}(x, y)|\ -1 \leq x \leq 1,\ -1 \leq y \leq 1\}$, oder aus der Cluster-Analyse auf dem Dendrogramm schematisch dargestellt.

Die zweidimensionale Analyse ließ Einzelteile von einer Stammgruppe dicht zuordnen, wenn sie entweder taxonomisch oder ökologisch untereinander ähnlich sind. Das Dengrogramm ist für die taxonomische Ähnlichkeitsabschätzung gebräuchlich. Je größer der berechnete Korrelations-koeffizient ist, desto größer ist die taxonomische Ähnlichkeit zwischen den Stämmen oder Clustern.

4.2.1. Zweidimensionale Analyse

Die taxonomisch relevanten Merkmale (x-Elemente) und die stammspezifischen Abbaupotentiale (y-Elemente) wurden beliebig aufgegliedert, um jedes (x, y)-Paar von Korrelationskoeffizienten auf der sogenannten taxonomischen Landkarte zuzuordnen. Wurde jeder Koeffizient zwischen jedem Stamm und dem *hypothetischen mittleren Organismus* (HMO) berechnet, ergab sich jedenfalls der Korrelationskoeffizient zwischen –1 und 1. Damit wurde jeder Stamm auf eine bestimmte XY-Ebene, $\{(x, y)|\ -1 \leq x \leq 1,\ -1 \leq y \leq 1\}$, als ein Punkt dargestellt. Die zweidimensionale Analyse stellt die Ähnlichkeit von Mikroorganismen auf der kontinuierlichen Ebene besser dar, als die beliebige Gruppierung auf dem Dendrogramm (Austin & Priest, 1986).

Zweidimensionale Analyse ist heutzutage von den chemosystematischen Methoden betroffen, wie z.B. Fettsäurenanalyse, Proteinprofil und Pyrolyse-Massenspektrum (PyMS). Die (x, y)-Paare bestehen aus den sogenannten *kanonischen Varianten*. Wird eine unbekannte Koordinate mit den taxonomisch anerkannten Zugeordneten verglichen, werden alle euklidische Abstände zwischen dem Teststamm und jedem Mittelwert von den taxonomischen Zugeordneten gerechnet, um die Taxonomie vom unbekannten Stamm mit dem niedrigsten Wert zu bestimmen (MacFie et al., 1978). Zum Beispiel haben Chun et al. (1993) unter Verwendung artifizieller neuralgischer Netzwerke (′artificial neural networks′, ANN) PyMS-*kanonische Varianten* von einigen *Streptomyces* Stämmen analysiert.

Es ist aber schwer, für *kanonische Varianten* einen Maßstab zu stellen. Der hypothetische mittlere Organismus (HMO), dessen Merkmale aus den empirischen oder taxonomisch anerkannten Daten z.B. von ′Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology′ entnommen werden, gibt einen Maßstab für alle ab. Jedes Merkmal vom HMO liegt bei einer unendlichen Zahl zwischen –1 und 1.

Merkmale vom HMO liegen um so näher bei Eins, je mehr Testergebnisse positiv sind: z.B. verwerteten 122 Stämme von 132 getesteten Stämmen Ethylvinylether als einzige C/E-Quelle (HMO ≈ 0,84). Ethylvinylether wurde durch manche Mikroorganismen leicht abgebaut. Die leichte Abbaubarkeit von einer Chemikalie stimmt nicht immer mit der Gefährdung von Umwelt und Menschen überein. Zum Beispiel wird Bis-(chlormethyl)-ether, das vom U.S. Environmental Protection Agency auf die Klasse A (bekannt human-carcinogen) eingestuft wird, im Wasser schnell zerfällt, aber die Abbauprodukte, wie z.B. Chlormethanol und Chlorformaldehyd, sind sehr giftig. Als ein anderes Beispiel diente 1-Butanol (HMO ≈ 0,83) zum Wachstum von mehreren Teststämmen als Ethanol (HMO ≈ 0,75), 1-Propanol (HMO ≈ 0,78) und 1-Pentanol (HMO ≈ 0,57). Trotzdem hält sich 1-Butanol für giftiger als Ethanol.

Im Gegenteil liegen Merkmale vom HMO um so näher bei -1, je mehr Testergebnisse negativ sind. In dieser Arbeit ergab sich keine positive Reaktion für 2-Bromethylethylether, Isopropylether, Methyl-*tert*-butylether, *tert*-Butyl-2,3-glycidylether, Dimethylsulfoxid, 1,4-Dioxan, 1,2-Epoxyhexan, 2-Chlorethanol, Diethylenglykol, Formaldehyd, Chloracetaldehyd, Chloressigsäure, Benzo(*b*)furan, Acridon, Benzo(*a*)pyren, 4-Aminobenzoesäure, und Zellulose als einzige C/E-Quelle (HMO = -1).

Taxonomische Gruppierungen von einigen Stämmen hatten eine enge Beziehung mit ihren Abbaupotentialen auf Pyren, Fluoren, Dibenzofuran, und Alkylether. Alle Pyren-abbauende Stämme gehörten zu *Mycobacterium*, und alle Fluoren/Dibenzofuran-abbauende Stämme gehörten zu *Terrabacter*. Außerdem ließen sich die meisten Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme der Gattung *Rhodococcus* erscheinen.

Bisherige Studien über den PAK-Abbau liegen vor, daß hoch-kondensierte PAKs (z.B. Phenanthren und Pyren) überhaupt durch Bakterien in der Natur abgebaut werden. Über 97 % an Phenanthren wird durch bakterielle Stämme in Küstenböden abgebaut (MacGillivray & Shiaris, 1994). Am Initialangriff von PAKs beteiligen sich bakterielle Schlüsselenzymsysteme, sog. NADH/PAK-Dioxygenase.

Die Pyren-abbauenden *Mycobacterium* Stämme wurden sowohl aus einer PAK-belasteten Kokereibodenprobe aus Essen als auch aus einer wenig PAK-belasteten Humusprobe Schwäbischer Alb isoliert. Hoch-kondensierte Aromaten befinden sich nicht nur in den Industriegebieten wie z.B. in den Kokereiböden (Boldrin et al., 1993; Schneider et al., 1996), sondern auch im Humus, der aus zahlreichen Verbindungen von Fulvinsäuren und Huminsäuren zusammengesetzt wird (Choudhry, 1984). Daraus erhalten sich durch katalytische Pyrolyse-Dehydrogenierungsreaktion zahlreiche polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Naphthalin, Anthracen, Phenanthren, Carbazol, Fluoranthen, Pyren, Chrysen, Perylen, usw. Chemische Pyrolyse-Dehydrierverfahren halten

sich jedoch für unnatürlich, aber im wesentlichen befinden sich zahlreiche polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) in der Kohle.

Pyren ist schwer wasserlöslich (175 µg l^{-1}), und hält sich damit für schwer abbaubar. Nur wenige Bakterienarten sind bekannt für den Abbau von Pyren. Pyren-abbauende Mykobakterien zeigen ein breites Substratspektrum nicht nur an leicht wasserlöslichen PAKs, wie z.B. Phenanthren (1600 µg l^{-1}), Fluoren und Fluoranthen (Boldrin et al., 1993), sondern auch an schwer wasserlöslichen PAKs, wie z.B. Benz[*a*]anthracen (10 µg l^{-1}) und Benzo[*a*]pyren (< 1 µg l^{-1}, Schneider et al., 1996).

Im Vergleich dazu löst sich Phenanthren leicht ins Wasser (1600 µg l^{-1}). Das bedingt seine leichte Abbaubarkeit (Bossert & Bartha, 1984). Verschiedene Bakterienarten sind bekannt für den Abbau von Phenanthren. In dieser Arbeit wurde die Heterogenität von den Phenethren-Abbauern bestätigt.

Die beiden Stammgruppen von den Pyren- und Phenanthren-Abbauern verwerten Phenanthren im allgemeinen als einzige C/E-Quelle. Durch Anreichrung mit Phenanthren entwickelten sich die Phenanthren-abbauenden Stämme PHE222 und PHE223 als Hauptverwerter in einer Kokerei-Bodenprobe. Der Pyren-abbauende Stamm PYR400 herrschte hingegen in der mit Pyren angereicherten Probe vor. Die *Pseudomonas* Stämme PHE222 und PHE223 wuchsen mit Phenanthren schneller als der *Mycobacterium* Stamm PYR400. Daher herrschten die ersten Verwerter im ganzen vor, wenn die Probe mit Phenanthren angereichert wurde. Dazu spielte der Stamm PYR400 wahrscheinlich am Abbau von Phenanthren eine Nebenrolle. Wenn man eine Probe, worin Phenanthren-Abbauer und Pyren-Abbauer vorhanden sind, mit einer Mischung von Phenanthren und Pyren behandelt, verschwindet wahrscheinlich Phenanthren schneller als Pyren. Mit zunehmendem Mengenverhältnis von Pyren zu Phenanthren wird die Abbaurate von Pyren um so schneller, solange die Proportion der Pyren-Abbauer allmählich zunehmen. Unter den selektiven Bedingungen entwickelt sich ein Spezial-Mikroorganism erst aufgrund seiner Abbaupotentiale. Dazu ist die schnelle Wachstums- bzw. Abbaurate eine hervorragende Leistung für die Vorherrschung.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoren bzw. Dibenzofuran-abbauenden Stämme stammten aus verschiedenen Orten. Die zwei Stämme *Terrabacter* sp. DPO360 und DPO1361 wurden bislang von verschiedenen Autoren morphologisch, physiologisch, biochemisch und taxonomisch geforscht. Aus dieser Arbeit ging hervor, daß die anderen Fluoren/Dibenzofuran-abbauenden Stämme (DPM201, DPM202, DPO210, DPO320 und DPO340) auch innerhalb von *Terrabacter* zugeordnet werden. Alle DPO/DPM-Stämme verwerten Fluoren und Biphenyl als einzige C/E-Quelle. Außer den Stämmen DPM201 noch DPM202 verwerten die anderen DPO-Stämme auch Dibenzofuran als einzige C/E-Quelle. Außerhalb von *Terrabacter* ist der *Sphingomonas* Stamm RW1 für den Abbau von Dibenzofuran bekannt geworden (Wittich et al., 1992). Die Abbaufähigkeit für Dibenzofuran ist

weder eine determinative Bedingung für die Taxonomie von *Terrabacter*, noch eine hinreichende Bedingung.

Als ein anderes Beispiel gehören die Pyren-abbauenden Stämme zu *Mycobacterium* an. Jedoch besitzen alle Spezies von *Mycobacterium* die Pyren-Abbaufähigkeit nicht. Die Abbaufähigkeit für Pyren ist auch keine determinative Bedingungen für die Taxonomie von *Mycobacterium*, aber die stammspezifische Abbaufähigkeit scheint dafür eine hinreichende Bedingung zu sein.

Hexan-Abbauer und Styrol-Abbauer sind angewandte Beispiele im Fachbereich biologische Abluftreinigung an der Universität Stuttgart. Alle Hexan-abbauende Stämme stammten aus einem Hexan-beaufschlagten Biofiltermaterial, während die Herkünfte von den Styrol-abbauenden Stämmen verschieden sind: Vier Stämme VLB120, VLB130, VLB140 und VLB160 stammten aus einem Styrol-zugeführten Kompost, und drei Stämme MLB110, MLB120 und ELB120 stammten aus einer Toluol (MLB) bzw. Ethylbenzol (ELB) zugeführten Bodenprobe, und der Stamm M2A wurde von einem Styrol-beaufschlagten Biofiltermaterial stammend isoliert. Der Biphenyl-abbauende Stamm *Pseudomonas* sp. NCIB10643, der Styrol abbauen konnte, arbeitete sich in der Styrol-abbauenden Stammgruppe zusammen. Neun Hexan-abbauende Stämme bestanden aus mehreren Bakterienarten als neun Styrol-abbauende Stämme. Trotzdem ergaben die ersten aus der zweidimensionalen Analyse eine dichtere Zuordnung als die letzten. Vermutlich bildet die ganze Biozönose, einschließlich der Hexan-abbauenden Stämme, seit langem eine dichte Zonierung unter Streßbedingungen (i.e. n-Hexan) im geschlossenen Habitat.

Die zweidimensionale Analyse von Spezial-Mikroorganismen hat, bezüglich ihrer taxonomisch relevanten und stammspezifischen Merkmale, eine große Bedeutung für die Taxonomie und die Ökologie.

4.2.2. Klassifizierung der Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme

Alle 45 Aralkylether- und Alkylether-abbauende Stämme wurden aus einer Belebungsanlage des Klärwerks Stuttgart-Büsnau stammend isoliert. Außer den Stämmen THF400 und MOB600 zeigten die anderen 43 Stämme eine ökologische und taxonomische Ähnlichkeit an. Demzufolge wurden die 43 Stämme aus der zweidimensionalen Analyse innerhalb von *Rhodococcus* dicht zugeordnet.

Rhodococcus zeigt einen komplizierten Pedigree an. Seit der ersten Einleitung von ′*rhodochrous* (Zopf)′ innerhalb der Actinomyceten (Gordon & Mihm, 1957) ist es bekannt, daß *Rhodococcus* zwischen *Mycobacterium* und *Nocardia* liegt. *Rhodococcus* befindet sich in der Natur überall, wie z.B. in Boden, Süßwasser, Meer, Darmtrakten, und Atemwegen. Die meisten Spezies sind keine

Human-Pathogene (Lechevalier, 1988). In dem ′International Code of Nomenclature of Bacteria′ (Sneath, 1992) besteht der Gattung *Rhodococcus* aus 18 Typspezies.

Die morphologischen und physiologischen Charakteristika von den 43 Stämmen stimmten mit der Beschreibung über *Rhodococcus* von ′Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 4′ (Williams et al., 1989) überein: Alle Stämme sind Gram-positiv und aerob. Sie besitzen eine Katalase, aber keine Oxidase. Sie zeigen einen Lebenslauf zwischen Stäbchen und Kokken an, und sie bilden gelegentlich Substratmyzelien unter der Agaroberfläche. Die Koloniemorphologie ist glatt, rauh, oder schleimig, und die Koloniefarbe ist kremefarben, gelb, orangenfarben, oder rot.

Sie haben ein breites Substratspektrum an verschiedenen Substraten: Alle 43 Stämme verwerten D-Arabinose, Mannitol, Sorbitol, Milchsäure, Fumarat, Ethinylethylether, Ethylvinylether, Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol, 1-Pentanol, 2-Methyl-1-butanol, 3-Methyl-1-butanol, Hexadecan, Essigsäure-ethylester, 2-Methoxyphenol (Guajakol), 2-Ethoxyphenol, Benzylalkohol, und L-Tyrosin als einzige C/E- bzw. C/N-Quelle. Manche Stämme, deren Zahl von den positiven Ergebnissen in der Parenthese angegeben ist, verwerten D-Glucose (41), D-Fructose (33), Brij58 (40), 2,3-Dihydrofuran (29) 1,4-Butandiol (31), Essigsäurevinylester (30), Phenol (41), Benzylaldehyd (36), L-Isoleucin (38), L-Leucin (38), L-Valin (37) und Monoethanolamin (35) als einzige C/E- bzw. C/N-Quelle. Alle Stämme wachsen auf Komplexmedien (z.B. NA-Medien, R2A-Medien und TSA-Medien) ohne weiteres, um sich mehrere Monate aktiv zu erhalten. Die meisten Stämme haben Wachstumsoptima in R2A-flüssigen Kulturen bei einer Salzkonzentration von 0 ~ 1 %(w/v) und 30°C unter neutralen oder alkalischen Bedingungen.

Alle Stämme sind gegenüber Kanamycin (30 µg), Rifampicin (30 µg) und Tetracyclin (10 µg), empfindlich, aber gegenüber Cycloheximid (50 µg), Nalidixinsäure (30 µg) und Kalium-Tellurit (37,5 µg) resistent. Die Applikation von einem Gemisch von Cycloheximid, Nalidixinsäure und Kalium-Tellurit erhöht die Medienselektivität für die Isolierung solcher Stämme. Mit der Zugabe von Penicillin erhöht sich die Selektivität für den opportunistischen Krankheitserreger *Rhodococcus equi* (Barthon & Hughes, 1981), aber in dieser Arbeit weist Penicillin (10 µg) gegenüber den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen unterschiedliche Empfindlichkeitsmuster auf (Tab. 4-1).

Die Koloniemorphologie und die Koloniefarbe von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämmen ändern sich von Zeit zu Zeit nach der Anzucht mit einem selektiven Substrat. Die Koloniemorphologie von einigen Aralkylether-abbauenden Stämmen verändern sich nach der Anzucht mit Anisol oder Phenetol. Rauhe und unregelmäßige Kolonien von den Stämmen St117 und MOP100 änderten sich nach der schleimigen und glattrandigen Form von den Stämmen St127 und MOP102. Nach langer Kultivierung auf Komplexmedien ohne Substratdruck kehrte die evolvierte

Koloniemorphologie von den Stämmen St127 und MOP102 nach der ursprünglichen Form von den Stämmen St117 und MOP100 zurück. Die morphologischen Veränderungen sind kein Mutationsereignis, sondern eine fundamentale Adaptation an giftigen Aralkylethern.

Die Koloniefarbe von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen ändert sich spontan von orange nach gelb ohne jeglichen Verlust ihrer Abbaufähigkeit für aliphatische Alkylether, Phenetol und Dibenzylether. Die Farbe ändert sich andererseits ohne Substratdruck (z.B. Diethylether) von orangenfarben nach rot. Das verursacht den völligen Verlust von ihren Etherabbaufähigkeiten. Pigmente von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen ändern sich ohne Rückkehr nach der ursprünglichen Koloniefarbe. Daher ist die Pigmentänderung von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen auf die Genmutation zurückzuführen.

Außerdem ist es bekannt, daß *Rhodococcus* umfangreiche Abbaupotentiale auf schwer abbaubare Substanzen besitzt, wie z.B. Alkane, alicyclische Kohlenwasserstoffe, Nitroaromate, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, Pyridine, Steroide (Cain, 1981b), Detergentien, Warfarin (Goodfellow & Williams, 1983), *S*-Ethyl-dipropylcarbamothionat, Atrazin (Behki et al., 1993; Nagy et al., 1995; Shao & Behki, 1996), polychlorierte Biphenyle (Masai et al., 1995; Maeda et al., 1995), Dibenzothiophen (Piddington et al., 1995), Lignin-verwandte Substanzen (Rast et al., 1980) und Huminsäure (Cross et al., 1976). Der Stamm *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 stellt sowohl durch eine Dioxygenierungsreaktion über *cis*-Diol von Indol als auch durch eine Monooxygenierungsreaktion über *trans*-Diol Indigo her (Allen et al., 1997).

Es ist kein Wunder, daß *Rhodococcus* zu zahlreichen Diskussionen über den Abbau von umweltproblematischen Chemikalien gestellt wird. Heutzutage nimmt man an, daß Actinomyceten die prokaryotische Äquivalenz von Pilzen sind. Sie sind nicht nur morphologisch ähnlich, sondern ihre Rolle ist auch ähnlich in der Natur (Goodfellow et al., 1988).

4.2.3. Differenzierung der Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme

Die Aralkylether- und Alkylether-abbauenden Stämme werden, bezüglich ihrer Abbaupotentiale auf ausgewählte Etherchemikalien wie 1,4-Dialkoxybenzol, Monoaralkylether, cyclische Alkylether und aliphatische Alkylether, in vier Gruppen untergeteilt.

<u>Die 1,4-Dialkoxybenzol-abbauenden Stämme</u>

Die Stämme DEOB100 und DEOB200 verwerten charakteristischerweise 1,4-Diethoxybenzol als einzige C/E-Quelle, und dealkylieren 1,4-Dimethoxybenzol ohne jegliches Wachstum. Sie können die

korrespondierenden Metabolite 1,4-Hydrochinon bzw. Chinone nicht weiter abbauen. Der Stamm DEOB100 verwerten dazu Phenol, aber der Stamm DEOB200 nicht.

Die Aralkylether-abbauenden Stämme

Sie verwerten charakteristischerweise mono-alkoxylierte Benzole, wie z.B. Anisol und Phenetol als einzige C/E-Quelle. Die *Rhodococcus* Stämme St117/127 und MOP100/102 sind hinsichtlich ihrer Morphologie und Abbaufähigkeit sehr ähnlich untereinander. Die beiden Gruppen zeigen die morphologischen und physiologischen Veränderungen in Gegenwart von Aralkyether wie z.B. Anisol und Phenetol an. Die Stämme MOP100 und 102 besitzen eine Pectin-Hydrolase. Das macht sie zu den damit negativen Stämmen St117 und 127 unterschiedlich.

Der orangenfarbene bzw. rote Stamm MOB100 zeigt eher ähnliche morphologische physiologische Charakteristika mit den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen als mit den oben beschriebenen Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen. Er besitzt aber keine Fähigkeit zum Abbau von aliphatischen Alkylethern oder Dibenzylether. Außer den Aralkylethern kann er Eugenol (4-Allyl-2-Methoxyphenol) als einzige C/E-Quelle verwerten.

Der Stamm MOB600 wird auβerhalb von *Rhodococcus* entfernt zugeordnet. Er verwertet außergewöhnlich 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol als einzige C/E-Quelle. Nach der Anzucht mit Aralkylether setzt er 3-Methoxyphenol schneller um, als 2-Methoxyphenol. Sogar wächst er mit 2-Methoxyphenol langsam nach einer Lag-phase. Im Vergleich dazu verwerten die anderen Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme nur 2-Methoxyphenol als einzige C/E-Quelle, nicht aber 3-Methoxyphenol. Außerdem baut der Stamm MOB600 kein 2-Ethoxyphenol ab, während die anderen Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme 2-Ethoxyphenol ohne weiteres verwerten. Der Stamm MOB600 baut auch verschiedene Aromaten ab, wie z.B. Benzol, Phenol, Styrol, Toluol, *o/m/p*-Kresole, und Biphenyl. Trotz seiner umfangreichen Abbaupotentiale auf Phenole und Benzole wächst er in/auf Komplexmedien schwer, ohne ein aromatisches Substrat (z.B. Phenol) zugetan wird. Er kann manche Kohlenhydrate, Aminosäuren, und Alkohole nicht als einzige C/E-Quelle verwerten. Seine Abbauwege von Aralkylethern scheinen zu den Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen unterschiedlich zu sein. Die Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme leiten eine 2-Monooxygenierungsreaktion unter Bildung von 2-Hydroxy-Aralkylethern ein. Vermutlich katalysiert ein Dioxygenasesystem vom Stamm MOB600 die initiale Oxidation von Aralkylethern, um *cis*-Aralkylether-Dihydrodiole zu bilden.

Alle aliphatische Alkylether-abbauende Stämme verwerten Phenetol als einzige C/E-Quelle, nicht aber Anisol mit den Ausnahmen, daß die zwei Stämme DEE5311 und DEE515 auch Anisol als

einziges Substrat verwerten. Phenetol ist ein gemeinsames Substrat für die beiden Stammgruppen von den Aralkylether- und aliphatische Alkylether-Abbauern. Im Vergleich dazu ist Anisol ein charakteristisches Substrat für die Aralkylether-Abbauer.

Die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme

Sie verwerten charakteristischerweise Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran als einzige C/E-Quelle. Sie verwerten nur Diethylether aus der aliphatischen Etherbindungsklasse. Sie können auch 2,3-Dihydrofuran als einzige C/E-Quelle verwerten, aber 2,5-Dihydrofuran dient zum Wachstum nicht für alle.

Einseitig Cα-Cβ-ungesättigte Etherbindungen, wie z.B. 2,3-Dihydrofuran (HMO ≈ -0,02), 3,4-Dihydro-2H-pyran (HMO ≈ -0,40), Ethinylethylether (HMO ≈ 0,37), und Ethylvinylether (HMO ≈ 0,84), werden nicht nur von Spezial-Mikroorganismen als einzige C/E-Quelle verwertet, sondern auch von manchen allgemeinen Mikroorganismen. Cα-Cβ-ungesättigte Etherbindungen werden entweder durch nicht-enzymatische Ozonierung unter Bildung von Ozonid (i.e. 1,2,4-Trioxolan) (Bunnelle, 1989), oder durch enzymatische Monooxygenierung unter Bildung von Epoxid abgebaut (Sone et al., 1989).

Die Stämme THF100, THF102, THF200 und THF202 gehören zu *Rhodococcus* an. Sie ergeben eine hohe Ähnlichkeit miteinander ($r > 0{,}9$). Sie können Di-carbonsäuren, wie z.B. Bernsteinsäure, L-Äpfelsäure und Adipinsäure, als einzige C/E-Quelle verwerten. Hingegen können die meisten Aralkylether- und aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme keine Di-carbonsäure verwerten.

Die Koloniemorphologie von den Stämmen THF100 und THF200 sind während der Agarkultivierung mit cyclischem Alkylether glattrandig und gelegentlich schleimig. Die schleimigen Kolonieform von den Stämmen THF100 und THF200 hat den Vorteil zum Abbau von Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran gegenüber der rauhen Kolonieform von den Stämmen THF102 und THF202. Die Stämme THF100 und THF200 haben eine höhere Toleranz (K_{SI}) gegen cyclische Alkylether als die Stämme THF102 und THF202. Als einzige C/E-Quelle macht Saccharose die damit positiv gewachsenen Stämme THF100 und THF102 zu den damit negativen Stämmen THF200 und THF202 unterschiedlich. Daraus wird vermutet, daß sich die Stämme THF100 und THF200 durch Anreicherung mit cyclischem Alkylether jeweils aus den Stämmen THF102 und THF202 evolviert haben. Die ersten passen sich an cyclische Alkylether mehr an.

Der Stamm THF400 wird auβerhalb von *Rhodococcus* entfernt zugeordnet. Er wächst langsam und bildet oft Zellflocken in flüssigen Zellkulturen. Er verwertet manche Chemikalien nicht, die die *Rhodococcus* Stämme als einzige C/E- oder C/N-Quelle verwerten können: z.B. ergab er kein

Wachstum mit D-Arabitol, Mannitol, Sobitol, Milchsäure, Hexadecan, 2-Methoxyphenol, 2-Ethoxyphenol, Benzylalkohol, L-Isoleucin oder Valin. Der Stamm THF400 kann hingegen Inositol, ±2-Butanol, ±2-Pentanol und Glycerol als einzige C/E-Quelle verwerten, die die *Rhodococcus* Stämme nicht gewöhnlich verwerten. Der Stamm THF400 verwertet auch einige Di-carbonsäuren, wie z.B. Bernsteinsäure und L-Äpfelsäure, nicht aber Adipinsäure. Die Wachstumsrate vom Stamm THF400 ist langsamer als bei den anderen *Rhodococcus* Stämmen. Der Stamm THF400 ergibt eine langsame lineare Wachstumsrate, μ_{max}/K_S, mit geringer Konzentration an cyclischen Alkylethern. Trotzdem kann sich er bis zur hohen Konzentration als Hauptverwerter entwickeln, weil er demgegenüber eine hohe Toleranz (K_{SI}) hat. Diethylether bewirkt eine starke Substrat-Hemmung gegen den Stamm THF400. In Gegenwart von Diethylether zeigt er nur ein langsames Wachstum und eine niedrige Toleranz demgegenüber.

<u>Die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme</u>

Sie alle gehören zu *Rhodococcus* an. Sie verwerten charakteristischerweise verschiedene aliphatische Alkylether als einzige C/E-Quelle, wie z.B.

symmetrische aliphatische Alkylether wie Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether, Di-n-pentylether, Di-n-hexylether und Di-n-heptylether

unsymmetrische aliphatische Alkylether wie *tert*-Butylethylether, n-Butylethylether und n-Butylmethylether

eine Mischung von **2- und 3-Isoamylether**, sowie **Phenetol** und **Dibenzylether**

Werden die beiden etherischen Gruppen aus Methylgruppe, Cα-verzweigten Alkylgruppen (z.B. Isopropyl- und *tert*-Butyl-) oder Phenylring zusammengesetzt, wie z.B. Dimethylether, Methyl-*tert*-Butylether, Isopropylether, *tert*-Butyl-2,3-glycidylether, Anisol, und Diphenylether, werden diese Etherverbindungen durch die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme nicht mehr abgebaut. Weder Benzylphenylether noch cyclische Alkylether (z.B. Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran) wird abgebaut. Daraus fand man, daß

ein O-Methylen-Cα-Atom ($R\text{-}^{\alpha}CH_2\text{-}O\text{-}R'$) durch aliphatische Alkylether-abbauende Stämme initial angegriffen wird.

Die aliphatische Alkylether-Abbauer wachsen mit Diethylether schnell (Verdoppelungszeit, t_d = 3 ~ 4 h), wobei sich keine sichtbare Substrat-Hemmung bis zu 25 mM aufweist. Diethylether wirkt aber eventuell auf die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme toxisch ein. Während des Stoffwechsels von Diethylether nahm die gesamte Biomasse zu, aber die aktive Zellzahl (KBE) war konstant. Ein unausgewogenes Wachstumsverhältnis befand sich zwischen der aktiven Zellzahl und der gesamten Biomasse. Die Ansäuerung der Zellkulturen trat dazu in der späteren Wachstumsphase auf. Das schnelle Abbau von Diethylether und die dadurch bedingte schnelle Wachstumsrate von den aliphatische Alkylether-abbauenden Stämmen sind eine Überlebensstrategie, um eine schnelle Absterberate auszugleichen.

Unter Verwendung ökologischen Begriffes über *r*-/*K*-Strategisten (Atlas & Bartha, 1981), scheinen die aliphatische Alkylether-Abbauer ein *r*-Strategist zu sein. Die Populationsgröße vom *r*-Strategist ist von Zeit zu Zeit schwankend, und das Wachstum ist normalerweise schwer im Hungerzustand, wie z.B. im Humus. Im Gegensatz dazu halten sich *K*-Strategisten vor Hunger aus. Mit geeignetem Substrat (z.B. Diethylether) entwickeln sich die *r*-Strategisten gelegentlich als Hauptkomponente. Unter dem starken Substratdruck herrschen die *r*-Strategisten, die sich demgegenüber aushalten, im ganzen vor. Aus den Hemmexperimenten mit Diethylether kommen die aliphatische Alkylether-Abbauer mit der hohen Konzentration an Diethylether (ca. 10 mM) in einer Belebtschlammprobe vor, aber die anderen *r*-Strategisten, wie z.B. der Stamm THF102, können mit geringem Diethylether Hauptverwerter vertreten. Der Stamm THF102 hat den Vorteil zum Wachstum bei einer niedrigen Konzentration an Diethylether, wobei er eine schnelle lineare Wachstumsrate ergibt. Wenn die beiden cyclische und aliphatische Alkylether-Abbauer am Abbau von Diethylether in derselben Nische eine Rolle spielen, werden ihre dynamische Verhalten nach Atlas (1986) zusammengefaßt. So fungieren in Gegenwart von Diethylether

die aliphatische Alkylether-Abbauer als ´hoch-tolerierende´ r-Strategisten,

und

die cyclische Alkylether-Abbauer als ´nieder-tolerierende´ r-Strategisten

Die meisten aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme verwerten keine halogenierte aliphatische Alkylether wie z.B. 2-Bromethylethylether oder 2-Chlorethylethylether als einzige C/E-Quelle mit den Ausnahmen, daß die Stämme DEE515 und DEE5151 mit 2-Chlorethylethylether wachsen. Die Stämme DEE515 und DEE5151 verwerten aber keine chlorierte Abbauprodukte, wie z.B. 2-Chlorethanol, 2-Chloracetaldehyd und 2-Chloressigsäure. Sie bauen 2-Chlorethylethylether unvollständig ab. Phenetol dient zum Wachstum für alle aliphatische Alkylether-abbauende Stämme, nicht aber Anisol mit den Ausnahmen von den Stämmen DEE5311 und DEE515. Die Stämme

DEE5311 und DEE515 besitzen die beiden unterschiedlichen Abbaufähigkeiten. Daher liegen sie zwischen den Aralkylether- und aliphatische Alkylether-Abbauern.

Tab. 4-1. Charakteristika zur Unterteilung von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen[1)]

	Unterteilung[2)]	1,4-Diethoxybenzol-Abbauer	Aralkylether-Abbauer	Cyclische Alkylether-Abbauer	Aliphatische Alkylether-Abbauer	DEE5311	DEE515	DEE5151
C/E-Quelle	1,4-Diethoxybenzol	+	-	-	-	-	-	-
	Anisol	-	+	-	-	+	+	-
	Phenetol	-	+	-	+	+	+	+
	Dibenzylether	-	-	-	+	+	+	+
	Diethylether	-	-	+	+	+	+	+
	Di-n-propylether	-	-	-	+	+	+	+
	2-Chlorethylethylether	-	-	-	-	-	+	+
	Tetrahydrofuran	-	-	+	-	-	-	-
	Tetrahydropyran	-	-	+	-	-	-	-
Antibiotika[3)]	Penicillin (10µg)	n [4)]	-	+	+	+	+	+
	Chloramphenicol (30µg)	n	+	+	-	-	-	-

Anm.

1) Die taxonomisch unterschiedlichen Stämme THF400 und MOB600 werden aus dieser Tabelle ausgeschlossen.
2) Die Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme unterteilen sich in Überein-stimmung mit ihren stammspezifischen Abbaupotentialen auf aufgeführte Etherverbindungen.
3) Zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber antibiotischen Hemmstoffen wurde üblicherweise die Hemmzone ums jegliche ∅ 6 mm-Filterblätterchen herum gemessen, auf dem eine bestimmte Menge an Hemmstoffen aufgetragen wurde.
4) n : *n*icht untersucht

Schließlich werden die Charakteristika zur Unterteilung von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen in der Tabelle 4-1 zusammenfassend tabellarisiert.

Die Empfindlichkeiten gegenüber antibiotischen Hemmstoffen bestätigten, daß die stammspezifischen Gruppierungen von den Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen eine taxonomische Bedeutung haben. Die Empfindlichkeiten gegenüber Chloramphenicol (30 µg) und Penicillin (10 µg) sind von großer Bedeutung: Die Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme St116, St117, MOP100 und MOP102 sind gegenüber Chloramphenicol (30 µg) empfindlich, aber gegen Penicillin (10 µg) resistent. Alle cyclische Alkylether-abbauende *Rhodococcus* Stämme sind gegenüber den beiden Antibiotika empfindlich. Die aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme sind gegen Chloramphenicol resistent, aber gegenüber Penicillin empfindlich. Statt des Penicillins weist Carbenicillin (100 µg) ein ähnliches Empfindlichkeitsmuster auf. Aus den Empfindlichkeitstests gegenüber Chloramphenicol und Penicillin her, lassen sich die Stämme DEE5311 und DEE515, die die beiden Charakteristika von den Aralkylether- und aliphatische Alkylether-Abbauern anzeigen, deutlich innerhalb der aliphatische Alkylether-abbauenden Stammgruppe kennzeichnen, d.h., sie sind gegen Chloramphenicol resistent, aber gegenüber Penicillin empfindlich.

4.3. Hypothetische Abbauwege der Alkylether

Die oxidativen Abbaumuster von Aralkylethern und Alkylethern wurden mit den ausgewählten Bakterien untersucht, die jeweils eigene Abbaufähigkeiten für Etherverbindungen besaßen. Jedes hypothetisches Abbauenzymsystem, das sich in einer Stammgruppe befand, konnte charakteristischerweise eine Etherbindungsklasse oxidieren, wie z.B. 1,4-Di-alkoxylierte Benzole, Monoaralkylether, cyclische Alkylether, oder aliphatische Alkylether.

Wie von White et al. (1996) zusammengefaßt, wird die Etherbindung nach der Initialoxidation nicht direkt abgespalten, sondern der oxidative Etherabbau vollzieht die Bildung von der instabilen Halbacetalbindung (O-C···OH), das spontan abgespalten wird.

4.3.1. 1,4-Dialkoxybenzole

Einige Studien berichteten, daß 1,3- bzw. 1,4-Di-alkoxylierte Benzole durch aerobe Bakterien oxidativ *O*-dealkyliert wurden. Zum Beispiel wird Acetylgruppe der Ethoxybenzoesäure durch oxidative *O*-Deethylierungsreaktion von Nocardien abgespalten, wobei NADH und O_2 stöchiometrisch verbraucht werden (Cartwright & Smith, 1967; Ribbons, 1970). Bernhardt et al.

(1975) berichteten, daß ein 4-Methoxybenzoesäure-Monooxygenasesystem (EC 1.14.99.15) von *Pseudomonas putida* DSM1868, das aus einer NADH-abhängigen Reduktase und einer Monooxygenase besteht, 4-Methoxybenzoesäure oxidativ demethyliert. Daraus entstanden Formaldehyd und 4-Hydroxybenzoesäure stöchiometrisch.

Die O-Arylgruppe besitzt wegen der Konjungation zwischen dem *p*-Orbital des Sauerstoffatoms und den aromatischen π-Elektronen eine höhere Bindungsenergie als die O-Alkylgruppe. Die Initialoxidation am O-Alkyl-C-Atom scheint energetisch günstig zu sein. Daher werden Aralkylether wahrscheinlich an der O-Alkylgruppe dirgierend oxidiert.

Die 1,4-Diethoxybenzol-abbauenden *Rhodococcus* Stämme DEOB100 und DEOB200 dealkylierten 1,3- bzw. 1,4-Di-alkoxylierte Benzole, wie z.B. 1,3-Dimethoxybenzol, 1,4-Dimethoxybenzol und 1,4-Diethoxybenzol. Daraus entstanden jeweils 3-Methoxyphenol, 4-Methoxyphenol und 4-Ethoxyphenol als Zwischenmetabolite. Sie verwerteten nur freigesetzte Ethylgruppen von 1,4-Diethoxybenzol als einzige C/E-Quelle, aber keine freigesetzte Methylgruppe von 1,3-Dimethoxybenzol oder 1,4-Dimethoxybenzol. Der Stamm DEOB100 dealkylierte 3-Methoxyphenol bzw. 4-Methoxyphenol weiter zu Hydrochinon/Chinon-Derivaten, während der Stamm DEOB200 sie nicht mehr umsetzte. Die Stämme DEOB100 und DEOB200 konnte weder Anisol, Phenetol, noch 1,2-Dimethoxybenzol (Veratrol) dealkylieren.

Nach der Anzucht mit Phenol oder Aralkylether setzten diese Stämme 2-Methoxyphenol schnell um. Ihre *O*-Dealkylierungsaktivitäten für 2-Methoxyphenol haben keine Beziehung mit den *O*-Dealkylierungsaktivitäten für 1,3-/1,4-Di-alkoxylierte Benzole und 3-/4-alkoxylierte Phenole. 2-Methoxyphenol oder 2-Ethoxyphenol fungieren als ein Inducer für Cytochrom-$P450_{RR1}$ vom Stamm *Rhodococcus rhodochrous* St116, um damit zu Brenzkatechin oxidiert zu werden. Andererseits induzieren 4-Methoxybenzoesäure und 4-Ethoxybenzoesäure ein unterschiedliches Cytochrom-$P450_{RR2}$-Enzym (Karlson et al., 1993). Cytochrome-P450, die eine *O*-Dealkylierungsreaktion mit phenolischen Etherverbindungen katalysieren, kommen in *Rhodococcus*, *Nocardia* (Cartwright et al., 1971) und *Streptomyces* (Sutherland, 1986) vor. Zum Beispiel ist ein Cytochrom-P450-Enzymsystem von *Streptomyces setonii*, das entweder mit 1,2-Dimethoxybenzol oder 2-Methoxyphenol induziert wird, für die *O*-Demethylierungsreaktionen verantwortlich. Die *O*-Dealkylierungsreaktion von Cytochrom-P450-Enzymen wird noch nicht ausführlich gemacht. So steht die Frage offen, ob das O-Aryl- oder O-Alkyl-C-Atom von Aralkyletherverbindungen initial attackiert wird (White et al., 1996).

4.3.2. Aralkylether

Die Aralkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme St127 und DEE5311 oxidierten Anisol und Phenetol. Daraus entstanden 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol.

Am Benzolring substituiertes Sauerstoffatom, das ein elektronenziehendes Effekt hat, neigt sein freies Elektronenpaar an den Kernring umzustellen. Damit bilden sich die σ-Komplexe zur *o-/p*-dirigierenden Substitution. Die σ-Komplexe vollziehen keine oder nur wenige *m*-Substitution. Wenn Aralkylether an der *ortho*-Stelle mit elektrophiler Hydroxylgruppe substituiert werden, wird damit die nächste *O*-Dealkylierungsreaktion an der O-Alkylbindung sterisch behindert. Statt dessen wird die *ipso*-Substitution an der O-Arylbindung vereinfacht (Ohe et al., 1994). Nach der *ipso*-Substitution zerfällt die Alkylgruppe nicht via Hemiacetal ins Aldehyd, sondern via Benzochinon-Hemiketal ins Alkohol. Dafür sind Cytochrom-P450-Enzyme verantwortlich.

Wurde der aliphatische Alkylether-abbauende *Rhodococcus* Stamm DEE5311 mit Diethylether angezogen, setzte er am Versuchsbeginn durch eine *O*-Hydroxylierungsreaktion am O-Alkyl-C-Atom Aralkylether zu Phenol um. Nach einigen Stunden wurden Anisol und Phenetol nicht mehr durch eine *O*-Hydroxylierungsreaktion umgesetzt, sondern durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion jeweils zu 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol. Wurde der Stamm DEE5311 mit Anisol oder Phenetol angezogen, setzte er Aralkylether nur durch eine 2-Monooxygenierungsreaktion um. Daraus wird festgestellt, daß das aliphatische Alkylether-abbauende Enzymsystem (i.e. *O*-Dealkylase) und das Aralkylether-abbauenden Enzymsystem (i.e. Aralkylether-2-Monooxygenase) unterschiedlich induziert werden.

Der Stamm DEE5311 besitzt während des Stoffwechsels von aliphatischen Alkylethern (z.B. Diethylether) keine Fähigkeit zum phenolischen Abbau. Toxisches Phenol wird durch eine *O*-Dealkylierungsreaktion mit Aralkylethern akkumuliert. Während des Stoffwechsels von Aralkylethern werden hingegen die Abbauenzyme zum Abbau phenolischer Produkte völlig bewerkstelligt. Daher belastet die 2-Monooxygenierung von Aralkylethern die Zelle weniger als die *O*-Dealkylierung. Aus den Umsatzversuchen mit dem Stamm DEE5311 geht hervor, daβ die primäre 2-Monooxygenierung während des Stoffwechsels von Aralkylethern günstiger ist, als die *O*-Dealkylierung.

Außerdem bewirkte Phenetol während des Wachstums toxische Emulgierung auf die Zelle. Der Stamm DEE5311 war gegen die Toxizität von Phenetol widerstandfähiger (K_{SI} = 5,03 mM) als der Stamm St127. Nach der Anzucht mit Diethylether setzte der Stamm DEE5311 Phenetol schneller um (0,57 mM h^{-1} pro OD_{546} = 1,0), als nach der Anzucht mit Anisol (0,055 mM h^{-1} pro OD_{546} = 1,0). Die *O*-Dealkylase entgiftete Phenetol ca. 10 fach schneller als die 2-Monooxygenase.

Nach der Anzucht mit Anisol oder Phenetol setzten die beiden Stämme St127 und DEE5311 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol zum vermutlichen 4-Methoxybrenzkatechin um, das als ein ′dead-end′-Produkt nicht mehr abgebaut wurde. Nach der Anzucht mit Phenol waren die Umsatzraten von 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol zu 4-Methoxybrenzkatechin noch schneller, aber Anisol und Phenetol wurden damit nur langsam umgesetzt. Daraus resultiert, daß 3-Methoxyphenol und 4-Methoxyphenol durch unspezifische Enzymreaktionen von der Phenol-Hydroxylase zu 4-Methoxybrenzkatechin oxidiert werden. Ähnlich katalysieren Phenol-Hydroxylasen von den Pilzstämmen *Candida tropicalis* (Bayly & Barbour, 1984) und *Penicillium* Bi7/2 (Hofrichter & Scheibner, 1993) unspezifische Oxidationen mit 3-Methylphenol und 4-Methylphenol, um 4-Methylbrenzkatechin zu bilden.

Der nicht weiter klassifizierte Stamm MOB600 setzte Anisol und Phenetol ebenfalls zu 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol um. Die Umsatzrate von Anisol und Phenetol erhöhte sich 7 ~ 40 fach nach der Anzucht mit Anisol. Die Zelle setzte nach der Anzucht mit Anisol oder Phenetol nicht nur Anisol und Phenetol um, sondern auch Toluol und 1,2-Methylendioxybenzol. Damit wurde 1,2-Methylendioxybenzol zu 3,4-Methylendioxyphenol transformiert. Der Stamm St127 oder der Stamm DEE5311 setzte hingegen kein 1,2-Methyldioxybenzol um. Nach der Anzucht mit Phenol oder Toluol setzte dieser Stamm aber kein 1,2-Methylendioxybenzol um. Die Transformation von 1,2-Methylendioxybenzol zu 3,4-Methylendioxyphenol wird mit dem primären Oxidasesystem katalysiert, das mit Aralkylether bewerkstelligt wird. 3,4-Methylendioxyphenol wirkt als ein ′dead-end′-Produkt eine Produkt-Hemmung aufs primäre Oxidasesystem vom Stamm MOB600 aus.

Aus den Umsatzversuchen mit 3-Methoxyphenol oder 4-Methoxyphenol bildete der Stamm MOB600 kein 4-Methoxybrenzkatechin als ein ′dead-end′-Produkt. Er besitzt keine unspezifische Phenol-Hydroxylase.

Im Vergleich zu den *Rhodococcus* Stämmen St127 und DEE5311 oxidierte der Stamm MOB600 2-Methoxyphenol und 3-Methoxyphenol schnell zum transitorischen 3-Methoxybrenzkatechin. Der Stamm MOB600 wuchs mit 2-Methoxyphenol oder 3-Methoxyphenol, aber die anderen Aralkylether- und Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme verwerteten kein 3-Methoxyphenol als einzige C/E-Quelle. Der Stamm MOB600 besaß dazu eine Dioxygenase nach der Anzucht mit einem aromatischen Substrat wie z.B. Anisol, Phenetol oder Toluol, um Brenzkatechin, 3-Methylbrenzkatechin und 3-Methoxybrenzkatechin extradiolisch abzubauen. Der Stamm, der eine extradiolisch arbeitende Dioxygenase besitzt, hat normalerweise ein hohe Oxidationspotentiale auf verschiedenen Aromaten und die *ortho*-Diphenole. Zum Beispiel baut *Pseudomonas putida* U (PsU) verschiedene Aromaten ab, wie z.B. Phenol, *o-/m-/p*-Kresole, 2,3-Xylolol und 3,4-Xylolol, wobei die *ortho*-Diphenole extradiolisch oxidiert werden (Bayly & Barbour, 1984). Ähnlich baut der Stamm

MOB600 verschiedene aromatische Substanzen ab, wie z.B. Phenol, *o-/m-/p*-Kresol, Toluol, 2-Methoxyphenol, 3-Methoxyphenol, Anisol, und Phenetol, wobei *ortho*-Diphenole, wie z. B. Brenzkatechin, 3-Methylbrenzkatechin und 3-Methoxybrenzkatechin, extradiolisch oxidiert werden. Die Initialoxidase vom Stamm MOB600 hat eine Reaktionspriorität für eine Reihe von 3-Methoxyphenol > 2-Methoxyphenol > 4-Methoxyphenol. Im Vergleich dazu zeigten die *Rhodococcus* Stämme St127 und DEE5311 die andere Reaktionspriorität für 2-Methoxyphenol >> 3-Methoxyphenol ≈ 4-Methoxyphenol.

Aus den Umsatz- und Oxidationsmustern vom Stamm MOB600 wird hypothetisch postuliert, daß sich ein 2,3-Dioxygenasesystem an der primären Oxidation von Aralkylethern beteiligt, um Aralkylether-2,3-Dihydrodiole zu bilden. In dieser Arbeit war es schwer, Aralkylether-2,3-Dihydrodiole nachzuweisen. Resnick und Gibson (1993) berichteten, daß der Toluol-2,3-Dioxygenase von *Pseudomonas putida* F39/D Anisol und Phenetol zu den entsprechenden Aralkylether-2,3-Dihydrodiolen oxidiert. Weil Aralkylether-2,3-Dihydrodiole in Wasser instabil sind, werden sie zu 2-Alkoxyphenolen oder 3-Alkoxyphenolen dehydratisiert.

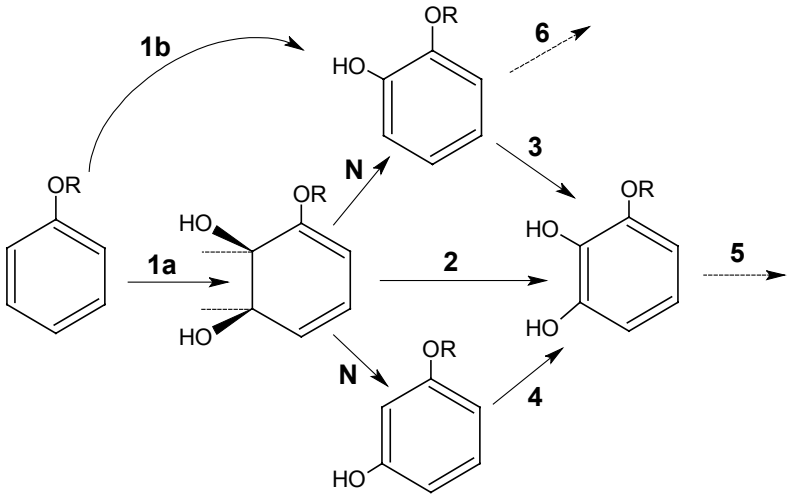


Abb. 4-1. Hypothetische Abbauwege von Aralkylethern durch den Stamm MOB600. An der primären Oxidation beteiligt sich entweder eine 2,3-Dioxygenase (1a) oder eine 2-Monooxygenase (1b): 1a) 2,3-Dioxygenase, **2**) Aralkylether-1,2-dihydrodiol-dehydrogenase, **3**) 2-Alkoxyphenol-3-monooxygenase, **4**) 3-Alkoxyphenol-2-monooxygenase, **5**) 3-Alkoxybrenzkatechin-2,3-dioxygenase, **N**) spontane Dehydratisierung, **1b**) Aralkylether-2-monooxygenase, **6**) 2-Alkoxyphenol-*O*-dealkylase (z.B. Cytochrom-P450; vgl. Abb. 1-6 im Kapitel 1.2.6)

Aus den Umsatzversuchen mit dem Stamm MOB600 wurde nur geringe Menge an 2-Alkoxyphenolen, wie z.B. 2-Methoxyphenol und 2-Ethoxyphenol, nachgewiesen. Daraus spontan entstandene 2-Alkoxyphenole und 3-Alkoxyphenole wurden jeweils nach der enzymatischen 3- oder 2-Monooxidation zu 3-Alkoxybrenzkatechinen wie z.B. 3-Methoxybrenzkatechin umgesetzt. Dabei werden 3-Alkoxyphenole mit ganzen Zellen schneller umgesetzt, als 2-Alkoxyphenole. Die 2- oder 3-Monooxygenase wurde jedenfalls nach der Anzucht mit Aralkylether induziert (Abb. 4-1).

In der Abbildung 4-2 geht es darum, daß die Transformation von 1,2-Methylendioxybenzol zu 3,4-Methylendioxyphenol mit einem 2,3-Dioxygenasesystem katalysiert wird.

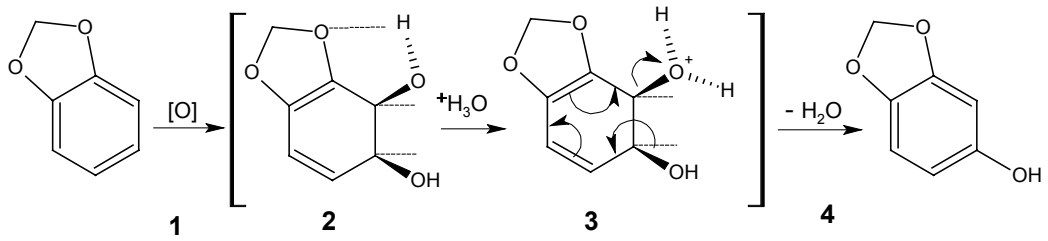


Abb. 4-2. Hypothetische 3,4-Dioxygenierungsreaktion und spontane Reaktionen für die Biotransformation von 1,2-Methylendioxybenzol zu 3,4-Methylendioxyphenol durch den Stamm MOB600: (1), Aralkylether-2,3-dioxygenase, (**2**) Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke, (**3**) Rearomatisierung, (**4**) Dehydratation.

Wenn sich eine Monooxygenase vom Stamm MOB600 an der Oxidation von 1,2-Methylendioxybenzol beteiligte, wäre die Bildung von 2,3-Methylendioxyphenol zu erwarten, denn die Monooxygenierung an der O-Arylbindung ist eine *o/p*-dirigierende Reaktion. Vermutliches Dihydrodiol von 1,2-Methylendioxybenzol ist sehr instabil, weil vier elektronenreiche Sauerstoffatome in engem Raum nahe liegen. Die elektronenreichen Sauerstoffatome neigen auf dem Wege der Rearomatisierung zur Stabilisierung intramolekulare Dehydratation zu vollziehen. Dabei bildet die proximale Hydroxylgruppe des transitorischen 3,4-Methylendioxybenzol-1,2-dihydrodiols eine intramolekulare Wasserstoff-Brücke mit dem benachbarten Sauerstoffatom an der Methylendioxybindung. Die Hydroxylgruppe fungiert als Träger einer zusätzlichen positiven Ladung (H^+), die von Hydronium-Ion (^+H_3O) übergeht. Das ist energetisch erheblich günstiger als eine positive Ladung am Kernring. Wenn sich die Rearomatisierung spontan ereignet, zerfällt die positiv geladene Hydroxylgruppe ins Wassermolekül (Dehydratation).

Tab. 4-2. Verschiedene Abbauwege von Aralkylethern mit den ausgewählten Bakterien[1)]

Abbauweg		*O*-Dealkylation	2-Monooxgenation	Dioxygenation
Stamm		DEE5311 (Dee$^+$)	DEE5311 (Mob$^+$) St127 (Mob$^+$)	MOB600 (Mob$^+$)
Oxidationsaktivität für				
Toluol		-	-	+
1,2-Methylendioxybenzol		-	-	+
Brenzkatechin-Abbauweg		-	*ortho*-Spaltung	*meta*-Spaltung
Transformation		RP8-HPLC-Analyse		
Ausgangsmaterial	Folgemetabolit			
Anisol	Phenol	+	-	-
Anisol	2-Methoxyphenol	(+) [2)]	+	+
3-/4-Methoxyphenol	4-Methoxybrenzkatechin	-	+	-
2-/3-Methoxyphenol	3-Methoxybrenzkatechin	-	-	+
1,2-Methylendioxybenzol	3,4-Methylendioxyphenol	-	-	+

Anm.
1) Die Stämme wurden bevor Versuch mit Diethylether (Dee$^+$) oder Anisol (Mob$^+$) angezogen
2) Wurde der DEE5311 mit Diethylether angezogen, konnte er am Anfang des Versuches Anisol und Phenetol zu Phenol umsetzen. Einige Stunden nach dem Versuch wurde Anisol nur zu 2-Methoxyphenol umgesetzt.

In der Tabelle 4-2 werden verschiedene Abbauwege von Aralkylethern mit den ausgewählten Aralkylether-abbauenden Stämmen DEE5311, St127 und MOB600 zusammengefaßt. Daraus wird bestätigt, daß Aralkylether via drei unterschiedliche Abbaumechanismen abgebaut werden, nämlich die *O*-Dealkylierung, die 2-Monooxygenierung, und die 2,3-Dioxygenierung.

4.3.3. Aliphatische Alkylether

Die aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme verwerten aliphatische Alkylether mit verschiedenen Kettenlängen, wie z.B. Diethylether und Di-n-propylether, Phenetol und Dibenzylether als einzige C/E-Quelle. Aus den bisherigen Studien wurden die Abbaumechanismen von aliphatischen Alkylethern selten bekannt gemacht. Wenige Studien haben hypothetisch die primäre Monooxygenierung vorgeschlagen. Dadurch entstanden Alkohole und Aldehyde stöchiometrisch (Stirling & Dalton, 1980; Hardison et al., 1997; Hur et al., 1997). Die bisherigen Studien bestätigten grundsätzlich den oxidativen Abbau von aliphatischen Alkylethern durch enzymatische *O*-Dealkylierung.

4.3.3.1. Schlüsselenzyme zum Etherabbau: *O*-Dealkylase und Alkohol-Oxidase

Der aliphatische Alkylether-abbauende *Rhodococcus* Stamm DEE5151 besitzt während des Stoffwechsels von geeignetem Ether (z.B. Diethylether) eine *O*-Dealkylase und eine Alkohol-Oxidase. Die Alkohol-Oxidase scheint eigentlich mit alkoholischem Substrat induziert zu werden, das vom Etherabbau entsteht. Die beiden *O*-Dealkylase und Alkohol-Oxidase zeigen jeweils breite Substratspektren an aliphatischen Alkylethern und den alkoholischen Produkten an. Aus den Induktionsverhalten und den Substratspektren wird hypothetisch postuliert, daß die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase zum Abbau von aliphatischen Alkylethern zusammen wirken.

Die hypothetische *O*-Dealkylase oxidiert nicht nur aliphatische Alkylether mit verschiedenen Kettenlängen wie z.B. Diethylether, Di-n-propylether, Di-n-butylether und Di-n-pentylether, sondern auch Aralkylether und Dibenzylether. Mit zunehmender Kettenlänge von symmetrischen Alkylethern neigt die Oxidationsrate abzunehmen.

Wurde der Stamm DEE5151 mit Diethylether angezogen, ergab er eine konstante Sauerstoffaufnahmerate mit n-Alkanen ohne jegliche Beziehung mit ihren Kettenlängen von n-Pentan bis n-Octadecan. Vermutlich oxidierte die Zelle kein n-Alkan produktiv, da die aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme keine flüchtige n-Alkane, wie z.B. n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, oder n-Octan, als einzige C/E-Quelle verwerteten. Aus den Oxidationsmustern vom Stamm DEE5151 mit n-Alkanen und symmetrischen Alkylethern wird angenommen, daß aliphatische Alkylether sowohl durch enzymatische *O*-Dealkylierungsreaktion am O-Methylen-Cα-Atom als auch durch unproduktive Monooxygeneirungsreaktion am terminalen bzw. distalen-C-Atom abgebaut werden. Die letzte gilt besonders für lange Kettenlängen von aliphatischen Alkylethern wie z.B. Di-n-hexylether und Di-n-heptylether. Im wesentlichen wurden Di-n-butylether und Di-n-pentylether auch durch die Dibenzofuran/Fluoren-abbauenden *Terrabacter* Stämme (DPM/DPO) und die Styrol-abbauenden *Rhodococcus* Stämme MLB120 und ELB120 als einzige C/E-Quelle verwertet. Insbesondere wurde n-Butylmethylether nicht nur durch die aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämme, sondern auch durch die Dibenzofuran/Fluoren-abbauenden *Terrabacter* Stämme DPM202, DPO210, DPO320, und DPO340, und die taxonomisch verschiedenen Hexan-abbauenden Stämme HXN500, HXN600, HXN1000, HXN1100, HXN1200, HXN1400, HXN1500 und HXN1900 als einzige C/E-Quelle verwertet. Außerhalb von der aliphatische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen verwerteten die oben genannten Stämme weder Diethylether noch Di-n-propylether als einzige C/E-Quelle. Weil Diethylether auch zum Wachstum für die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme dient, hält sich Di-n-propylether als ein charakteristisches Substrat für die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme.

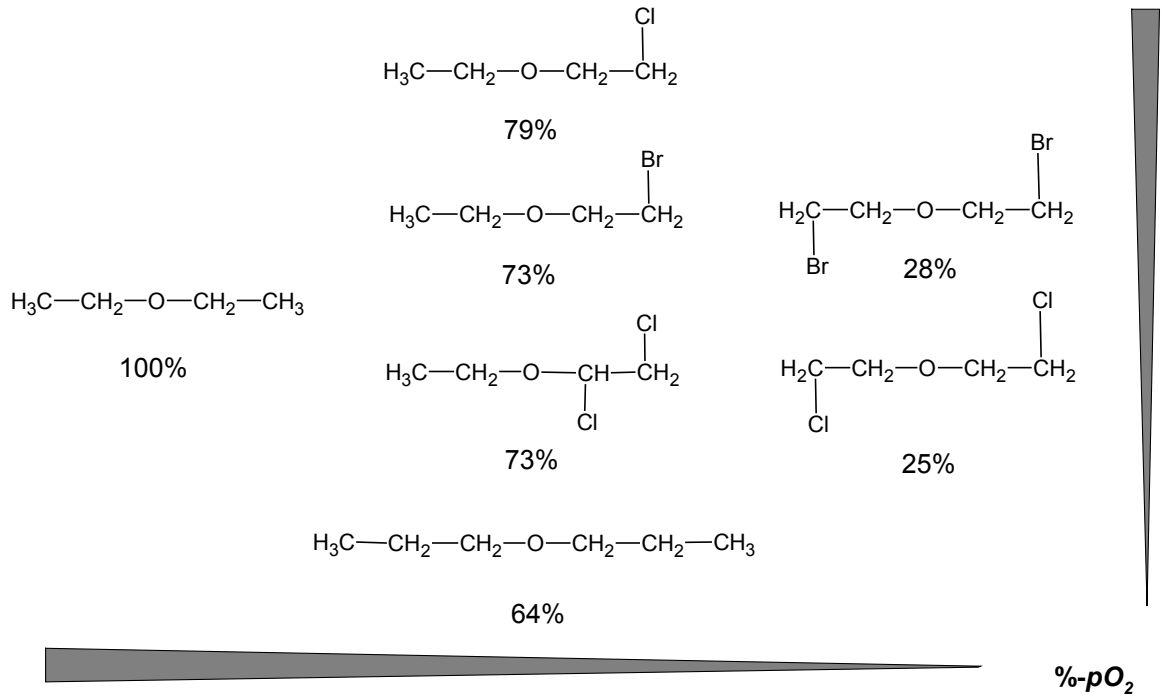


Abb. 4-3. Relative Oxidationsrate (%) von Diethylether, Di-n-propylether und halogenierten Ethylethern mit der hypothetischen O-Dealkylase vom Stamm DEE5151. Der Stamm DEE5151 wurde bevor Versuch mit Diethylether angezogen

Die *O*-Dealkylase oxidiert halogenierte Alkylether. Ihre halogenierte Abbauprodukte, wie z.B. 2-Chlorethanol, 2-Chloracetaldehyd, und 2-Chloressigsäure, werden aber durch die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme nicht als einzige C/E-Quelle verwertet, ohne enzymatisch dehalogeniert zu werden. In der Abbildung 4-3 geht es ums typische Oxidationsmuster vom Stamm DEE5151 mit Diethylether, Di-n-propylether und halogenierten Ethylethern.

Daraus folgt, daß die *O*-Dealkylase bevorzugt nicht-halogenierte Alkylgruppen angreift, d.h., die *O*-Dealkylase attackiert primär ein *O*-Methylen-C-Atom mit hoher Elektronendichte.

Die Alkohol-Oxidase, die mit Diethylether oder Ethanol induziert wird, besitzt ein hohes Oxidationspotential auf aliphatische Alkohole, Glykole, Cyclohexanol und Benzylalkohol. Die höchste Oxidationsrate erhält sich mit Ethanol oder 1-Propanol. Mit zunehmender Molekülmasse von Glykolen nimmt die Oxidationsrate logarithmisch ab. Einige Pilzstämme besitzen auch Alkohol-Oxidasen (EC 1.1.3.13 und EC 1.1.3.31), die breite Substratspektren an primären n-Alkoholen, 2-Propen-1-ol, 2-Buten-1-ol, halogenierten n-Alkoholen, Isopropanol, Isobutanol, 2-Propyn-1-ol, 1,4-Butandiol, Ethylenglykol, Ethylenglykol-mono-methylether und Formaldehyd haben.

4.3.3.2. Die Hemmwirkungen von Glutaraldehyd und Ethylvinylether auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase

Die zwei Oxidase, die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase, vom Stamm DEE5151 werden bei der Oxidation von Diethylether oder Ethanol mit der Zugabe von Glutaraldehyd oder Ethylvinylether gehemmt. Niedrige Konzentration an Glutaraldehyd (< 30 µM) wurde mit ganzen Zellen hyperbolish oxidiert, aber die Oxidationskurve wies mit der zunehmenden Konzentration eine Substrat-Hemmung auf, wobei die Hemmkonstante des Glutaraldehydes mit 72 µM abgeschätzt wurde.

In Gegenwart von Glutaraldehyd wurde die *O*-Dealkylase bei der Oxidation von Diethylether kompetitiv gehemmt, wobei die Hemmkonstante (K_i) nach der Modellgleichung (3.10) mit 20,8 µM abgeschätzt wurde. Glutaraldehyd bewirkte eine negative Kooperativität ($h < 1$) auf die *O*-Dealkylase, während sich ohne Glutaraldehyd keine negative Kooperativität ($h = 1$) ergab. Mit der zunehmenden Konzentration wurde der Koeffizient um so niedriger als Eins. Erst gebundenes Glutaraldehyd erschwerte die Bindung des nächsten Substrates (i.e. Diethylether) am Aktivzentrum.

Die Ethanol-Oxidationskurve wies eine sigmoide Gestalt auf. Bei Anwesenheit von Glutaraldehyd zeigte die Alkohol-Oxidationskurve eine Abnormität an, daβ sich das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, erniedrigte, und daβ der Gleichgewicht-Koeffizient, K, zwischen den aktiven und inaktiven Formen von der Alkohol-Oxidase nach der allosterischen Wechselwirkung anstieg. Zur Folge nahm die Enzymaffinität zum Ethanol stark ab. Aus der Abnormität von der Enzymkinetik wird vermutet, daß Glutaraldehyd die Alkohol-Oxidase modifiziert oder irreversibel hemmt.

Ethylvinylether ist leicht abbaubar, aber hemmt die *O*-Dealkylase und reprimiert die Induktion. Auf ähnliche Weise fungiert 2,3-Dihydrofuran als Inhibitor auf die *O*-Dealkylase und die Alkohol-Oxidase. Vermutlich sind die Cα-Cβ-Doppelbindungen von den beiden Substratanaloga für die spezifische Hemmung von der *O*-Dealkylase verantwortlich. Die Hemmwirkung des Ethylvinylethers auf die *O*-Dealkylase war nicht allosterisch, d.h., die *O*-Dealkylase gehorcht der Ein-Substrat-Reaktion, wobei der Koeffizient, h, ohne Bezug aufs Vorhandensein des Ethylvinylethers bei Eins liegt. Wie oben erwähnt, bewirkte Glutaraldehyd hingegen eine negative Kooperativität auf die *O*-Dealkylase. Glutaraldehyd scheint keine *O*-Dealkylase unmittelbar zu hemmen, sondern die Alkohol-Oxidase. Die damit bedingte Konformationsänderung von der Alkohol-Oxidase bewirkte eine Negativität auf die benachbarte *O*-Dealkylase in der Zelle, wenn die beiden Oxidasen in engem Zellkompartiment nahe liegen.

In Gegewart von Ethylvinylether wies die Diethylether-Oxidationkurve eine Abnormität auf. Damit erniedrigte sich das Maximum Oxidationsrate, und der Halbsättigungsgrad erhöhte sich. Ethylvinylether hemmte die *O*-Dealkylase vermutlich durch irreversible Bindung am Aktivzentrum.

Ethylvinylether hemmt auch die Alkohol-Oxidase bei der Oxidation von Ethanol. In Gegenwart von Ethylvinylether nahm die Gleichgewicht-Konstante, *K*, nach der allosterischen Wechselwirkung von der Alkohol-Oxidase zu, wobei das Maximum Oxidationsrate, $(pO_2)_{max}$, konstant war. Ethylvinylether bewirkte keine allosterische Wechselwirkung auf die Alkohol-Oxidase. Ethylvinylether scheint die Enzymaffinität zum Ethanol zu erniedrigen, ohne sich ans Aktivzentrum oder an die allosterische Stelle zu binden.

Zusammenfassend mit den Hemmwirkungen von Glutaraldehyd und Ethylvinylether auf die *O*-Dealkylase und die Alkolhol-Oxidase werden die folgenden Hypothesen vorgestellt:

i) Die beiden Enzyme, die O-Dealkylase und die Alkolhol-Oxidase, werden voneinander unterschiedlich induziert. Die O-Dealkylase wird mit geeignetem Ether induziert, der ein nicht-substituiertes O-Methylen-Cα-Atom besitzt. Die Alkolhol-Oxidase wird während des Abbaues von Ethern mit alkoholischem Produkt oder mit der Zugabe eines Alkohols (z.B. Ethanol) induziert.

ii) Die O-Dealkylase folgt der Ein-Substrat-Reaktion, und die Alkohol-Oxidase gehorcht der allosterischen Enzymreaktion.

iii) Die beiden Enzymsystemen kuppeln sich nicht nur mechanisch, sondern auch sterisch. Alipahtische Alkylether, Phenetol und Dibenzylether werden durch eine Kettenreaktion von den beiden Enzymen abgebaut. Zur Optimierung der Kettenreaktion werden die beiden Enzyme wahrscheinlich in der Membran naheliegend konfiguriert. Damit oxidiert die Alkohol-Oxidase Alkohole und Aldehyde weiter zu Säuren ohne Freisetzung in die Flüssigkeit.

4.3.3.3. Hypothetische Abbauwege des Ethylvinylethers

Ethylvinylether wird heutzutage als ein Baustein der Polymere in der Industrie breit verwendet. Es gibt nur wenige Berichte über den biologischen Abbau der Vinylether. Vinylether werden enzymatisch durch eine Monooxygenierungsreaktion via reaktives Epoxid zu Glykolaldehyd und Ethanol abgebaut (Sone et al., 1989). Weil Epoxide normalerweise instabil sind, werden die

Abbauwege nur mit den chemischen Epoxibildungen von Phenylvinylethern in aprotischem Lösungsmittel bestätigt. Der Nucleophilangriff eines Hydroxyl-Ions ans Epoxid veranläßt die spontane Etherspaltung. Daraus entstehen Glykolaldehyde und Phenole in wäßrigem 0,1 M Phosphat Puffer stöchiometrisch. In diesem Fall greift nucleophiles Hydroxyl-Ion nur ein Oxiran-Cα-Atom von der Epoxibindung an (Abb. 4-4).

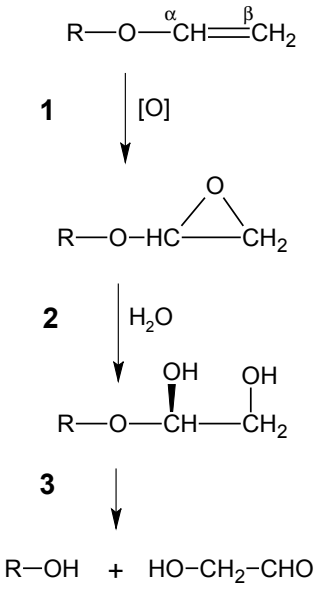


Abb. 4-4. (1) Die Monooxidation von Vinylethern (R = Phenyl- oder Alkylgruppe): (2) Der Abbau von instabilem Epoxid erfolgt mit dem Nucleophilangriff eines Hydroxyl-Ions in Wasser, um Halbacetalbindung zu bilden. **(3)** Halbacetal zerfällt spontan ins Glykolaldehyd und Alkohol.

Vinylether werden andererseits nach der *'anti-Markownikoff'*-Anlagerung eines Radikals abgebaut. Die Additionsreaktion ereignet sich nicht am O-Methinyl-Cα-Atom, sondern am Methylen-Cβ-Atom. Daraus entsteht ein transitorisches Epoxid-Radikal, und das zweite Radikal lagert sich ans O-Methinyl-Cα-Atom an. Thiolgruppen von Glutathion (GSH) oder Cystein sind für die biologische *'anti-Markownikoff'*-Addition wichtig. Thiyl-Radikal [R-S$^{\bullet}$] bildet sich nach der Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Thiolgruppe, um nach der *'anti-Markownikoff'*-Addition mit Alkenen zu reagieren.

$$HS\text{-}R + {}^{\bullet}X \leftrightarrow {}^{\bullet}S\text{-}R + HX$$

$$R'\text{-}O\text{-}{}^{\alpha}CH = {}^{\beta}CH_2 + {}^{\bullet}S\text{-}R \leftrightarrow R'\text{-}O\text{-}{}^{\alpha}CH_2{}^{\beta}CH_2\text{-}S\text{-}R$$

Zum Beispiel besitzt *Rhodococcus* sp. während des Stoffwechsels von Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) eine GSH-abhängige S-Transferase, die für die Transformation von Isopren, *cis*-1,2-Dichlorethen und *trans*-1,2-Dichlorethen jeweils zu 3,4-Epoxy-3-methyl-1-buten, *cis*-1,2-Dichlorepoxyethan und *trans*-1,2-Dichlorepoxyethan verantwortlich ist (Ewers & Knackmuss, 1991; van Hylckama Vlieg et al., 1998). Epoxide werden mit der GSH-abhängige S-Transferase weiter zu 2-Oxoaldehyden abgebaut. 2-Oxoaldehyde (z.B. Glyoxal) reagieren mit Glutathion, wodurch Hemithioacetale entsteht. Diese GSH-abhängige S-Transferase ist zur Entgiftung von 2-Oxoaldehyden im Zytosol von großer Bedeutung.

Die Addition eines Sauerstoff-Diradikals (O_2) konkurriert mit der enzymatischen Monooxidation von Vinylethern in der Zelle. Daraus entsteht jeweils ein Hydroperoxid (Alkoxy-Dioxetan) oder ein β-Hydroxy-hydroperoxid als Intermediate. Diese instabilen Intermediate zerfallen spontan in zwei Formaldehyd. Formaldehyd ist ein endgültiges Produkt, das während des Stoffwechsels von Vinylethern die Zelle beschädigt (Abb. 4-5).

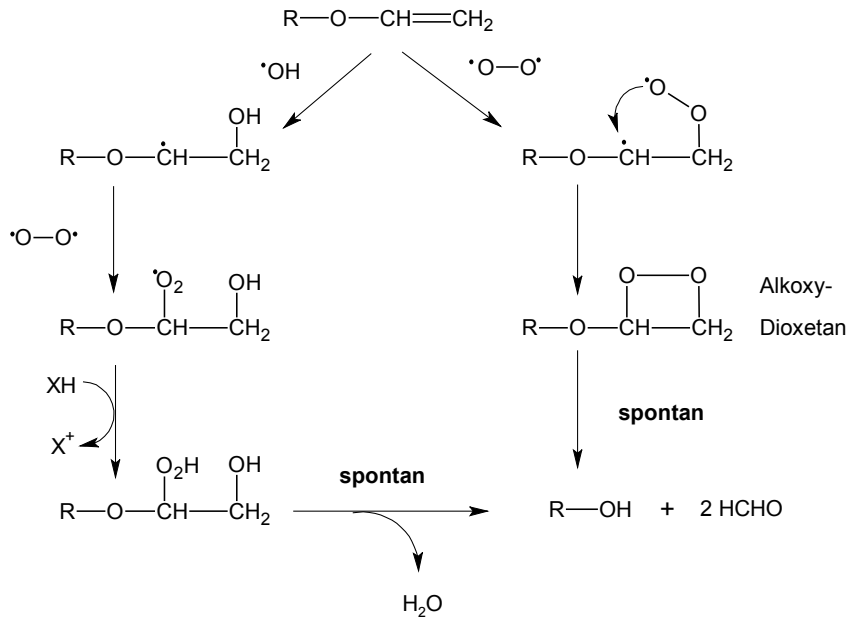


Abb. 4-5. Hypothetische Abbauwege von Vinylethern unter Beteiligung vom Sauerstoff-Diradikal (O_2). Zwei Formaldehyd Moleküle entstehen vom Abbau des Ethylvinylethers stöchiometrisch. Am Anfang der Reaktion wird Hydroxyl-Radikal nach der ′*anti-Markownikoff*-Addition′ am O-Methylen-Cβ-Atom (rechtsseits) hinzugefügt, oder ein Sauerstoff-Diradikal greift unmittelbar die Vinylbindung an (linksseits).

Vinylether werden auch nach dem chemischen ′*Criegree*′-Mechanismus unter Bildung von Ozonid (1,2,3-Trioxolan) bei der Ozonolyse abgebaut. Damit zerfällt instabiles Carbonyloxid ins Formyloxid und Ethylformat (Bunnelle, 1989).

4.3.3.4. Der Abbau von Dibenzylether

Dibenzylether ist eine ausgezeichnete Modellverbindung zur biochemischen Untersuchung der oxidativen Abbauvorgänge, um die primäre Monooxidation am O-Methylen-C-Atom (Cα-Hydroxylierung) zu erklären.

Zahlreiche Benzylether befinden sich in Lignin-Kohlenhydraten. Der biologische Abbau ist von hohem Interesse in der industriellen Papierbleichung. Manche chemische Prozesse lassen schwer abbaubare Chlorverbindungen als Nebenprodukte übrig (Jefferies, 1990). Extrazelluäre Peroxidasen von Fäulepilzen und einigen Actinomyceten spielen am Abbau des Lignins eine wichtige Rolle (Tien & Kirk, 1983 und 1984; Ramachandra et al., 1988). Aus den zahlreichen Bindungsarten von Lignin ist die β-Arylетherbindung eine Hauptkomponente. β-Arylether werden überhaupt mit Lignin-Peroxidasen von Weißfäulepilzen in der Natur abgebaut. Außer dem radikalischen Abbau werden bisher die anderen Abbaumechnismen selten bekannt gemacht. Durch chemische Oxidation mit einem Elektronenakzeptor, wie z.B. 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ), wird Benzylether unter Bildung von Benzyl-Kation abgebaut (Watanabe et al. 1989). Diese chemische Oxidation erfolgt auf Kosten von zwei Elektronen mit der Abstraktion eines Hydrid-Ions (^{-}H) von der Methylengruppe. Benzyl-Kation wird dann vom Hydroxyl-Anion (^{-}OH) in Wasser attackiert (S_{N2}). Daraus entstandenes Halbacetal wird spontan zu Benzylaldehyd abgespalten (Penn & Lin, 1990).

Die S_{N2}-Substitution verläuft mit zunehmender Elektronendichte um so einfacher. Methylgruppe, Ethylgruppe und Benzylgruppe zeigen unterschiedliche Reaktionsleichtigkeiten für die S_{N2}-Substitution an. Wurde Phenol oder Benzoesäure (dM/dt, μM min^{-1}) während des Abbaues von Anisol, Phenetol oder Dibenzylether quantifiziert, ergab sich die Produktionsrate in der Reihefolge von Dibenzylether > Phenetol > Anisol. Die Ergebnisse stimmten mit der Oxidationsrate (pO_2, nMole ml^{-1} min^{-1} = μM min^{-1}) gut überein. Vorausgesetzt, daß die hypothetische *O*-Dealkylase vom Stamm DEE 5151 bevorzugt ein O-Methylen-Cα-Atom angreift, neigt die Reaktionsleichtigkeit von Dibenzylether, Phenetol und Anisol dazu, von der O-Methylen-Cα-Atomzahl abhängig zu sein (Tab. 4-3). Ethylgruppe des Phenetols enthält fünf Wasserstoffatome. Die relative Oxidationsrate von Phenetol war 7,7 μM min^{-1}. Vorausgesetzt, daß die Methyl-Cβ-Hydroxylierungsrate [$CH_2(OH)CH_2$-O-Phenyl] mit der Oxidationsrate von Anisol [1,3 μM min^{-1}] gleichwertig ist, beträgt die O-Methylen-Cα-Hydroxylierungsrate [$CH_3CH(OH)$-O-Phenyl] 6,4 μM min^{-1} (6,4 = 7,7 – 1,3).

Tab. 4-3. Reaktionsleichtigkeiten von Anisol, Phenetol und Dibenzylether mit ganzen Zellen vom Stamm DEE5151

Chemikalien	Anisol CH_3-O-C_6H_5	Phenetol $C^{\beta}H_3C^{\alpha}H_2$-O-$C_6H_5$	Dibenzylether $(C_6H_5CH_2)_2$-O
Cα-O-Bindung	**Methyl**	**Ethyl**	**Benzyl**
Relative Cα-H-Bindungsstärke [1)]	1	4,4	
***p*O_2 [μM min^{-1}]** [2)] **pro OD_{546}=1**	1,3	7,7	13,1
dM/dt [μM min^{-1}] [3)] **pro OD_{546}=1**	1,7	8,0	22,2

Anm.

1) Relative Cα-H-Bindungsstärken von Methylgruppe und Ethylgruppe wurden vom Sykes (1988) entnommen
2) Die relative Sauerstoffaufnahmerate [nMole ml^{-1} min^{-1}] wurde nach der Molkonzentration [μM min^{-1}] umgerechnet.
3) Die Produktionsrate von Phenol (beim Abbau von Anisol und Phenetol) und Benzoesäure (beim Abbau von Dibenzylether) wurde jeweils aus der Abbaurate von Anisol, Phenetol und Dibenzylether berechnet, wenn die mit Diethylether angezogene Zelle am Versuchsbeginn weder Phenol noch Benzoesäure abbauen konnte.

Damit werden die Reaktionsleichtigkeiten von der Methyl-Cβ-H-Bindung und der O-Methylen-Cα-H-Bindung nach der sich daran gebundenen H-Atomzahl jeweils mit 0,43 und 3,2 abgeschätzt. Die O-Methylen-Cα-H-Bindung wird mit einer Hydroxylgruppe ca. 7,4 fach schneller substituiert, als die Methyl-Cβ-H-Bindung. Wird die Reaktionsleichtigkeit von der O-Methylen-Cα-H-Bindung aus den chemischen relativen C-H-Bindungsstärken zwischen Methylgruppe und Ethylgruppe (1 : 4,4) berechnet, wird die O-Methylen-Cα-H-Bindung mit einer Hydroxylgruppe 6,7 fach schneller substituiert, als die Methyl-Cβ-H-Bindung. Die empirische Reaktionsleichtigkeit von der O-Methylen-Cα-H-Bindung ist ein bißchen größer als der theoretisch berechnete Wert. Im wesentlichen wurde keine terminale Hydroxylierung von Phenetol, wie z.B. 2-Phenoxyethanol und 2-Phenoxyessigsäure, nachgewiesen. Die hypothetische *O*-Dealkylase vom Stamm DEE5151 vermöchte dazu, Phenetol am O-Methylen-Cα-Atom spezifisch zu hydroxylieren.

Methylengruppe von Benzylether wird andererseits mit den π-Elektronen des Benzolringes konjungiert. Das sp^2-hybridisierte Benzyl-Radikal [$C_6H_5C^{\bullet}H$-O-] ist reaktionsträger als Alkyl-Radikale. Ein Wasserstoffatom wird vom Benzyl-Radikal weiter abstrahiert, damit sich reaktionsfähiges Benzyl-Kation bildet. Benzyl-Kation unterzieht sich dann dem nukleophilen Angriff eines Hydroxyl-Ions (S_N2) in Wasser. Daraus entstandenes Halbacetal wird dann stöchiometrisch zu Benzylaldehyd und Benzylalkohol abgespalten.

Wurden Benzylaldehyd und Benzylalkohol mit ganzen Zellen schnell zu Benzoesäure oxidiert, erhielt sich offensichtlich ein stöchiometrisches Verhältnis, ca. 2 : 1, zwischen der Produktionsrate von Benzoesäure (22,2 µM min^{-1}) und der Oxidationsrate von Dibenzylether (13,1 µM min^{-1}). Dieses Verhältnis bestätigt, daß die *O*-Dealkylase Dibenzylether an einer Methylengruppe primär oxidiert.

Aus den unterschiedlichen Abbaustudien mit den *Sphingomonas* Stämmen BZE101 und BZE102 her, wird bestätigt, daß sich der biologische Abbau von Dibenzylether durch monooxidative Hydroxylierung an der Methylengruppe ereignet (Abb. 4-6). Bei diesen Stämmen erhielt sich am Versuchsbeginn die Produktionsrate von Benzoesäure gegenüber dem Abbaurate von Dibenzylether stöchiometrisch, weil die Zelle allerdings eine Benzyl-Alkohol/Aldehyd-Oxidase dabei hatte.

Wurde der Stamm DEE5151 mit Diethylether angezogen, oxidierte er Diethylether, Dibenzylether und Benzylalkohol, nicht aber Benzoesäure. Kein Enzym zum Abbau von Benzoesäure war mit Diethylether bewerkstelligt. Damit wurde Dibenzylether unvollständig abgebaut. Wenn dieser Stamm mit Dibenzylether wuchs, wurden die Enzyme für die Oxidation von Diethylether, Dibenzylether, Benzylalkohol, und Benzoesäure vollständig induziert. Die *O*-Dealkylase wurde eigentlich entweder mit Diethylether oder Dibenzylether induziert. Daraus wird festgestellt, daß sich dasselbe Oxidasesystem (*O*-Dealkylase) an der Initialoxidation von Diethylether oder Dibenzylether beteiligt, und daß verschiedene Etherbindungen, die ein nicht-substituiertes O-Methylen-Cα-Atom besitzen, die *O*-Dealkylase induzieren.

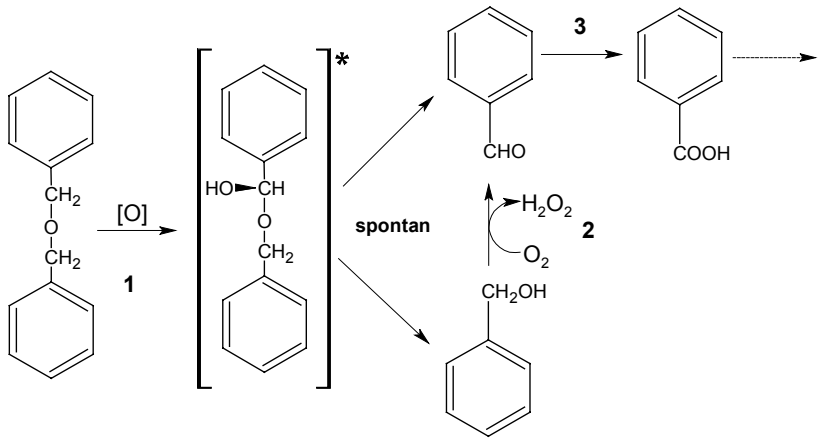


Abb. 4-6. Hypothetische Abbauwege von Dibenzylether durch den *Rhodococcus* Stamm DEE5151 und durch die *Sphingomonas* Stämme BZE101 und BZE102: (1) O-Methylen- Cα-Hydroxylase, **(2)** und **(3)**, Benzyl-Alkohol/Aldehyd-Oxidase

Hinsichtlich dieser Abbaumechanismen, scheint die Funktionen von den beiden primären Oxidasesystemen von dem *Rhodococcus* Stamm DEE5151 und den *Sphingomonas* Stämmen BZE101 und BZE102 ähnlich zu sein, aber die beiden unterscheiden sich voneinander aufgrund ihrer Substratspezifitäten an Etherverbindungen.

4.3.4. Cyclische Alkylether

Der Abbau von cyclischen Alkylethern ist noch unklar. Trudgill (1984) hat postuliert, daß Tetrahydrofurane an der nicht-substituierten 2- oder 5-Position primär hydroxyliert werden (Abb. 4-7A). Bernhardt und Diekmann (1991) bestätigten es mit einigen cyclische Alkylether-abbauenden *Rhodococcus* Stämmen, die Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran durch oxidative Hydroxylierung an der 2- oder 5-Position abbauen konnten. Bock et al. (1996) berichteten, daß der Stamm *Rhodococcus ruber* 219 2,5-Dimethyltetrahydrofuran an methyliertem Cα-Atom hydroxyliert (Abb. 4-7B).

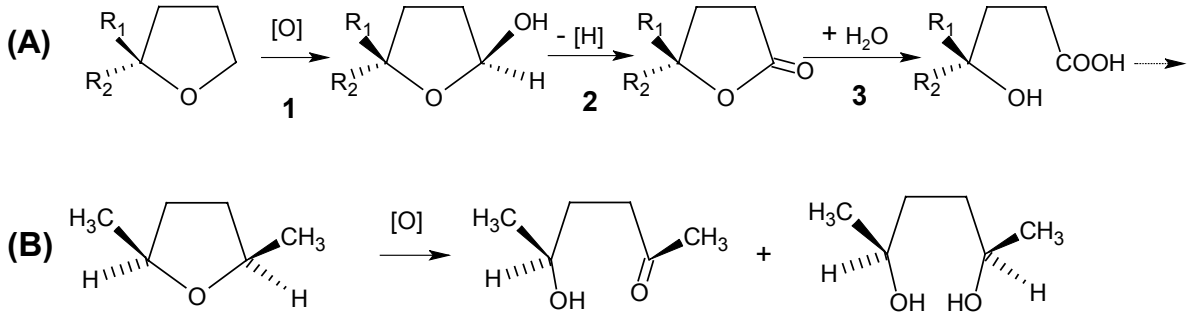


Abb. 4-7. Hypothetische Abbauwege von Tetrahydrofuranen durch eine Monooxygenierungsreaktion: (A) Der oxidative Abbau erfolgt mit dem Initialangriff nicht nur an einem nicht-substituierten O-Methylen-C-Atom unter Beteiligungen von (**1**) O-Methylen-Hydroxylase, (**2**) Dehydrogenase, und (**3**) Esterase (modifiziert aus Trudgill, 1984), **(B)** sondern auch an einem methylierten Cα-Atom von 2,5-Dimethyltetrahydrofuran (Bock et al.1996)

Aus dieser Arbeit geht hervor, daβ Diethylether durch die cyclische und aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme im allgemeinen abgebaut wird. Außerhalb von Diethylether bauen die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme weder aliphatische Alkylether mit längeren Kettenlängen (z.B. Di-n-

propylether), Phenetol, noch Dibenzylether ab, die alle die aliphatische Alkylether-abbauenden Stämme als einzige C/E-Quelle verwerten. Im Gegenteil dazu bauen die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme Tetrahydrofuran und Tetrahydropyran ab, die kein aliphatische Alkylether-Abbauer abbauen kann.

Ethylvinylether, das die *O*-Dealkylase vom Stamm DEE5151 spezifisch hemmt, hat keine Hemmwirkung auf die THF-Hydroxylase von den Stämmen THF100 und THF400. Die beiden Enzymsysteme sind voneinander unterschiedlich, obwohl sie Diethylether in ähnlicher Weise oxidieren können.

Wenn sich die terminalen Methylgruppen von Diethylether nach der freien Rotation von den sp^3-Orbitalen auf verschiedene Positionen umdrehen, hätte die THF-Hydroxylase von der cyclische Alkylether-abbauenden Stammgruppe eine Substratspezifität am *cis*-Rotationsisomer (Abb. 4-8). Das *cis*-Rotationsisomer ähnelt dem Tetrahydrofuran, mit dem die THF-Hydroxylase die höchste Oxidationsrate ergibt. Im Gegensatz dazu besitzt die DEE-Hydroxylase (i.e. *O*-Dealkylase) die höchste Substratspezifität vermutlich am *trans*-Rotationsisomer.

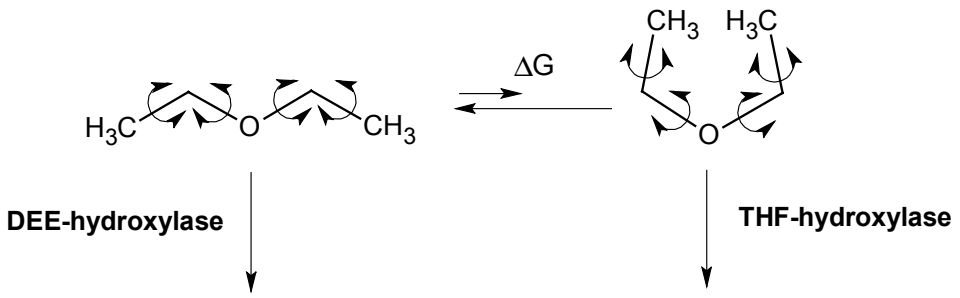


Abb. 4-8. Rotationsisomere von Diethylether zur Erklärung über die Substrat-spezifitäten von der THF-Hydroxylase und der DEE-Hydroxylase: Die DEE-Hydroxylase (i.e. *O*-Dealkylase) von den aliphatische Alkylether-Abbauern hat die Substratspezifizität am *trans*-Rotationsisomer von Diethylether. Die THF-Hydroxylase von den cyclische Alkylether-Abbauern zeigt im Gegensatz dazu die Substratspezifizität am *cis*-Rotationsisomer, das dem Tetrahydrofuran ähnelt. Weil die Potentialenergie, ΔG°, zur Rotation vom sp^3-Orbital niedrig ist, bilden sich diese Rotationsisomere freiwillig in der Raumtemperatur.

Das erklärt sich aus der Tatsache, daß die cyclische Alkylether-Abbauer kein Di-n-propylether oxidieren. Lange aliphatische Alkylether, wie z.B. Di-n-propylether, behindern das Vorkommen des *cis*-Rotationsisomers wegen der sterischen Abstoßung zwischen den terminalen Methylgruppen. Die DEE-Hydroxylase oxidiert hingegen aliphatische Alkylether mit verschiedenen Kettenlängen, Phenetol und Dibenzylether, aber keinen cyclischen Alkylether. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, daß die DEE-Hydroxylase nicht am *cis*-Rotationsisomer, sondern am *trans*-Rotationsisomer von Diethylether eine Substratspezifität hat.

Die cyclische Alkylether-abbauenden Stämme THF100 und THF400 oxidierten auch Cα-verzweigte Etherverbindungen, wie z.B. Ethyl-*tert*-butylether und Isopropylether, schneller als Diethylether. Verzweigte Etherverbindungen haben eine größere Neigung dazu, die terminalen Methylgruppen anzunähern. Diese Tendenz ist größer mit mehreren Methyl-Substituenten an den O-Methylen-Cα-Atomen von Diethylether.

In der Abbildung (4-9) geht es ums Oxidationspotential vom Stamm THF100 auf verschiedene Etherverbindungen.

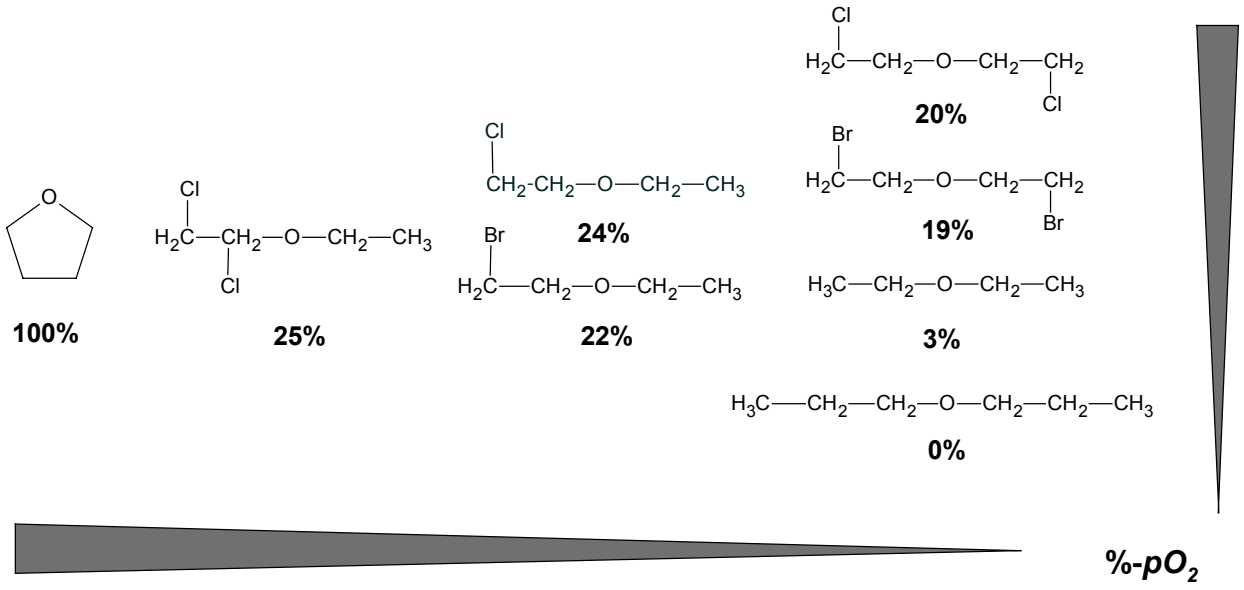


Abb. 4-9. Relative Oxidationsrate von Tetrahydrofuran, halogenierten Ethylethern, Diethylether und Di-n-propylether mit der hypothetischen THF-Hydroxylase vom Stamm THF100 (vgl. Abb. 4-3)

Wird das Oxidationspotential vom Stamm THF100 mit dem vom Stamm DEE5151 verglichen (vgl. Abb. 4-3), ergibt die THF-Hydroxylase zur DEE-Hydroxylase ein unterschiedliches Oxidationsmuster. Beim Stamm THF100 wird die Oxidationsrate um so schneller, je mehr Ethylgruppe von Diethylether halogeniert wird. Halogeniertes Kohlenstoffatom besitzt eine wenige Elektrondichte wegen der elektronenziehenden Effekte von Halogenatom(en). Mehr substituierte Halogenatome erschweren die freie sp^3-sp^3-Rotation, weil halogenierte Ethylgruppe einer höheren Potentialenergie als nicht-halogenierte bedarf. Die Potentialenergie zur *syn*-periplanaren (*cis*-) Konformation liegt in der Reihefolge von ±1,2-Dichlorethylgruppe > 2-halogenierte Ethylgruppe > nicht-halogenierte Ethylgruppe. Diese Reihefolge stimmt genau mit der THF-Hydroxylaseaktivitäten vom Stamm THF100 für eine Reihe von ±1,2-Dichlorethylethylether > 2-halogenierten Ethylethern > Diethylether überein**.**

2-Halogenierte Ethylethylether, wie z.B. 2-Bromethylethylether und 2-Chlorethylethylether, werden durch die cyclische Alkylether-Abbauer schneller oxidiert, als Bis-(2-halogenierte Ethyl)-ether. Bis-(2-halogenierte Ethyl)-ether haben eine zusätzliche Repulsionskraft zwischen den negativen Dipolmomenten ($X^{\delta-}$ … $X^{\delta-}$) von Halogenatomen (X), um die Potentialenergie zur *syn*-periplanaren Konformation zu erhöhen. Die Repusionskraft wird größer, wenn sich die gleichen Dipolmomenten annähern.

Summary (English)

A purpose of this study was the enrichment and isolation of aryl alkyl ether- and alkyl ether-utilizing bacteria from various samples. 45 strains were isolated from the enrichment cultures using various ethers as a sole carbon and energy source. According to the phenotypic characterization, 43 strains of them belonged to *Rhodococcus* except for two strains MOB600 and THF400.

The bacterial isolates were characterized and divided into aryl alkyl ether-, aliphatic ether- or alicyclic ether-utilizing bacteria according to their substrate spectrums. The arbitrary categorization was consistent with the antibiotic susceptibility against chloramphenicol (30 µg) and penicillin G (10 µg). The antibiotic susceptibility against chloramphenicol and penicillin was a useful tool for the characterization and the classification of aryl alkyl ether- and alkyl ether-utilizing *Rhodococcus* strains. Aryl alkyl ether-utilizing *Rhodococcus* strains were resistant to penicillin, but sensitive to chloramphenicol. Alicyclic ether-utilizing *Rhodococcus* strains were sensitive to both antibiotics. Aliphatic ether-utilizing *Rhodococcus* strains were sensitive to penicillin, but resistant to chloramphenicol.

Ether bond is usually broken through a hydroxylation at the *O*-methylene carbon atom to form unstable semiacetal. The primary enzyme systems could be characterized based on the physical and chemical properties of oxidized ethers as well as the physiological and biochemical characteristics of microorganisms. Both of aryl alkyl ether- and aliphatic ether-utilizing *Rhodococcus* strains degraded phenetole (ethoxybenzene) in common as a sole carbon and energy source. Aryl alkyl ether-utilizing *Rhodococcus* strains utilized both anisole (methoxybenzene) und phenetole through a hydroxylation at the *ortho*-position of the aryl ring. Aliphatic ether-utilizing *Rhodococcus* strains utilized various aliphatic ethers such as diethylether, di-n-propylether, di-n-butylether, di-n-pentylether, di-n-hexylether, di-n-heptylether, ethyl-*tert*-butylether, and 2-/3-isoamylether as well as phenetole and dibenzyl ether through a hydroxylation at the *O*-methylene carbon atom. The aliphatic ether-utilizing strains also oxidized anisole perhaps at the *O*-methyl carbon atom, but most of them could not utilize anisole as a sole carbon and energy source with the exception of two strains DEE5311 and DEE515. Therefore, phenetole was initially attacked at the different positions by two different bacterial groups. Exceptionally, strains DEE5311 and DEE515 possess both enzyme systems to oxidize phenetole at the *O*-methylene carbon atom (i.e. *O*-Dealkylase) or the *ortho*-position of the aryl ring (i.e. 2-Monooxygenase).

As another example, both of aliphatic ether- and alicyclic ether-utilizing strains degraded diethylether in common as a sole carbon and energy source. Alicyclic ether-utilizing strains utilized

characteristically alicyclic ethers, such as tetrahydrofurane and tetrahydropyrane, as a sole carbon and energy source, but did not utilize other longer aliphatic ethers (e.g., di-n-propylether). In contrast, aliphatic ether-utilizing strains utilized various chain-lengths of aliphatic ethers, but neither tetrahydrofurane nor tetrahydropyrane. The initial oxidation of alicyclic ethers and aliphatic ethers seems to occur at the cyclic or aliphatic *O*-methylene carbon atom. Although the substrate specificity of DEE-hydroxylase (or *O*-dealkylase) of aliphatic ether-utilizing strains was quite different from that of THF-hydroxylase of alicyclic ether-utilizing strains, both enzymes oxidized diethylether perhaps at the *O*-methylene carbon atom. The substrate specificities of both enzymes seem to be dependent on the rotational isomerism of diethylether: The DEE-hydroxylase may be specific to the *trans*-conformation, while the THF-hydroxylase may have the substrate specificity to the *cis*-conformation. Rotational *cis*-isomer of diethylether appears to be structurally analogous with tetrahydrofurane to which the THF-hydroxylase shows the highest activity. Longer aliphatic ethers, such as di-n-propylether, are hindered to form any *cis*-conformation. The steric hindrance explains the reason, why the THF-hydroxylase could not oxidize long-chained aliphatic ethers. In contrast, the DEE-hydroxylase oxidized various aliphatic ethers, phenetole and dibenzylether, but not alicyclic ethers. Consistent with the substrate spectrum, the DEE-hydroxylase seems to be specific to the rotational *trans*-isomers.

Various degradation pathways of aryl alkyl ethers and alkyl ethers were summarized below with adequate model systems.

1. *Rhodococcus* sp. DEOB100 and DEOB200, which utilized 1,4-diethoxybenzene as a sole carbon and energy source, were able to dealkylate 1,3-dimethoxybenzene and 1,4-dimethoxybenzene, but not 1,2-dimethoxybenzene. They could utilize only dissociated ethyl group as a sole carbon and energy source, but dissociated methyl group or quinone derivatives did not serve as a sole carbon and energy source.
2. Anisole and phenetole were transformed to 2-methoxyphenol (guaiacol) and 2-ethoxyphenol, respectively, through a 2-monooxidation by *Rhodococcus* sp. St127 and DEE5311 which had grown with anisole or phenetole as a sole carbon and energy source.

   When *Rhodococcus* sp. DEE5311 was cultivated with diethylether, the resting-cells transformed anisole and phenetole to phenol through a hydroxylation at the *O*-alkyl groups (*O*-dealkylation). After a few hour incubation, the resting-cells produced only 2-methoxyphenol and 2-ethoxyphenol through a 2-monooxidation of anisole and phenetole, respectively.

   Taxonomically not-classified strain MOB600 utilized not only aryl alkyl ethers, such as 2-, 3-methoxyphenol, anisole and phenetole, but also a broad range of aromatic hydrocarbons, such as benzene, toluene, styrene, *o-/m-/p*-cresols, and biphenyl. This strain utilized 3-methoxyphenol,

whereas other aryl alkyl ether-utilizing *Rhodococcus* strains did not. Strain MOB600 appeared to possess different biochemical tools to degrade aryl alkyl ethers. Different from other aryl alkyl ether-degrading *Rhodococcus* strains, strain MOB600 converted 2-methoxyphenol and 3-methoxyphenol to 3-methoxycatechol, suggesting that strain MOB600 degrades aryl alkyl ethers primarily through a dioxygenation. When the resting cells of strain MOB600 transformed 1,2-methylendioxybenzene to 3,4-methylendioxyphenol, the primary dioxygenase system appeared to be inhibited with increasing of 3,4-methylendioxyphenol.

3. All of aliphatic ether-utilizing strains, which could characteristically utilize a broad range of aliphatic ethers, phenetole and dibenzylether as a sole carbon and energy source, belong to *Rhodococcus*. After the cultivation with diethylether, they possess also an alcohol-oxidase with a broad substrate range of alcohols and glycols. These two enzyme systems, so called *O*-dealkylase and alcohol-oxidase, play an important role in the degradation of aliphatic ethers and related compounds. The *O*-dealkylase showed a one-substrate reaction with diethylether. The alcohol-oxidase showed a sigmoid reaction with ethanol, suggesting that this enzyme consisted of allosteric subunits.

   Both *O*-dealkylase and alcohol-oxidase were strongly inhibited with ethylvinylether, 2,3-dihydrofurane or glutaraldehyde. Ethylvinylether and 2,3-dihydrofurane are regarded as structural analogues of diethylether to which the *O*-dealkylase shows the highest activity. Cα-Cβ-unsaturated alkylethers inhibited the *O*-dealkylase probably by the irreversible binding at the active center. Ethylvinylether reduced the affinity of the alcohol-oxidase to ethanol, but the maximal reaction velocity, V_{max}, was constant at various concentrations of ethylvinylether,.

   Glutaraldehyde exhibited another inhibitory effect on the alcohol-oxidase and the *O*-dealkylase. Glutaraldehyde reduced the affinity of the alcohol-oxidase to ethanol, probably by the irreversible inhibition. Glutaraldehyde had an inhibitory effect on the *O*-dealkylase, resulting in the increase of Michaelis-Menten-constant, K_M. However, the maximal reaction velocity, V_{max}, was constant. In the presence of glutaraldehyde, the *O*-dealkylase displayed an unusual negative cooperativity like an allosteric enzyme.

   The inhibitory effects of glutaraldehyde or ethylvinylether on the *O*-dealkylase and the alcohol-oxidase of aliphatic ether-utilizing strains revealed that the enzyme reactions of the *O*-dealkylase and the alcohol-oxidase were coupled in the degradation of various ethers: The *O*-dealkylase produced alcohol and aldehyde through a hydroxylation of ether, and the alcohol-oxidase could immediately transform alcohol and aldehyde to carboxylic acid. The coupled reactions of both enzymes could be optimized, provided that their active centers are adjacent to each other in the cell compartment (*i.e.* membrane).

4. Dibenzylether was a common substrate to examine the degradation pathways by aliphatic ether-utilizing *Rhodococcus* strain DEE5151 and dibenzylether-utilizing *Sphingomonas* strains BZE101 and BZE102. Both bacterial groups possessed a benzyl alcohol/aldehyd-oxidase to degrade dibenzylether via benzoic acid. Therefore, the degradation of one dibenzylether molecule resulted in the stoichiometric production of two benzoic acid molecules by the coupled reactions of the *O*-dealklyase and the alcohol-oxidase. The *O*-dealkylase of *Rhodococcus* sp. DEE5151 was more highly potent for the oxidation of aliphatic ethers, phenetole and dibenzylether than those of *Sphingomonas* sp. BZE101 and BZE102, which were able to oxidize only dibenzylether.

   The *O*-dealkylase activity of *Rhodococcus* sp. DEE5151 increased in the following order of anisole, phenetole and dibenzylether, which indicated that the enzyme activity depends on the number of *O*-methylene C-atoms. The *O*-dealkylase preferably attacks an *O*-methylene carbon atom (*O*-metylene-Cα-position).
5. Alicyclic ether-utilizing strains utilized diethylether as well as alicyclic ethers, such as tetrahydrofurane and tetrahydropyrane. Both of *Rhodococcus* sp. THF100 and a not-classified actinomycete THF400 exhibited similar oxidation potentials to ethers.

   Compared with aliphatic ether-utilizing strain *Rhodococcus* sp. DEE5151, strains THF100 and THF400 displayed another substrate specificity to aliphatic, alicyclic and halogenated ethers. The DEE-hydroxylase (i.e., *O*-dealkylase) activity of strain DEE5151 decreased in the following order of diethylether, di-n-propylether, 2-halogenated ethylethylether, ±1,2-dichloroethylethylether, and bis-(2-halogenated ethyl)-ether. The DEE-hydroxylase was unable to oxidize tetrahydrofurane. In contrast, the THF-hydroxylase activity of strain THF100 decreased in the following order of tetrahydrofurane, ±1,2-dichloroethylethylether, 2-halogenated ethylethlyether, bis-(2-halogenated ethyl)-ether, and diethylether. The THF-hydroxylase did not oxidize di-n-propylether.

   After the cultivation of strains THF100 and THF400 with diethylether, the alcohol-oxidase was not induced, and the THF-oxidase activity was not inhibited with ethylvinylether, which indicated that the THF-hydroxylase of alicyclic ether-utilizing strains is quite different from the DEE-hydroxylase of aliphatic ether-utilizing strains, and that the THF-hydroxylase activity is not coupled with an alcohol-oxidase activity. Even though both enzymes attack the same *O*-methylene carbon atom of diethylether, their substrate specificities are different. From examination of the oxidation potentials of these two enzyme systems, the rotational isomerism of diethylether probably accounts for the substrate specificity. The THF-hydroxylase is specific to the *cis*-conformation, whereas the DEE-hydroxylase is specific to the *trans*-conformation.

5. Literatur

Albrecht, F. 1995. Charakterisierung Styrol Verwertender Bakterien im Hinblick auf einen Einsatz im Biofilter. Diplomarbeit. **Universität Stuttgart**

Allen, C. C. R., D. R. Boyd, M. J. Larkin, K. A. Reid, N. D. Sharma, & K. Wilson, 1997. Metabolism of Naphthalene, 1-Naphthol, Indene, and Indole by *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB12038. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 151

Allen, J. R., & S. A. Ensign, 1998. Identification and Characterization of Epoxide Carboxylase Activity in Cell Extracts of *Nocardia corallina* B276. *J. Bacteriol.* **180**: 2072

Allen, P. M. 1988. Evolution : Why the Whole is Greater Than the Sum of the Parts. p. 2 ~ 30. *In*: W. Wolff, C.-J. Soeder, & F. R. Drepper (eds), Ecodynamics: Contributions to Theoretical Ecology. Proceeding of an International Workshop, October 1987. **Springer-Verlag**, Berlin-Heidelberg

APHA, AWWA, & WPCF, 1985. Standard Methods: for the Examination of Water and Wastewater, 16th. **APHA**, Washington, DC.

Archer, I. V. J. 1997. Epoxide Hydrolases as Asymmetric Catalysts. *Tetrahedron* **53**: 15617

Armengaud, J., & K. N. Timmis, 1998. The Reductase RedA2 of the Multi-Component Dioxin Dioxygenase System of *Sphingomonas* sp. RW1 is Related to Class-I Cytochrom P_{450}-Type Reductases. *Eur. J. Biochem.* **253**: 437

Atlas, R. M. 1986. Applicability of General Ecological Principles to Microbial Ecology. p. 339 ~ 370 *In*: E. R. Leadbetter, & J. S. Poindexter (eds.). Bacteria in Nature Vol. 2: Methods and Special Applications in bacterial Ecology. **Plenum Press**, New York-London

Atlas, R. M., & R. Bartha, 1981. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications, **Addison Wesley Reading**. Massachusetts

Austin, B., & F. Priest, 1986. Modern Bacterial Taxonomy. **Van Nostrand Reinhold**, UK

Barclay, C. D., G. F. Farquhar, & R. L. Legge, 1995. Biodegradation and Sorption of Polyaromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 958

Bartholomew, J. W. 1981. Chapter 17. Stains for Microorganisms in Smears. *In*: G. Clark (ed). Staining Procedures. 4th Ed. **Williams & Wilkins**, Baltomore

Barthon, M. D., & K. L. Hughes, 1981. Comparison of Three-Techniques for Isolation of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* from Contaminated Sources. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 219

Bayly, R. C., & M. G. Barbour, 1984. The Degradation of Aromatic Compounds by the Meta and Gentisate Pathways. p.253 ~ 294. *In* : D.T. Gibson (ed). Microbial Degradation of Organic Compounds. **Marcel Dekker, Inc**., New York-Basel

Beaudette, L. A., S. Davies, P. M. Fedorak, O. P. Ward, & M. A. Pickard, 1998. Comparison of Gas Chromatography and Mineralization Experiments for Measuring Loss of Selected Polychlorinated Biphenyl Congeners in Cultures of White Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol*. **64**: 2020

Behki, R., E. Topp, W. Dick, & P. Germon, 1993. Metabolism of the Herbicide Atrazine by *Rhodococcus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1955

Bernhardt, D., & H. Diekmann, 1991. Degradation of Dioxane, Tetrahydrofuran and Other Cyclic Ethers by an Environmental *Rhodococcus* Strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 120

Bernhardt, F. -H., H. Pachowsky, & H. Staudinger, 1975. A 4-Methoxy-O-Demethylase from *Pseudomonas putida*. A New Type of Monooxygenase System. *Eur. J. Biochem.* **57**: 241

Bochner, B. 1989. ″Breathprints″ at the Microbial Level: An Automated Redox-Based Technology Quickly Identifies Bacteria According to Their Metabolic Capacities. *ASM News* **55**: 536

Bock, C., R. M. Kroppenstedt, & H. Diekmann, 1996. Degradation and Bioconversion of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by *Rhodococcus ruber* 219. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 408

Bogan, B. W., & R. T. Lamar, 1995. One-Electron Oxidation in the Degradation of Creosote Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol*. **61**: 2631

Boldrin, B., A. Thiem, & C. Fritzsche, 1993. Degradation of Phenanthren, Fluorene, and Pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1927

Bormann, F. H., & G. E. Likens, 1979. Pattern and Process in a Forested Ecosystem. **Springer-Verlag**, NewYork

Borup, M. B., & E. J. Middlebrooks, 1987. Pollution Control in the Petrochemicals Industry. **Lewis Pub. Inc.**, Michigan

Bossert, I. D., & R. Bartha, 1986. Structure-Biodegradability Relationships of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **37**: 490

Boosert, I. D., & G. C. Compeau, 1995. Cleanup of Petroleum Hydrocarbon Contamination in Soil. p. 77 ~ 125. *In*: L. Y. Young, & C. E. Cerniglia (eds). Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. **Wiley-Liss, Inc.**, New York.

Boyles, D. T. 1980. Toxicity of Hydrocarbons and Their Halogenated Derivatives in an Aqueous Environment. p. 545 ~557. *In*: B. K. Afghan, & D. Mackay (eds.). Hydrocarbons and Halogenated Hydrocarbons in the Aquatic Environment. **Plenum Press**. New York-London

Britton, L. N. 1984. Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocabons. p.89 ~ 129. *In*: D. T. Gibson (ed). Microbial Degradation of Organic Compounds. **Marcel Dekker, Inc**., New York-Basel

Bronstein, I. N., & K. A. Semendjajew, 1989. Taschenbuch der Mathematik, 24. Auflage. **Gemeinschaftausgabe Verlag Nauka**, Moskau, **BSB B.G. Teubner Verlagsgesellschaft**, Leipzig

Bunnelle, W. H. 1989. Ester Oxide Intermediates in the Ozonolysis of Cyclic Vinyl Ethers. *J. Am. Chem. Soc*. **111**: 7613

Bünz, P. V., & A. M. Cook, 1993. Dibenzofuran 4,4a-Dioxygenase from *Sphingomonas* sp. Strain RW1: Angular Dioxygenation by a Three-Component Enzyme System. *J. Bacteriol.* **175**: 6467

Burdock, G. A., & R. A. Ford, 1992. Safety Evaluation of Dibenzyl Ether. *Food Chem. Toxic*. **30**: 559

Cain, R. B. 1981a. Microbial Degradation of Surfactants and "Builder" Components. p. 325 – 370. *In*: T. Leisinger, R. Hütter, A. M.Cook, & J. Nüesch (eds). Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds. **Academic Press**, London

Cain, R. B. 1981b. Regulation of Aromatic and Hydroaromatic Catabolic Pathways in Nocardioform Actinomycetes. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. Suppl.* **11**: 335

Cartwright, N. J., K. S. Holdom, & D. A. Broadbent, 1971. Bacterial Attack on Phenolic Ethers: Dealkylation of Higher Ethers and Further Obserbations on O-Demethylases. *Microbios* **3**: 113

Cartwright, N. J., & A. R. W. Smith, 1967. Bacterial Attack on Phenolic Ethers. An Enzyme System Demethylating Vanillic Acid. *Biochem. J*. **102**: 826

Chandrasekaran, S., & D. Lalithakumari, 1998. Plasmid-Assisted Morpholine Degradation by *Pseudomonas fluorescens* CAS102. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14** : 7

Chaplin, M. F., & C. Bucke, 1990. Enzyme Technology. **Cambridge Unversity Press**, Cambridge

Choudhry, G. G. 1984. Humic Substances: Structural, Photophysical, Photochemical and Free Radical Aspects and Interactions with Environmental Chemicals. **Gordon and Breach Sci. Pub.**, New York-London-Paris-Montreux-Tokyo

Chun, J., E. Atalan, A. C. Ward, & M. Goodfellow, 1993. Artificial Neural Network Analysis of Pyrolysis Mass Spectrometric Data in the Identification of *Streptomyces* strains. *FEMS Microbiol. Lett*. **107**: 321-326

Collins, C. H., & P. M. Lyne, 1984.Microbiological Methods. **Butterworths**, London

Combourieu, B., P. Besse, M. Sancelme, H. Veschambre, A. M., Delort, P. Poupin, & N. Truffaut, 1998. Morpholine Degradation Pathway of *Mycobacterium aurum* MO1: Direct Evidence of Intermediates by In Situ ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 153

Connell, J. H., & R. O. Slatyer, 1977. Mechanisms of Succession in Natural Communities and Their Role in Community Stability and Organization . *Amer. Nat.* **111**: 1119

Cornish-Bowden, A. 1974. A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Non-competitive Inhibitors. *Biochem. J.* **137**: 143

Costin, J. D., M. Kappner, & W. Schmidt, 1983. Differenzierung von Gram-Positiven und Gram-Negativen Bakterien mit dem L-Alanin-Aminopeptidase-Test. *Forum Mikrobiologie* **6**: 351

Crawford, D. L. 1978. Lignicellulose Degradation by Selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol*. **35**: 1041

Cross, J. 1987. Introduction to Nonionic Surfactants. p. 3 – 28. *In*: J. Cross (ed), Nonionic Surfactants: Chemical Analysis. **Marcel Dekker, Inc**., New York

Cross, T., T. J. Rowbotham, E. N. Mishustin, E. Z. Tepper, F. Antoine-Portaels, K. P. Schaal, & H. Bickenbach, 1976. The Ecology of Nocardioform Actinomycetes. p. 337 ~ 371. *In*: M. Goodefellow, G. H. Brownell, & J. A. serrano (eds.). The Biology of Nocardiae. **Academic Press,** London

Daniel, S. L., E. S. Keith, H. Yang, Y. -S. Lin, & H. L. Drake, 1991. Utilization of Methoxylated Aromatic Compounds by the Acetogen *Clostridium thermoaceticum*: Expression and Specificity of the CO-Dependent O-Demethylating Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**: 416

Dart, R. K., & R. J. Stretton, 1980. Microbiological Aspects of Pollution Control, 2nd Ed. **Elsevier Sci. Pub.Co.**, Amsterdam

Dass, S. B., C. G. Dosoretz, C. A. Reddy, & H. E. Grethlein, 1995. Extracellular Proteases Produced by the Wood-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium* under Ligninolytic and Non-Ligninolytic Conditions. *Arch. Microbiol.* **163**: 254

Datta, N. 1985. Plasmids as Organisms. p. 3 – 16. *In*: D. R. Helinski, S. N. Cohen, D. B.Clewell, D. A. Jackson, & A.Hollaender (eds). Plasmids in Bacteria. **Plenum Press**, New York

Dehmel, U., K. -H. Engesser, K. N. Timmis, & D. F. Dwyer, 1995. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the Gene Encoding a Novel Dioxygenase Involved in Metabolism of Carboxydiphenyl Ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Arch. Microbiol.* **163**: 35

Dhawale, S. W., S. S. Dhawale, & D. Dean-Ross, 1992. Degradation of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* Occurs under Ligninolytic as well as Nonligninolytic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol***. 58**: 3000

Dietrich, D., W. J. Hickey, & R. Lamar, 1995. Degradation of 4,4′-Dichlorobiphenyl, 3,3′, 4,4′-Tetrachlorobiphenyl, and 2,2′,4,4′,5,5′-Hexachlorobiphenyl by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3904

Dohms, C. 1995. Biotransformation von Tricyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen: Strukturaufklärung primärer Metabolite und Charakterisierung einer Carbazol-verwertenden Kultur. **Dissertation**. **Universität Stuttgart**.

Eaton, D. C. 1985. Mineralization of Polychlorinated Biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol***. 7**: 194

Elliott, R. H., & L. Strunin, 1993. Hepatotoxicity of Volatile Anaesthetics. *Brit. J. Anaesth.* **70**: 339.

Elstner, E. F. 1990. Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. **Wissenschaftsverlag**, Mannheim

Engesser, K. H., & P. Schulte, 1989. Degradation of 2-Bromo-, 2-Chloro- and 2-Fluorobenzoate by *Pseudomonas putida* CLB250. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 143

Engesser, K. H., V. Strubel, K. Christoglou, P. Fischer, & H. G. Rast, 1989. Dioxygenolytic Cleavage of Aryl Ether Bonds: 1,10-Dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one, A Novel Arene Dihydrodiol as Evidence for Angular Dioxygenation of Dibenzofuran. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 205

Ensign, S. A. 1996. Aliphatic and Chlorinated Alkenes and Epoxides as Inducers of Alkene Monooxygenase and Epoxidase Activities in *Xanthobacter* Strain Py2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 61

Estabrook, R.W., N.Chacos, C. Martin-Wixtrom, & J. Capedevila, 1982. p. 371 – 384. *In*: M. Nozaki, S.Yamamoto, Y. Ishimura, M. J. Coon, L. Ernster, & R. W. Estabrook (eds). Oxygenases and Oxygen Metabolism. **Academic Press**, New York

Ewers, J. W. C., & H. -J. Knackmuss, 1991. Biodegradation of Chloroethenes using Isoprene as a Co-substrate, p. 77 – 83. *In*: H. Verachtert, & W. Verstraete (eds.). Proceedings of the International Symposium on Environmental Biotechnology Oostende. **Royal Flemish Society of Engineers**, Oostende, Belgium.

Faber, K. 1995. Biotransformations in Organic Chemistry. **Springer-Verlag**, Berlin-Heidelberg-New York

Ferguson, A. 1980. Biochemical Systematics and Evolution. **Halsted Press**, **John Wiley and Sons**, New York-Toronto

Filer, K., & A. R. Harker, 1997. Identification of the Inducing Agent of the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Pathway Encoded by Plasmid pJP4. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 317

Fortnagel, P., H. Harms, R. -M. Wittich, S. Krohn, H. Meyer, V. Sinnwell, H. Wilkes, & W. Francke, 1990. Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27. *Appl. Environ. Microbiol*. **56**: 1148

Frankalnd, J. C. 1981. Mechanisms in Fungal Succession. p. 403 ~ 426. *In*: D. T. Wicklow, & G. C. Carroll (eds.). The Fungal Community. **Marcel Dekker**, New York

Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, & N. R. Krieg, 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. **ASM**, Washington, D.C.

Gibson, D.T., & V. Subramanian, 1984. Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. p.181 ~ 252. *In*: D. T. Gibson (ed). Microbial Degradation of Organic Compounds. **Marcel Dekker, Inc**., New York-Basel.

Gill, C. O., & C. Ratledge, 1972. Effects of n-Alkanes on the Transfer of Glucose in *Candida* sp. Strain 107. *Biochem. J.* **127**: 59

Glenn, J. K., L. Akileswaran, & M. H. Gold, 1986. Mn(II) Oxidation is the Principal Function of the Extracellular Mn-Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 688

Goodfellow, M., & E. Williams, 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**: 189

Goodfellow, M., S. T. Williams, & M. Mordarski, 1988. Actinomycetes in Biotechnology. **Academic Press**. London

Gordon, R. E., & J. M. Mihm, 1957. A Comparative Study of Some Strains Received as Nocardiae. *J. Bacteriol.* **73**: 15

Goszczynski, S., A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, R. L. Crawford, & D. L. Crawford, 1994. New Pathway for Degradation of Sulfonated Azo Dyes by Microbial Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.* **176**: 1339

Grant, M. A., & J. G. Holt, 1977. Medium for the Selective Isolation of Members of the Genus *Pseudomonas* from Natural Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1222

Gribbon, L. T., & M. R. Marer, 1995. Oxidative Metabolism in Nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* Cells Studied by Substrate-Enhanced Tetrazolium Reduction and Digital Image Processing. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3379

Griffiths, E. T., S. G. Hales, N. J. Russell, & G. F. White, 1987. Identification of Hydrophobic Metabolites Formed During Biodegradation of Alkyl Ethoxylate and Alkyl Ethoxy Sulfate Surfactants by *Pseudomonas* sp. DES1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**: 217

Hammel, K. E. 1992. Oxidation of Aromatic Pollutants by Lignin-Degrading Fungi and Their Extracellular Peroxidase. p. 41 ~ 60. *In*: H. Sigel, & A. Sigel (eds). Metal Ions in Biological Systems, Vol.28: Degradation of Environmental Pollutants by Microorganisms and Their Metalloenzymes. **Marcel Dekker, Inc**., New York.

Hammel, K. E., B. Kalyanaraman, & T. K. Kirk, 1986. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* Ligninase. *J. Biol. Chem*. **261**: 16948

Hammel, K. E., & P. J. Tardone, 1988. The Oxidative 4-Dechlorination of Polychlorinated Phenols is Catalyzed by Extracellular Fungal Lignin Peroxidases. *Biochemistry* **27**: 6563

Hammer, E., D. Krowas, A. Schäfer, M. Specht, W. Francke, & F. Schauer, 1998. Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2215

Hardison, L. K., S. S. Curry, L. M. Ciuffetti, & M. R. Hyman, 1997. Metabolism of Diethylether and Cometabolism of Methyl-tert-Butyl Ether by a Filamentous Fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3059

Hauptmann, S. 1986. Einführung in die orananische Chemie. **VEB Deutscher Verlag**. Leipzig

Hegeman, G. 1985. The Mineralization of Organic Materials under Aerobic Conditions. p. 97 ~ 112. *In*: E. R. Leadbetter, & J. S. Poindexter (eds.). Bacteria in Nature, Vol. 1: Bacterial Activities in Perspective. **Plenum Press**, New York-London

Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller, & C. E. Cerniglia, 1988a. Pyrene Degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products. *Appl. Environ. Microbiol*. **54**: 2556

Heitkamp, M. A., W. Franklin, & C. E. Cerniglia, 1988b. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2549

Hill, C. M., R. D. Wright, & W. G. Bardsley, 1977. Does Any Enzyme Follow the Michaelis-Menten Equation ?. *Mol. Cell. Biochem.* ***15***: 173

Hofrichter, M., & K. Scheibner, 1993. Utilization of Aromatic Compounds by the *Penicillium* Strain Bi7/2. *J. Basic Microbiol.* **33**: 227

Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, & W. Fritsche, 1998. Enzymatic Combustion of Aromatic and Aliphatic Compounds by Manganese Peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 399

Hollenberg, P. F. 1992. Mechanism of Cytochrome P450 and Peroxidase-Catalysed Xenobiotic Metabolism. *FASEB J.* **6**: 686

Holt, J. G., & N. R. Krieg, 1994 Enrichment and Isolation. p. 179 ~ 215. *In:* Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, & N. R. Krieg (eds), Methods for General and Molecular Bacteriology. **ASM**, Washington, D.C.

Hommel, R. K. 1990. Formation and Physiological Role of Biosurfactants Produced by Hydrocarbon-Utilizing Microorganisms. *Biodegradation* **1**: 107

Houslay, M. D., & K. K. Stanley, 1982. Dynamics of Biological Membranes: Influence on Synthesis, Structure and Fuction. **John Wiley & Sons**. New York

Hur H. -G., L. M. Newman, L. P. Wackett, & M. J. Sadowsky, 1997. Toluene 2-Monooxygenase-Dependent Growth of *Burkholderia cepacia* G4/PR1 on Diethyl Ether. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1606

Hyman, M. R., C. L. Page, & D. J. Arp, 1994. Oxidation of Methyl Fluoride and Dimethyl Ether by Ammonia Monooxygenase in *Nitrosomons europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3033

Janssen, D. B., J. Gerritse, J. Brackman, C. Kalk, D. Jager, & B. Withholt, 1988. Purification and Characterization of a Bacterial Dehalogenase with Activity Toward Halogenated Alkanes, Alcohols and Ethers. *Eur. J. Biochem.* **171**: 67

Jeffries, T. W. 1990. Biodegradation of Lignin-Carbohydrate Complexes. *Biodegradation* **1**: 163

John, D. M., & G. F. White, 1998. Mechanism for Biotransformation of Nonylphenol Polyethoxylates to Xenoestrogens in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **180**: 4332

Joshi, D. K., & M. H. Gold, 1993. Degradation of 2,4,5-Trichlorophenol by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1779

Joshi, D. K., & M. H. Gold, 1996. Oxidation of Dimethoxylated Aromatic Compounds by Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Euro. J. Biochem.* **237**: 45

Kahn, A. A., R. -F. Wang, W, -W. Cao, W. Franklin, & C. E. Cerniglia, 1996. Reclassification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Metabolizing Bacterium, *Beijerinckia* sp. Strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by Fatty Acid Analysis, Protein Pattern Analysis, DNA-DNA Hybridization, and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 466

Karlson, U., D. F. Dwyer, S. W. Hooper, E. R. Moore, K. N. Timmis, & L. D. Eltis, 1993. Two Independently Regulated Cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that Degrades 2-Ethoxyphenol and 4-Methoxybenzoate. *J. Bacteriol.* **175**: 1467

Käser, K. 1993. Der Abbau von Anisol durch eine bakterille Mischkultur. **Diplomarbeit**. **Universität Stutgart**

Katayama, Y., S. Nishikawa, A. Murayama, M. Yamasaki, N. Morohoshi, & T. Haraguchi, 1988. The Metabolism of Biphenyl Structures in Lignin by the Soil Bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett.* **233**: 129

Kaufmann, F., G. Wohlfarth, & G. Diekert, 1998. *O*-Demethylase from *Acetobacterium dehalogenans* Substrate Specificity and Function of the Participating Proteins. *Eur. J. Biochem.* **253**: 706

Kawai, F. 1985. Existence of Ether Bond-Cleaving Enzyme in a Polyethylene Glycol-Utilizing Symbiotic Mixed Culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**: 273

Kawai, F. 1995. Bacterial Degradation of Glycol Ethers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 532

Kay-Shoemake, J. L., & M. E. Watwood, 1996. Limitations of the Lignin Peroxidase System of the White-Rot Fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 438

Kersten, P. J., B. Kalyanaraman, K. E. Hammel, B. Reinhammar, & T. K. Kirk, 1990. Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxybenzenes. *Biochem. J.* **268**: 475

Kirk,T. K., & R. L. Farrell, 1987. Enzymatic Combustion : The Microbial Degradation of Lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 465

Köhler, A., A. Jäger, H. Willershausen, & H. Graf, 1988. Extracellular Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall has No Role in the Degradation of DDT. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 618

Kreft, J. -U., & B. Schink, 1997. Specificity of *O*-Demethylation in Extracts of the Homoacetogenic *Holophaga foetida* and Demethylation Kinetics Measured by a Coupled Photometric Assay. *Arch. Microbiol.* **167**: 363

Krieg, N. R., & J. G. Holt, 1984. Bergey′s Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1. **Williams & Wilkins**, Baltimore

Lechevalier, M. P. 1988. Actinomycetes in Agriculture and Forestry. p. 327 ~ 358. *In*: M. Goodfellow, S. T. Williams, & M. Mordarski (eds.). Actinomycetes in Biotechnology. **Academic Press**. London.

Li, D., M. Alic, J. A. Brown, & M. H. Gold, 1995. Regulation of Manganese Peroxidase Gene Transcription by Hydrogen Peroxide, Chemical Stress, and Molecular Oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 341

Locci, R., & G. Sharples, 1984. Morphology. p.165 ~ 199. *In*: M. Goodfellow, M. Mordarski, & S. T. Williams (eds). The Biology of the Actinomycetes. Academic Press, London

Locci, R. 1988. Comparative Morphology of Actinomycetes in Natural and Artificial Habitats. p. 482 ~ 489. *In*: Y. Okami, T. Beppu, & H. Ogawara (eds). Biology of Actinomycetes ′88: Proceeding of Seventh International Symposium on Biology of Actinomycetes. **Japan Sci. Soc. Press**, Tokyo.

MacFie, H. J. H., C. S. Gutterridge, & J. R. Norris, 1978. Use of Canonical Variates Analysis in Differentiation of Bacteria by Pyrolysis Gas-Liquid Chromatography. *J. Gen. Microbiol.* **104**: 67

MacGillivray, A. R., & M. P. Shiaris, 1994. Relative Role of Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms in Phenanthrene Transformation in Coastal Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1154

McSweeney, C. S., A. Dulieu, Y. Katayama, & J. B. Lowry, 1994. Solubilization of Lignin by the Ruminal Anaerobic Fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2985

Maeda, M., S. -Y. Chung, E. Song, & T. Kudo, 1995. Multiple Genes Encoding 2,3-Dihydroxybiphenyl 1,2-Dioxygenase in the Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, Isolated from a Termite Ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 549

Maki, H., N. Masuda, Y. Fujiwara, M. Ike, & M. Fujita, 1994. Degradation of Alkylphenol Ethoxylates by *Pseudomonas* sp. Strain TR01. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2265

Masai, E., S. Kubota, Y. Katayama, S. Kawai, M. Yamasaki, & N. Morohoshi, 1993a. Characterization of the Cα-Dehydrogenase Gene Involved in the Cleavage of β-Aryl Ether by *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1655

Masai, E., Y. Katayama, S. Kubota, S. Kawai, M. Yamasaki, & N. Morohoshi, 1993b. A Bacterial Enzyme Degrading the Model Lignin Compound β-Aryl Etherase is a Member of the Glutathione-*S*-Transferase Superfamily. *FEBS Lett.* **323**: 135

Masai, E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukada, & K. Yano, 1995. Characterization of Biphenyl Catabolic Genes of Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl Degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2079

Masai, E., S. Shinohara, H. Hara, S. Nishikawa, Y. Katayama, & M. Fukuda, 1999. Genetic and Biochemical Characterization of a 2-Pyrone-4,6-Dicarboxylic Acid Hydrolase Involved in the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J. Bacteriol.* **181**: 55

Mazure, N., & N. Truffaut, 1994. Degradation of Morpholine by *Mycobacterium aurum* MO1. *Can. J. Microbiol.* **40**: 761

McCarty, A. J., A. Paterson, & P. Broda, 1986. Lignin Solubilization by *Thermomonospora mesophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 347

Meier, T. 1994. Abbau von Vinylchlorid im Biofilter mit selektierten Mikroorganismen. *VDI Berichte* **1104**: 325

Mo, K., C. O. Lora, A. E. Wanken, M. Javanmardian, X. Yang, & C. F. Kulpa, 1997. Biodegradation of Methyl-t-Butyl Ether by Pure Bacterial Cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 69

Monna, L., T. Omori, & T. Kodama, 1993. Microbial Degradation of Dibenzofuran, Fluorene, and Dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 285

Mueller, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattmann, & P. H. Pritchard, 1990. Isolation and Characterization of a Fluoranthene-Utilizing Strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1079

Murray, R. G. E., R. N. Doetsch, & C. F. Robinow, 1994. Determinative and Cytological Light Microscopy. p. 21 ~ 41. *In*: Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, & N. R. Krieg (eds.), Methods for General and Molecular Bacteriology. **ASM**, Washington, D.C.

Nagy, I., F. Compernolle, K. Ghys, J. Vanderleyden, & R. De Mot, 1995. A Single Cytochrome P-450 System is Involved in Degradation of the Herbicides EPTC (S-Ethyl dipropylthiocarbamate) and Atrazine by *Rhodococcus* sp. Strain NI86/21. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2056

NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry). 1991. Nomenclature of Electron-Transfer Proteins. Recommendations 1989. *Eur. J. Biochem.* **200**: 599

Numata, M., T. Saito, T. Yamazaki, Y. Fukumori, & T. Yamanata, 1990. Cytochrome P-460 of *Nitrosomonas europaea*: Further Purification and Further Characterization. *J. Biochem.* **108**: 1016

Obradors, N., & J. Auilar, 1991. Efficient Biodegradation of High-Molecular-Weight polyethylene Glycols by Pure Cultures of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2383

Odum, H. T. 1969. The Strategy of Ecosystem Development, *Science* **164**: 262

Office of Air Quality Planning & Standards. 1998. Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants About Health Effects Fact Sheets. **U. S. EPA**

Office of Solid Waste. 1996. Chapter 4. Potential Gaps Associated with Non-TC Chemicals. p. 4.1 – 4.44. *In*: Office of Solid Waste. Hazardous Waste Characteristics Scoping Study. **U. S. EPA**

Ohe, T., T. Mashino, & M. Hirobe, 1994. Novel Metabolic Pathway of Arylethers by Cytochrome P-450: Cleavage of the Oxygen-Aromatic Ring Bond Accompanying ipso-Substitution by the Oxygen Atom of the Active Species in Cytochrome P-450 Models and Cytochrome P-450. *Arch Biochem. Biophys.* **310**: 402

Ollikka, P., K. Alhonmäki, V. -M. Leppänen, T. Glumoff, T. Raijola, & I. Suominen, 1993. Decolorization of Azo, Triphenyl Methane, Heterocyclic, and Polymeric Dyes by Lignin Peroxiadse Isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4010

Orth, A. B., D. J. Royse, & M. Tien, 1993. Ubiquity of Lignin-Degrading Peroxidases among Various Wood-Degrading Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4017

Palleroni, N. J. 1995. Microbial Versatility. p. 3 – 25. *In*: L. Y.Young, & C. E.Cerniglia (eds). Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. **Wiley-Liss**, New York

Panke, S., B. Witholt, A. Schmid, & M. G. Wubbolts, 1998. Towards a Biocatalyst for (S)-Styrene Oxid Production: Characterization of the Styrene Degradation Pathway of *Pseudomonas* sp. Strain VLB120. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2032

Parales, R. E., J. E. Adamus, N. White, & H. D. May, 1994. Degradation of 1,4-Dioxane by an Actinomycete in Pure Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4527

Paszczynski, A., M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, & D. L. Crawford, 1992. Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3598

Pedersen, J. Z., & A. Finazzi-Agro, 1993. Protein-Radical Enzymes. *FEBS Lett.* **325**: 53

Penn, J. H., & Z. Lin, 1990. Substituent Dependence of the π-Acceptor Induced Bond Cleavage Reactions of Benzyl Phenyl Ethers. *J. Org. Chem.* **55**: 1554

Perez, J., & T. W. Jeffries, 1992. Roles of Manganese and Organic Acid Chelators in Regulating Lignin Degradation and Biosynthesis of Peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium.* *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2402

Pfeifer, F., S. Schacht, J. Klein, & H. G. Trüper, 1989. Degradation of Diphenylether by *Pseudomonas cepacia*. *Arch. Microbiol.* **152**: 515

Pfeifer, F., H. G. Trüper, J. Klein, & S. Schacht 1993. Degradation of Diphenylether by *Pseudomonas cepacia* Et4: Enzymatic Release of Phenol from 2,3-Dihydroxydiphenylether. *Arch. Microbiol.* **138**: 1123

Piddington, C. S., B. R. Kovacevich, & J. Rambosek, 1995. Sequence and Molecular Characterization of a DANN Region Encoding the Dibenzothiophene Desulfurization Operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 468

Pieper, D. H., K. Stadler-Fritzsche, K. -H.Engesser, & H. -J.Knackmuss, 1993. Metabolism of 2-Chloro-4-methylphenoxyacetate by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch. Microbiol.* **160**: 169

Popp, J. L., & T. K. Kirk, 1991. Oxidation of Methoxybenzenes by Manganese Peroxiadse and by Mn^{3+}. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 145

Poupin, P., N. Truffaut, B. Combourieu, P. Besse, M. Sancelme, H. Veschambre, & A. M. Delort, 1998. Degradation of Morpholine by an Environmental *Mycobacterium* Strain Involves a Cytochrome P-450. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 159

Powers, E. M. 1995. Efficacy of the Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3756

Price, N. C., & L. Stevens, 1989. Fundamentals of Enzymology, 2nd Ed. **Oxford Sci. Pub**. Oxford-New York

Ramachandra, M., D. L. Crawford, & G. Hertel, 1988. Charakterization of an Extracellular Lignin Peroxidase of the Lignocellulolytic Actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3057

Rast, H. G., G. Engelhardt, W. Diegler, & P. R. Wallhoffer, 1980. Bacterial Degradation of Model Compounds for Lignin and Chlorophenol Derived Lignin Bound Residues. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: 259

Reddy, C. A. 1993. An Overview of the Recent Advances on the Physiology and Molecular Biology of Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **30**: 91

Reddy, G. V. B., M. D. S. Gelpke, & M. H. Gold, 1998. Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium* : Involvement of Reductive Dechlorination. *J. Bacteriol.* **180**: 5159

Resnick, S. M., & D. T. Gibson, 1993. Biotransformation of Anisole and Phenetole by Aerobic Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria. *Biodegradation* **4**: 195

Ribbons, D. W. 1970. Stoichiometry of O-Demethylase Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **8**: 101

Rizk, P. N., & R. P. Hanzlik, 1995. Oxidative and Non-Oxidative Metabolism of 4-Iodoanisole by Rat Liver Microsomes. *Xenobiotica* **25**: 143

Ruttimann-Johnson, C., & R. T. Lamar, 1996. Polymerization of Pentachlorophenol and Ferulic Acid by Fungal Extracellular Lignin-Degrading Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3890

Sassanella, T. M., F. Fukumori, M. Bagdasarian, & R. P. Hausinger, 1997. Use of 4-Nitrophenoxyacetic Acid for Detection and Quantification of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)/α-Ketoglutarate Dioxygenase Activity in 2,4-D-Degrading Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1189

Sato, S. I., J. W. Nam, K. Kasuga, H. Nojiri, H. Yamane, & T. Omori, 1997. Identification and Characterization of Genes Encoding Carbazole 1,9a-Dioxygenase in *Pseudomonas* sp. Strain CA10. *J. Bacteriol.* **179**: 4850

Schenkman, J. B. 1993. Historical Background and Description of the Cytochrome P450 Monooxygenase System. p. 3-14. *In*: J. B. Schenkman & H. Greim (eds). Handbook of Experimental Pharmacology, **Vol. 105**. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg.

Schenzle, A., H. Lenke, P. Fischer, P. A. Williams, & H. -J.Knackmuss, 1997. Catabolism of 3-Nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1421

Schmid, A., B. Rothe, J. Altenbuchner, W. Ludwig, & K. -H. Engesser, 1997. Characterization of Three Distinct Extradiol Dioxygenases Involved in Mineralization of Dibenzofuran by *Terrabacter* sp. DPO360. *J. Bacteriol.* **179**: 53

Schmidt, S., P. Fortnagel, & R. M. Wittich, 1993. Biodegradation and Transformation of 4,4′- and 2,4-Dihalodiphenyl Ethers by *Sphingomonas* sp. Strain SS33. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3931

Schmidt, S., R. M. Wittich, P. Fortnagel, D. Erdmann, & W. Francke, 1992a. Metabolism of 3-Methyldiphenyl Ether by *Sphingomonas* sp. SS31. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 253

Schmidt, S., R. M. Wittich, D. Erdmann, H. Wilkes, W. Francke, & P. Fortnagel, 1992b. Biodegradation of Dipheylether and Its Monohalogenated Derivatives by *Sphingomonas* sp. Strain SS3. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2744

Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, & D. Warshawsky, 1996. Degradation of Pyrene, Benz[a]anthracene, and Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 13

Schocken, M. J., & D. T. Gibson, 1984. Bacterial Oxidation of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Acenaphthene and Acenaphthylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 10

Selifonov, S. A., P. J. Chapman, S. B. Akkerman, J. F. Gurst, J. M. Bortiatynski, M. A.Nanny, & P. G. Hatcher, 1998. Use of ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance to Assess Fossil Feul Biodegradation: Fate of [1-^{13}C] Acenaphthen in Creosote Polycyclic Aromatic Compound Mixtures Degraded by Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1447

Schomburg, D., & D. Stephan (eds), 1995. Enzyme Handbook. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg

Shao, Z. Q., & R. Behki, 1996. Characterization of the Expression of the thcB Gene, Coding for a Pesticide-Degrading Cytochrome P-450 in *Rhodococcus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 403

Smalla, K., U. Wachtendorf, H. Heuer, W. -T. Liu, & L. Forney, 1998. Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1220

Smith, M. R., M. Ewing, & C. Ratledge, The Interactions of Various Aromatic Substrates Degraded by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643: Synergistic Inhibition of Growth by Two Compounds that Serve as Growth Substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 536

Sneath, P. H. A. 1992. International Code of Nimenclature of Bacteria. **ASM**. Washington, D.C.

Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt, 1986. Bergey′s Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2. **Williams & Wilkins**, Baltimore

Sneath, P. H. A., & R. R. Sokal, 1973. Numerical Taxonomy. **W.H. Freeman & Co**., San Francisco

Sone, T., M. Isobe, & E. Takabatake, 1989. Effect of Ring Substituent on the Stability of the Epoxide Derived from Phenyl Vinyl Ether. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1922

Spadaro, J. T., M. H. Gold, & V. Renganathan, 1992. Degradation of Azo Dyes by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2397

Spain, J. D. 1982. Basic Microcomputer Models in Biology. **Addison-Wesley Pub. Co**. Massachusetts

Steffan, R. J., K. McClay, S. Vainberg, C. W. Condee, & D. Zhang, 1997. Biodegradation of the Gasoline Oxygenates Methyl-tert-butylether, Ethyl-tert-butylether, and tert-Amylmethylether by Propane-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4216

Stirling, D. I., & H. Dalton, 1980. Oxidation od Dimethyl Ether, Methyl Formate and Bromomethane by *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J. Gen. Microbiol.* **116**: 277

Strubel, V. 1991. Der mikrobielle Abbau von Dibenzofuran: Modelluntersuchungen zum Abbau von cyclischen Biarylethern. **Dissertation**. **Universität Stuttgart**

Strubel, V., K. -H. Engesser, P. Fischer, & H. -J. Knackmuss, 1991. 3-(2-Hydroxyphenyl) Catechol as Substrate for Proximal meta Ring Cleavage in Dubenzofuran Degradation by *Brevibacterium* sp. Strain DPO1361. *J. Bacteriol.* **173**: 1932

Strubel, V., H. G. Rast, W. Fietz, H. -J. Knackmuss, & K. -H. Engesser, 1989. Enrichment of Dibenzofuran Utilizing Bacteria with High Co-metabolic Potential Towards Dibenzodioxin and Other Anellated Aromatics. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 233

Stryer, L. 1990. Biochemie: Völlig Neubearbeitete Auflage, der deutschen Ausgabe von Stryer, L. (1988) Biochemistry. **Spektrum der Wissenschaft**

Sugimori, D., R. Ando, & I. Okura, 1995. Comparison of Reactivity of Alkane Hydroxylation with Intact Cells and Cell-Free Extracts of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **53**: 199

Sutherland, J. B. 1986. Demethylation of Veratrole by a Cytochrome P-450 in *Streptomyces stonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 98

Sutherland, J. B., F. Rafii, A. A. Khan, & C. E. Cerniglia, 1995. Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. p. 269 ~ 306. *In*: L. Y. Young, & C. E. Cerniglia (eds). Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. **Wiley-Liss, Inc.**, New York.

Sykes, P. 1988. Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie: Eine Einführung. 9. Überarbeitete Auflage. **VCH Verlagsgesellschaft mbH**, Weinheim

Takada, S., M. Nakamura, T. Matsueda, R. Kondo, & K. Sakai, 1996. Degradation of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by the White Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4323

Tamburro, C. H. 1992. Chronic Liver Injury in Phenoxy Herbicide-Exposed Vietnam Vetrans. *Environ. Resear.* **59**: 175

Tien, M. 1987. Properties of Ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and Their Possible Applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **15**: 141

Tien, M., & T. K. Kirk, 1983. Lignin-Degrading Enzyme from Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* **221**: 661

Tien, M., & T. K. Kirk, 1984. Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H_2O_2-Requiring Oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2280

Timm, G. E. 1996. TSCA Section 4 Findings for 21 Hazardous Air Pollutants: A supporting Document for Proposed Hazardous Air Pollutants (HAPs) Test Rule. **Chemical Control Division**, **Office of Pollution Prevention and Toxics**, **U.S. EPA**. p. 31- 33

Tranum-Jensen, J. 1988. Electron Microscopy: Assays Involving Negative Staining. *Meth. Enz.* **165**: 357

Trudgill, P. W. 1984. The Microbial Metabolism of Furans. p. 295 ~ 308. *In*: D. T. Gibson (ed). Microbial Degradation of Organic Compounds. **Marcel Dekker, Inc**., New York-Basel,

Tsukamura, M. 1990. Growth Physiology of Mycobacteria in Modified Dubos Liquid Medium. *Microbiol. Immunol.* **34**: 995

Umezawa, T. & T. Higuchi, 1989. Cleavages of Aromatic Ring and Beta-O-4 Bond of Synthetic Lignin (DHP) by Lignin Peroxidase. *FEBS Lett.* **242**: 325

U.S. EPA. 1994. National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants for Source Category: Gasoline Distribution (Stage I), Proposed Rule. *In*: Federal Register. The Ferderal Register Online via GPO Access. **40 CFR Part 63**

U.S. EPA. 1995a. National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants: Petroleum Refineries ; Final Rule. *In*: Federal Register. The Ferderal Register Online via GPO Access. **40 CFR Parts 9, 60 and 63**

U.S. EPA. 1995b. Final Standards for Hazardous Air Pollutant Emissions from Wood Furniture Manufacturing Operation; Final Rule. *In*: Federal Register. The Ferderal Register Online via GPO Access. **40 CFR Parts 9 and 63**

U.S. EPA. 1995c. Inert Ingredient in Pesticide Products: Reclassification of Certain List 3 Inert Ingredients to List 4B. *In*: Federal Register. The Federal Register Online via GPO Access. **U.S. Federal Register 60(130)**: 35396 – 35399

U.S. EPA. 1996. National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants: Off-Site Waste and Recovery Operations: Final Rule. *In*: Federal Register. The Ferderal Register Online via GPO Access. **40 CFR Part 63**

U.S. EPA. 1997. National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants Pharmaceuticals Production; Proposed Rule. *In*: Federal Register. The Ferderal Register Online via GPO Access. **40 CFR Part 63**

U.S. EPA. 1998a. NESHAP: Polyether Polyols Production. *In*: U.S. EPA. Spring 1998 Regulatory Agenda-Air. **Agenda: 9804**. RIN: 2060-AE81, SEQNO: 3293

U.S. EPA. 1998b. Regulatory Investigation of Dioxin in Pulp and Paper Mill Sludge. *In*: U.S. EPA. Spring 1998 Regulatory Agenda-Air. **Agenda: 9804**. RIN: 2070-AC05, SEQNO: 3464

Valenzuela, J., U. Bumann, R. Céspedes, L. Padilla, & B. González, 1997. Degradation of Chlorphenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) in Bleached Kraft Mill Effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 227

Valli, K., & M. H. Gold, 1991. Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **173**: 345

Valli, K., H. Wariishi, & M. H. Gold, 1992, Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-p-dioxin by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium. J. Bacteriol.* **174**: 2131

van Hylckama, J. E. T., J. Kingma, A. J. van den Wijngaard, & D. B. Janssen, 1998. A Glutathione S-Transferase with Activity towards cis-1,2-Dichloroepoxyethane is Involved in Isoprene Utilization by *Rhodococcus* sp. Strain AD45. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2800

van der Klei, I. J., L. V. Bystrykh, & W. Harder, 1990. Alcohol Oxiadse from *Hansenula polymorpha* CBS 4732. *Meth. Enzym.* **188**: 420

van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, & A. J. Zehnder, 1992. Molecular Mechanism of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **56**: 677

Wagener, S., & B. Schink, 1988. Fermentative Degradation of Nonionic Surfactants and Polyethylene Glycol by Enrichment Cultures and by Pure Cultures of Homoacetogenic and Propionate-forming Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 561

Walter, U., M. Beyer, J. Klein, & H. J. Rehm, 1991. Degradation of Pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 671

Wariishi, H., K.Valli, & M. H. Gold. 1991. *In vitro* Depolymerization of Lignin by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**: 269

Watanabe, T., J.Ohnishi, Y. Yamasaki, S. Kaizu, & T. Koshijima, 1989. Binding-Site of the Ether Linkages Between Lignin and Hemicelluloses in Lignin-Carbohydrate Complexes by DDQ-Oxidation. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2233

Watkinson, R. J., & P. Morgan, 1990. Physiology of Aliphatic Hydrocarbon-Degrading Microorganisms. *Biodegradation* **1**: 79

Wayne, L. G., & G. A. Diaz, 1982. Serological, Taxonomic and Kinetic Studies of the T and M Classes of Mycobacterial Catalase. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**: 296

Weast, R. C., M. J.Astle, & W. H. Beyer, Handbook of Chemistry and Physics 67th. **CRC-Press, Inc**., Boca Raton, Florida

White, G. F., N. J. Russell, & E. C. Tidswell, 1996. Bacterial Scission of Ether Bonds. *Microbiol. Rev.* **60**: 216

Wicklow, D. T. 1981. Interference Competetion and the Organization of Fungal Communities. p. 351 ~ 375. *In*: D. T. Wicklow, & G. C. Carroll (eds). The Fungal Community. **Marcel Dekker**, New York.

Williams, S. T., M. E. Sharpe, & J. G. Holt, 1989. Bergey′s Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4. **Williams & Wilkins**, Baltimore

Witholt, B., M. -J. de Smet, J. Kingma, J. B. van Beilen, M. Kok, R. G. Lageveen, & G. Eggink, 1990. Bioconversions of Aliphatic Compounds by *Pseudomonas oleovorans* in Mutiphase Bioreactors: Background and Economic Potential. *Trends Biotechnol.* **8**: 46

Witholt, B., O. Favre-Bulle, R. Lageveen, J. Kingma, J. B. van Beilen, H. Marvin, & H. Preusting, 1992. Synthesis of Apolar Organic Compounds by *Pseudomonas* spp. and *Escherichia coli* in Two-Liquid-Phase Fermentations. p. 301 ~ 314. *In*: E.Galli, S. Silver, & B. Witholt (eds). *Pseudomonas*: Molecular Biology and Biotechnology. **ASM**, Washington, D.C.

Wittich, R. M., H. Wilkes, V. Sinnwell, W. Francke, & P. Fortnagel, 1992. Metabolism of Dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1005

Wong, J. T. 1965. On the Steady-State Method of Enzyme-Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **87**: 1788

Wood, P. M. 1992. A Comparison of Peroxidase and Cytochrome P-450. *Biochem. Soc.Trans.* **20**: 349

Yabuuchi, E., Y. Kosako, I. Yano, H. Hotta, & Y. Nishiuchi, 1995. Transfer of two *Burkhoderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov., and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* **39**: 897

Yadav, J. S., & C. A. Reddy, 1993. Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX) by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 756

Yadav, J. S., J. F. Quensen, 3rd, J. M. Tiedje, & C. A. Reddy, 1995. Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* as Evidenced by Congener-Specific Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2560

Zhang, Y., & R. M. Miller, 1994. Effect of a *Pseudomonas* Rhamnolipid Biosurfactant on Cell Hydrophobicity and Biodegradation of Octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2101

Ich danke

Herrn Prof. Dr. K.-H.Engesser für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, für seine gute Betreuung und für viele aufmunternde Worte. Für seinen außerordentlichen Einsatz für die interdisziplinäre Idee dieser Arbeit, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bin ich ihm zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Knackmuss für die freundliche Übernahme des Mitberichtes und des Gutachtens zum Antrag auf die jährlichen Stipendienverlängerungen des DAAD;

Herrn Prof. Dr.-Ing. P. Kämpfer für die freundliche Übernahme des Mitberichtes;

den Mitarbeitern am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft, Abteilung biologische Abluftreinigung, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre;

Herrn Dipl. Chem. E. Schmidl für seine sprachliche Korrektur dieser Arbeit;

dem deutschen akademischen Austauschdienst (DAAD) für seine finanzielle Unterstützung und für seine gute Beratung;

allen Familien in Korea für ihre stete Unterstützung und Gebete, besonders gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern und meiner Frau für ihre unbezahlbare Mühe und Pflege.

Lebenslauf

Name:	Yong-Hak Kim
geboren	28. Juni 1966 in Buyou, Chungchung-Namdo, Korea (süd)
Staatsangehörigkeit	süd-koreanisch
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Schulausbildung	
1973 - 1979	Sungok Elementary School / Seoul
1979 - 1982	Namdaemoon Middle School / Seoul
1982 - 1985	Kyoungdong High School / Seoul
Dezember 1984	Staatsexamen für die Immatrikulation auf die Hochschule
Hochschulausbildung	
März 1985 – Februar 1989	Studium in der Mikrobiologie an der Seoul-National University
März 1989 – August 1991	Master-Arbeit in der mikrobiellen Ökologie an der Seoul-National University: "Screening of the Ligninolytic Bacteria from Various Humic Soils"
Juni 1994 – September 1994	Deutsche Sprachkurse nach dem Programm des deutschen akademischen Austauschdienstes (DAAD) in Mannheim
September 1994	Die Prüfung zum Nachweis deutscher Sprachkenntnisse (PNDS) für ausländische Studienbewerber zur Aufnahme eines Fachstudiums in Deutschland
September 1995	Kenntnisprüfungen zur Annahme als Doktorrand der Fakultät Geo- und Biowissenschaften in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Ökologie
Seit Oktober 1994	Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart

ANHANG X

Tests (X)	Stamm (N) ID	HMO(X)
1. Größe (Durchmesser)	HES112	-0.0074074
2. Zellpigmente	HES41	0.2296296
3. löslichte Pigmente	HES42	-0.9185185
4. Substratmycel	HES43	-0.4962963
5. Größe (Dicke)	HES222	-0.0296296
6. Kokken	HES23	0.0814815
7. Stäbchen	HES24	0.9925926
8. Zyklus (pleomorph)	HES111	0.1555556
9. Beweglichkeit (30°C)	HES112	-0.3185185
10. Gleiten (30°C)	HES121	-0.9703704
11. 3 %(w/v) KOH	KL31	-0.1052632
12. Aminopeptidase	KL32	-0.1654135
13. Gramfärbung	33MM500	0.0997444
14. Säurefestigkeit	33MT526dark	-0.7851852
15. Sporenbildung	JS1	-0.9851852
16. Katalase	JS10	0.8358209
17. Oxidase	JS11	-0.4552239
18. Temperatur (°C)	FR101	-0.0185185
19. pH	FR102	0.1481481
20. Salz (%)	FR103	0.9777778
21. Erythritol	FR104	-0.6
22. D-Arabinose	FR105	-0.7259259
23. L-Arabinose	FR106	-0.4740741
24. Ribose	FR107	-0.5185185
25. D-Xylose	FR108	-0.4740741
26. L-Xylose	FR109	-0.9703704
27. Adonitol	FR210	-0.6888889
28. D-Arabitol	FR211	0.1851852
29. L-Arabitol	FR212	-0.6814815
30. Xylitol	FR213	-0.5925926
31. D-Glucose	FR300	0.7555556
32. Galactose	FR400	-0.2814815
33. D-Fructose	FR500	0.4814815
34. D-Mannose	FR600	0.0148148
35. L-Sorbose	FR700	-0.837037
36. Rhamnose	FR800	-0.2888889
37. Dulcitol	FR900	-0.9851852
38. Inositol	FR910	-0.6
39. Mannitol	FR920	0.3185185
40. Sorbitol	FR930	0.1259259
41. α-Methyl-D-Glucoside	FR940	-0.8518519
42. α-Methyl-D-Mannoside	FR950	-0.9851852
43. Salicin	FR960	-0.7185185
44. Cellobiose	FR970	-0.5925926
45. Maltose	FR980	-0.5407407
46. Lactose	FR990	-0.7703704
47. Melibiose	FR1000	-0.8222222
48. Saccharose	FR1010	-0.2592593
49. Trehalose	FR1020	-0.2592593
50. Melezitose	FR1030	-0.6444444
51. D-Raffinose	FR1040	-0.8888889
52. β-Gentiobiose	FR1050	-0.6962963
53. Glykogen	FR1060	-0.9333333
54. Michäusure	FR1070	0.6666667
55. Pyruvat	FR1080	0.5777778
56. Zitronensäure	FR1090	0.1777778
57. DL-Isocitrat	FR1100	-0.3777778
58. 2-Oxo-glutarat	FR1110	-0.9777778
59. Glutarat	FR1120	-0.9851852
60. Succinat	FR1130	-0.1259259
61. Fumarat	FR1140	0.0148148
62. L-Malat	FR1150	-0.8222222
63. Malonat	FR1160	-0.6814815
64. Maleinsäure	FR1170	-0.9555556
65. Oxalacetat	FR1180	-0.9925926
66. Glyconat	FR1190	-0.9777778
67. Adipinsäure	FR1200	-0.6666667
68. Benzoesäure	FR1210	-0.0740741
69. Salicylsäure	FR1220	-0.9333333
70. Gluconsäure	FR1230	-0.3
71. D-Alanin	FR1240	-0.1629629
72. L-Alanin	FR1250	0.237037
73. L-Aspartat	FR1260	-0.5333333
74. L-Asparagin	FR1270	0.0888889
75. L-Cystein	FR1280	-0.9703704
76. L-Cystin	FR1290	-0.962963
77. S-Methyl-L-Cystein	FR1300	-0.9333333
78. L-Glutamat	FR1310	0.1703704
79. Glycin	FR1320	-0.6444444
80. L-Histidin	FR1330	-0.2074074
81. L-Isoleucin	FR1340	0.3703704
82. L-Leucin	FR1350	0.3777778
83. L-Lysin	FR1360	-0.5407407
84. L-Methionin	FR1370	-0.7777778
85. L-Phenylalanin	FR1380	-0.3111111
86. L-Prolin	FR1390	0.1037037
87. L-Serin	FR1400	-0.2814815
88. L-Threonin	FR1410	-0.4518519
89. DL-Tryptophan	FR1420	-0.8074074
90. L-Tyrosin	FR1430	-0.4
91. L-Valin	FR1440	0.1407407
92. L-Arginin	FR1450	-0.2666667
93. Casein	FR1460	-0.8962963
94. Zellulose	FR1470	0
95. Chitin	FR1480	-0.9851852
96. Gelatine	FR1490	-0.6
97. Pectin	FR1500	-0.9111111
98. Poly-β-hydroxybutyrat	FR1510	-0.9703704
99. Stärke (löslich)	FR1520	-0.7777778
100. Tween20/80 (1:1)	FR1530	-0.9259259
101. Agar (Oxoid Nr.1)	FR1540	-0.9703704
102. Agar (Oxoid Nr.2)	FR1550	0.9481481
103. TSA	FR1560	0.8962963
104. NA	FR1570	0.9925926
105. R2A	FR1580	
Unabhängige Versuchszahl		
(%)-Fit		
Kon(SX)-(HMO(X))		

Stamm (N) ID	Kon(SX)-(HMO(X))
HES112	0.5318721537
HES41	0.5370114147
HES42	0.6256256251
HES43	0.4566917
HES222	0.7135645384
HES23	0.6950507591
HES24	0.6101335693
HES111	0.5920589
HES112	0.6790135002
HES121	0.6828428629
KL31	0.6887736929
KL32	0.6480904074
33MM500	0.5836573988
33MT526dark	0.6556154454
JS1	0.6587113039
JS10	0.5978350562
JS11	0.5978350562
FR101	0.5350542422
FR102	0.5984455532
FR103	0.5950635538
FR104	0.5950635538
FR105	0.6198911127
FR106	0.5919919922
FR107	0.5779543588
FR108	0.5779543588
FR109	0.6012127441
FR210	0.6012127441
FR211	0.6012127441
FR212	0.6012127441
FR213	0.6012127441
FR300	0.6012127441
FR400	0.5718852617
FR500	0.5718852617
FR600	0.6572204041
FR700	0.6572204041
FR800	0.6572204041
FR900	0.6572204041
FR910	0.6572204041
FR920	0.6572204041
FR930	0.6572204041
FR940	0.6572204041
FR950	0.6572204041
FR960	0.6572204041
FR970	0.6572204041
FR980	0.6572204041
FR990	0.6572204041
FR1000	0.6572204041
FR1010	0.6572204041
FR1020	0.6572204041
FR1030	0.6572204041
FR1040	0.6572204041
FR1050	0.6572204041
FR1060	0.6572204041
FR1070	0.6572204041
FR1080	0.6572204041
FR1090	0.6572204041
FR1100	0.6572204041
FR1110	0.6572204041
FR1120	0.6572204041
FR1130	0.6572204041
FR1140	0.6572204041
FR1150	0.6572204041
FR1160	0.6572204041
FR1170	0.6572204041
FR1180	0.6572204041
FR1190	0.6572204041
FR1200	0.6572204041
FR1210	0.6572204041
FR1220	0.6572204041
FR1230	0.6572204041
FR1240	0.6572204041
FR1250	0.6572204041
FR1260	0.6572204041
FR1270	0.6572204041
FR1280	0.6572204041
FR1290	0.6572204041
FR1300	0.6572204041
FR1310	0.6572204041
FR1320	0.6572204041
FR1330	0.6572204041
FR1340	0.6572204041
FR1350	0.6572204041
FR1360	0.6572204041
FR1370	0.6572204041
FR1380	0.6572204041
FR1390	0.6572204041
FR1400	0.6572204041
FR1410	0.6572204041
FR1420	0.6572204041
FR1430	0.6572204041
FR1440	0.6572204041
FR1450	0.6572204041
FR1460	0.6572204041
FR1470	0.6572204041
FR1480	0.6572204041
FR1490	0.6572204041
FR1500	0.6572204041
FR1510	0.6572204041
FR1520	0.6572204041
FR1530	0.6572204041
FR1540	0.6572204041
FR1550	0.6572204041
FR1560	0.6572204041
FR1570	0.6572204041
FR1580	0.6572204041
Unabhängige Versuchszahl	2 2 2

ANHANG Y

Tests (Y)	Stamm (N)	HMO (Y)
1. Dimethylether (Gas)		-0.984251969
2. Diethylether		-0.606299213
3. Di-n-propylether		-0.68503937
4. 2-Bromethylethylether		-
5. 2-Chlorethylethylether		-0.952755906
6. 60% Ethylylethylether in Hexan		0.37288136
7. Di-n-butylether		-0.57480315
8. Di-n-pentylether		-0.32283464
9. Ethylvinylether		0.842519685
10. n-Butylethylether		-0.57480315
11. n-Butylmethylether		-0.51181102
12. Isopropylether		-
13. Methyl-tert-butylether		-
14. Isoamylether		-0.653543307
15. Diethylenglykolmono-butylether		-0.842519685
16. Diethylenglykol-di-butylether		-0.968503937
17. Butyl-2,3-glycidylether		-0.826771654
18. tert-Butyl-2,3-glycidylether		-
19. Bis(β-Cl-ethyl)-ether		-0.023622047
20. Dimethylsulfoxid		-
21. Tetrahydrofuran		-0.889763779
22. Tetrahydropyran		0.905511811
23. 1,4-Dioxan		-
24. 3,4-Dihydro-2H-pyran		-0.401574803
25. 2,3-Dihydrofuran		-0.023622047
26. 2,5-Dihydrofuran		-0.968503937
27. Furan		-0.968503937
28. 2,3-Epoxy-1-propanol		-0.480314961
29. 1,2-Epoxyhexan		-
30. 1,2-Epoxyoctan		-0.952755906
31. Methanol		0.732283465
32. Ethanol		0.748031496
33. 1-Propanol		0.779527559
34. 1-Butanol		0.826771654
35. 1-Pentanol		0.57480315
36. Isopropanol		-0.323846457
37. 2-Butanol		-0.480314961
38. 2-Pentanol		-0.480314961
39. 1,4-Butandiol		0.196850394
40. 2-Methyl-1-Butanol		0.527559055
41. 3-Methyl-1-Butanol		0.57480315
42. 2-Chlorethanol		-
43. tert-Butanol		-0.984251969
44. Glycerin		0.165354331
45. Ethylenglykol		-0.637795276
46. Diethylenglykol		-
47. n-Pentan		-0.905511811
48. n-Hexan		-0.858267717
49. n-Heptan		-0.795275591
50. n-Hexen		-0.921259843
51. n-Octen		-0.842519685
52. Isooctan		-0.968503937
53. n-Hexadecan		0.149606299
54. Pristan		-0.417323835
55. Aceton		-0.448818898
56. Ethylacetat		0.637795276
57. Vinylacetat		-0.527559055
58. Formaldehyd		-
59. Chloressigsäure		-
60. Chloroacetaldehyd		-
61. Benzol		-0.826771654
62. Phenol		-0.023622047
63. Anisol		-0.795275591
64. Phenetol		-0.57480315
65. Styrol		-0.811023622
66. Toluol		-0.637795276
67. Xylol		-0.889763779
68. 2-Methoxyphenol		-0.181102362
69. 3-Methoxyphenol		-0.937007874
70. 4-Methoxyphenol		-0.968503937
71. 2-Ethoxyphenol		-0.181102362
72. 2-Ethoxyanisol		-0.984251969
73. Eugenol		-0.858267717
74. Benzylalkohol		0.57480315
75. Benzylaldehyd		0.244094488
76. 1,2-Diethoxybenzol		-0.984251969
77. 1,3-Diethoxybenzol		-0.653543307
78. 1,4-Diethoxybenzol		-0.889763779
79. 1,2-Dimethoxybenzol		-0.968503937
80. 1,3-Dimethoxybenzol		-0.984251969
81. 1,4-Dimethoxybenzol		-0.984251969
82. 1,2-Methylenoxyd-benzol		-0.984251969
83. Benzodifuran		-0.976377953
84. 1,4-Benzodioxan		-
85. Dibenzofuran		-0.913385827
86. Dibenzylether		-0.401574803
87. Diphenylether		-0.724409449
88. Benzylphenylether		-0.842519685
89. Biphenyl		-0.842519685
90. 2-Methoxybiphenyl		-0.866141732
91. 4-Methoxybiphenyl		-0.905511811
92. Naphthalin		-0.826771654
93. 1-Methoxynaphthalin		-0.818897638
94. 2-Methoxynaphthalin		-0.968503937
95. 1-Methylnaphthalin		-0.905511811
96. 2-Methylnaphthalin		-0.937007874
97. Bibenzyl		-0.98437
98. Biphenylen		-0.867187
99. Acenaphthen		-0.921875
100. Phenanthren		-0.377952756
101. Anthracen		-0.921259843
102. Fluoren		-0.742187
103. Carbazol		-0.932687
104. Dibenzothiophen		-0.90625
105. Xanthen		-0.890625
106. Acridin		-0.914062
107. Dibenzofuran		-0.8437
108. Acridon		-
109. Phenoxazin		-0.84375
110. Iminostilben		-0.889763779
111. Fluoranthen		-0.71875
112. Pyren		-0.710937
113. Benzo[a]pyren		-
114. Monoethanolamin		-0.916666667
115. Acetamid		-0.127877953
116. Acrylamid		-0.946969697
117. Imidazol		-0.984948482
118. 2-Aminobenzoat		-0.939393939
119. 4-Aminobenzoat		-
Insbehängige Versuchszahl		
Korr[S(Y);HMO(Y)]	% P-Wert	98.50%