

1. Einleitung

Die Akkumulation schwer abbaubarer naturfremder Stoffe, sog. Xenobiotika, in der Umwelt erfährt immer stärkere Beachtung. Ein Abbau dieser persistenten Stoffe kann biologisch oder technisch eingeleitet werden. Wenn ein biologischer Abbau von Xenobiotika möglich ist, ist dem meist der Vorrang einzuräumen, da der Schadstoff im günstigsten Fall vollständig zu Kohlendioxid und Wasser umgewandelt werden kann und so dem biologischen Gleichgewicht zurückgeführt wird, ohne daß toxische oder schwer abbaubare Intermediate entstehen. Zudem ist die biologische Reinigung meist auch die kostengünstigere Alternative.

Zu den Xenobiotika werden auch Etherverbindungen gezählt. Neben industriell eingesetzten Etherverbindungen, wie Tetrahydrofuran, Diethylether, Polyethylenglykole, u.v.a.m., machen Detergenzien und Agrochemikalien, wie Fungi- und Herbizide, den Großteil der anthropogen in die Umwelt entlassenen Etherverbindungen aus (White et al., 1996). In der Literatur findet man Hinweise darauf, daß ein mikrobiologischer Abbau von Etherverbindungen möglich ist. In der Praxis wird jedoch auch mittels chemischer Oxidation durch Einsatz von Wasserstoffperoxid und Ozon die biologische Abbaubarkeit von Ethern unterstützt (Adams et al., 1994).

Tetrahydrofuran (THF) ist ein gut wasserlöslicher, leicht flüchtiger zyklischer Ether, der in großem Maße in der Industrie als Lösungsmittel Anwendung findet (Brownstein, 1991). Im Jahr 1997 wurde THF weltweit mit ca. 70 000 t produziert (Jassel, persönliche Mitteilung), wobei es auch als Ausgangsprodukt für andere Produkte dient. THF wird als Lösungsmittel für Lacke, Klebstoffe und in Spinn-, Tauch- und Streichlösungen eingesetzt. Im chemischen Labor wird es u.a. bei Extraktionen verwandt. Des Weiteren ist es Ausgangsprodukt für hochmolekulare Ether (z.B. Polyoxitetramethylenglykole), fünfgliedriger Heterozyklen (Pyrrolidin, Tetrahydrothiophen) und Verbindungen wie Succinatdialdehyd oder 1,4-Dihalogenbutan (BG Chemie, 1988; Römpf, 1990).

Chemisch können Etherbindungen durch Einsatz hoher Temperaturen und konzentrierter Säuren gespalten werden (Mo et al., 1997). Über den mikrobiellen Abbau von THF, das im Mittelpunkt des Interesses der vorliegenden Arbeit steht, ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt vergleichsweise wenig publiziert worden. In der jüngeren Literatur findet man einige Hinweise auf die Existenz THF abbauender Mikroorganismen (Dmitrenko et al.,

1987; Gvozdyak et al., 1988; Bernhardt und Diekmann, 1991; Parales et al., 1994; Poupin et al., 1998; Steffan, 1998), obwohl Painter und King (1985) den zyklischen Ether THF als eine nicht schnell biologisch abbaubare chemische Substanz bezeichneten. Die wenigen wissenschaftlichen Arbeiten, die sich mit dem biologischen Abbau dieses zyklischen Ethers befassen, stehen in klarem Widerspruch zu dessen Bedeutung in der heutigen chemischen Industrie. In der oben zitierten Literatur finden sich allerdings eingesetzte THF-Konzentrationen von z.T. weit unterhalb der *in situ* anzutreffenden 50 mM (3,61 g/l). Diese Konzentration kann in entsprechenden industriellen, nicht kommunalen, Abwassern angetroffen werden (J.R. Andreesen, persönliche Mitteilung). Wird ein mikrobiologischer Abbau gewünscht, müssen Organismen isoliert werden, die in der Lage sind die THF-Konzentrationen, wie sie *in situ* vorkommen, zu tolerieren und abzubauen. Die genetische Stabilität der schadstoffabbauenden Bakterien ist von Bedeutung. Oftmals liegen die Gene, die für die am Schadstoffabbau beteiligten Enzyme codieren, auf Plasmiden in der Bakterienzelle vor (Schlegel, 1992; Madigan et al., 1997). Es ist jedoch bekannt, daß Plasmide verlorengehen können und so dem betroffenen Bakterium die dort codierten genetischen Informationen dann fehlen.

Der Lösungsmittelcharakter von Etherverbindungen, der die Integrität von Cytoplasmamembranen angreift, stellt einen Schwierigkeitsfaktor beim mikrobiellen Abbau von Ethern dar. Die Toxizität organischer Lösungsmittel für mikrobielle Zellen beruht auf der Anreicherung in der Cytoplasmamembran, wodurch diese zerstört wird (Sikkema et al., 1995). Die Bakterien, die lipidauflösende Substrate zur Energiegewinnung nutzen können, müssen demzufolge in der Lage sein, sich vor der Zerstörung ihrer Zellintegrität zu schützen; sie müssen daher auf den Lösungsmittelstreß reagieren können.

Es besteht ein großes Interesse an Lösungsmittel toleranten Mikroorganismen, die für Biotransformationsprozesse eingesetzt werden könnten (Isken et al., 1999), und an den Mechanismen, die zu dieser Toleranz führen (Aono und Kobayashini, 1997). Um die negativen Einflüsse von Lösungsmitteln zu überleben, sind Veränderungen in der Zusammensetzung der Cytoplasmamembran erforderlich (Weber und de Bont, 1996). Diese Mechanismen sind jedoch bisher noch nicht vollständig verstanden (Weber et al., 1994; Aono und Kobayashini, 1997). Während durch Lösungsmittel hervorgerufene Adaptationsprozesse in Gram-positiven Bakterien erst wenig untersucht wurden (Rhee et

al., 1996; Tsitko et al., 1999), wurden in den vergangenen Jahren die zugrunde liegenden Mechanismen für Lösungsmitteltoleranz in Gram-negativen Bakterien, insbesondere von *Pseudomonas spp.* und *E. coli*, intensiv untersucht (Isken et al., 1999). Mehrere Adaptionsmechanismen werden in der Literatur genannt, wobei zwischen Kurz- und Langzeitantworten unterschieden wird. Durch Verstärkung der Cytoplasmamembran erreicht der Mikroorganismus, daß die Diffusion des Lösungsmittels vom Medium ins Zellinnere erschwert wird. So gilt als erste Antwort der Zelle, wenn sie einem Lösungsmittel ausgesetzt wird, die *cis* → *trans* Isomerisierung der ungesättigten Fettsäuren (Kurzzeitantwort) (Weber et al., 1994; Isken et al., 1997; Ramos et al., 1997), wobei diese Umwandlung unabhängig von einer *de novo* Fettsäure- und Lipidsynthese ist (Holtwick et al., 1997). Als Langzeitantworten werden die vermehrte Synthese ungesättigter Fettsäuren, Veränderung der Phospholipidzusammensetzung und Konzentrationsänderungen von den in den membraneingeschlossenen Proteinen und Hopanoiden genannt (Weber und de Bont, 1996; Segura et al., 1999). Organische Lösungsmittel erhöhen die Membranfluidität; ungesättigte Fettsäuren in der *trans* Konfiguration wirken dem entgegen (Holtwick et al., 1997; Segura et al., 1999). Diese genannten Adaptationen werden von Ramos et al. (1997) und Kieboom et al. (1998) als statische Adaptationen angesehen, durch die eine physikalische, aber dennoch durchlässige Barriere erreicht wird. Die Resistenzen gegenüber sehr hohen Lösungsmittelkonzentrationen können jedoch damit nicht erklärt werden (Ramos et al. 1997; Kieboom et al., 1998). Vielmehr sind hierfür Efflux-Systeme verantwortlich (Isken und de Bont, 1996; Isken et al., 1997; Kieboom et al., 1998; Li et al., 1998). Das von Isken und de Bont (1996) beschriebene Efflux-System hat hohe Sequenzhomologien zu bekannten Efflux-Systemen, die u.a. hydrophobe Antibiotika, Farbstoffe und Schwermetalle aus den Zellen schleusen (Nikaido, 1996; Paulsen et al., 1996). Einer weiteren Resistenzantwort, der Metabolisierung der Chemikalie (Ramos et al., 1997; Segura et al., 1999), messen Segura et al. (1999) interessanterweise nur eine geringe Bedeutung bei, weil viele Bakterien bekannt sind, die Lösungsmittel nur tolerieren und nicht als Energiequelle nutzen (siehe z.B. Inoue und Horikoshi, 1989).

White et al. (1996) geben eine gute Übersicht über die bekannten aeroben und anaeroben bakteriellen Etherabbauwege und die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen, die zur Öffnung der Etherbindung führen. Bereits Alexander (1965) beschrieb, daß es die Etherbindung ist, die einen biologischen Abbau sehr erschwert. Interessant ist, daß

strenggenommen viele einleitende Enzyme, die am Etherabbau beteiligt sind, nicht direkt die Etherbindung spalten, sondern daß sie das Substrat labilisieren, indem sie molekularen Sauerstoff an ein an der Etherbindung benachbartes C-Atom einführen und es so in seine halbacetale Form überführen, die spontan hydrolytisch gespalten wird (White et al., 1996).

Viele Oxygenasen sind initiale Enzyme in bekannten Schadstoffabbauwegen. Man unterscheidet bei diesen Enzymen Mono- und Dioxygenasen. Letztere führen beide Sauerstoffatome des O₂ in das Substrat ein. Monooxygenasen hingegen katalysieren den Einbau nur eines Sauerstoffatoms in das Substrat, während das zweite zu Wasser reduziert wird (Lehninger et al., 1994). Oxygenasen bestehen meist aus einer Oxygenase- und einer Reduktasekomponente und man unterscheidet zwischen Ein- und Mehrkomponenten Enzymen. Es gibt verschiedene Klassen von Monooxygenasen, die aufgrund der jeweils involvierten Redoxcofaktoren unterschieden werden (Ziegler, 1988). Neben flavin- oder eisenhaltigen Monooxygenasen gibt es die Familie der Cytochrom P-450 haltigen Enzyme, die ein breites Spektrum von Hydroxylierungsreaktionen katalysieren (Sariaslani, 1991). Cytochrom P-450 haltige Enzyme sind bei Eu- und Prokaryoten verbreitet, in der Lage Etherbindungen zu spalten (White et al., 1996) und oft am Abbau von Xenobiotika beteiligt (Sariaslani, 1991).

Bernhardt und Diekmann (1991) isolierten einen THF abbauenden *Rhodococcus ruber* Stamm, der neben THF auch γ -Butyrolacton, 1,4-Butandiol und Succinat, nicht jedoch 3-Hydroxytetrahydrofuran verstoffwechseln konnte. Aufgrund dieser Substratstudie gingen sie von folgendem THF-Abbauweg aus:

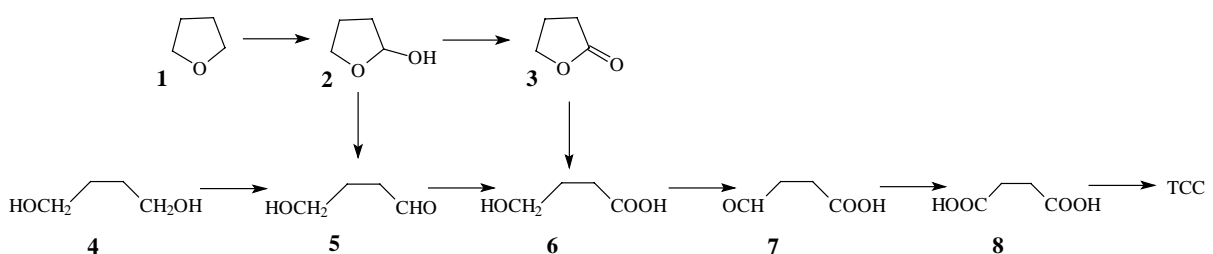


Abb. 1: Postulierter THF-Abbauweg (Bernhardt und Diekmann, 1991). 1, Tetrahydrofuran; 2, 2-Hydroxytetrahydrofuran; 3, γ -Butyrolacton; 4, 1,4-Butandiol; 5, 4-Hydroxybutyraldehyd; 6, 4-Hydroxybuttersäure; 7, Succinatsemialdehyd; 8, Succinat.

Die Autoren postulierten, daß es am C2-Atom des THFs zur Hydroxylierung kommt (Abb. 1), die von einer Monooxygenase katalysiert wird. 2-Hydroxytetrahydrofuran könnte als Hemiacetal durch hydrolytische Spaltung des Rings zu 4-Hydroxybutyraldehyd umgewandelt oder durch eine Alkoholdehydrogenase zu γ -Butyrolacton oxidiert werden. Aus beiden letztgenannten Intermediaten könnte über eine Aldehyddehydrogenase- bzw. Lactonasereaktion 4-Hydroxybuttersäure entstehen, die durch eine Alkoholdehydrogenase- bzw. Aldehyddehydrogenasereaktionen über Succinatsemialdehyd zu Succinat oxidiert werden kann. Succinat kann dann zur Energiegewinnung in den Tricarbonsäurezyklus (TTC) eingeschleust werden. Die postulierte Hydroxylierung am C2-Atom wurde durch Arbeiten von Bock et al. (1996) bestätigt. Da es sich bei 2-Hydroxy-THF um eine instabile Verbindung handelt, wurden THF induzierte Zellen des *R. ruber* Stamms 219 mit 2,5-Dimethyl-THF inkubiert, um ein stabiles Zwischenprodukt nachweisen zu können (Bock, 1994). Es wurden zwei Hauptintermediate detektiert, wovon ein Metabolit als Hexan-2,5-dion identifiziert wurde (Bock et al., 1996). Dies wird als Bestätigung des Reaktionswegs $2,5\text{-Dimethyl-THF} \rightarrow 2,5\text{-Dimethyl-2-Hydroxy-THF} \rightleftharpoons 5\text{-Hydroxy-Hexan-2-on} \rightarrow \text{Hexan-2,5-dion}$ gewertet (Bock et al., 1996).

In Abwasseraufbereitungsanlagen wird THF allgemein im CSB-Summenparameter erfaßt. Wegen der Flüchtigkeit des Ethers ist die Konzentrationsabnahme aufgrund biologischer Aktivität im Abwasser nicht exakt zu bestimmen (Diekmann, 1994). Niedrigere THF-Konzentrationen in Abwässern würden zu einem niedrigeren CSB-Wert führen, was aus ökologischer und finanzieller Sicht von großem Nutzen ist.

Für eine biologische Abwasserreinigung ist es vorteilhaft mit immobilisierten Zellen zu arbeiten, insbesondere bei hohen oder stark schwankenden Schadstoffkonzentrationen, oder wenn der Abbau stark persistenter oder toxischer Substanzen erwünscht ist (Rehm, 1990; Schulz, 1993). Eine häufig eingesetzte Methode ist die adsorptive Immobilisierung von Mikroorganismen (Busscher und Weerkamp, 1987).

Die Bildung eines Biofilms wird von van Loosdrecht et al. (1990a) in vier Phasen eingeteilt: Transport von Mikroorganismen an die Trägeroberfläche (Phase I), initiale reversible Adhäsion der Mikroorganismen (Phase II), feste irreversible Anheftung der Organismen an die Trägeroberfläche (Phase III) und Ausbildung eines Biofilms durch Wachstum der adsorbierten Mikroorganismen (Phase IV).

Bei der reversiblen Adhäsion zeigt die Bakterienzelle noch zweidimensionale Brown'sche Molekularbewegungen, bei der irreversiblen Adhäsion zeigt die Bakterienzelle diese Bewegung nicht mehr und kann nur durch Einwirkung starker Scherkräfte vom Träger gelöst werden (James, 1982; van Loosdrecht et al., 1990b).

Wenn Zelle und Träger genügend nahe sind, kommt es zu sog. „short-range“ Interaktionen. Es wird spekuliert, daß nun die hydrophoben Gruppen der Bakterienoberfläche für die Verdrängung des Wasserfilms zwischen Zelle und Träger sorgen. Nimmt ihre Distanz auf $\leq 1,5$ nm ab, so wird die Energiebarriere zwischen Zelle und Träger aufgehoben und es kann zu spezifischen Interaktionen kommen (ionische Bindungen, Ausscheidungen von Exopolysacchariden, die Zelle und Träger „zusammenkleben“). Die weitere Ausbildung des Biofilms erfolgt durch Synthese der extrazellulären Matrix, Wachstum und Vermehrung der Mikroorganismen. Die Primärbesiedlung ist ein Prozeß, der sich im Zeitraum von Stunden vollzieht, während die Ausbildung eines Biofilms Tage oder längere Zeit benötigt (Schaule, 1992).

Es gibt keine allgemein anerkannte Theorie, die die mikrobielle Adsorption beschreibt (Klein und Ziehr, 1990; Martiensen, 2000a), weil die Gesamtheit der ablaufenden Interaktionen zwischen Zell- und Trägeroberfläche noch nicht im Detail verstanden ist (Marshall, 1991). Van Loosdrecht et al. (1990b), geben eine gute Übersicht über die zwei bisher am häufigsten diskutierten Theorien: Die Derjaguin-Landau-Verwey-Oberbeek-(DLVO-) Theorie und die Theorie der Gibb'schen Oberflächenenergie (ΔG).

Die DLVO-Theorie beschreibt die sog. „long-range“ Interaktionen, die Van-der-Waals- und elektrostatischen Kräfte, die die Adhäsion beeinflussen. Nach van Loosdrecht et al. (1990b) ist diese Theorie geeignet, sowohl das Phänomen der reversiblen, als auch der irreversiblen Adsorption zu erklären, während Norde und Lyklema (1989) die biologischen Prozesse, die zur irreversiblen Adhäsion führen, durch die DLVO-Theorie nicht erfaßt sehen. Für die Theorie der Gibb'schen Oberflächenenergie gilt als Voraussetzung, daß unmittelbarer Kontakt zwischen den miteinander agierenden Oberflächen besteht. Hierbei ist die Adhäsion allein von den vorhandenen Oberflächenenergien abhängig. Adhäsion erfolgt wenn $\Delta G \leq 0$ ist (Klein und Ziehr, 1990; van Oss et al., 1995).

Da physikochemische Wechselwirkungen zwischen Zellen und Trägern die erste Phase der Adsorption beeinflussen (van Loosdrecht et al., 1989; Dalton et al., 1994; Groening et al., 1988), sollte die Charakterisierung der Bakterienzelloberfläche des THF abbauenden Bakteriums im Vordergrund stehen, um mögliches Adhäsionsverhalten voraussagen zu

können. Aus der Literatur ist bekannt, daß Zellalter und Substrat (Neufeld et al., 1980; Hazen et al., 1986; van Loosdrecht et al., 1987), Inkubationstemperatur (Hazen et al., 1986) und weitere Inkubationsparameter (Sutherland, 1985), wie z.B. Phosphatgehalt (Büchs et al., 1988), den Charakter von mikrobiellen Zelloberflächen beeinflussen, aber auch die Wachstumsphase Einfluß auf die Hydrophobizität hat. So beschreiben van Loosdrecht et al. (1987) eine ansteigende Zellhydrophobizität mit hoher Wachstumsrate im Chemostaten und in der exponentiellen Wachstumsphase in einer Batch-Kultur. Als verantwortliche Faktoren für die bakterielle Adhäsion an angebotene Träger werden Ladung (Olssen et al., 1976; Pelletier et al., 1997), Hydrophobizität (Rosenberg und Kjelleberg, 1986; Rijnaarts et al., 1993; Pelletier et al., 1997) und extrazelluläre Strukturen der Zelloberfläche (Marshall, 1992; Gehrke et al., 1998; Langille und Weiner, 1998; Quintera et al., 1998), wie extrazelluläre Polysaccharide, Flagellen und Fimbrien genannt. Zita und Hermansson (1997) berichten, daß eine hohe Oberflächenhydrophobizität mit erhöhter Zelladhäsion an Abwasserflocken korrelierte. Dies ist im Prozeß der Abwasserreinigung erwünscht, da es die Abscheidung mikrobieller Zellen vom gereinigten Effluentenstrom erleichtert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine vorhandene Mischkultur an höhere, *in situ* relevante THF-Konzentrationen zu adaptieren und das für den THF-Abbau verantwortliche Bakterium in Reinkultur zu isolieren, um die zugrunde liegende Stoffwechselaktivität einem charakterisierbaren Bakterium zuordnen zu können. Das THF abbauende Isolat sollte taxonomisch und wachstumsphysiologisch charakterisiert werden. Da das Wachstum mit Ether einem Lösungsmittelstreß entspricht, sollte das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Streßbedingungen (Temperatur, Salz, hohe Ethersubstratkonzentrationen) untersucht werden, um herauszufinden, inwieweit das Bakterium auf diese untersuchten Stressoren wachstumsphysiologisch reagiert. Einleitende enzymatische Untersuchungen sollten klären, ob eine THF abhängige enzymatische Aktivität in wachsenden, ruhenden und permeabilisierten Zellen nachgewiesen werden kann, da aus Untersuchungen von Bernhardt (1991) und Bock (1994) abgeleitet werden konnte, daß mit einer geringen und instabilen Enzymaktivität gerechnet werden mußte. Für die Reinigung und Charakterisierung eines Enzyms sind diese Voruntersuchungen wichtig, um so Aussagen über dessen Stabilität im zellfreien Extrakt zu erhalten. Für einen möglichen biotechnologischen Einsatz zur Reinigung THF haltiger Abwasser wäre es vorteilhaft, das THF abbauende bakterielle Isolat

mittels Adhäsion- oder Zelleinschlußmethoden zu immobilisieren. In Vorversuchen sollten die physikochemischen Zelloberflächeneigenschaften, die die primäre Adhäsion beeinflussen, untersucht werden, um Voraussagen zum möglichen Adhäsionsverhalten machen zu können. Des weiteren sollte untersucht werden, inwieweit das angebotene Substrat die physikochemischen Eigenschaften der Zelloberfläche beeinflusste. Für den quantitativen Nachweis des THFs mußte eine gaschromatographische Methode erarbeitet werden.