

Angewandte Mikrobiologie

Erdöl abbauende Mikroorganismen

FRIEDER SCHAUER, RABEA SIETMANN
INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT GREIFSWALD

Erdöl als ein Gemisch von hydrophoben und inerten Kohlenwasserstoffen stellt für eine Reihe von Bakterien, Hefen und filamentösen Pilzen eine Kohlenstoff- und Energiequelle dar. Für einen effektiven Abbau der Komponenten sind besondere katabole Fähigkeiten und Umweltfaktoren von Bedeutung.

Crude oil is composed of hydrophobic and inert hydrocarbons and thus is a source of carbon and energy for many bacteria, yeasts, and filamentous fungi. The degradation of the components of crude oil requires specific catabolic abilities. Environmental factors are also important considerations.

■ Die weite Verbreitung von Erdölprodukten und die zunehmende Belastung von Böden und Gewässern mit Rohöl und dessen Destil-

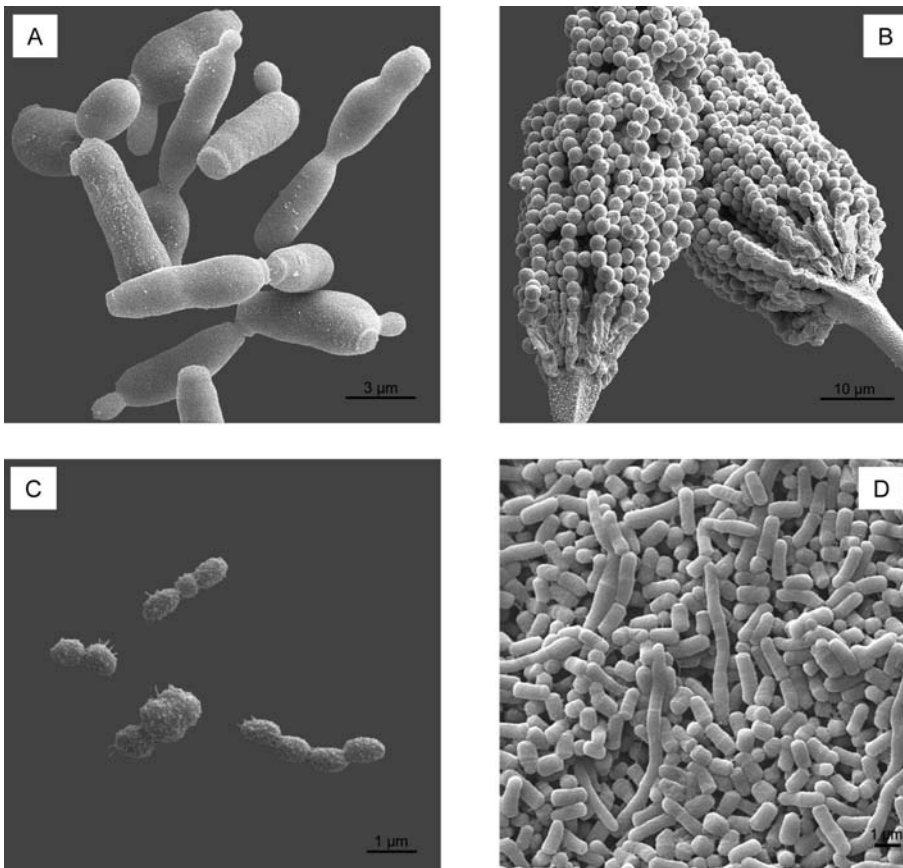
lations- und Verarbeitungsprodukten hat das Interesse an Erdöl abbauenden Mikroorganismen verstärkt. Bereits der Eintrag des in

die Meere gelangten Öls wurde weltweit auf 1,7 bis 8,8 Millionen Tonnen geschätzt [1]. Der diesjährige Havariefall im Golf von Mexiko führte allein schon zu einer geschätzten Belastung von inzwischen 700 Mio. Liter in diesem Gebiet (www.br-online.de, 28.07.2010). Neben der Ölförderung im Meer, den Kontaminationen durch küstennahe Raffinerien, Ölhäfen oder ölhaltige Abwässer, die über Flüsse in die Meere gelangen, kommt dem weltweit zunehmenden Schiffsverkehr eine beträchtliche Bedeutung zu. Die Forschungen auf dem Gebiet der Erdölmikrobiologie widmen sich darüber hinaus jedoch auch der Rolle von Mikroorganismen bei der Entstehung, Erkundung und Ausbeutung von Erdöllagerstätten, ihrer möglichen Funktion bei der Stoffwandlung von Erdölbestandteilen und der Herstellung von spezifischen Oxidationsprodukten sowie dem Einsatz von Kohlenwasserstoffen – vor allem *n*-Alkanen – als relativ billigen Substraten für technische Fermentationen im Rahmen der Biotechnologie.

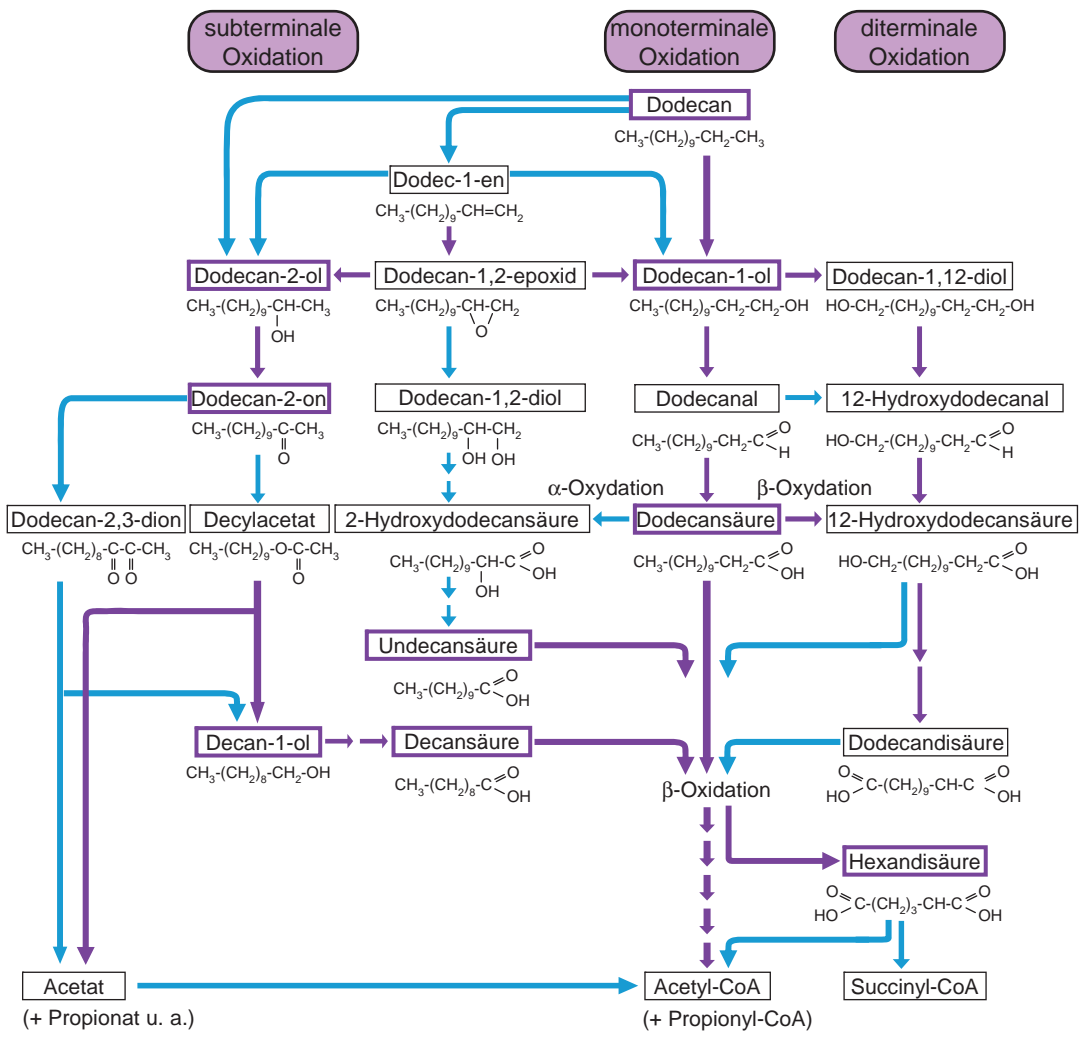
Erdöl als mikrobielles Substrat

Erdöl besteht aus etwa 2.000 Einzelsubstanzen. Je nach Förderregion unterscheidet sich die chemische Zusammensetzung stark. Kohlenwasserstoffe stellen mit 50 bis 98 Prozent den Hauptanteil dar. Dabei dominieren als Stoffgruppen mit 35 bis 75 Prozent die Paraffine (meist *n*-Alkane, seltener Isoalkane), gefolgt von den Cycloalkanen mit 20 bis 45 Prozent und den Aromaten (besonders Phenylalkane) mit 15 bis 25 Prozent.

Während *n*-Alkane und monoaromatische Substanzen mikrobiell relativ schnell verwertet werden können, stellen mehrfach verzweigte aliphatische Kohlenwasserstoffe sowie substituierte und kondensierte Cycloalkane schwer abbaubare Substrate dar, die vielfach nur mikrobielle Spezialisten oder Mischkulturen effektiv abbauen können. Erdöl als komplexes Gemisch verschiedener Substanzklassen kann somit nicht durch eine einzelne Mikroorganismen-Art vollständig verwertet werden; es ist im Regelfall eine konzentrierte Aktion verschiedener Mikroorganismen-Typen mit unterschiedlichen Eigenschaften erforderlich.



▲ **Abb. 1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Erdöl abbauenden Mikroorganismen. A, *Candida maltosa*; B, *Penicillium spec.*; C, *Alcanivorax borkumensis* und D, *Rhodococcus ruber*.



◀ **Abb. 2:** Katabolismus von aliphatischen Kohlenwasserstoffen in *Candida maltosa* (violette Abbauewege; akkumulierte Metaboliten sind hervorgehoben). Hellblau markierte Abbauewege kommen überwiegend in Bakterien oder filamentösen Pilzen vor. Weitere Erklärungen im Text.

Vorkommen und Verbreitung Erdöl abbauender Mikroorganismen

Mikroorganismen, die Hauptbestandteile von Erdöl abbauen können, findet man sowohl unter den Bakterien als auch unter den filamentösen Pilzen, den Hefen oder einzelnen Algengruppen. Einige Bakterien, die Kohlenwasserstoffe abbauen, sind an ein marines Milieu adaptiert, so Vertreter der Gattungen *Alcanivorax* (Abb. 1C), *Marinobacter*, *Oleiphilus*, *Oleispira* oder *Thalassolituus* (sämtlich Gammaproteobacteria). Aromatische Kohlenwasserstoffe bauen vor allem marine *Nephtunomonas*- und *Cycloclasticus*-Arten ab. Andere Bakterien wie *Pseudomonas*-, *Acinetobacter*- oder *Thermoleophilum*-Arten leben eher im Süßwasser. Auch scheinen einige Methan-oxidierende, Sulfat-reduzierende, Stickstoff-fixierende Bakterien (*Azotobacter*-, *Azospirillum*- und *Xanthobacter*-Arten) und phototrophe (*Rhodospirillum*- und *Rhodopseudomonas*-Arten) teilweise zur Oxidation von aliphatischen Kohlenwasserstoffen befähigt zu sein. In Böden dominieren meist Gram-positive Bakterien der Gattungen *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* (Abb. 1D), *Nocardia*,

Nocardioides, *Dietzia*, *Arthrobacter* oder *Geobacillus*.

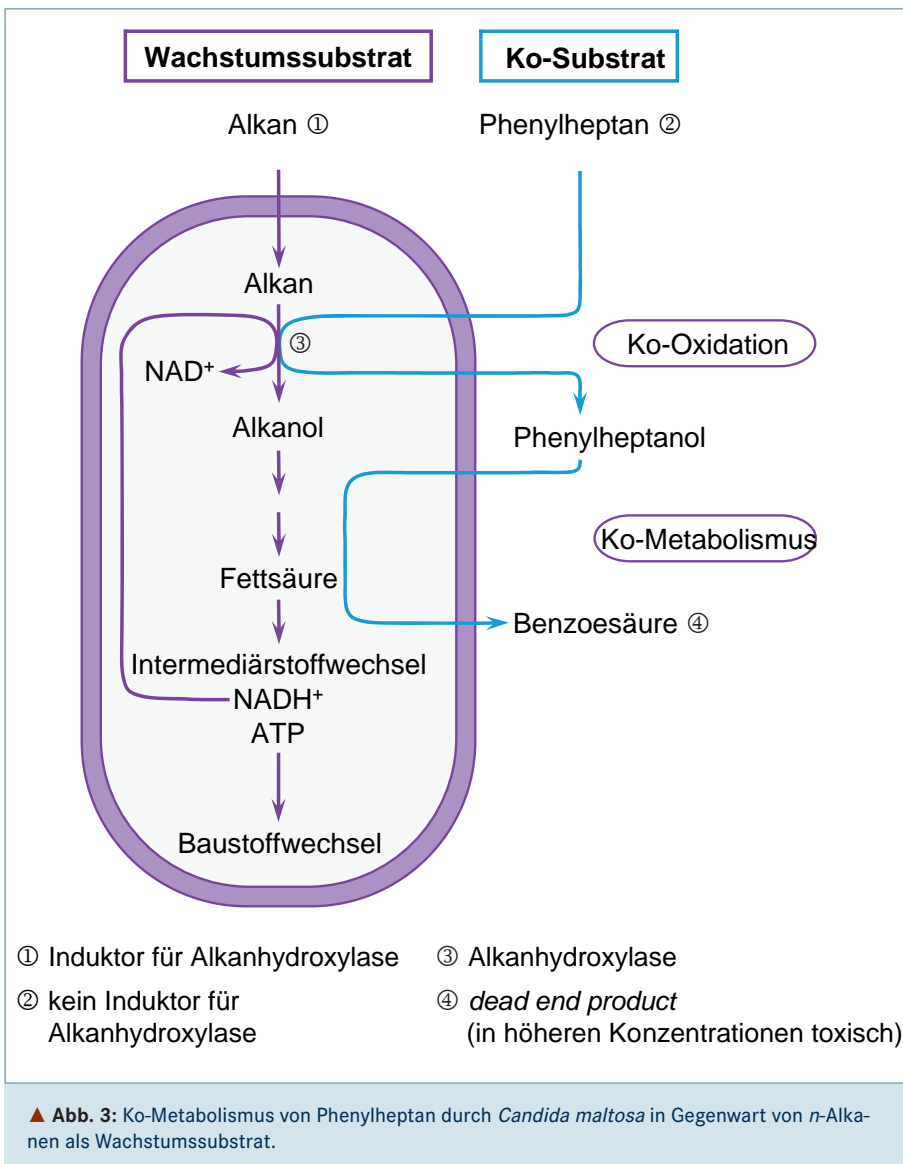
Innerhalb der filamentösen Pilze, die insbesondere in Böden und nur teilweise in aquatischen Habitaten leben, verwerten beispielsweise Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* (Abb. 1B) oder *Trichoderma* Erdöl-Kohlenwasserstoffe. Unter den Hefen findet man Alkan-oxidierende Arten besonders bei den Gattungen *Candida* (29 Prozent der Arten; Abb. 1A), *Debaryomyces*, *Lodderomyces*, *Pichia* und *Yarrowia* bzw. in den zu den Basidiomyceten zählenden Hefegattungen *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* und *Trichosporon*. Auch Chlorophyll-freie, sekundär heterotroph lebende Algen der Gattung *Prototheca* sind in der Lage, auf aliphatischen Kohlenwasserstoffen zu wachsen.

Aufnahme und Abbau aliphatischer Kohlenwasserstoffe

Bei der Aufnahme von wasserunlöslichen Alkanen (C₁₂ bis C₂₂), was eine wesentliche Voraussetzung für die weitere Verwertung

darstellt, werden die Alkane über hydrophobe Bereiche der Zellumhüllung in die Zellen kanalisiert; spezifische Aufnahmesysteme in der Membran wurden bisher nicht nachgewiesen. Man unterscheidet Öl-positive Mikroorganismen, die sich aufgrund ihrer hydrophoben (z. B. Mykolsäuren enthaltenden) Zelloberflächen direkt in die Ölphase einlagern können, und Öl-negative, die in der Wasserphase suspendiert bleiben. Vor allem Letztere benötigen für eine effektive Aufnahme von Öl-Mikrotröpfchen emulgierend wirkende Glykolipide (Biodetergenzien), die von den Zellen ausgeschieden werden.

Der Hauptabbaueweg von n-Alkanen verläuft über die monoterminalen Oxidation (am C₁-Atom) der Alkane. Dabei werden primäre Alkohole, Aldehyde und Fettsäuren gebildet (Abb. 2). Das Schlüsselenzym für den ersten oxidativen Angriff am relativ inerten Alkanmolekül (Primäroxidation) ist die an Membranen gebundene Alkan-Monooxygenase. In Mikroorganismen existieren zwei Hauptformen von Alkanhydroxylase-Systemen: Das erste kommt bei Gram-negativen Bakterien (z. B. *Pseudomonas*-Arten) vor und enthält als



typisches elektronentransportierendes Protein Rubredoxin. Das zweite System, das vor allem in Gram-positiven Bakterien (z. B. *Rhodococcus*-Arten) und Pilzen (z. B. *Candida*-Arten) gefunden wird, basiert auf der Wirkung von Cytochrom P450 als terminaler Oxidase.

Weitere Wege des Abbaus der Alkane sind die diterminale Oxidation zu langkettigen Dicarbonsäuren und schließlich (unter Abspaltung von Acetyl-CoA) zu Succinyl-CoA und die subterminale Oxidation (oft am C₂- oder C₃-Atom) zu sekundären Alkoholen und Ketonen. Letztere werden durch eine Keton-Monooxygenase zu Estern oxidiert, die durch Esterasen in kürzerkettige primäre Alkohole und Monocarbonsäuren gespalten werden (Abb. 2).

Bei einigen Mikroorganismen kommt nur der monoterminale Abbauweg vor (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcanivorax borkumensis*),

bei anderen sind zusätzlich diterminale (*Candida maltosa*) oder subterminale Abbauege (*Mortierella isabellina*) vorhanden. Darüber hinaus können viele Erdöl-Kohlenwasserstoffe nur über Mechanismen der Ko-Oxidation bzw. des Ko-Metabolismus [2] abgebaut werden (Abb. 3).

Mehrfach verzweigte Alkane (z. B. Pristan) können die meisten Kohlenwasserstoff verwertenden Mikroorganismen nur teiloxidieren und nicht als Wachstumssubstrat nutzen. Daher finden sich verzweigte Kohlenwasserstoffe als persistente Restsubstrate in älteren ölkontaminierten Arealen. Nur wenige Bakterien (z. B. *Rhodococcus ruber* oder *Mycobacterium neoaurum*) sind in der Lage, Methyl-verzweigte Fettsäuren – unter zusätzlicher Bildung von Propionyl-CoA von den Verzweigungsstellen – als Wachstumssubstrat zu nutzen [3].

Obwohl der durch Monooxygenasen katalysierte und daher von molekularem Sauerstoff abhängige Abbau die weitaus effektivere Art des mikrobiellen Katabolismus von aliphatischen Kohlenwasserstoffen darstellt, existieren Mikroorganismen, die – z. B. in Sedimenten – einen anaeroben Kohlenwasserstoffabbau ermöglichen können [4].

Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe

Erdöl enthält als aromatische Komponenten neben Alkylbenzothiophenen und polyzyklischen Aromaten vor allem Alkyl-substituierte Monoaromaten (Phenylalkane). Der Abbau von polyzyklischen Aromaten erfolgt durch zweifache Hydroxylierung und nachfolgende Ringspaltung [5]. Phenylalkane können durch Alkan-oxidierende Mikroorganismen an der Seitenkette oxidiert werden; dabei werden aus Phenylalkanen für Mikroorganismen toxische aromatische Säuren wie Benzoesäure oder Phenyllessigsäure gebildet. Falls durch Alkan-oxidierende oder weitere Mikroorganismengruppen auch eine Oxidation am Ring katalysiert wird, entstehen als Ringspaltungsprodukte alkylierte Muconsäurederivate oder – infolge einer internen Esterbildung von Ring-hydroxylierten Phenylalkansäuren – Lactonstrukturen bzw. Cumarine [6].

Abbau alicyclischer Kohlenwasserstoffe

Die Mechanismen der mikrobiellen Oxidation von Cycloalkanen auf biochemischer und molekularer Ebene sind hauptsächlich für Bakterien beschrieben. Die einleitende bakterielle Oxidation von Cyclohexan resultiert beispielsweise in der Bildung von Cyclohexanol, das weiter umgesetzt wird zu Cyclohexanon. Eine Cyclohexanon-Monooxygenase katalysiert dann die Oxidation von Cyclohexanon zum ϵ -Caprolacton durch eine Bayer-Villiger-Reaktion. Anschließend wird der Ring des Lactons gespalten, wobei 6-Hydroxyhexansäure entsteht, die in Adipinsäure umgewandelt wird [7]. Analog dazu verläuft auch der Abbau von Cyclododecan zu Dodecandisäure. Die gebildeten Dicarbonsäuren werden dann von den Zellen in den Intermediärstoffwechsel eingeführt.

Bedeutung Erdöl abbauender Mikroorganismen bei Ölhavarien

Bei Ölhavarien im Meer reichern sich im Bereich der Ölkontamination die marinen Erdöl abbauenden Mikroorganismen langsam an. In der ersten Phase nach der Havarie sind

die Organismen infolge der großen Ölmengen jedoch zunächst überfordert, sodass eine mechanische Abschöpfung durch Schiffe oder der Einsatz von Absaugvorrichtungen die effektivere Variante der Ölbeseitigung darstellen. Erst wenn zusammenhängende Ölbe- reiche nicht mehr vorkommen und eine zunehmende Verteilung in der oberen Wasserschicht stattfindet, steigt die Bedeutung von Kohlenwasserstoff abbauenden Mikroorganismen für eine Eliminierung der verbliebenen Ölan- teile. Infolge des durch das eingetragene Öl aufgetretenen Kohlenstoffüber- schusses und einem relativen Mangel an Stickstoff und Phosphor kann es zu Wachstumslimitationen der Mikroor- ganismen kommen, sodass eine wohl- dosierte Zufuhr von anorganischen Nährstoffen förderlich sein kann. Weiterhin stellen ein verbesserter Sau- erstoffeintrag durch erhöhte Turbulenz der Wasserphase sowie der Einsatz von umweltfreundlichen Detergenzien oder Dispersionsverfahren zur Emulgierung des Öls fördernde Faktoren dar, die eine Eliminierung des Öls beschleunigen können. Eine externe Zufuhr von Öl abbauenden Laborstämmen im Falle von Erdölhavarien ist prinzipiell mög- lich, erfordert aber infolge hoher Kos- ten, der begrenzten Artenzahl und des dadurch limitierten Substratspektrums

noch eine weitere, erhebliche Optimie- rung – vor allem im Vergleich zu *in situ*- Fördermaßnahmen von im Meer leben- den, an das marine Milieu optimal angepassten Ölabbauern. ■

Literatur

- [1] Clark RB (1992) Kranke Meere? Verschmutzung und ihre Folgen. Spektrum Verlag, Heidelberg
- [2] Alexander M (1999) Biodegradation and bioreme- diation. Academic Press, San Diego
- [3] Nhi-Cong LT, Mikolasch A, Klenk H-P et al. (2009) Degradation of the multiple branched alkane 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane (pristane) in *Rhodococcus ruber* and *Mycobacterium neoaurum*. Int Biodeter Biodegr 63:201–207
- [4] Wilkes H, Kuhner, S, Bolm C et al. (2003) Formation of *n*-alkane- and cycloalkanes-derived organic acids during anaerobic growth of a denitrify- ing bacterium with crude oil. Org Geochem 34:1313– 1323
- [5] Haritash AK, Kauschik CP (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J Hazard Mater 169:1–15
- [6] Awe S, Mikolasch A, Schauer F (2009) Formation of coumarines during the degradation of alkyl substi- tuted aromatic oil components by the yeast *Trichosporon asahii*. Appl Microbiol Biotechnol 84:965–976
- [7] Cheng Q, Thomas SM, Rouvière P (2002) Biological conversion of cyclic alkanes and cyclic alcohols into dicarboxylic acids: biochemical and molecular basis. Appl Microbiol Biotechnol 58:704– 711

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Frieder Schauer
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Institut für Mikrobiologie
Friedrich-Ludwig-Jahn-Straße 15
D-17487 Greifswald
Tel.: 03834-864204
Fax: 03834-864202
schauer@uni-greifswald.de

AUTOREN



Frieder Schauer

1967–1972 Biologiestudium in Greifswald. Seit 1992 Leiter der Abteilung Angewandte Mikrobiologie am Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.



Rabea Sietmann

1992–1998 Biologiestudium in Rostock und Greifswald. Seit 2004 Leiterin des Laboratoriums für Elektronenmikroskopie der Fachrichtung Biologie der Universität Greifswald.