

## Reduktive Dehalogenierung von chlorierten Benzolen und Dioxinen durch *Dehalococcoides*

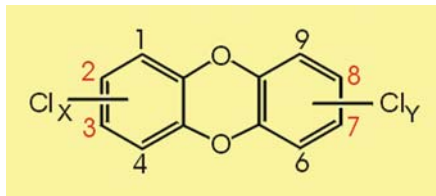
Ute Lechner<sup>1</sup>, Michael Bunge<sup>1</sup> und Lorenz Adrian<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

<sup>2</sup>Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Berlin

► Hexachlorbenzol, polychlorierte Dioxine (PCDD) und polychlorierte Biphenyle (PCB) gehören zu den zwölf *Persistent Organic Pollutants* (POPs)<sup>[1]</sup>, toxischen Verbindungen, die global verbreitet sind und häufig in Nahrungsketten angereichert werden. PCDD sind besonders bedenklich, da einige der 75 nach Zahl und Position der Chlorsubstituenten unterscheidbaren Einzelverbindungen (Kongenere), darunter vor allem 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TeCDD), eine sehr hohe Toxizität besitzen (Abb. 1). Zu der großen Persistenz in der Umwelt tragen sowohl der lipophile Charakter als auch der hohe Chlorierungsgrad bei, der einen aeroben Abbau erheblich erschwert.

Eine typische Senke für hochchlorierte, hydrophobe Verbindungen sind aquatische Sedimente. Hier wurde schon vor gut zehn Jahren reduktive Dechlorierung von PCB und Dioxinen beobachtet und auf die Aktivität anaerober Bakterien zurückgeführt (siehe z. B.<sup>[2]</sup>). Bei der reduktiven Dechlorierung werden schrittweise Chloratome durch Wasserstoffatome ersetzt. Einige Bakterien sind in der Lage, diesen Prozess zur Energiekonservierung zu nutzen<sup>[3]</sup>. Bei diesem Dehalorespiration genannten Atmungsprozess fungieren chlorierte organische Verbindungen aufgrund ihres relativ hohen Redoxpotenzials (+300 bis +600mV) als terminale Elektronenakzeptoren. Die Fähigkeit zur Dehalorespiration wurde für einige Vertreter der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, der  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Proteo-



**Abb. 1: Strukturformel von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen. Insgesamt gibt es 75 verschiedene Einzelverbindungen (Kongenere). Hervorgehoben sind die Kohlenstoffatome 2, 3, 7 und 8. Dioxinkongenere, die an diesen vier lateralen Positionen Chloratome tragen, besitzen durch Ausbildung einer planaren Konformation eine hohe Toxizität. x, y: 1–4.**

bakterien und der *Chloroflexi* nachgewiesen. Die reduktive Dechlorierung von relativ gut wasserlöslichen Verbindungen wie Chlorbenzolen, Chlorphenolen und chlorierten Ethenen ist biochemisch und molekularbiologisch an Reinkulturen detailliert untersucht worden<sup>[3]</sup>. Bisher waren jedoch keine Reinkulturen zum Studium der Dechlorierung der wesentlich hydrophoberen POPs wie Dioxine, Chlorbenzole oder PCB bekannt.

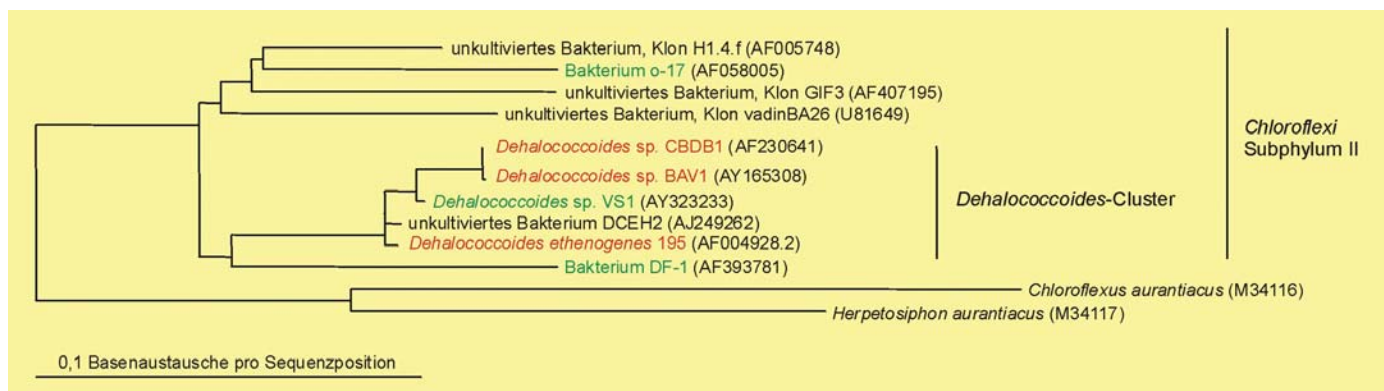
### Isolierung eines Chlorbenzole dehalogenierenden Bakteriums

Die Isolierung eines Chlorbenzole dechlorierenden Bakteriums war eine mehrjährige Sysiphus-Arbeit. Aus Sediment der Saale bei

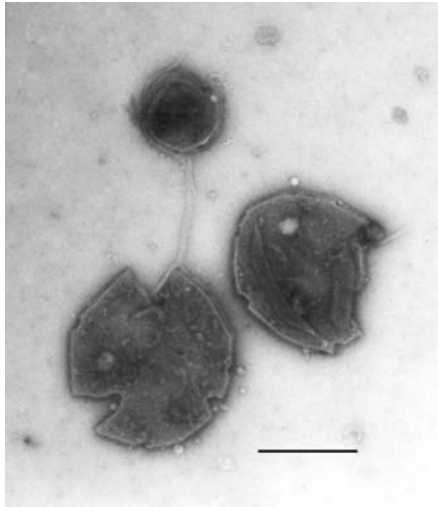
Jena wurde eine Mischkultur angereichert, die mit Pyruvat als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle ein Gemisch aus 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol zu 1,3- und 1,4-Dichlorbenzol dechlorierte<sup>[4]</sup>. Die Chlorbenzole konnten aufgrund ihrer Toxizität und schlechten Löslichkeit nur in sehr geringen Konzentrationen (10–30  $\mu$ M) eingesetzt werden. Schrittweise wurde die Pyruvat vergärende Begleitflora durch Beschränkung des Mediums auf wenige notwendige Komponenten und die Zugabe von Antibiotika reduziert<sup>[5]</sup>. Die Isolierung einer Reinkultur gelang schließlich aus Verdünnungsreihen, die ein mit 0,3 Prozent einer *Low melting*-Agarose verfestigtes Medium enthielten. Mit Trichlorbenzol als Elektronenakzeptor, Wasserstoff als Elektronendonator und Acetat als Kohlenstoffquelle bildeten sich nach drei Wochen kaum sichtbare Kolonien, die nicht auftraten, wenn eine der Komponenten fehlte. Der nach einigen Transfers isolierte Stamm CBDB1 ist extrem sauerstoffempfindlich und verliert die Dechlorierungsaktivität irreversibel, wenn er nur wenige Sekunden der Luft ausgesetzt wird<sup>[6]</sup>.

### Dehalococcoides-Spezies

Phylogenetisch lässt sich Stamm CBDB1 in das *Dehalococcoides*-Cluster in einem Subphylum der *Chloroflexi* einordnen (Abb. 2). Dieses Subphylum umfasst neben einer Fülle von „Umweltsequenzen“ zwei weitere isolierte Vertreter: *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195<sup>[7]</sup> und *Dehalococcoides* sp. Stamm BAV1<sup>[8]</sup>, die Tetrachlorethen beziehungsweise Dichlorethen über Vinylchlorid zu Ethen dechlorieren. In Mischkulturen wurden ein weiterer Vinylchlorid dechlorierender *Dehalococcoides*-Stamm (VS1)<sup>[9]</sup> und die PCB-dechlorierenden, mit dem *Dehalococcoides*-Cluster assoziierten Bakterien DF-1<sup>[10]</sup> und o-17<sup>[11]</sup> identifiziert (Abb. 2). Die Zellen aller bislang beschriebenen *Dehalococcoides*-Spezies sind diskusförmig, haben einen



**Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum des Dehalococcoides-Clusters im Phylum Chloroflexi. Hervorgehoben sind die drei bisher beschriebenen reaktiv dechlorierenden Reinkulturen (Rot) und Bakterien, deren Bedeutung für die reduktive Dechlorierung in Mischkulturen nachgewiesen wurde (Grün). In Klammern: Datenbank-Nummer.**



**Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Stamm CBDB1 als Negativkontrast. Größenmaßstab = 0,5  $\mu\text{m}$**

Durchmesser von 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$  und sind durch eine ungewöhnliche Zellform charakterisiert (Abb. 3). Die Zellwand scheint kein Peptidoglykan zu enthalten, und die Oberfläche ist S-Layer-artig strukturiert. Alle bisher kultivierten *Dehalococcoides*-Stämme er-

wiesen sich als obligate Dehalogenierer, die weder durch Gärung noch durch die Reduktion verschiedener anderer Elektronenakzeptoren wachsen konnten.

### Dioxine als Elektronenakzeptoren

Aus verschiedenen Flusssedimenten Mitteldeutschlands wurden anaerobe Mischkulturen angereichert, die die relativ ungiftigen, nur an einem Ring chlorierten Dioxinkongeneren 1,2,3,4-TeCDD, 1,2,4- und 1,2,3-Trichlordibenzo-*p*-dioxin (TrCDD) zu niedriger chlorierten Kongeneren umsetzten<sup>[12, 13]</sup>. In allen Dioxin-dechlorierenden Mischkulturen wurden 16S-rRNA-Gensequenzen identifiziert, die mit denen von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 vollständig übereinstimmten. Untersuchungen zeigten, dass Stamm CBDB1 in Reinkultur alle oben genannten Kongeneren zum 2-Monochlordibenzo-*p*-dioxin dechlorierte<sup>[14]</sup>. Die Chloratome wurden bevorzugt von den peripheren Positionen 1 und 4 (Abb. 1) eliminiert, konnten aber auch, wie die Untersuchung von 2,3-Dichlordibenzo-*p*-dioxin zeigte, von lateralen Positionen abgespalten werden. Dieses Dechlorierungsverhalten war zuvor

auch in einigen Anreicherungskulturen beobachtet worden. Die Dechlorierungsaktivität blieb über mehrere Passagen mit Dioxinen erhalten, was darauf hindeutet, dass Stamm CBDB1 die Dioxine ebenfalls als Elektronenakzeptoren nutzen kann.

1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin gehört aufgrund seiner vier lateralen Chlorsubstituenten zu den giftigsten Dioxinkongeneren. Auch dieses umweltrelevante Kongener wurde, wenn auch sehr langsam (0,8 nmol l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), durch Stamm CBDB1 dechloriert (Abb. 4). Wie zuvor bei den Dioxinkongeneren, die nur an einem Ring chloriert waren, wurde zuerst das periphere Chloratom (Position 1) freigesetzt, sodass in sehr niedrigen Konzentrationen das hochtoxische 2,3,7,8-TeCDD als Intermediat entstand. Entsprechend der oben beschriebenen lateralen Dechlorierungskapazität von Stamm CBDB1 wurde dann von jedem Ring von 2,3,7,8-TeCDD jeweils ein Chloratom unter Bildung eines Dichlordibenzo-*p*-dioxins abgespalten<sup>[14]</sup>. Zweifach chlorierte Dioxinkongeneren sind weitaus weniger giftig als die hoch chlorierten und sind weniger persistent, da sie durch aerobe Bakterien angegriffen werden können. ▶▶

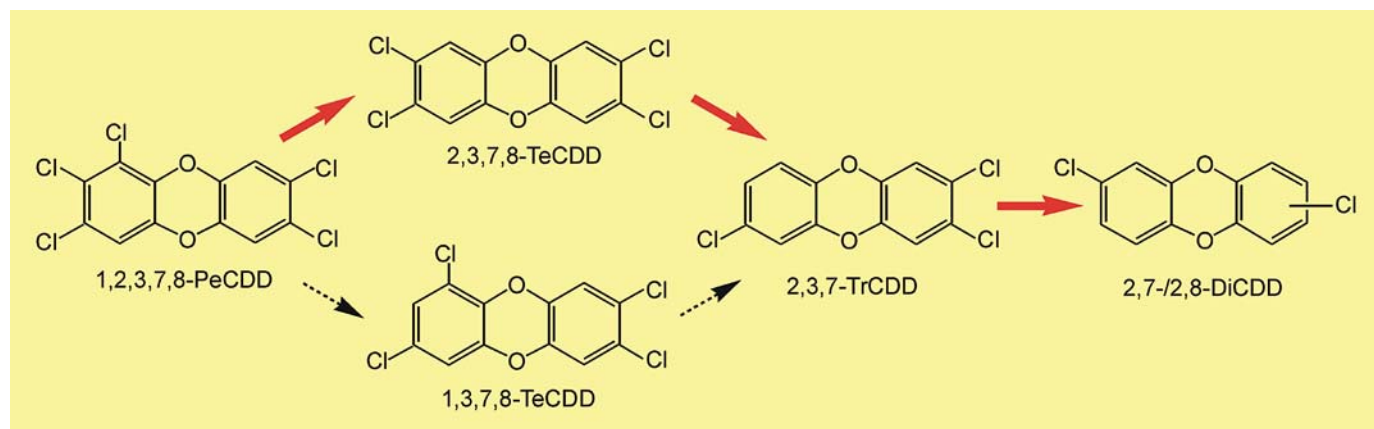


Abb. 4: Reduktive Dechlorierung von 1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-p-dioxin (PeCDD) durch Stamm CBDB1. Aus 3  $\mu\text{M}$  1,2,3,7,8-PeCDD wurden innerhalb von 104 Tagen neben Spuren von 1,3,7,8-TeCDD und 2,3,7-TrCDD 56 nM 2,3,7,8-TeCDD und 10 nM 2,7- bzw. 2,8-DiCDD gebildet. Rote Pfeile kennzeichnen den postulierten Hauptweg, schwarze Pfeile einen Nebenweg der Dechlorierung.

Die Entdeckung des Potenzials von *Dehalococcoides* zur Chlorbenzol-, PCB- und Dioxin-Dechlorierung eröffnet möglicherweise neue Strategien zur Behandlung entsprechender Umweltbelastungen. Mit *Dehalococcoides* angereicherte Inokula wurden bereits mehrfach erfolgreich in kommerziellen und wissenschaftlichen Projekten zur Entfernung chlorierter Ethene aus Grundwasser eingesetzt<sup>[15]</sup>. Aus diesem Grund stellt die weitere Erforschung von Physiologie, Enzymatik und Genetik dieser ungewöhnlichen Bakterien eine spannende wissenschaftliche Herausforderung dar.

### Danksagung

Wir bedanken uns bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppen und bei Professoren Jan R. Andreessen und Helmut Görisch für die fruchtbare Zusammenarbeit. Unsere Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Land Sachsen-Anhalt unterstützt.

### Literatur

- [1] **Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants** (POPs), Stockholm, 22 May 2001 (<http://www.pops.int/>)
- [2] **Beurskens, J. E. M., Mol, G. A. J., Barrefeld, H. L., van Munster, B., and Winkels, H. J.** (1993): Geochronology of priority pollutants in a sedimentation area of the Rhine river. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1549–1566.
- [3] **Holliger, C., Wohlfahrt, G., and Diekert, G.** (1999): Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 383–398.
- [4] **Adrian, L., Manz, W., Szewzyk, U., and Görisch, H.** (1998): Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and

1,2,4-trichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 496–503.

[5] **Adrian, L., Szewzyk, U., and Görisch, H.** (2000): Bacterial growth based on reductive dechlorination of trichlorobenzenes. *Biodegradation* 11, 73–81.

[6] **Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., and Görisch, H.** (2000): Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408, 580–583.

[7] **Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J. M., and Zinder, S. H.** (1997): Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276, 1568–1571.

[8] **He, J., Ritalahti, K. M., Yang, K.-L., Koenigsberg, S. S., and Löffler, F. E.** (2003): Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* 424, 62–65.

[9] **Cupples, A. M., Spormann, A. M., and McCarthy, P. L.** (2003): Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and *cis*-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 953–959.

[10] **Wu, Q., Watts, J. E. M., Sowers, K. R., and May, H. D.** (2002): Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 807–812.

[11] **Cutter, L. A., Watts, J. E. M., Sowers, K. R., and May, H. D.** (2001): Identification of a microorganism that links its growth to the reductive dechlorination of 2,3,5,6-chlorobiphenyl. *Environ. Microbiol.* 3, 699–709.

[12] **Ballerstedt, H., Kraus, A., and Lechner, U.** (1997): Reductive dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and its products by anaerobic mixed cultures from Saale River sediment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1749–1753.

[13] **Bunge, M., Ballerstedt, H., and Lechner, U.** (2001) Regiospecific dechlorination of spiked tetra- and trichlorodibenzo-*p*-dioxins by anaerobic bacteria from PCDD/F-contaminated Spittelwasser sediments. *Chemosphere* 43, 675–681.

[14] **Bunge, M., Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, W. G., Andreessen, J. R., Görisch, H., and Lechner, U.** (2003): Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 421, 357–360.

[15] **Lendvay, J. M., et al.** (2003): Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1422–1431.

### Korrespondenzadressen:

**Dr. Ute Lechner**  
 Institut für Mikrobiologie  
 Martin-Luther-Universität Halle  
 Kurt-Mothes-Str. 3  
 D-06120 Halle  
 Tel.: 0345-5526353  
 u.lechner@mikrobiologie.uni-halle.de

**Dr. Lorenz Adrian**  
 Fachgebiet Technische Biochemie  
 Technische Universität Berlin  
 Seestr. 13  
 D-13353 Berlin  
 Tel.: 030-31427509  
 lorenz.adrian@tu-berlin.de