

Biologischer Abbau von 2-Butoxyethanol durch *Pseudomonas* sp. BOE100

Dipl.-Ing. Christine Woiski, Dr.-Ing. Daniel Dobslaw, Prof. Dr. K.-H. Engesser
Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft

Einleitung

Der Abbau von Butoxyethanol (BET) durch den Stamm *Pseudomonas* sp. BOE100 wurde untersucht. BET ist ein Lösemittel, das hauptsächlich in Lacken und Farben verwendet wird, aber auch in Oberflächenreinigern, Kosmetika und Textilien enthalten ist. Außerdem ist es Bestandteil von Öldispersanten wie zum Beispiel Corexit EC9527A. Es zählt zu den „high volume chemicals“. BOE100 wurde aus einem Biowäscher einer Sonderabfallbehandlungsanlage isoliert. Eine 16S-rDNA-Analyse hat BOE100 als *Pseudomonas* sp. identifiziert.

Detektion von Metaboliten

Durch Zugabe von Chloramphenicol (CAP) wurde bei einer Flüssigkultur von BOE100 die Proteinsynthese blockiert. Daraufhin akkumulierten Intermediate im Medium, die nach Extraktion mit Dichlormethan im GC-MS analysiert wurden. Als Metabolite des Abbaus konnten Butoxyessigsäure (BES), n-Butanol (ButOH) und Butter-säure identifiziert werden (Abb. 1).

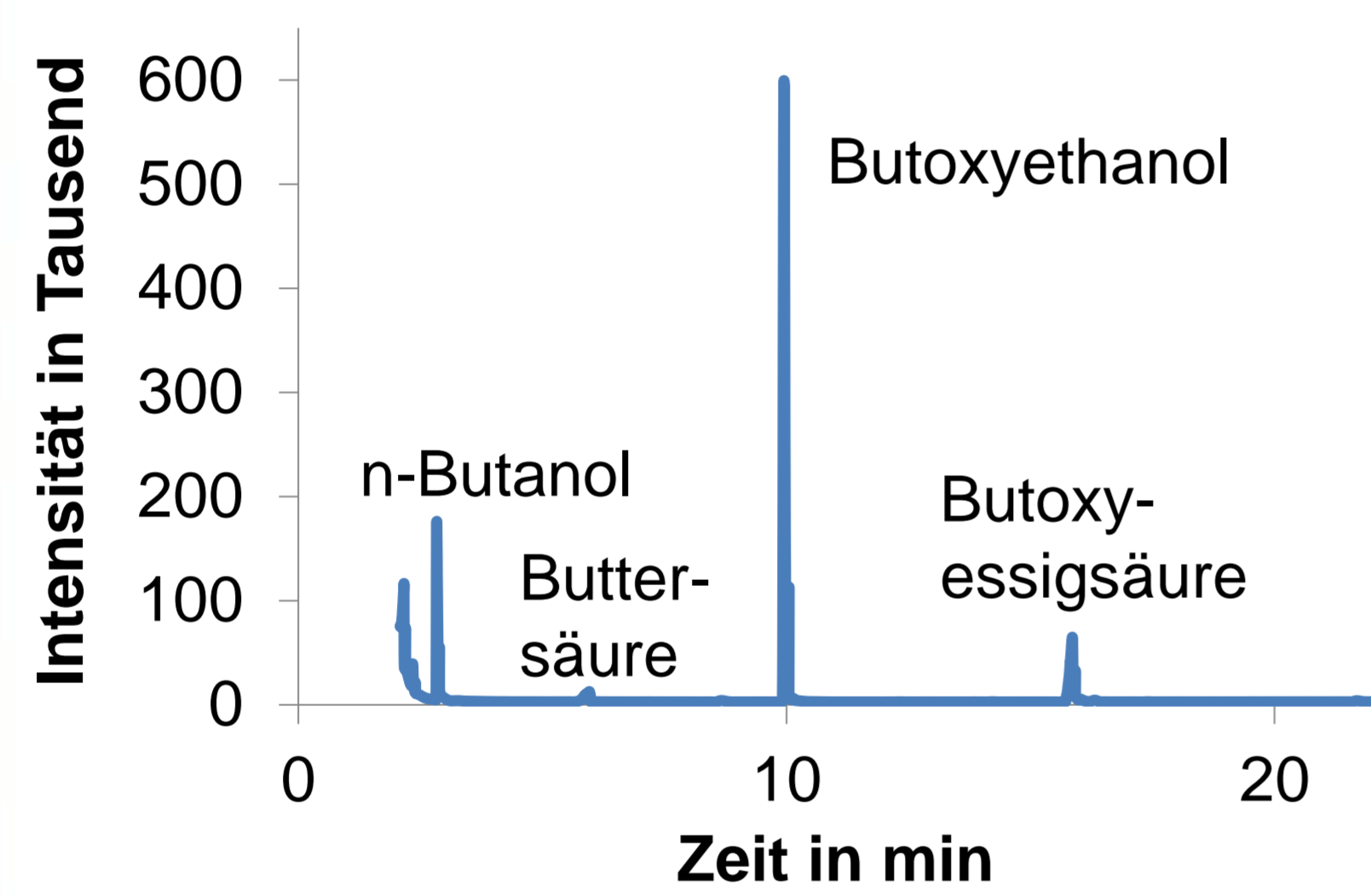


Abb. 1: Chromatogramm der mit CAP versetzten Probe. Neben dem zugegebenen Substrat BET wurden BES, ButOH und Butter-säure als mögliche Intermediate detektiert.

Ein Abbauweg wurde postuliert:

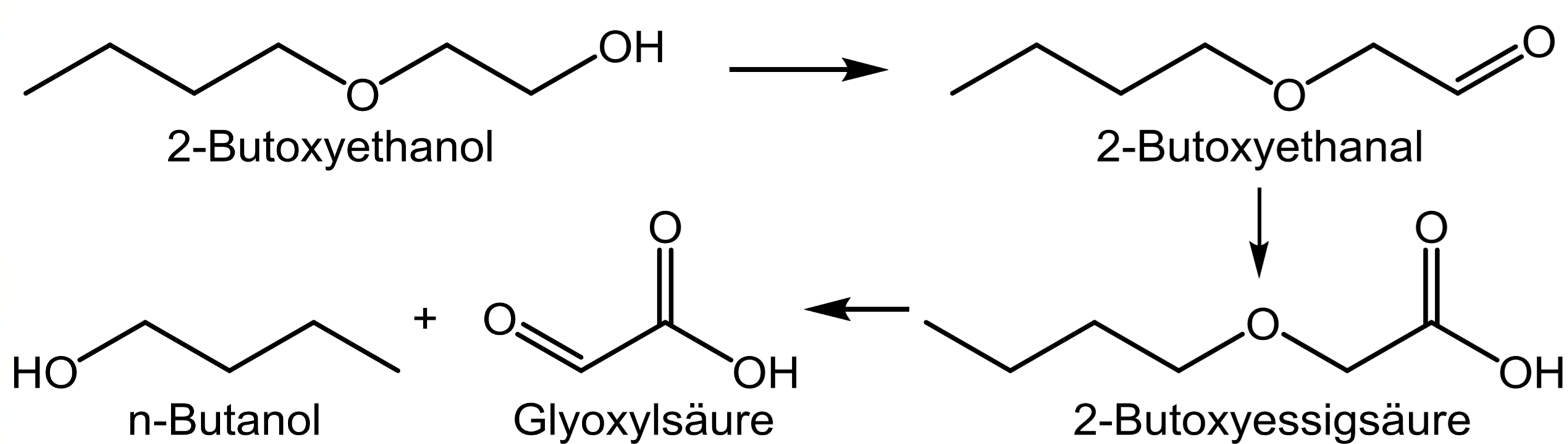


Abb. 2: Abbauweg von 2-Butoxyethanol in BOE100

Enzymaktivität

Im Rohextrakt einer BET-induzierten Kultur wurde die NAD-Abhängigkeit der am Abbau beteiligten Alkoholdehydrogenasen (ADH) untersucht, indem nach Zugabe von

Substrat und NAD die Zunahme von NADH photometrisch bei 340 nm bestimmt wurde (Abb. 3). Dabei wurde deutlich, dass die ADH, die BET oxidiert, nicht NAD-abhängig ist, diejenige, die ButOH oxidiert, hingegen schon. Es handelt sich also um zwei unterschiedliche ADHs.

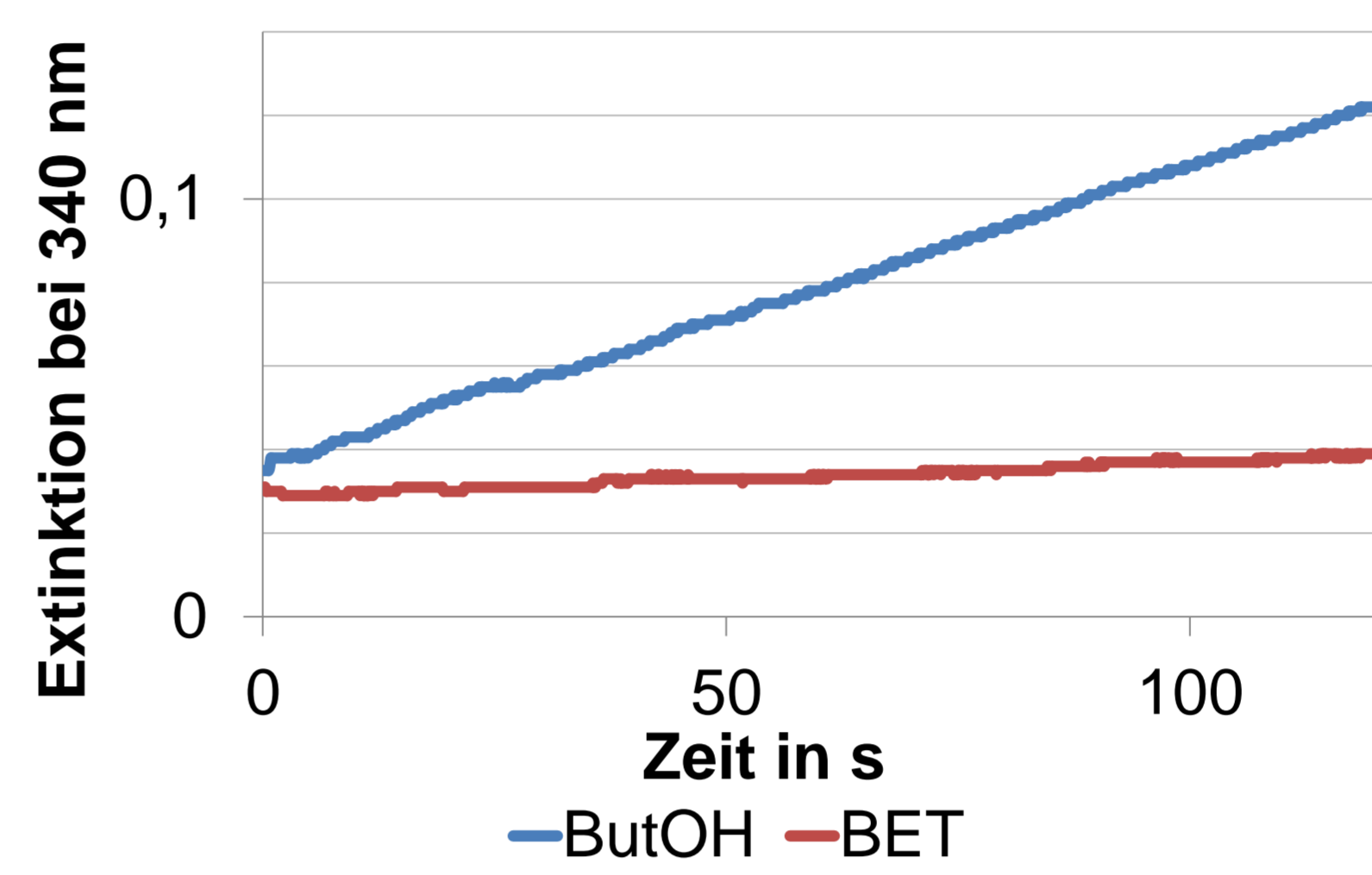


Abb. 3: NADH-Zunahme im Rohextrakt bei Zugabe von ButOH bzw. BET. BET-induzierte Zellen zeigen eine NAD-Abhängigkeit der Oxidation von ButOH, nicht aber von BET.

Transposonmutagenese

Die am Abbau von BET beteiligten Enzyme sollten mittels Transposonmutagenese ermittelt werden. Der Donorstamm *E. coli* S17-1 mit dem Plasmid pCro2a (Onaca et al., 2007) wurde verwendet. Es konnten Mutanten gewonnen werden, die BES weiterhin abbauen konnten, BET hingegen nicht mehr.

Betroffene Gene wurden kloniert und sequenziert. Dabei konnten drei Gencluster identifiziert werden: eine ADH und deren Coenzyme Cytochrom c und PQQ (Abb 4). Diese ADH wurde beim Abbau von Phenylethanol (PE) beschrieben (Arias et al., 2007) und ist daher nicht spezifisch für BET.

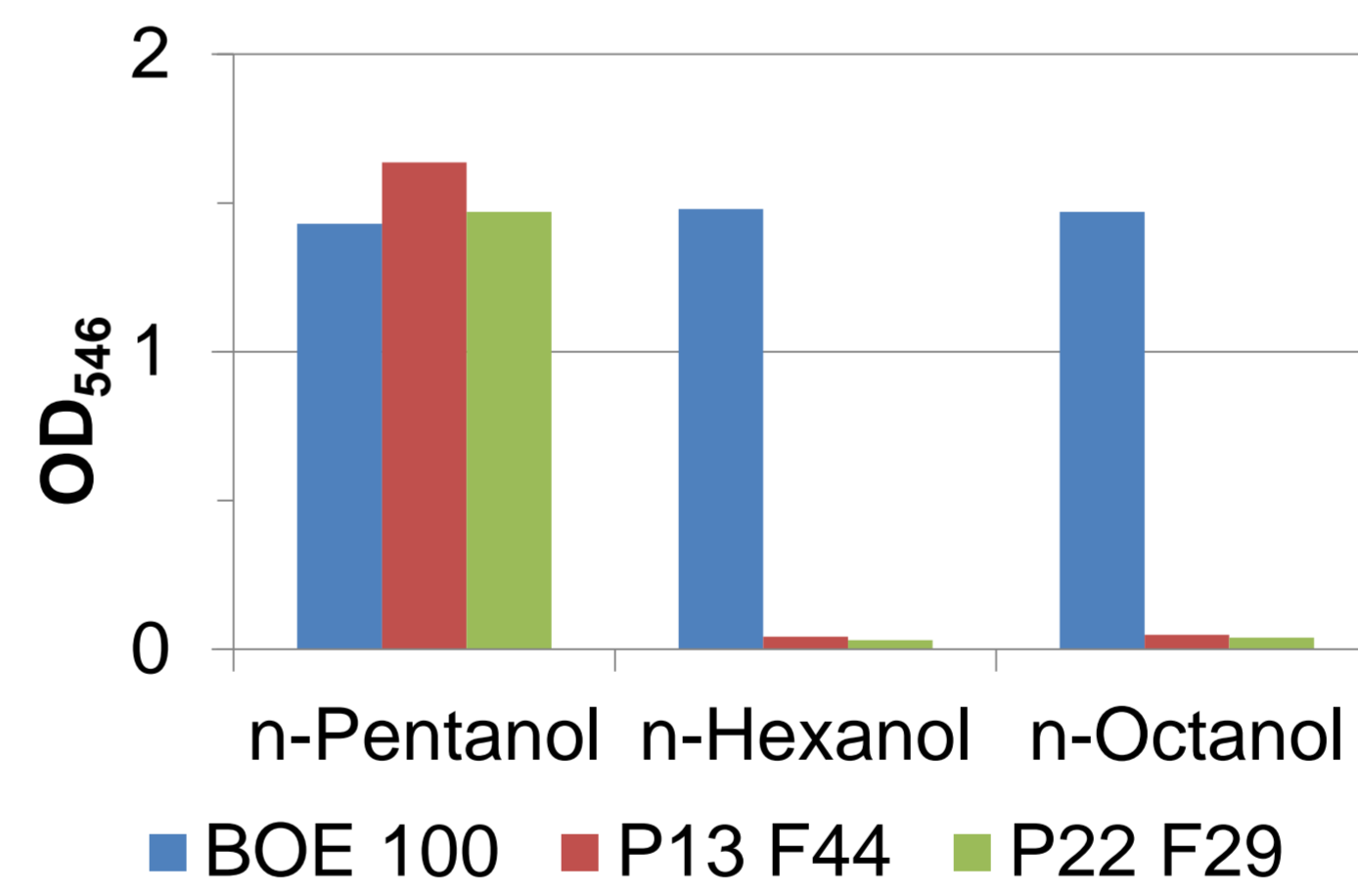


Abb. 5: Substratpattern WT sowie Mutanten P13 F44 und P22 F29. BOE100 und 2 Mutanten wurden bezüglich ihres Wachstums auf diversen Alkoholen untersucht. Nach einer Woche wurde die OD₅₄₆ bestimmt.

Die Mutanten P13 F44 und P22 F29 sowie der Wildtyp (WT) wurden hinsichtlich ihres Wachstums auf n-Pentanol, n-Hexanol und Octanol untersucht. Es stellte sich heraus, dass besagte PQQ-abhängige ADH neben BET auch Hexanol und Octanol oxidiert. Pentanol hingegen wird von einer anderen ADH oxidiert (Abb. 5).

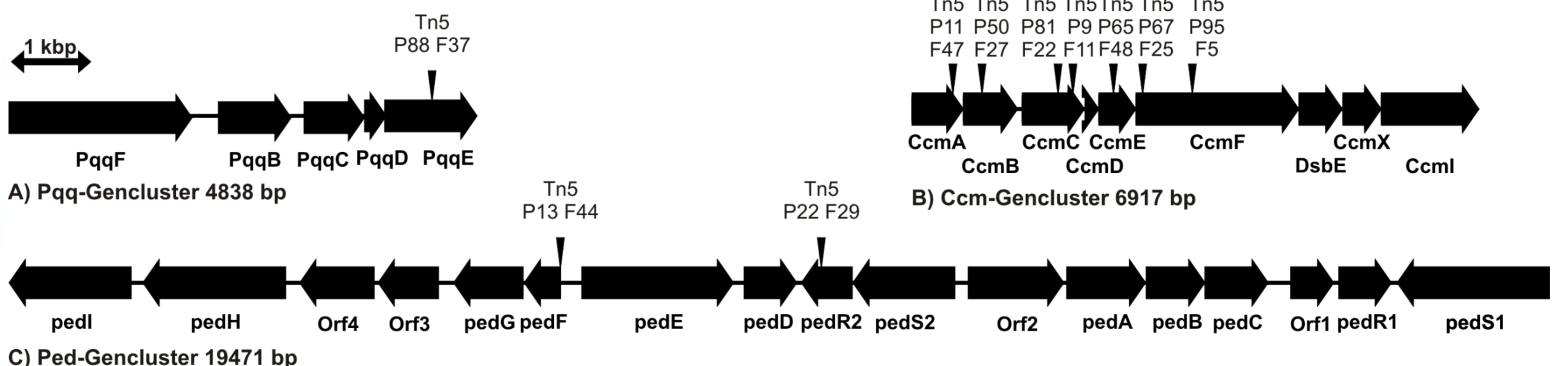


Abb. 4: Gencluster der Alkoholdehydrogenase und deren Coenzyme PQQ und Cytochrom c, die durch Transposonmutagenese inaktiviert wurden. Die Dreiecke zeigen die Insertionsstellen der Tn5s an, darüber steht der Name der jeweiligen Mutante. Die Bezeichnungen der Gene sind analog zu Arias et al. (2007). A) PQQ-Synthase B) Cytochrom c (Ccm) C) Gencluster der Alkoholdehydrogenase (ped steht für Phenylethanoldehydrogenase)

Kontakt: Prof. Dr. K.-H. Engesser, ISWA, Abt. Biologische Abluftreinigung, Bandtälle 2, D-70569 Stuttgart, Email: karl-h.engesser@iswa.uni-stuttgart.de, http://www.iswa.uni-stuttgart.de/alr, Tel: +49(0)711-685-63734

