

Der mikrobielle Abbau von Chloraromaten als Bestandteil des globalen Chlorzyklus

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I/Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dr. rer. nat. Ute Lechner
geb. am 23. 11. 1953 in Roßlau/Elbe

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. W. Reineke
3. Prof. Dr. M. Schlömann

Halle (Saale), 14. Juni 2007

urn:nbn:de:gbv:3-000012238

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012238>]

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
Vorwort	2
1 Chloraromaten – anthropogene und natürliche Bildung und ihr Schicksal in der Umwelt	2
1.1 Chlorphenole und Dioxine – chemisch-physikalische und toxikologische Eigenschaften	3
1.2 Der globale Kreislauf der Halogene	6
1.3 Abiotische natürliche Bildung von Organohalogenen	7
1.4 Biosynthese von Organohalogenen	8
1.5 Halogenierte Phenole und Dioxine – natürliche Quellen	10
1.5.1 Chlorphenole	10
1.5.2 Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine und –furane	10
1.6 Anthropogene Quellen von ausgewählten Chloraromaten	11
1.6.1 Chlorphenole	12
1.6.2 PCDD/F	13
1.7 Aufklärung einer Dioxinquelle im Raum Bitterfeld	14
1.8 Übersicht über den mikrobiellen Abbau von Halogenorganika	19
1.8.1 Dehalogenierung und Abbau unter verschiedenen Umweltbedingungen	20
2 Aerober Abbau von Chlorphenolen	23
2.1 Abbau von Chlorphenolen durch <i>Defluviobacter lusatiensis</i> Stamm S1	25
2.1.1 Isolierung und taxonomische Beschreibung von 4C2MP- und 2,4-DCP-abbauenden Bakterien	25
2.1.2 Untersuchungen zum Abbauweg von 2,4-DCP und 4C2MP durch <i>D. lusatiensis</i> Stamm S1 ^T	27
2.1.2.1 Die initiale 2,4-Dichlorphenolhydroxylase	28
2.1.2.2 Molekularbiologische Untersuchung von Genen des modifizierten ortho-Weges	31
3 Reduktive Dehalogenierung von chlorierten aromatischen Verbindungen	34
3.1 Aspekte der Anreicherung von Chlorphenol-dechlorierenden Bakterien	38
3.2 Vielseitigkeit der Gattung <i>Desulfitobacterium</i>	40
3.3 <i>Sedimentibacter</i> – ein häufiger Begleiter in reduktiv dechlorierenden Mischkulturen	43

3.4 Reduktive Dehalogenierung von polychlorierten Dioxinen und die Rolle von <i>Dehalococcoides</i>	45
3.4.1 Dioxindechlorierende Anreicherungskulturen und Regiospezifität der reduktiven Dechlorierung	46
3.4.2 Mikrobielle Zusammensetzung von dioxindechlorierenden Mischkulturen	50
3.4.3 Reduktive Dechlorierung von Dioxinen durch <i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm CBDB1	51
3.4.4 Ausblick	53
4 Literaturverzeichnis	55
5 Danksagung	68
6 Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten der Verfasserin zum Thema der Habilschrift	69
7 Lebenslauf	70
8 Eidesstattliche Erklärung	71

Abkürzungsverzeichnis

AOX	absorbierbares organisch gebundenes Halogen
ARDRA	<i>amplified ribosomal DNA restriction analysis</i>
CCDO	Chlorcatechol-1,2-dioxygenase
4C2MP	4-Chlor-2-methylphenol
3Cl-4OHPA	3-Chlor-4-hydroxyphenylelessigsäure
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DCP	Dichlorphenol
2,4-DCPH	2,4-Dichlorphenolhydroxylase
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis(<i>p</i> -chlorphenyl)ethan
d.w.	<i>dry weight</i>
HCB	Hexachlorbenzen
HCH	Hexachlorcyclohexan
MCP	Monochlorphenol
MCPA	4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure
nt	Nukleotide
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCDD/F	polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine und Dibenzofurane
PCE	Tetrachlorethen
PCP	Pentachlorphenol
POP	<i>persistent organic pollutants</i>
TCP	Trichlorphenol
TeCP	Tetrachlorphenol
TEQ	Toxizitätsäquivalente
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure

Abkürzungen von Gattungsnamen

<i>A.</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Ds.</i>	<i>Desulfitobacterium</i>
<i>B.</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>N.</i>	<i>Nocardioides</i>
<i>C.</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>O.</i>	<i>Ochrobactrum</i>
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>	<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>D.</i>	<i>DeFluvibacter</i>	<i>S.</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Df.</i>	<i>Delftia</i>	<i>Se.</i>	<i>Sedimentibacter</i>
<i>Dh.</i>	<i>Dehalococcoides</i>	<i>Sf.</i>	<i>Sulfurospirillum</i>
<i>Dm.</i>	<i>Desulfomonile</i>		

Abkürzungen von polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen/-furanen

DiCDD/F	Dichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
HeCDD/F	Heptachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
HxCDD/F	Hexachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
MCDD/F	Monochlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
PeCDD/F	Pentachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
TrCDD/F	Trichlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
TeCDD/F	Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan
OCDD/F	Octachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin/furan

Vorwort

Der mikrobielle Abbau von Chlororganika hat sich in der Evolution herausgebildet als Reaktion auf die natürlich entstandene Vielfalt chlororganischer Verbindungen, deren Verwertung einen Vorteil in der Konkurrenz um Kohlenstoff- oder Energiequellen bot. Er reflektiert das Prinzip der „mikrobiellen Unfehlbarkeit“ (Alexander 1965), nach der jeder natürlich gebildete Stoff mikrobiell abbaubar ist. Entsprechend werden auch strukturidentische oder -analoge Verbindungen anthropogener Herkunft umgesetzt. Das Wirken dieses Prinzips ist jedoch von der lokalen Existenz geeigneter Mikroorganismen, zulänglichen Milieubedingungen, der Verfügbarkeit und der chemischen Struktur der Verbindungen abhängig, so dass einige Verbindungen auf Grund ihres langsamen Umsatzes als persistent erscheinen. Diese Arbeit befasst sich mit den Bedingungen und Möglichkeiten des bakteriellen Abbaus von Chloraromaten an Hand von zwei ausgewählten Prozessen: dem Abbau von Chlorphenolen durch aerobe Bakterien und der reduktiven Dehalogenierung von Chlorphenolen und polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxinen durch anaerobe Bakterien. Der Beitrag anthropogener Aktivitäten zur Kontamination der Umwelt mit Chloraromaten und die daraus resultierende Problematik wird an einem regionalen Beispiel dargestellt. Die Habilitationsschrift gründet sich auf 11 bereits veröffentlichte Publikationen (Kapitel 6; mit römischen Ziffern wird im Text auf die entsprechenden Abschnitte verwiesen) und bezieht zur Abrundung einige bisher nicht veröffentlichte Daten ein.

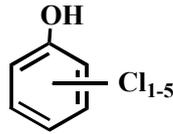
1 Chloraromaten – anthropogene und natürliche Bildung und ihr Schicksal in der Umwelt

Chloraromaten sind in ihrer Funktion z.B. als Pestizide oder als Vorstufen für die Synthese einer Vielzahl von Chemikalien zweifellos von großer Bedeutung für die moderne menschliche Gesellschaft. Im Laufe der letzten ca. vierzig Jahre wurden jedoch die Folgen einer unkritischen Herstellung und Freisetzung sichtbar. Die Persistenz der Verbindungen in der Umwelt, ihre Tendenz zur Bioakkumulation, Toxizität und die Bildung von toxischen Nebenprodukten bei Herstellung oder Abbau führten zur Beeinträchtigung der Biosphäre einschließlich des Menschen. Im Ergebnis wurde weltweit die Produktion und Verbreitung einiger dieser Substanzen wie z.B. Pentachlorphenol (PCP) oder polychlorierte Biphenyle (PCB) nahezu vollständig eingestellt. Andere wie z.B. Hexachlorbenzen (HCB) und polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und -furane (PCDD/F) wurden als *Persistent organic pollutants* (POP) eingestuft und ihr Vorkommen sowie mögliche Entstehungs- und

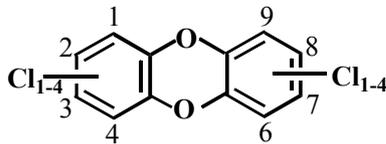
Verbreitungswege unter internationale Kontrolle gestellt (Stockholm Convention 2001). Diese und andere Maßnahmen haben zu einer starken Einschränkung des Eintrags von Chloraromaten in die Umwelt geführt. Das darf jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass aus der Epoche der rasanten Entwicklung der Chlorchemie im vorigen Jahrhundert noch eine Vielzahl von *Hot Spots* mit sehr hohen Konzentrationen an Chloraromaten in der Umwelt existieren, die heute als Quelle für neue Kontaminationen dienen. Aktuelle Berichte von Chemieunfällen mit Freisetzungsfolgen (oft in Ländern mit hohen wirtschaftlichen Wachstumsraten wie z.B. China) zeigen die unveränderte Bedeutung von Bemühungen um die Durchsetzung von Sicherheitsstandards in der chemischen Industrie und eines weltweiten Konzeptes zur Nachhaltigkeit (Stringer & Johnston 2002).

1.1 Chlorphenole und Dioxine – chemisch-physikalische und toxikologische Eigenschaften

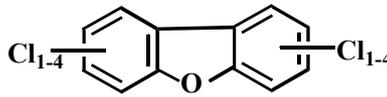
Die Strukturen der im Mittelpunkt der Arbeit stehenden Substanzklassen sowie die Zahl der jeweils möglichen Einzelverbindungen aufgrund von Anzahl und Position der Chlorsubstituenten sind in Abb. 1 dargestellt. Unter dem Sammelbegriff Dioxine fasst man nicht nur chlorierte, sondern auch bromierte und gemischt halogenierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane zusammen, deren mögliche Gesamtzahl 1700 bzw. 3320 beträgt. Die Schwefelanaloga der PCDF und PCDD werden als polychlorierte Dibenzothiophene (PCDT) (Abb. 1) bzw. Thianthrene bezeichnet. Die Einzelverbindungen der Dioxine werden Kongenere genannt. Eine Homologengruppe umfasst Kongenere mit gleicher Anzahl Chlorsubstituenten (= Isomere). Beim Vergleich komplexer Dioxinmuster in Umweltproben bezeichnet der Begriff Homologenprofil die Halogen-Homologenverteilung aller Halogenierungsgrade, der Begriff Isomerenmuster die isomerenspezifische Verteilung der Kongenere aller Halogenierungsgrade (Ballschmiter & Bacher 1996). Obwohl die Zählung der Kohlenstoffatome eines PCDD/F-Kongeners nach IUPAC-Nomenklatur am rechten Phenylring beginnt, hat sich für die Darstellung von mikrobiellen Abbauprozessen die spiegelbildliche Darstellung mit dem Beginn der Nummerierung der Kohlenstoffatome am linken Phenylring eingebürgert (z.B. Wittich 1998) und wird hier entsprechend angewandt (Abb. 1).



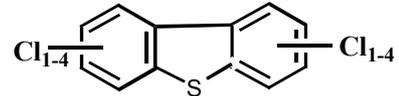
Chlorphenole
19 Verbindungen



Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine
(PCDD)
75 Kongenere



Polychlorierte Dibenzofurane
(PCDF)
135 Kongenere



Polychlorierte Dibenzothiophene
(PCDT)
135 Kongenere

Abb. 1: Strukturen von chlorierten Phenolen, Dibenzo-*p*-dioxinen, Dibenzofuranen und Dibenzothiophenen und Anzahl der Einzelverbindungen in Abhängigkeit von Position und Anzahl der Chloratome.

In die Umwelt gelangte Chloraromaten verteilen sich in die Kompartimente Wasser, Boden, Luft und Biosphäre entsprechend ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften (Tab. 1). Letztere bestimmen ebenfalls ihre Bioverfügbarkeit und das Spektrum der möglichen Abbaureaktionen. Wasserlöslichkeit und Dampfdruck nehmen innerhalb einer Substanzklasse mit der Zahl der Chlorsubstituenten ab, d.h. damit steigt die Tendenz ihrer Bindung an Boden- oder Sedimentpartikel und des Verbleibens am Eintragungsort. Die Henry-Konstante als Maß für die Verteilung zwischen Gas- und Wasserphase zeigt, dass die Tendenz zum Austrag in die Luft für Chlorphenole geringer als für niedrig chlorierte Dioxine ist, eine Tatsache, die Auswirkungen auf die Wiederfindungsraten letzterer Stoffe in mikrobiologischen und analytischen Experimenten hat (Bunge et al. 2003; XI). Der hohe Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{OW}) der Dioxine unterstreicht deren Tendenz zur Sorption an organische Phasen in Boden oder Sediment. Die mono- bis trichlorierten Phenole sind vergleichsweise gut wasserlöslich. Ihr hoher pKa-Wert (7-9; Suntio et al. 1988) führt jedoch dazu, dass sie im neutralen Bereich teilweise oder ganz protoniert und daher lipophil sind, so dass sie in Membranen integrieren und „entkoppelnd“ wirken (z.B. Heipieper et al. 1991, Nicholas & Ordal 1978). Die Summe der Eigenschaften führt sowohl für Chlorphenole als auch PCDD/F zu einer starken Tendenz zur Bioakkumulation und zu hohen Halbwertszeiten in der Umwelt (Tab. 1).

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften ausgewählter Chlorphenole (Shiu et al. 1994) und Dioxine (Shiu et al. 1988).

Verbindung	Wasserlöslichkeit bei 25 °C (µM)	Dampfdruck bei 25 °C (Pa)	Henry-Konstante (Pa m ³ mol ⁻¹)	log K _{ow}	log BCF	Halbwertszeit (W: Wasser; B: Boden; S: Sediment)
<u>Chlorphenole:</u>						
4-Chlorphenol	211 000	20	0,095	2,4	1,1	2 d (W); 23 d (B); 71 d (S)
2,4-Dichlorphenol	28 000	12	0,435	3,2	1,4-1,6	2 d (W); 23 d (B); 71 d (S)
2,4,6-Trichlorphenol	2200	1,25	0,569	3,7	1,9-2,2	23 d (W); 71 d (B); 230 d (S)
Pentachlorphenol	53	0,00415	0,079	5,05	3-3,8	23 d (W); 71 d (B); 230 d (S)
<u>Dibenzo-<i>p</i>-dioxine:</u>						
2-MCDD	1,27	0,017	14,8	5	k.A.	k.A.
2,3-DiCDD	0,059	0,0004	6,6	5,6	k.A.	k.A.
1,2,4-TrCDD	0,026	0,0001	3,6 ^a – 3,8	6,4	k.A.	k.A.
1,2,3,4-TeCDD	0,002	0,000006	2 ^a – 3,8	6,6	k.A.	k.A.
2,3,7,8-TeCDD	0,0006	0,000005 – 0,0000001	1,6 – 10,3	6,8	2-5,7 ^b	10 a (B) ^b ; 9,9-98 a (S) ^b
OCDD	8,7 x 10 ⁻⁷	1,1 x 10 ⁻¹⁰	0,0004 – 0,87 x 10 ⁻⁶	8,2	3,4-7,1 ^b	> 10 a (B) ^b ; 0,02 – 143 a (S) ^b

^aSantl et al. (1994); ^bGeyer et al. (2000); K_{ow}: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient; BCF : Biokonzentrationsfaktor (hier bezogen auf das Frischgewicht); k.A.: keine Angaben verfügbar; MCDD, DiCDD, TrCDD, TeCDD, OCDD: Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Octachlordibenzo-*p*-dioxin.

Zusammen mit der Befähigung zur Bioakkumulation stellt die Toxizität aller untersuchten Verbindungen ein hohes Gefährdungspotential dar. Für Chlorphenole werden Reizungen und Schädigungen von Haut und inneren Organen im Zusammenhang mit direktem Kontakt und höheren Konzentrationen berichtet, wobei 2,4,6-Trichlorphenol (TCP) und PCP als voraussichtlich kanzerogen für den Menschen gelten (Anonym 2002). Die akute Toxizität der PCDD/F äußert sich in Hautekzemen (Chlorakne). In der Folge von Expositionen z.B. durch Chemieunfälle wurden erhöhte Mortalität durch Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen und erhöhte Zahl von Krebserkrankungen festgestellt (Bertazzi et al. 1998). Die höchste Toxizität besitzen die lateral, d.h. an den Positionen 2, 3, 7 und 8 chlosubstituierten Kongenere. Das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TeCDD) gilt als die toxischste jemals synthetisierte Verbindung mit einem akuten oralen LD₅₀-Wert von ca. 1 µg kg⁻¹ (Meerschweinchen) (Dauderer 1990). Dieses Substitutionsmuster führt zu einer planaren Ausrichtung der Moleküle, wodurch sie als Liganden für den cytosolischen *aryl hydrocarbon* (Ah)-Rezeptor fungieren, der, im Komplex mit dem Kern-Translokationsprotein Arnt, an sogenannte *xenobiotic response elements* in der DNA bindet und die Expression einer Reihe von Genen induziert, z.B. solcher, die detoxifizierende Enzyme kodieren. Dieser Komplex kann auch an den Östrogenrezeptor binden, die Transkription östrogenabhängiger Gene auslösen und damit den Effekt von Östrogenen vortäuschen (Ohtake et al. 2003), was die beobachtete hormonelle Wirkung der PCDD/F in der Umwelt erklären könnte (Geyer et al.

2000). Um das Risiko realer Dioxinkontaminationen einschätzen zu können, werden die gemessenen Konzentrationen der Einzelkongenere entsprechend ihrer akuten Toxizität mit Äquivalenzfaktoren multipliziert. Die Summe wird in ng Toxizitätsäquivalente (TEQ) (kg Trockengewicht [d.w.]⁻¹) angegeben. Dabei werden den Kongeneren nach einem internationalen Äquivalenzsystem (NATO) folgende Faktoren zugeordnet: 2,3,7,8-TeCDD: 1; 1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin (PeCDD): 0,5, den anderen 2,3,7,8-substituierten Dioxinen mit sechs bzw. sieben Chloratomen: 0,1 bzw. 0,01; Octachlordibenzo-*p*-dioxin (OCDD): 0,001. Den nicht-2,3,7,8-chlorierten Kongeneren wird kein oder ein Äquivalenzwert von 0,001 zugeordnet (Fiedler & Hutzinger 1991).

1.2 Der globale Kreislauf der Halogene

Die Halogene sind am Aufbau der Lithosphäre mit 0,08 % Fluor, 0,031 % Chlor, 0,00016 % Brom und 0,00003 % Jod beteiligt. In Folge ihrer Reaktionsfähigkeit treten sie meist in Verbindungen auf, wobei Chloride wie z.B. Steinsalz (NaCl), Sylvin (KCl) oder Carnallit (KCl · MgCl₂ · 6 H₂O) zu den wichtigsten Vorkommen zählen. Im Meerwasser ist der Anteil von NaCl an allen Salzen mit ca. 2,7 % am höchsten. Durch Windbewegung von der Ozeanoberfläche freigesetzte Aerosole befördern jährlich ca. 2 · 10⁹ t Chlorid in die Atmosphäre, die über Niederschläge zum größten Teil wieder rezirkuliert werden, aber ein gewisser Teil wird in der Atmosphäre auch zu anderen anorganischen Chlorspezies wie Salzsäure, molekularem Chlor (Cl₂), unterchloriger Säure (HOCl) und infolge von Reaktionen mit Hydroxylradikalen auch zu atomarem Chlor umgesetzt (Keene 1999). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde immer deutlicher, dass neben den anorganischen eine Vielzahl von natürlichen organischen Halogenverbindungen existiert (Neidleman & Geigert 1986). Die Zahl der bekannten Halogenverbindungen stieg zwischen 1998 und 2002 von 2900 (Gribble 1998) auf 3800, davon 2200 Chlororganika (Gribble 2003). Da es zumindest in naturbelassenen Regionen der Erde nicht zu einer Akkumulation halogener organischer Verbindungen kommt, muß ein Gleichgewicht mit entsprechenden Abbauprozessen bestehen. In Analogie zu den Kreisläufen anderer Elemente wie z.B. Kohlenstoff oder Stickstoff, in denen Mikroorganismen eine wesentliche Rolle bei der Bildung und Rezirkulierung des organischen Materials spielen, kann man also von der Existenz eines globalen Chlorzyklus ausgehen, dessen Pole anorganisches und organisch gebundenes Chlor (Cl_{org}) bilden (Abb. 2).

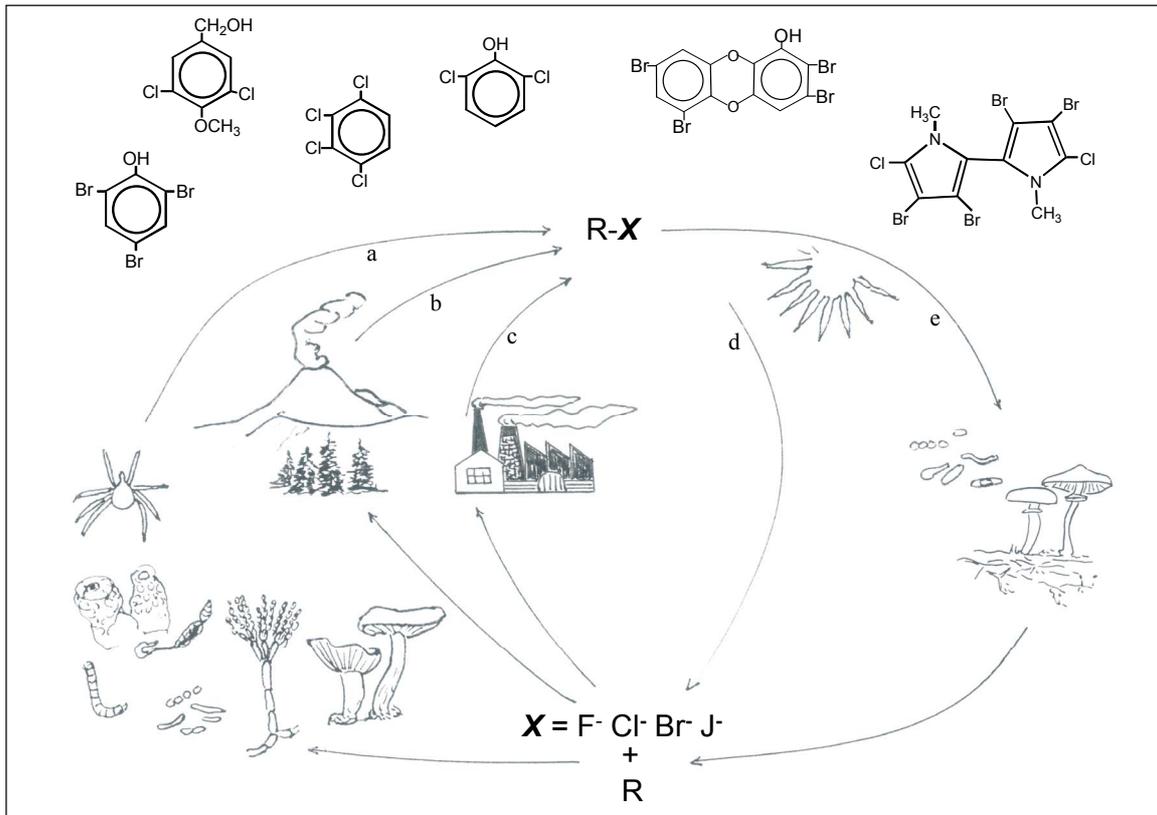


Abb. 2: Globaler Halogenzyklus mit (a) biogenen, (b) geogenen und (c) anthropogenen Bildungsreaktionen und (d) chemisch-physikalischen (z.B. Photolyse) und (e) biologischen Abbauprozessen (adaptiert nach Häggblom & Bossert 2003).

1.3 Abiotische natürliche Bildung von Organohalogenen

Organohalogene werden in verschiedenen abiotischen Prozessen gebildet. So reagiert z.B. durch Photolyse entstandenes atomares Chlor in der Atmosphäre mit flüchtigen organischen Verbindungen wie kurzkettigen Alkanen, Dimethylsulfid oder Isopren unter Bildung von chlororganischen Verbindungen (Nordmeyer et al. 1997). Jährlich werden global ca. $3,5-5 \cdot 10^6$ t CH_3Cl (Ballschmiter 2003) in die Atmosphäre freigesetzt. Dafür sind u.a. Alkylierungen von Halogenidionen durch chemische Oxidation organischen Materials in Gegenwart von Fe (III) in Waldböden und Torfmooren verantwortlich. *In vitro* wurden Guajakol (eine häufige monomere Komponente in Humus), Eisenferrihydrit und Chloridionen entsprechend zu *o*-Chinon, Fe (II) und CH_3Cl umgesetzt (Keppler et al. 2000). Auch in geothermischen Prozessen werden Halogenorganika gebildet. In Gasproben von Fumarolen und Lava wurden fünf fluorierte, 100 chlorierte, 25 bromierte und vier jodierte Verbindungen identifiziert,

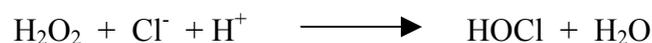
darunter chlorierte Benzene, Chlortoluen und Heterozyklen wie Chlorselenophen (Jordan et al. 2000). Bei der Verbrennung von pflanzlichem Material beispielsweise in Waldbränden oder Buschfeuern entstehen ebenfalls halogenierte Verbindungen wie z.B. Dioxine (Gribble 1998).

1.4 Biosynthese von Organohalogenen

Eine beeindruckende Vielfalt halogener Verbindungen wird von Lebewesen gebildet. Die Mehrzahl der in den letzten 30 Jahren entdeckten Verbindungen stammt von Meeresorganismen, aber viele wurden auch in Bakterien, terrestrischen Pflanzen, Pilzen, Flechten, Insekten, Tieren und auch dem Menschen gefunden (Gribble 2003). Obwohl Fluor das häufigste Halogen auf der Erde ist, gibt es wahrscheinlich aufgrund der geringen Löslichkeit von Fluoriden nur wenige natürliche Organofluorverbindungen, darunter z.B. Fluoracetat, das in *Streptomyces cattleya* durch eine Fluorinase aus S-Adenosylmethionin gebildet wird (O'Hagan et al. 2002). Im Meer überwiegt die Biosynthese von bromierten Verbindungen (Gribble 1999), während terrestrische Organismen vorzugsweise chlorierte Verbindungen zu produzieren scheinen (Gribble 2003). Die Bildung von Organohalogenen kann im Detail sicher unterschiedliche und spezifische Wirkungen hervorrufen (siehe unten), eine generelle Schutzfunktion gegen Bakterienbewuchs und Fraßfeinde kann jedoch angenommen werden.

Trotz der überwältigenden Zahl halogener biogener Verbindungen sind nur wenige enzymatische Mechanismen für ihre Synthese bekannt (van Pee & Unversucht 2003).

Haloperoxidasen benötigen H_2O_2 und Halid-Ionen (Cl^- , Br^- , I^-) für die Katalyse und besitzen Protoporphyrin IX als Co-Faktor (Neidleman & Geigert 1986). Bei der enzymatischen Reaktion wird die entsprechende hypohalogenige Säure als halogenierendes Agens gebildet:



Vom HOCl-Addukt am Eisen (III) protoporphyrin IX wird Cl^+ auf das Substrat in der distalen Tasche der Chlorperoxidase übertragen (Sundaramoorthy et al. 1998, Wagenknecht & Woggon 1997). Haloperoxidasen wurden aus Pilzen, marinen Rot-, Braun- und Grünalgen, marinen Würmern und Säugern isoliert (Neidleman & Geigert 1986). Die phagozytäre Myeloperoxidase ist in die Ausbildung von Artherosklerose involviert, indem sie Tyrosinreste des *High density lipoprotein* (HDL) in der Arterienwand chloriert (Bergt et al. 2004). Die ersten bakteriellen Bromperoxidase wurden von *Streptomyces* und *Pseudomonas*

beschrieben (van Pee & Lingens 1985). Neben den Häm-Peroxidasen wurden auch Vanadium-haltige Peroxidasen charakterisiert (Messerschmidt et al. 1997).

Perhydrolasen besitzen keine Co-Faktoren, benötigen jedoch für ihre Aktivität auch H_2O_2 . Die katalytische Triade aus Serin-, Aspartat- und Histidin-Rest ermöglicht die Acylierung des Enzyms am Serin. In Gegenwart von H_2O_2 erfolgt die Perhydrolyse unter Bildung einer Persäure, die Halidionen zu der reaktiven hypohalogenigen Säure umsetzt (Hofmann et al. 1998).

Da die Halogenierungsreaktion der genannten Enzyme auf der chemischen Umsetzung mit hypohalogeniger Säure beruht, ist ihre Substratspezifität relativ gering. Es ist möglich, dass bei der Enzymreaktion in der natürlichen Umwelt gleichzeitig verschiedene halogenierte organische Verbindungen entstehen, die in ihrer Komplexität eine wichtige Funktion wie Schutz gegen Räuber oder Konkurrenten oder antibiotische Wirkung entfalten können. Die Chlorperoxidase des marinen Polychaeten *Notomastus lobatus* produziert z.B. in Gegenwart von Phenol und Bromid 2,4,6-Tribrom-, 2,4-Dibrom- und 4-Bromphenol (Yoon et al. 1994).

Erst seit 1995 sind Halogenasen mit einer hohen Substrat- und Regiospezifität bekannt (Dairi et al. 1995), die sogenannten $FADH_2$ -abhängigen Halogenasen (van Pee 2001). In die Synthese des gegen Pilze wirkenden Antibiotikums Pyrrolnitrin [3-Chlor-4-(2'-nitro-3'-chlorophenyl)pyrrol] sind z.B. zwei Halogenasen, PrnA und PrnC, involviert, die spezifisch je einen Chlorsubstituenten in Tryptophan einführen (Kirner et al. 1998). Homologe der entsprechenden Gene sind an der Synthese von Antibiotika wie Chloroeremomycin (Vancomycin-Gruppe) (van Wageningen et al. 1998), 7-Chlortetracyclin (Dairi et al. 1995), Chloramphenicol (Pirae et al. 2004) und Pentachloropseudilin (Wynands & van Pee 2004) beteiligt. Für die Reaktion ist eine (unspezifische) Reduktase erforderlich, die reduziertes FAD bereitstellt. Im postulierten Reaktionsmechanismus wird in Analogie zu Monooxygenase-Reaktionen ein Halogenase-Flavinhydroperoxid-Intermediat gebildet, das ein benachbartes Chloridion zu Hypochlorit oxidiert. Auf der Grundlage der Kristallstruktur von PrnA wurde die Ursache für die Spezifität dieser Chlorierungsreaktion klar. Das entstandene Hypochlorit wird durch einen Tunnel im aktiven Zentrum zum 10 \AA entfernten Substrat geleitet, das so im Enzym positioniert ist, dass das zu chlorierende C-Atom präsentiert wird (Dong et al. 2005).

1.5 Halogenierte Phenole und Dioxine – natürliche Quellen

1.5.1. Chlorphenole

Die gebildeten Mengen von halogenierten Phenolen erreichen lokal oft hohe Konzentrationen, wie z.B. im Meersediment oder im Waldboden (Tab. 2). Als mögliche Vorstufen für die Bildung von Chlorphenolen im Waldboden kommen chlorierte Anisylmetabolite (CAM) in Frage, die durch verschiedene Weißfäule-Pilze wie *Bjerkandera adusta* (Rauchporling), *Lepista nuda* (Violetter Rötel-Ritterling) und *Hypholoma fasciculare* (Grünblättriger Schwefelkopf) gebildet werden (de Jong & Field 1997). Zu den Hauptmetaboliten in Holz oder Waldstreu gehören neben Drosophilin A (Tab. 2) 3,5-Dichlor-*p*-anisylalkohol und der entsprechende Aldehyd [75 bis 205 mg (kg d.w.)⁻¹] (de Jong et al. 1994, Verhagen et al. 1998b) und 2,6-Dichloranisol (Hjelm et al. 1999), die unter anaeroben Bedingungen demethyliert und ggf. nach Oxidation des Alkoholrestes zu 2,6-Dichlorphenol decarboxyliert werden können (Verhagen et al. 1998a).

1.5.2 Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und -furane

Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/F) entstehen u. a. in Verbrennungsprozessen, bei Temperaturen von ca. 300 °C bis 700 °C, wenn Chlor in organischer oder anorganischer Form und kohlenstoffhaltiges Material vorhanden sind (Ballschmiter & Bacher 1996). Bei der Verbrennung von pflanzlicher Biomasse sind die entsprechenden Bedingungen gegeben, wie die Dioxingehalte in Asche aus der Verbrennung von Torf in schottischen Küstenregionen belegen (Meharg & Killham 2003). So ist anzunehmen, dass Waldbrände und Buschfeuer wesentlich zu den in abgelegenen Gebieten gemessenen Hintergrundkonzentrationen von PCDD/F beitragen und dass Dioxine zumindest seit der Besiedlung der Erde mit Landpflanzen vor ca. 400 Millionen Jahren natürlich gebildet wurden. Möglicherweise sind die Dioxingehalte in Kaolin und Ton auf weit zurückliegende (geo)thermische Prozesse zurückzuführen. Ferrario et al. (2000) ermittelten PCDD/F-Gehalte von über 1000 ng TEQ (kg d. w.)⁻¹ in kohlenstoffreichen Tonschichten, die vor ca. 40 Millionen Jahren abgelagert wurden. Sehr ähnliche Kongenerenprofile fanden sich in australischen Küstensedimenten (Gaus et al. 2001) und in deutschen Kaolinproben (Jobst &

Aldag 2000). Eine nicht unwesentliche natürliche Quelle von Dioxinen stellen Reaktionen von Peroxidasen mit Chlorphenolen dar (Öberg & Rappe 1992, Wittsiepe et al. 2000). Die Bildung von Dioxinen wurde sowohl bei der Kompostierung als auch in Belebtschlammanlagen beobachtet (Öberg et al. 1993), wobei wahrscheinlich Chlorphenole als Vorstufen dienten. Neben der natürlichen Bildung von Chlorphenolen wurde die *de novo*-Synthese von Dioxinen in Waldböden nachgewiesen (Hoekstra et al. 1999). Zwei tetrabromierte Dioxine, Spongiadioxin A und B, wurden in einem marinen Schwamm identifiziert (Utkina et al. 2001).

Tabelle 2: Natürliche Bildung halogener Phenole

Verbindung	Quelle	Mengen/Bemerkungen	Referenz
2,4-Dichlorphenol	<i>Penicillium</i> sp.	2 mg l ⁻¹ /in synthetischem Medium	1
2,6-Dibromphenol	<i>Saccoglossus kowalewskii</i>	2-250 µg cm ⁻³ /Schleimschicht und innere Höhlenwand im Sediment; Hemmung des aeroben Bakterienwachstums	2
	<i>Balanoglossus biminiensis</i> (Hemichordaten)	10-15 mg pro Tier/verantwortlich für „jodartigen“ Geruch	3
4-Bromphenol, 2,4-Dibromphenol, 2,4,6-Tribromphenol	<i>Notomastus lobatus</i> (Annelid)	376 µg (mg Protein) ⁻¹ /im Schwanz durch Chlorperoxidase gebildet.	4
2,6-Dibrom-4-chlorphenol 2,4-Dichlor-6-bromphenol 2,4/3,5-Dichlorphenol 2,6-Dibromphenol 2,4,6-Tribromphenol	<i>Ptychodera bahamensis</i> (Eichelwurm, Hemichordat)	0,5-1,3 t pro km Küstenlinie und Jahr	5
2,6-Dichlorphenol	<i>Amblyomma americana</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (verschiedene Zeckenarten)	2-3 ng pro Weibchen/ Sexpheromon	6, 7
2,5-Dichlorphenol	<i>Romalea microptera</i> (Heuschreckenart)	14 ppm im Sekret/ Repellent gegen Ameisen	8
4-Chlorphenol, 2,4/2,5-Dichlorphenol, 2,6-Dichlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol	Waldboden	Jeweils bis zu 45 µg (kg d.w.) ⁻¹ / <i>de novo</i> -Synthese nach Inkubation mit Na ³⁷ Cl nachgewiesen	9
2,4,6-Trichlorphenol	Unbekannt	Nachweis in bis zu 800 Jahre alten Seesedimenten	10
2,3,5,6-Tetrachlor-4-methoxyphenol (Drosophilin A)	<i>Psathyrella subatrata</i> <i>Bjerkandera adusta</i> <i>Peniophora pseudipini</i> <i>Phellinus fastiosus</i> (Weißfäule-Pilze)	3 mg l ⁻¹ 0,13-0,5 mg l ⁻¹ 0,5-1 mg l ⁻¹ 4-16 mg l ⁻¹ / in Kulturflüssigkeit nachgewiesen	11, 12

Referenzen: (1) Ando et al. 1970; (2) King 1986; (3) Ashworth & Cormier 1967; (4) Yoon et al. 1994; (5) Corgiat et al. 1993; (6) Berger 1972; (7) Chow et al. 1975; (8) Eisner et al. 1971; (9) Hoekstra et al. 1999; (10) Paasivirta et al. 1988; (11) Anchel 1952; (12) Teunissen et al. 1997.

1.6 Anthropogene Quellen von ausgewählten Chloraromaten

Zu den Bildungsreaktionen von Chlororganika im Rahmen des globalen Chlorzyklus leisten anthropogene Aktivitäten einen erheblichen Beitrag. Für halogenierte Aromaten konstatierten

das Europäische Schadstoffemissionsregister (<http://www.eper.cec.eu.int/eper/>) und Euro Chlor, eine Handelsassoziation führender europäischer Produzenten von Chlor (<http://www.eurochlor.org>), sinkende Emissionen von 1985 bis 2001. Beispielsweise wurden 1985 in Europa noch folgende geschätzte Mengen an Chlorbenzenen in Wasser und Luft emittiert: 0,84 t Hexachlorbenzen (HCB); 21 t (1995) Trichlorbenzen, 14 t 1,4-Dichlorbenzen, 160 t 1,2-Dichlorbenzen und 320 t Chlorbenzen. 2001 waren die meisten Emissionen um 86 bis 99 % reduziert. Die Abgabe von Monochlorphenolen und PCP vor allem in Gewässer betrug 1995 noch ca. 1,7 bzw. 300 t, während für 2001 keine relevanten Mengen mehr angegeben wurden. Die Freisetzung der als POP eingeschätzten Chlororganika HCB und PCDD/F war 2001 mit 98 bzw. 1 kg pro Jahr bereits relativ gering (<http://www.eper.cec.eu.int/eper/>).

1.6.1 Chlorphenole

Chlorphenole werden direkt in Formulierungen oder als Intermediate bei der Synthese von Pestiziden, Farbstoffen und Pharmazeutika eingesetzt und werden durch Chlorierung von Phenol oder durch alkalische Hydrolyse von entsprechenden Chlorbenzenen hergestellt. Mono-, Di- und Trichlorphenole werden für die Herstellung von Agrochemikalien genutzt (Stringer & Johnston 2002). Pentachlorphenol ist als Bestandteil von Holzschutzmitteln bekannt. Ein Gemisch aus 70-80 % 2,3,4,6-Tetrachlorphenol (2,3,4,6-TeCP) und 20-30 % 2,4,6-Trichlorphenol (2,4,6-TCP) plus Pentachlorphenol (PCP) ist unter dem Namen Ky-5 bekannt und wurde seit den 40er Jahren in Finnland produziert. Herstellungsbedingt enthielt das Produkt etwa 3 % Verunreinigungen in Form von PCDD/F, Diphenylethern und Phenoxyphenolen. Obwohl es seit 1988 verboten ist, sind heute noch im Sediment des südfinnischen Flusses Kymijoki unterhalb der Pestizidfabrik bis zu $1,6 \text{ mg (kg d.w.)}^{-1}$ Chlorphenole und $289 \text{ } \mu\text{g (kg d.w.)}^{-1}$ 2,3,7,8-PCDD/F nachweisbar (Lyytikäinen 2004). Die Weltproduktion von PCP betrug allein 1985 ca. 100 000 t (McAllister et al. 1996). Obwohl die Nutzung von PCP stark rückläufig ist, gibt es registrierungspflichtige Anwendungsausnahmen zur Konservierung bestimmter Hölzer und Textilien. 2,4,6-Trichlorphenol wurde neben seiner Verwendung als Holzschutzmittel hauptsächlich als Bestandteil von Pestizidformulierungen eingesetzt, so in Fungiziden, Insektiziden und Bakteriziden u.a. für die Konservierung von Leim, Textilien und Leder (Anonym 2002, Stringer & Johnston 2002).

1.6.2 PCDD/F

PCDD/F werden nur in kleinsten Mengen als Standards für die Umweltanalytik gezielt hergestellt. Die Synthese und Gewinnung von spezifischen Kongeneren kann z.B. durch Kondensation geeigneter *ortho*-Chlorphenole oder Alkalimetall-Phenolate bei etwa 300 °C, durch Umsatz von Catechol mit einem geeigneten chlorierten Benzen oder Chlornitrobenzen oder durch direkte Chlorierung von Dibenzo-*p*-dioxin erfolgen (Pohland & Yang 1972, eine Zusammenfassung siehe bei Ballschmiter & Bacher 1996).

Die anthropogene Freisetzung von PCDD/F beruht zu einem großen Teil auf Prozessen und Produkten der Halogenchemie und auf thermischen Prozessen (Ballschmiter & Bacher 1996). Während generell die Bildung von PCDD/F durch höhere Temperaturen (> 300 °C) gefördert wird, gibt es auch „kalte“ Bildungsprozesse. So entstehen bei der Herstellung von *ortho*-halogenierten Phenolen durch alkalische Hydrolyse von halogenierten Benzenen bei 140 bis 220 °C durch Kondensationsreaktionen beträchtliche Mengen an PCDD/F als Nebenprodukte. Die als Seveso-Unfall in die Geschichte eingegangene Explosion in der Chemiefabrik ICMESA in Norditalien ereignete sich durch Anstieg der Reaktortemperatur von 150 auf 250 °C und überhöhten Druck bei der alkalischen Hydrolyse von 1,2,3,4-Tetrachlorbenzen für die Herstellung von 2,4,5-Trichlorphenol. Zusammen mit etwa 2030 kg Trichlorphenolat (Ramondetta & Repossi 1998) wurden ca. 3 kg 2,3,7,8-TeCDD (Meharg & Osborn 1995) freigesetzt. Durch die Herstellung und Anwendung von Halogenphenolen wurden schätzungsweise bisher global 50 t PCDD/F emittiert. Durch den Einsatz von Chlorphenoxy-Herbiziden, insbesondere von 2,4-Dichlorphenoxy- (2,4-D) und 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T), wurden ca. 3 t PCDD/F freigesetzt (Ballschmiter & Bacher 1996). Etwa 75 Millionen Liter verschiedener Kombinationen von 2,4-D und 2,4,5-T, besonders „Agent Orange“ (je 50 % der *n*-Butylester von 2,4-D und 2,4,5-T), wurden als Entlaubungsmittel im Vietnamkrieg versprüht. Ausgehend von den gemessenen Konzentrationen in den eingesetzten Herbiziden wurde eine Emission von 221 bis 366 kg des hochgiftigen 2,3,7,8-TCDD aus der Flugdokumentation der Sprüh-Einsätze berechnet (Stellman et al. 2003). Die folgenden Verbindungen enthalten ebenfalls z.T. hohe Verunreinigungen mit PCDD/F: PCB, technische Chlorbenzene (vor allem HCB), Hexachlorcyclohexan (HCH), Tetrachlorbenzochinone (*o*- und *p*-Chloranil) und das über Jahrzehnte als Mottenpulver und als „Luftverbesserer“ eingesetzte 1,4-Dichlorbenzen (Liu et

al. 2004). Industrielle Chlorierungs- und Bleichprozesse, wie z.B. für die Herstellung von Sulfatzellstoff und Papier, führten durch Polymerisierung und Chlorierung aromatischer Grundkörper (z.B. *p*-Cumarylalkohol) ebenfalls zur Dioxinbildung und wurden inzwischen durch andere Bleichverfahren ersetzt (Ballschmiter & Bacher 1996).

PCDD/F entstanden auch bei elektrochemischen Verfahren wie der Chloralkali-Elektrolyse, wahrscheinlich bedingt durch den Einsatz von Grafit Elektroden und relativ hohe Temperaturen (Rappe 1994).

Bei thermischen Prozessen werden zwei prinzipielle Entstehungswege diskutiert, die Bildung aus im Brenngut vorhandenen Vorstufen wie Phenolen oder Biphenylen durch Kondensationsreaktionen unter dem Einfluß von Radikalen, und die *de novo*-Synthese, wobei vom Aufbau aromatischer Strukturen im Rahmen unvollständiger Verbrennungen organischen Materials ausgegangen wird (Ballschmiter & Bacher 1996). In beiden Fällen führen letztlich Halogenierungsreaktionen zu den relativ stabilen PCDD/F und entziehen diese weiteren flammenchemischen Umsätzen. Dioxine emittierende thermische Prozesse sind z.B. Müll- und Klärschlammverbrennung, Energie- und Wärmeerzeugung auf fossiler Brennstoffbasis, aber auch Brände, bei denen chlorhaltiges Material wie PVC oder PCB verbrennt (Fiedler & Hutzinger 1991). Das als anorganisches Salz vorhandene Chlor im Ausgangsmaterial wie z.B. Kohle und Hausmüll (1,3 bzw. 2,5 g kg⁻¹) ermöglicht die Halogenierungsreaktionen. Die aus Chlorid gebildete Salzsäure ist als primäres Verbrennungsprodukt anzusehen, aus dem über die Bildung von Cl₂ Halogenradikale, die eigentlichen Halogenierungsmittel, entstehen.

Thermische Reaktionen in metallurgischen Prozessen wie z.B. der Eisen- und Stahlverarbeitung, Kupfer-, Zink- und Bleiverhüttung sowie Aluminiumherstellung und -verarbeitung führen ebenfalls zur Bildung von PCDD/F (Rappe 1994, Yu et al. 2006). Eine bisher wenig reflektierte Quelle von PCDD/F ist die Herstellung von wasserfreiem Magnesiumchlorid (Oehme et al. 1989a, Oehme et al. 1989b).

Jede PCDD/F-produzierende Quelle erzeugt ein spezifisches Homologenprofil und Isomerenmuster (Ballschmiter & Bacher 1996, Rappe 1994). Durch die hohe Persistenz kann man deshalb noch lange nach einer Freisetzung die Herkunft der PCDD/F ermitteln.

1.7 Aufklärung einer Dioxinquelle im Raum Bitterfeld

Die Entwicklung der Region Bitterfeld-Wolfen zu einem Zentrum der Chemieindustrie wurde am Ende des 19. Jahrhunderts durch Ansiedlung der Elektrochemie begründet. Die

Standortwahl beruhte u.a. auf den reichlich in der Umgebung vorhandenen Braunkohlefeldern zur Stromgewinnung, den nahe gelegenen Kalilagerstätten und der günstigen Versorgung mit Brauchwasser und der Entsorgung des Abwassers durch die Mulde (Hackenholz 2004). Die Herstellung von Chlor durch Chloralkali-Elektrolyse war über fast ein Jahrhundert ein wichtiges Standbein der Bitterfelder Industrie und bildete die Grundlage für die Entwicklung einer bedeutenden Chlorchemie, die insbesondere durch die Entwicklung und Herstellung von Vinylchlorid und PVC, aber auch durch eine große Vielfalt von anderen chlorierten Produkten gekennzeichnet war (Bitterfelder Chronik 1993, Pistor 1958).

Ein weiterer Schwerpunkt in Bitterfeld bestand in der elektrochemischen Herstellung von Leichtmetallen und Legierungen und deren Weiterverarbeitung (Hackenholz 2004). Von herausragender Bedeutung waren die Herstellung von Aluminium und Magnesium. Bereits 1905 wurden sechs Öfen aufgestellt, mit denen aus Carnallit ($\text{KCl} \cdot \text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) als Elektrolyt durch Schmelzflusselektrolyse Magnesium gewonnen wurde. Um die Verwendung des bisher hauptsächlich als Reduktionsmittel in der Metallurgie und für pyrotechnische Zwecke genutzten Magnesiums zu erweitern, wurden Magnesiumlegierungen hergestellt. Unter dem Namen Elektron, das ca. 90 % Magnesium und als weitere Bestandteile vor allem Aluminium, Zink und Mangan enthielt, wurde 1909 ein Leichtbauwerkstoff patentiert, der auf der Pariser Weltausstellung 1937 den Grand Prix erhielt (Bitterfelder Chronik 1993, Hackenholz 2004). Bei Ausbruch des 1. Weltkrieges behauptete Deutschland mit dem Bitterfelder Standort bereits die Weltmarktführerschaft bei der Magnesiumherstellung. Das Werk in Bitterfeld profitierte von Aufträgen des Kriegsministeriums und verdreifachte seine Magnesiumkapazitäten auf 0,8 Tagestonnen. Das aus dem Carnallit entstehende Chlor wurde in einer Kalkmilchwäsche gebunden. Technologische Schwierigkeiten bereitete jedoch das aufschwimmende KCl, das sich bei der elektrolytischen Verarmung an Magnesium an der Oberfläche des Elektrolysebades absetzte und abgeschlagen werden mußte. Verbesserungen wurden durch den Zusatz von wasserfreiem MgCl_2 erzielt. Dieses Verfahren wurde bis 1928 betrieben (Büchen 1995). Ein entscheidender technologischer Fortschritt wurde 1927 bis 1930 erzielt und in einer Reihe von Patenten niedergelegt (siehe Beck 1939) und beruhte auf dem ausschließlichen Einsatz wasserfreien MgCl_2 in der Elektrolyse. Dies erlaubte die Erhöhung der jährlichen Magnesiumproduktion von ca. 1500 t 1927 auf bis ca. 4000 t in den Jahren 1940 bis 1945 (Bitterfelder Chronik 1993), besonders stimuliert durch den Magnesiumbedarf der Kriegswirtschaft für pyrotechnische Produktionen, Brandbomben und Leichtmetall-Legierungen beispielsweise für den Fahrzeug- und Flugzeugbau (Hackenholz 2004). Zur Erhöhung der Magnesiumproduktion wurden 1934/35 von der IG Farben neue Werke in Aken

an der Elbe und in Staßfurt errichtet, so dass 1943 alle drei Werke zusammen 27300 t Magnesium erzeugten (Wagner 1999). Die Grundlage dieses Verfahrens war eine neue Technologie für die Herstellung von wasserfreiem MgCl_2 , die auf der Umsetzung von Magnesiumoxid mit Kohlenstoff und Chlor in folgender exothermer Reaktion beruhte (Büchen 1995):



(bei höheren Temperaturen)

Um eine geeignete Porosität für das Durchströmen der verwendeten festen Magnesiumverbindungen Magnesit (MgCO_3) oder Dolomit ($\text{MgCO}_3 \cdot \text{CaCO}_3$) mit dem Reaktionsgas Chlor zu ermöglichen, mussten diese mit wasserhaltigem MgCl_2 und kohlenstoffhaltigem Material (Kohle, Teer, Sägemehl, Torf) brikettiert werden. Beides führte dazu, dass bei entsprechenden Temperaturen das entweichende Wasser bzw. Kohlenoxid Poren hinterließen (Staib 1927). Die Umsetzung erfolgte in so genannten Chlorierungsöfen mit einer Höhe von 6,1 m, einem Durchmesser von 4 m, innen 2,7 m (Abb. 3). Jeder Ofen produzierte 20 t MgCl_2 pro Tag, das in flüssiger Form am Boden abgezogen und den Elektrolysezellen zugeführt wurde. Das frei werdende Chlor wurde den Chlorierungsöfen wieder zugeführt (Büchen 1995, Moschel 1930). Ein typischer Ansatz im Oxidchloridverfahren bestand aus einer Mischung von $\text{MgO} + \text{MgCl}_2 + 30 \% \text{H}_2\text{O}$. Diesem wurden 6 % Braunkohle und 6 % Pech zugesetzt (Büchen 1995). Im Endausbau existierten in Bitterfeld fünf Chlorierer und 72 Elektrolysezellen (Bitterfelder Chronik 1993). Nach Kriegsende wurde die Magnesiumproduktion durch die Alliierten still gelegt. Über die Entsorgung der Abluft aus den Chlorierern gibt es kaum Berichte. Für die nach dem Krieg in Norwegen durch die Norsk Hydro aufgebaute, nach dem Bitterfelder Verfahren arbeitende Anlage wurde beschrieben, dass der Chlorüberschuß aus dem MgCl_2 -Prozeß und das elektrolytisch gebildete Chlor mit Meerwasser gewaschen und rezirkuliert wurden. Das Waschwasser wurde direkt in den benachbarten Fjord geleitet (Oehme et al. 1989a). Als eine Reaktion auf die dauernden Klagen der Bitterfelder Einwohner wurde 1921 in Bitterfeld das vermutlich erste Rauchgaslaboratorium der chemischen Industrie errichtet (Pistor 1958). Eine Chlorabsorptionsanlage, deren genaue Funktionsweise bisher nicht zu ermitteln war, wurde zur Vermeidung größerer Flurschäden errichtet (Hackenholz 2004). Zu vermuten ist, dass Waschwässer aus der Abgaswäsche zusammen mit anderen industriellen und kommunalen Abwässern im Raum Bitterfeld ohne Klärung in das Spittelwasser, einen acht km langen Nebenfluß der Mulde, geleitet wurden.

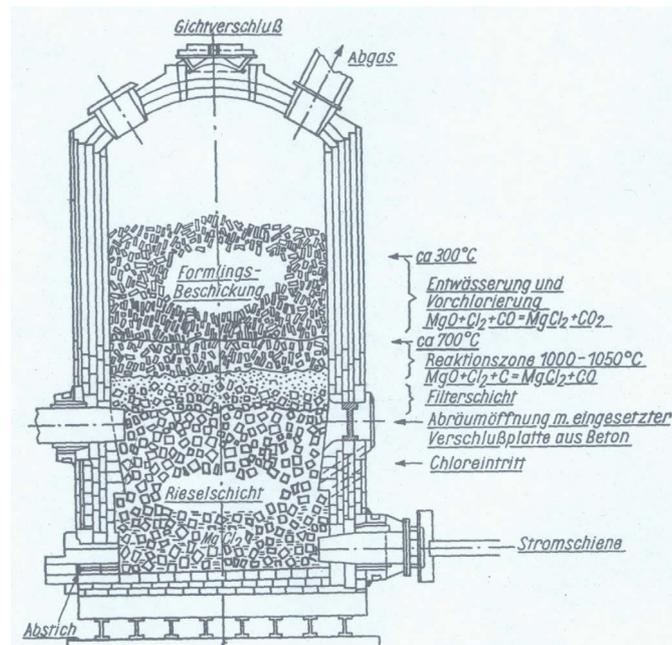


Abb. 3: Chlorierer zur Herstellung von wasserfreiem Magnesiumchlorid (aus Schichtel 1954).

Das Spittelwasser diente bis 1994 zur Aufnahme aller Abwässer aus der Industrieregion Bitterfeld-Wolfen. Erst dann wurde eine Gemeinschaftskläranlage in Betrieb genommen. Entsprechend stellte sich die Belastung von Sedimenten und Überflutungsflächen des Spittelwassers, der Mulde und der Elbe bei einer ersten, groß angelegten ökologischen Analyse dar (Modellhafte Machbarkeitsstudie 1993). In dem bis zu 2 m mächtigen, schwarzen Sediment des Spittelwassers waren neben Schwermetallen hohe Konzentrationen von chlororganischen Verbindungen nachweisbar, wie HCH und 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(p-chlorphenyl)ethan (DDT) (beides bis zu $10 \text{ mg (kg d.w.)}^{-1}$) (Wilken et al. 1994), polychlorierte Naphthalene (Brack et al. 2003), Pestizide (Brack et al. 1999), Chlorbenzene und eine Reihe weiterer Verbindungen (Bunge et al. 2006; I). Mit dem Nachweis von PCDD/F im Spittelwassersediment wurde die Hauptquelle für die Dioxinbelastung der Elbe erkannt (Götz et al. 1996, Götz et al. 1998, Götz & Lauer 2003). Das Spittelwassersediment, das auf eine Masse von ca. 20 000 t geschätzt wird (Bitterfeld/Spittelwasser Site. Case Study 2000), enthält Dioxinkonzentrationen zwischen 3000 und 120000 ng TEQ $(\text{kg d.w.})^{-1}$ (Götz et al. 1998, Bunge et al. 2001; IX). Hoch mit chlororganischen Verbindungen belastete Sedimentschichten waren durch eine verminderte Aktivität von hydrolytischen Enzymen gekennzeichnet, die Funktionen in den natürlichen C-, N-, S- und P-Kreisläufen besitzen (Bunge et al. 2006; I, Abb. 3). Das deutet darauf hin, dass anthropogen entstandene hohe

Chlororganika-Konzentrationen einen generell inhibierenden Einfluss auf Abbauprozesse besitzen und durch Toxizität und Komplexität zu ihrer eigenen Persistenz beitragen.

Obwohl als Quelle für die Dioxine eine Vielzahl von Prozessen von der Chloralkali-Elektrolyse, über die in Wolfen ansässige Zellstoffindustrie bis zur Pestizidherstellung in Frage kam, wurde bereits durch Götz et al. (1996) gezeigt, dass das im Spittelwassersediment identifizierte Homologenprofil dem im Sediment nahe der norwegischen Magnesiumfabrik (Norsk Hydro) nachgewiesenen (Oehme et al. 1989b) ähnelte. Das Vorherrschen von PCDF gegenüber PCDD (5-10 : 1) und die mit dem Chlorierungsgrad steigenden Konzentrationen der Kongenere sind auffällige Merkmale des „Spittelwasserprofils“ (Bunge et al. 2006; I, Abb. 1). Andere Prozesse in der metallverarbeitenden Industrie verursachen ebenfalls in der Regel höhere Anteile an PCDF gegenüber PCDD, jedoch dominieren zumeist penta- und nicht die höher chlorierten PCDF (Rappe 1994, Yu et al. 2006). Eine weitere Übereinstimmung mit dem „Magnesiummuster“ ist das Auftreten charakteristischer penta- und tetrachlorierter PCDF-Isomere (Oehme et al. 1989b), deren „Fingerprint“ sich deutlich von dem Dioxinmuster der Eisen- und Stahlindustrie unterscheidet (vgl. Bunge et al. 2006; I, Abb. 2 und Rappe 1994). Vermutlich werden auch polychlorierte Dibenzothiophene (PCDT), die S-Analoga von Dibenzofuranen (Abb. 1), durch den hohen Schwefelgehalt der verwendeten Kohle in diesem Prozess gebildet. Ihre Moleküle besitzen das gleiche Masse-Ladungs-Verhältnis wie die entsprechenden PCDD und eluieren nach den Dioxinen im Chromatogramm. Sie wurden in den ausgebaggerten Sedimenten der Elbe (Bille-Siedlung, Hamburg) identifiziert (Rappe 1994). Entsprechende Peaks fanden sich auch in den *selected ion monitoring* (SIM)-Analysen der TeCDD und PeCDD des Spittelwassersedimentes (Abb. 4). PCDT wurden meist als Indikatoren für Eisenerz- oder Stahlverarbeitung angesehen (Rappe 1994). In der Bitterfelder Geschichte (Bitterfelder Chronik 1993, Hackenholz 2004) gibt es jedoch keine Hinweise auf eine nennenswerte Eisenerz- oder Stahlverarbeitung, abgesehen von einer Pyrit-Rösterei, die jedoch aufgrund der geringen Chlorgehalte im Ausgangsmaterial kaum als Dioxinquelle in Frage kommt.

Der Magnesiumproduktionsprozess stellte ideale Bedingungen für die Neubildung von Dioxinen aber auch PCDT dar: neben reichlicher Chlorzufuhr und Temperaturen von 300 bis 1000°C lieferte das als Kohlenstoffquelle verwendete Material wie z.B. Braunkohle die Grundlage der genannten Biarylstrukturen. Auch die Datierung der am höchsten dioxinbelasteten Sedimente der Elbe in die vierziger bis fünfziger Jahre des vorigen Jahrhunderts (Götz & Lauer 2003) spricht für den Magnesiumprozess als Hauptquelle der Dioxinbelastung des Elbe-Fluss-Systems.

Nach dem Bitterfelder Verfahren wurde nicht nur an den drei IG-Farben-Standorten, sondern auch bei verschiedenen Lizenznehmern in Großbritannien, den USA und Frankreich Magnesium produziert (Büchen 1995). Die globale Source-Sink-Massenbilanz der Dioxine ist nicht geschlossen (Brzuy & Hites 1996). Neben noch unerkannten natürlichen Prozessen könnte die Magnesiumherstellung einen bisher unterschätzten Beitrag zur globalen Dioxinbelastung geleistet haben.

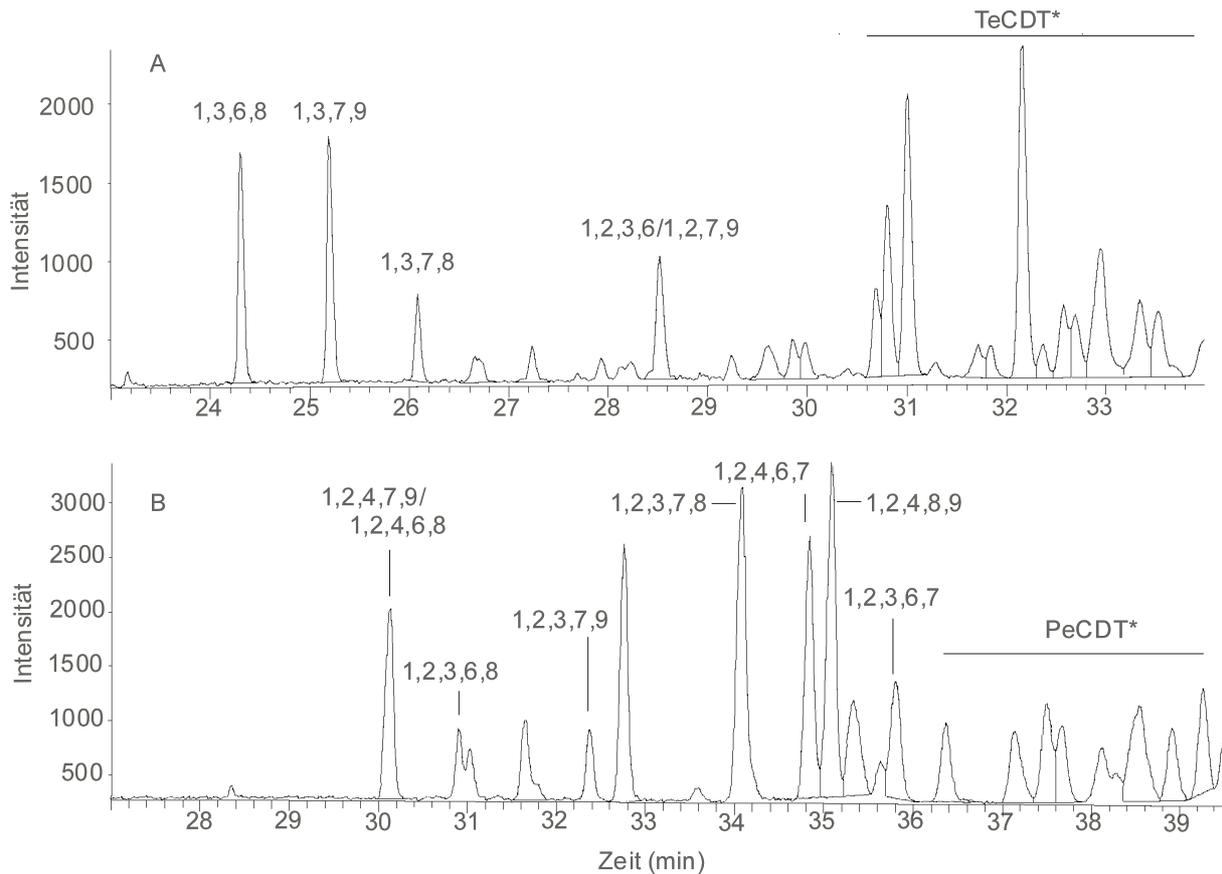


Abb. 4: Isomerenmuster der tetra- (TeCDD) (A) und pentachlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PeCDD) (B) in Spittelwassersediment. Dargestellt sind *selective ion monitoring* (SIM)-Chromatogramme der Massenzahlen 320 und 356 der Molekülionen von TeCDD bzw. PeCDD. Die durch Retentionszeit und Chlor-Isotopenverhältnis zugeordneten Dioxinkongeneren sind bezeichnet. *Durch Vergleich mit dem Isomerenmuster einer Bodenprobe aus der Bille-Siedlung, Hamburg (Rappe 1994), vermutlich als tetra- bzw. pentachlorierte Dibenzothiophene (TeCDT, PeCDT) anzusprechende Verbindungen.

1.8 Übersicht über den mikrobiellen Abbau von Halogenorganika

Der zweite Teil des Chlorzyklus umfasst die Chlororganika-abbauenden Prozesse, von denen hier die für chlorierte Aromaten relevanten Reaktionen betrachtet werden sollen. Wie andere Chlororganika auch, unterliegen Chloraromaten physikalisch-chemischen Prozessen wie z.B. der photolytischen Spaltung (Czaplicka 2006) oder einer reduktiven Dechlorierung durch

redoxaktive Elemente wie Zn (0) oder reduzierte Huminsäuren (Adriaens et al. 1996). Der Beitrag biologischer Abbauprozesse ist jedoch in der Regel höher als z. B. der von Photodegradation und Sorptionsprozessen (Pignatello et al. 1983). Das Potential biologischer Abbauprozesse äußert sich in der Existenz einer großen Vielfalt von Abbaureaktionen (Reineke 2001), deren Ausprägung von den jeweils herrschenden Umweltbedingungen abhängig ist (Abb. 5).

1.8.1 Dehalogenierung und Abbau unter verschiedenen Umweltbedingungen

Mit steigendem Halogenierungsgrad steigt das Redoxpotential chlorierter Aromaten ($E_0' \approx 0,26 - 0,5 \text{ V}$) (Dolfing & Harrison 1992, Dolfing & Harrison 1993, Huang et al. 1996). Dadurch verringert sich die Effizienz der Verwertung ihres Kohlenwasserstoffgerüsts als Elektronendonator im aeroben Atmungsprozess. Außerdem wird der nukleophile, Oxygenase-katalysierte Angriff des Sauerstoffs am aromatischen Ring durch den +M-Effekt der Halogensubstituenten erschwert. So wurden bisher keine aeroben Bakterienreinkulturen angereichert, die hochchlorierte Verbindungen wie Hexachlorbenzen oder penta- bis octachlorierte Dioxine als Wachstumssubstrat nutzen können. Für höher chlorierte Aromaten, deren Ring bereits durch eine Hydroxylgruppe aktiviert ist (z.B. Pentachlorphenol), haben aerobe Bakterien Dechlorierungsmechanismen entwickelt, die letztlich eine vollständige Mineralisierung über 1,2,4-Trihydroxybenzen oder den Hydrochinonweg (Abb. 5) ermöglichen (Cai & Xun 2002, Häggblom et al. 1988, Uotila et al. 1992). Die klassischen Abbauwege für nichthalogenierte Aromaten führen über 1,2-Dihydroxybenzen (Catechol) als Ringspaltungssubstrat, das entweder intradiol (*ortho*-Weg) oder extradiol (*meta*-Weg) gespalten und schrittweise in Metabolite des Tricarbonsäurezyklus (TCC) überführt wird. Für den Abbau vieler Chloraromaten haben sich in der Evolution Varianten dieser beiden Wege mit Chlorcatechol als zentralem Intermediat herausgebildet, bei denen die entsprechenden Enzyme eine Anpassung an chlorierte Substrate und Intermediate erfuhren bzw. Dehalogenierungsaktivität erwarben (Schlömman 1994, van der Meer 1997). Eine große Zahl von Chloraromaten (Chlorphenole, Chlorbenzene, Chlortoluene, Chloraniline, Chlorbenzoate, Chlorsalizylate) wird über periphere Abbauprozesse in Chlorcatechole umgewandelt und über den modifizierten *ortho*-Weg abgebaut (Abb. 5, 6). Die Dehalogenierung erfolgt durch Muconsäure-Isomerase und Maleylacetat-Reduktase. Der Hydrochinonweg mit Chlorhydrochinon als zentralem Intermediat führt ebenfalls über Chlormaleylacetat. Die Dehalogenierungskapazität der Maleylacetat-Reduktase wird auch hier für das Einschleusen

der Intermediate in den TCC genutzt. Der *meta*-Weg galt lange als unproduktiv für den Abbau von Chloraromaten, da die Catechol-2,3-dioxygenase durch das bei der extradiolen Ringspaltung von 3-Chlorcatechol gebildete reaktive Säurechlorid inaktiviert werden kann (Bartels et al. 1984). Die Catechol-2,3-dioxygenase von *Pseudomonas putida* GJ31 hat jedoch die Fähigkeit, 3-Chlorcatechol unter gleichzeitiger Ringspaltung und Dehalogenierung zu 2-Hydroxymuconat umzuwandeln und damit in den *meta*-Weg einzuspeisen (Kaschabek et al. 1998) (Abb. 5). Neben den hier skizzierten Abbauwegen werden Chloraromaten häufig bereits im peripheren Abbauweg vollständig dehalogeniert, so dass sie über den klassischen *ortho*- oder *meta*-Abbauweg mineralisiert werden können. In der Umwelt tragen vermutlich Interaktionen verschiedener Mikroorganismen zum vollständigen Abbau von Chloraromaten bei, z.B. wenn Chloraromaten cometabolisch, also durch unspezifische Enzyme anderer Abbauwege umgesetzt und Intermediate ausgeschieden werden, die anderen Organismen unter Umständen als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen können. Weißfäulepilze, die eine wesentliche Funktion beim Abbau des persistenten Lignin-Makromoleküls besitzen, sind dafür bekannt, dass sie Aromaten durch extrazelluläre Lignin- oder Mangan-Peroxidasen angreifen können. Für *Phanerochaete chrysosporium* wurde gezeigt, dass der cometabolische Umsatz von 2,7-DiCDD durch die Interaktion beider Peroxidasen unter anderem über 1-Chlor-3,4-benzochinon und 4-Chlorcatechol zum zentralen Intermediat 1,2,4-Trihydroxybenzen erfolgte (Valli et al. 1992) (Abb. 5). Auch höher chlorierte Dioxine können durch Pilze umgesetzt werden (Manji & Ishihara 2004, Takada et al. 1996). Aktuelle Arbeiten mit *Phlebia*-Arten weisen darauf hin, dass eine Cytochrom P450-vermittelte Reaktion für die Bildung von hydroxylierten und methoxlierten Dioxinintermediaten und eine partielle Dechlorierung zum 3,5-Dichlorcatechol verantwortlich ist (Kamei & Kondo 2005, Kamei et al. 2005) (Abb. 5).

Obwohl die Assimilation von Chloraromaten unter anaeroben Bedingungen aufgrund ihres hohen Redoxpotentials nicht begünstigt scheint, wurde ein Abbau von Monochlorphenolen und -benzoaten und z.T. von Brom- und Fluorbenzoaten in verschiedenen Anreicherungskulturen in Gegenwart zumindest einer der Elektronenakzeptoren Sulfat, Nitrat oder Eisen (III) beschrieben (z.B. Häggblom et al. 1993, Song et al. 2002, Vargas et al. 2000). Inzwischen sind viele Halobenzoat-abbauende, denitrifizierende Proteobakterien bekannt (Song et al. 2000b). Eine ausgeglichene Elektronenbilanz zwischen Halobenzoat-Assimilation und Denitrifikation ist für *Thauera aromatica* 3CB-1 beschrieben (Häggblom & Young 1999, Song et al. 2000a) (Abb. 5). In der aquatischen Umwelt mag ebenfalls ein phototropher Umsatz von Halogenaromaten eine Rolle spielen (nicht dargestellt). 3-Chlor- bzw.

Brombenzoat werden von *Rhodospseudomonas palustris* photoheterotroph assimiliert (Egland et al. 2001, van der Woude et al. 1994). Mineralisierungen unter denitrifizierenden oder photoheterotrophen Bedingungen scheinen aber auf Aromaten mit ein bis zwei Halogensubstituenten beschränkt zu sein.

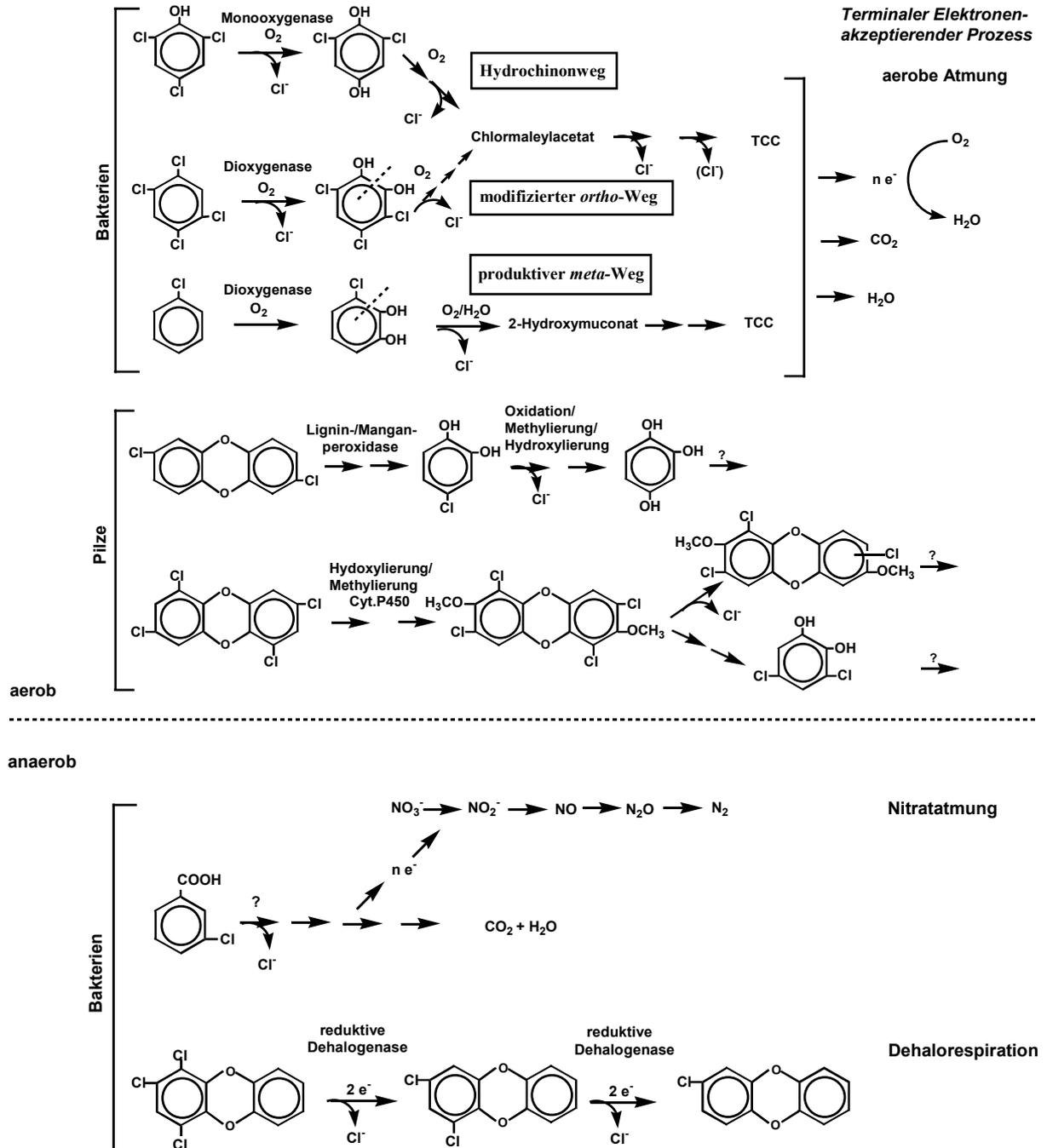


Abb. 5: Mikrobielle Abbauprozesse von chloraromatischen Verbindungen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Der Übersichtlichkeit halber sind die Produkte nicht in stöchiometrischen Mengen angegeben.

----- : Ort der Ringöffnung beim meta- und ortho-Weg.

Das hohe Redoxpotential liefert jedoch die Grundlage für einen wichtigen weiteren Transformationsprozess von Halogenaromaten unter anaeroben Bedingungen: ihre reduktive Dehalogenierung. Dabei dienen die halogenierten Verbindungen als terminale Elektronenakzeptoren in der sogenannten Dehalorespiration (Übersichten z.B. in Dolfig & Beurskens 1995, Häggblom & Bossert 2003, Holliger et al. 1999, Mohn & Tiedje 1992) (siehe auch Kapitel 3). Die schrittweise Dehalogenierung von Chloraromaten endet häufig auf der Stufe der monochlorierten Verbindung wie in Abb. 5 für 1,2,4-Trichlordibenzo-*p*-dioxin gezeigt. Die Verringerung der Anzahl der Chloratome erhöht die enzymatische Zugänglichkeit der Moleküle für weitere Abbauprozesse, z.B. durch aerobe Bakterien, und erhöht gleichzeitig deren Wasserlöslichkeit und damit Bioverfügbarkeit.

2 Aerober Abbau von Chlorphenolen

Der Abbau von Chlorphenolen durch aerobe Bakterien erfolgt hauptsächlich über zwei Wege, den Hydrochinon-Weg und den modifizierten *ortho*-Weg (Abb. 5, 6). Charakteristisch für ersteren Weg ist ein chloriertes Hydrochinon-Intermediat, das als Resultat einer mit der Dechlorierung gekoppelten Monooxygenasereaktion in *para*-Position zur phenolischen OH-Gruppe entsteht. Dieser Weg ermöglicht den Abbau von Tri- bis Pentachlorphenolen, ist aber auch für den Abbau von 4-Chlorphenol beschrieben (Nordin et al. 2005). Die entsprechenden Monooxygenasen wurden entweder als Cytochrom-P450-Monooxygenasen (Uotila et al. 1991) oder Zweikomponenten-Monooxygenasen beschrieben, deren Reduktase-Komponente reduziertes FAD für die Oxygenase-Komponente bereit stellt (Gisi & Xun 2003, Louie et al. 2002) oder das intermediäre Tetrachlorbenzochinon zum Tetrachlorhydrochinon umwandelt (Dai et al. 2003). Varianten des Hydrochinonweges wurden z.B. für *Burkholderia (B.) phenoliruptrix* (früher: *B. cepacia*) AC1100 (Zaborina et al. 1998), *Azotobacter* sp. GP1 (Li et al. 1991), *Ralstonia pickettii* DTB0602 (Kiyohara et al. 1992), *Sphingobium chlorophenicum* ATCC 39723 (Dai et al. 2003), *Mycobacterium chlorophenicum* PCP-1 (Uotila et al. 1995), *Streptomyces rochei* 303 (Golovleva et al. 1992) und *Nocardioides simplex* 3E (Ferraroni et al. 2005) beschrieben. Beim Abbau höher chlorierter Phenole über den Hydrochinonweg treten vor der Ringspaltung verschiedene Dehalogenierungsschritte bzw. -mechanismen auf. So werden in *Sphingobium chlorophenicum* die Intermediate Tetra- und Trichlorhydrochinon durch eine spezielle Glutathion-S-Transferase reduktiv (Warner et al. 2005) und das Folgeprodukt durch eine 2,6-Dichlor-*p*-hydrochinon-Chlorhydrolase hydrolytisch dehalogeniert (Lee & Xun 1997).

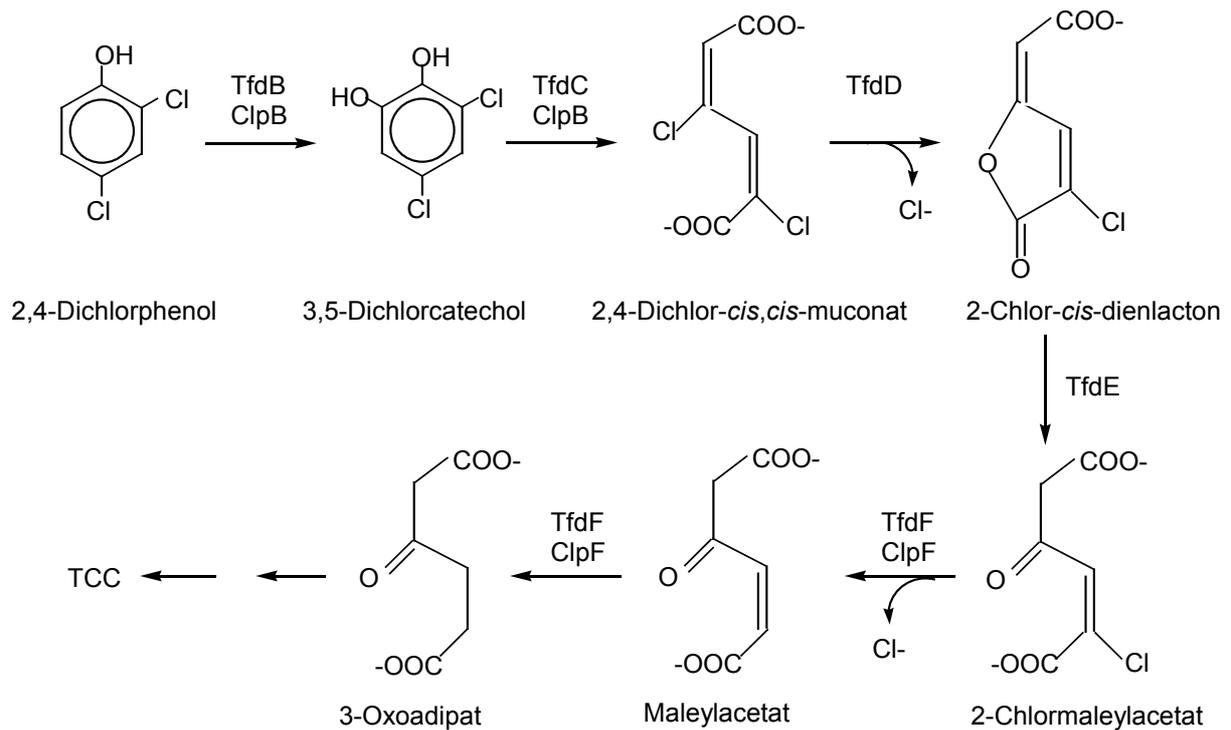


Abb. 6: Abbau von 2,4-Dichlorphenol über den modifizierten *ortho*-Weg. Die Enzyme des 2,4-D (*Two, four-D*)-Abbauweges sind mit Tfd, die im chlorphenolabbauenden Bakterium *Deffluvibacter lusatiensis* S1^T nachgewiesenen sind mit Clp gekennzeichnet. Tfd/ClpB: 2,4-Dichlorphenolhydroxylase; TfdC/ClpC: Chlorcatechol-1,2-dioxygenase; TfdD: Chlormuconatcycloisomerase; TfdE: Dienlactonhydrolase; Tfd/ClpF: Maleylacetatreduktase.

Mono- und dichlorierte Phenole werden häufig über den modifizierten *ortho*-Weg abgebaut (Abb. 6). Das initiale, in *ortho*-Stellung zur OH-Gruppe hydroxylierende Enzym gehört zu den Flavin-haltigen, NAD(P)H-oxidierenden Einkomponenten-Monooxygenasen und wird als 2,4-Dichlorphenol-6-monooxygenase oder kurz 2,4-Dichlorphenolhydroxylase (EC 1.14.13.20) (2,4-DCPH) bezeichnet. Das ringspaltende Enzym, die Chlorcatechol-1,2-dioxygenase, besitzt im Gegensatz zur Catechol-1,2-dioxygenase höhere Aktivitäten für Chlorcatechole als für Catechol (Pieper et al. 1988). Die Dehalogenierung erfolgt erst nach der Ringspaltung durch die Chlormuconatisomerase (Schlömman 1994) und die Maleylacetatreduktase (Seibert et al. 1993). Deren Produkt, 3-Oxadipat, wird aktiviert und dann in die Intermediate des Tricarbonsäurecyclus Acetyl-CoA und Succinyl-CoA überführt (Göbel et al. 2002).

Die Mehrzahl der Untersuchungen zum Chlorphenolabbau über den modifizierten *ortho*-Weg wurde durch das Interesse am Abbau von Phenoxyalkanoat-Herbiziden initiiert und fokussierte auf die beiden typischen Intermediate 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) und 4-Chlor-2-methylphenol (4C2MP). Die isolierten Bakterien gehören im Wesentlichen zu den Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt [z.B. *Arthrobacter* sp. (Bollag et al. 1968) und

Rhodococcus opacus 1CP (Eulberg et al. 1998, Gorlatov & Golovleva 1992)], den 'Gammaproteobacteria' [z.B. *Pseudomonas* sp. NCIB9340 (Tyler & Finn 1974), *Pseudomonas* sp. B13 (Knackmuss & Hellwig 1978), *Azotobacter chroococcum* (Balajee & Mahadevan 1990)], den 'Betaproteobacteria' [z.B. *Cupriavidus* (*C.*) *necator* JMP 134, die *B. cepacia*-Stämme BRI6001 (Greer et al. 1990), CSV90 (Bhat et al. 1994) und 2a (früher *Acinetobacter* sp., Beadle & Smith 1982), *Delftia* (*Df.*) *acidovorans* P4a (Hoffmann et al. 2003)] und den 'Alphaproteobacteria' [z.B. *Xanthobacter* sp. CP (Ditzelmüller et al. 1989), *Ochrobactrum anthropi*-Stämme (Müller et al. 1998), *Sphingomonas* (*S.*) *herbicidovorans* MH (Müller et al. 2004) und *Sphingomonas* sp. TFD44 (Fulthorpe et al. 1995, Thiel et al. 2005)].

Zu den hinsichtlich der Biochemie und genetischen Organisation des Abbaus von Phenoxyalkanoaten bzw. Chlorphenolen am besten untersuchten Bakterien gehört *C. necator* JMP 134 (pJP4) (frühere taxonomische Bezeichnungen: *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia* bzw. *Wautersia eutropha*; Vandamme & Coenye 2004). Zwei Module von Chlorcatechol-katabolen Genen, die Gencluster *tfd_I* (*tfdC_ID_IE_IF_IB_I*) und *tfd_{II}* (*tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}B_{II}*) (Laemmli et al. 2000) (Genbezeichnungen siehe Abb. 6), befinden sich auf dem Plasmid pJP4 (Schlömman 2002). Die folgenden Gencluster besitzen eine sehr ähnliche Operonstruktur mit orthologen Genen des Chlorcatecholabbauweges: *tcbCDEF* auf Plasmid pP51 in dem Trichlorbenzen-abbauenden *Pseudomonas* sp. P51 und *clcABD* auf Plasmid pAC27 in dem 3-Chlorbenzoat-abbauenden *Pseudomonas* (*P.*) *putida*, in denen jedoch die Gene für die 2,4-Dichlorphenolhydroxylase fehlen (Übersichten in Schlömman 1994, van der Meer 1997).

2.1 Abbau von Chlorphenolen durch *Defluviobacter lusatiensis* Stamm S1

2.1.1 Isolierung und taxonomische Beschreibung von 4C2MP- und 2,4-DCP-abbauenden Bakterien

Im Synthesewerk Schwarzheide (Lausitz) wurden bis ca. 1990 chlorierte Phenoxy-carbonsäureherbizide wie z.B. 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure (MCPA), 4-(2,4-Dichlorphenoxy)-buttersäure und 2-(2,4-Dichlorphenoxypropionsäure) hergestellt. Das in die Belebtschlammanlage der dreistufigen Abwasserbehandlung eingeleitete Abwasser enthielt durchschnittlich 1,6 g l⁻¹ der Herbizide und ca. 0,7 g l⁻¹ der Synthesestufen 2,4-DCP und 4C2MP (Bloedorn 1991). Messungen des absorbierbaren organisch gebundenen Chlors als

Halogen (AOX) dokumentierten die fast vollständige Mineralisierung der chlorierten Verbindungen im Belebtschlammbecken. Zur Anreicherung und Isolierung der chlorphenolabbauenden Bakterien wurde Belebtschlamm zuerst einer Fed-Batch-Kultivierung mit täglichem Zusatz von 4C2MP und anschließender kontinuierlicher Kultivierung unterzogen. Die angereicherte Mischkultur besaß eine Abbaurrate von $3 \mu\text{mol } 4\text{C2MP h}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ (Lechner et al. 1995; II). Vier chlorphenolabbauende, Gram-negative Stämme wurden isoliert. Der bei der höchsten Verdünnungsrate häufigste Stamm, S1^T, zeigte in Batch-Kulturen die höchste Abbaurrate gegenüber 4C2MP. Dieses Bakterium wurde zur Untersuchung des Chlorphenolabbauweges ausgesucht und zusammen mit dem morphologisch ähnlichen Isolat S4 taxonomisch beschrieben (Lechner et al. 1995; II, Fritsche et al. 1999; IV und Fritsche 1998). Im Unterschied zu vielen bis dahin beschriebenen, Gram-negativen, chlorphenolabbauenden Bakterien konnten die beiden Stämme die Herbizide MCPA und 2,4-D nicht abbauen. Von Bauschutt der abgerissenen Herbizidfabrik in Schwarzheide wurden später weitere sowohl nur Chlorphenole (Müller et al. 1998) als auch Phenoxy-carbonsäuren abbauende Bakterien (Hoffmann et al. 2003, Müller et al. 1999) isoliert. In den Stämmen S1^T und S4 wurde die Fähigkeit zum Abbau über den modifizierten *ortho*-Weg durch 4C2MP, 2,4-DCP und 4-Chlorphenol induziert und erwies sich als eine stabile Eigenschaft, die durch mehr als 30 Passagen auf Vollmedium ohne Chlorphenolzusatz nicht verloren ging. 4C2MP-induzierte Zellen waren auch zum (unvollständigen) Umsatz von 2- und 3-Chlorphenol und 2-Methylphenol in der Lage. Phenol und 2-Methylphenol induzierten jedoch einen eigenen Abbauweg, den klassischen *ortho*-Weg. Eine Catechol-2,3-dioxygenase wurde jedoch nicht durch Phenol induziert, wie dies für *C. necator* JMP 134 beschrieben worden ist (Müller & Babel 1996, Pieper et al. 1989).

Die Untersuchung der morphologischen, physiologischen und chemotaxonomischen Eigenschaften, insbesondere der Nachweis von Ubichinon 10 (Q-10), der Fettsäure 18:1 als Hauptkomponente der zellulären Fettsäuren und Spermidin als Hauptpolyamin führte zur Einordnung der Isolate in die α -2-Unterklasse der Proteobakterien. Auf der Basis der Fettsäureanalyse wurde *Ochrobactrum anthropi* als verwandt vorgeschlagen. Durch Mustervergleich der löslichen Proteine, eine Ribotype-Analyse (S. Jorks, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, pers. Mitteilung) und vergleichende Substratverwertungsspektren (Biotype 100, BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich; Daten nicht gezeigt) erwiesen sich jedoch *O. anthropi*^T und die als *Ochrobactrum*-Stämme identifizierten Bauschutt-Isolate (Müller et al. 1998) als unterschiedlich. Die Sequenz des fast vollständigen 16S rRNA-Gens platzierte Stamm S1^T in die Nähe von *Phyllobacterium* und

Mesorhizobium mit einer eigenständigen Abstammungslinie im Dendrogramm, die jedoch zur Zeit der Beschreibung durch den Mangel an vergleichbaren Sequenzen nicht durch einen hohen Bootstrap-Wert gestützt wurde (Fritsche et al. 1999; IV). Die Isolate wurden aufgrund ihrer eigenständigen phylogenetischen Stellung und der phänotypischen Merkmale als neue Gattung und neue Art, *Defluviobacter* (*D.*) *lusatiensis*, mit S1^T als Typstamm der Art beschrieben. Inzwischen wurden weitere Bakterien in der unmittelbaren phylogenetischen Nachbarschaft beschrieben. Im hierarchischen System der *'Alphaproteobacteria'* wurden sie innerhalb der Ordnung *'Rhizobiales'* der Familie *'Phyllobacteriaceae'* zugeordnet (Lee et al. 2005). In Übereinstimmung mit „Taxonomic outline of the Prokaryotes“ (Garrity et al. 2004) wird die Familie *'Phyllobacteriaceae'* in drei, durch hohe Bootstrap-Werte gestützte Subcluster unterteilt. Das erste enthält die Gattungen *Aminobacter*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium* und *Pseudaminobacter* (siehe auch Abb. 1 in Fritsche et al. 1999; IV), das zweite die Gattungen *Ahrensia* (Uchino et al. 1998) und *Nitratireductor* (Labbé et al. 2004) und das dritte die Gattungen *Aquamicrobium* (Bambauer et al. 1998) und *Defluviobacter*. Die 16S rRNA-Gensequenzen von Stamm S1^T und den anderen Vertretern der *'Phyllobacteriaceae'* sind maximal 96 % identisch mit Ausnahme von *Aquamicrobium defluvii* NKK mit 98 % Sequenzidentität. Letzteres legt eine Verwandtschaft von S1^T mit diesem Thiophen-2-carboxylat-abbauenden Bakterium auf Gattungsebene nahe, jedoch fehlen dafür zur Zeit vergleichbare chemotaxonomische und physiologische Daten. Das von Lee et al. (2005) vorgeschlagene taxonomische System der *'Alphaproteobacteria'* auf der Basis der Unterteilung in vorläufig sechs Ordnungen wird dem Bedürfnis nach Erweiterbarkeit besser gerecht und überwindet die vormalige Unterteilung in die α -1- bis α -4-Untergruppen, die jeweils phylogenetisch sehr tief voneinander abzweigende Gruppen zusammenfassten (siehe z. B. Takeuchi et al. 1994).

2.1.2 Untersuchungen zum Abbauweg von 2,4-DCP und 4C2MP durch *D. lusatiensis* Stamm S1^T

Bei Wachstum auf 4C2MP wurde im Kulturfiltrat des Stammes S1^T ein Intermediat des modifizierten *ortho*-Weges nachgewiesen: 2-Methyl-4-carboxymethylenbut-2-en-4-olid (oder kurz: 2-Methyldienlacton) (Abb. 6). Außerdem war im Rohextrakt die Aktivität einer 2,4-Dichlorphenolhydroxylase (2,4-DCPH) und einer Chlorcatechol-1,2-dioxygenase meßbar (Lechner et al. 1995; II), so dass von einem Abbau der Chlorphenole über den modifizierten *ortho*-Weg ausgegangen werden konnte.

2.1.2.1 Die initiale 2,4-Dichlorphenolhydroxylase

Für die Isolierung des initialen Enzyms des Chlorphenolabbaus war eine Zellanzucht auf dem toxischen Chlorphenol notwendig. In Batch-Versuchen wurde der Abbau durch 4C2MP-induzierte Zellen bereits durch Gabe von 150 μM 4C2MP oder 60 μM 2,4-DCP vollständig gehemmt. Deshalb wurden Zellen aus dem Auslauf einer kontinuierlichen Kultur mit 4C2MP als limitierendem Substrat aufgefangen und in einer belüfteten Fed-Batch-Kultivierung weiter mit 4C2MP bis zur Zellernte versorgt unter Bedingungen, die die Akkumulation von 4C2MP ausschlossen (Makdessi & Lechner 1997; III). Die 2,4-DCPH von Stamm S1^T wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie, hydrophobe Interaktions-Chromatographie und Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt (Makdessi & Lechner 1997; III). Das Enzym ist ein Homotetramer mit einer Untereinheitengröße von 64 kDa (massenspektrometrische Bestimmung), enthält vier FAD, besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5,2, ein pH-Optimum von 8, eine spezifische Aktivität von 2,4 U (mg Protein)⁻¹ und nutzt NADH und NADPH mit gleicher spezifischer Aktivität als Cosubstrate. Diese Eigenschaften ähneln denen der 2,4-DCPHs, die von drei 2,4-D-abbauenden Bakterien, zwei *B. cepacia*-Stämmen (Beadle & Smith 1982, Radjendirane et al. 1991) und *C. necator* JMP 134 (pJP4) (Liu & Chapman 1984, Perkins et al. 1990), gereinigt wurden. Das von Liu & Chapman (1984) angereicherte Enzym stellte wahrscheinlich ein Gemisch von TfdB_I und TfdB_{II} dar, da 2,4-D die Expression der 2,4-DCPH codierenden Gene beider Module auf Plasmid pJP4 induziert (Laemmlli et al. 2000). Kürzlich haben Ledger et al. (2006) jeweils eines der beiden *tfdB*-Gene auf dem Plasmid pJP4 durch Insertion einer Kanamycin-Resistenz-Kassette inaktiviert und im Rohextrakt die individuellen Aktivitäten der 2,4-DCPHs untersucht. Die Substratspektren aller untersuchten 2,4-DCPHs ähneln sich: sie sind begrenzt auf den Umsatz von Halogenphenolen, die in 2- und/oder 4-Position substituiert sind. Außerdem werden 4C2MP und 2-Methylphenol umgesetzt. Mit Phenol, 3-Methylphenol oder 2,4,6-Trichlorphenol wird nahezu kein Sauerstoffverbrauch gemessen. Generell ist bekannt, dass externe aromatische Hydroxylasen eine gewisse Entkopplung der O₂-Reduktion von der Substrathydroxylierung zeigen, d.h. dass ein Teil des intermediär am Enzym gebildeten Flavin-4a-hydroperoxids unter H₂O₂-Freisetzung wieder reduziert wird (Harayama et al. 1992). Bei Zweikomponenten-Flavin-Monooxygenasen kann die Reduktase-Komponente in Abwesenheit von Substrat allein verantwortlich für die beobachtete Entkopplung sein (z.B. Becker et al. 1997). Bei Einkomponenten-Monooxygenasen ist sie abhängig von der Substratbindung. Die Substrate kann man in Substrat-Effektoren und Nicht-Substrat-Effektoren unterteilen (z.B. Neujahr

1991). In beiden Fällen führt die Bindung des Substrats zur Oxidation des enzymgebundenen Flavins, aber im letzteren nicht zur Hydroxylierung des Substrats sondern nur zur H₂O₂-Freisetzung.

Die 2,4-DCPH von Stamm S1^T besitzt im Vergleich mit den von 2,4-D-Verwertern gereinigten Enzymen deutliche Unterschiede in der Substratspezifität. Sie setzt 4C2MP besser um als 2,4-DCP, während die spezifische Aktivität der anderen Enzyme gegenüber 4C2MP maximal 82 % gegenüber der mit 2,4-DCP betrug (Beadle & Smith 1982). Auch 2-Methylphenol wird mit höherer spezifischer Aktivität und vollständig (Substrat-Effektor) umgesetzt. Außerdem fungierten 2,3- und 3,4-DCP als Substrat-Effektoren und wurden zu Chlorcatecholen umgesetzt. Auch 2,5-DCP, 3,5-DCP und 2,4,5-TCP wurden, wenn auch unvollständig, hydroxyliert. Als Nicht-Substrat-Effektoren erwiesen sich nur 2,6-DCP und 3-Chlorphenol. Dagegen diente 4-Methylphenol im Unterschied zu den anderen Enzymen nicht als Substrat für die 2,4-DCPH von Stamm S1^T.

Das Gen für die 2,4-DCPH wurde mit Hilfe einer aus dem *tfdB_I*-Gen von *C. necator* JMP 134 abgeleiteten Sonde in Gesamt-DNA von Stamm S1^T in einer Kopie nachgewiesen, kloniert und sequenziert. Expressionsanalysen im Rohextrakt des rekombinanten *E. coli*-Stammes bestätigten die Funktion des Gens (Fritsche 1998, Fritsche & Lechner 1998). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des als *clpB* bezeichneten Gens war bis auf das fehlende Methionin am Start identisch im Bereich der experimentell ermittelten N-terminalen Sequenz (Makdessi & Lechner 1997; III), die ein typisches Bindemotif für den ADP-Rest des FAD (Wierenga et al. 1986) enthielt. Außerdem wurde ein zweites typisches Fingerprint-Motif für die FAD-Bindung (Aminosäuren 304-314) (Eggink et al. 1990) und am C-Terminus ein mögliches NAD(P)H-Bindemotif identifiziert (Fritsche 1998).

Die Aminosäuresequenz der 2,4-DCPH zeigte die höchste Ähnlichkeit zu der von TfdB_I (pJP4) und zu der eines 2,4-DCP-abbauenden *Pseudomonas*-Stammes WZ-2003 (Accession-Nr. AY496436; Zhong et al. 2004) (76 bzw. 73 % Identität). Die 2,4-DCPHs bilden einen eigenen Zweig im Stammbaum von Einkomponenten-Flavin-Monooxygenasen, die Phenole, Hydrochinone oder Hydroxybiphenyl *ortho* zur OH-Gruppe hydroxylieren (Abb. 7).

Die von den Plasmiden pJP4 (Laemmli et al. 2000), pEST4011 (Vedler et al. 2004) und pIJB1 (Poh et al. 2002) und dem chromosomalen Transposon in *Delftia (Df.) acidovorans* (Hoffmann et al. 2003) codierten TfdBs unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren und deuten auf horizontalen Gentransfer zwischen den entsprechenden Betaproteobakterien hin.

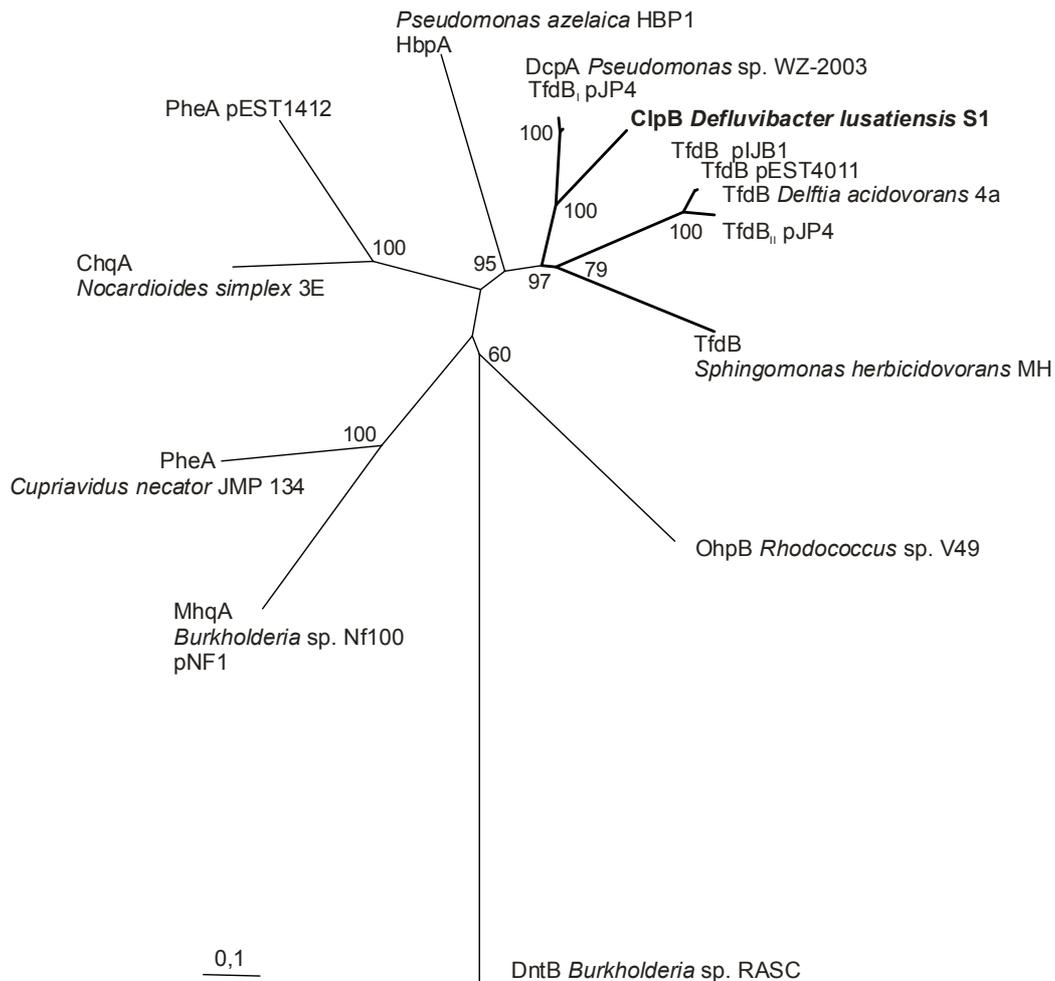


Abb. 7: Verwandtschaft der 2,4-Dichlorphenolhydroxylasen mit anderen aromatenhydroxylierenden Monooxygenasen. Das Dendrogramm wurde auf der Basis eines ClustalW-Alignments mit den Programmen PROTDIST und FITCH und die Bootstrap-Werte aus 100 Wiederholungen mit SEQBOOT (PHYLIP-Software, Vers. 3.5) berechnet. Die fett gezeichneten Äste führen zu 2,4-Dichlorphenolhydroxylasen. Es wurden nur Proteine mit experimentell nachgewiesener Funktion berücksichtigt. *Accession*-Nummern für die Sequenzen sind: 2,4-Dichlorphenolhydroxylasen: ClpB, *D. lusatiensis* S1^T, AJ536297; TfdB_I pJP4, *C. necator* JMP 134, AY365053; TfdB_{II} pJP4, *C. necator* JMP 134, U16782; TfdB pIJB1, *B. cepacia* 2a, AF029344; TfdB pEST4011, *A. xylooxidans* EST4002, AY540995; TfdB, *Df. acidovorans* 4a, AF176242; DcpA, *Pseudomonas* sp. WZ-2003, AY496436; 2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase: HbpA, *P. azelaica* HBP1, U73900; Phenolhydroxylasen: PheA pEST1412, *Pseudomonas* sp. EST1001, M57500; PheA, *C. necator* JMP 134, CP000091; Chlorhydrochinon-Monooxygenase: ChqA, *N. simplex* 3E, AY822041; Methylhydrochinon-Monooxygenase: MhqA *Burkholderia* sp. NF100, AB211038; 3-(2-Hydroxyphenyl) propionsäure-Monooxygenase: OhpB, *Rhodococcus* sp. V49, AF274045. Als *Outgroup* wurde die Sequenz der 4-Methyl-5-nitrocatechol-Monooxygenase DntB, *Burkholderia* sp. RASC (U68411) verwendet.

Das ebenfalls plasmidcodierte TfdB_I aus *C. necator* JMP134 (Perkins et al. 1990) bildet dagegen mit der 2,4-DCPH des noch wenig beschriebenen Pseudomonaden und dem vermutlich chromosomal codierten ClpB von *D. lusatiensis* S1^T eine eigene, früh von den

Phenolhydroxylasen abzweigende Linie. Interessant ist, dass auch das TfdB des ebenfalls zu den 'Alphaproteobacteria' gehörenden *S. herbicidovorans* MH (Müller et al. 2004) einen eigenständigen Ast im Dendrogramm bildet. Das lässt spekulieren, dass die Alphaproteobakterien ein bisher vielleicht unterschätztes Reservoir an Genen für den Chloraromatenabbau besitzen.

2.1.2.2 Molekularbiologische Untersuchung von Genen des modifizierten ortho-Weges

Southern-Hybridisierungen gegen Gesamt-DNA von Stamm S1^T unter wenig stringenten Bedingungen mit Sonden, die durch PCR von *tfdC*₁, *tfdD*₁ und *tfdE*₁ von *C. necator* JMP 134 (pJP4) abgeleitet wurden, ergaben den Hinweis auf eine Kopie einer Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase im Genom von Stamm S1^T aber keinen Hinweis auf *tfdD*- und *tfdE*-ähnliche Gene. Ein ca. 450 kb großes Plasmid wurde in S1^T nachgewiesen, das im Gegensatz zur Gesamt-DNA jedoch nicht mit den *tfdB*- bzw. *tfdC*-Sonden hybridisierte.

Auf dem sequenzierten, ca. 6 kb umfassenden chromosomalen Bereich von Stamm S1^T wurden neben *clpB* auch die Gene für eine Chlorcatechol-1,2-dioxygenase (*clpC*), eine Maleylacetatreduktase (*clpF*) und das unvollständige Gen für einen LysR-Typ-Regulator (*clpR*) identifiziert (Fritsche 1998, Fritsche & Lechner 1998) (Abb. 8). Der (Chlor)aromatenabbau wird in der Regel durch Transkriptionsregulatoren der LysR-Familie reguliert (Tropel & van der Meer 2004). Im modifizierten *ortho*-Weg dient Chlormuconat als Co-Induktor (z.B. Filer & Harker 1997, McFall et al. 1997, Vedler et al. 2000). Die Anwesenheit des typischen LysR-Erkennungsmotivs T-N₁₁-A (ca. 65 nt vor dem Startcodon) neben einer konservierten -35-Region vor den Genen *clpC* und *clpF* spricht für eine Funktion von ClpR bei der Transkriptionsaktivierung von *clpCB* und *clpF* (Fritsche 1998). Vor *clpB* wurden keine Hinweise auf Promotor- oder LysR-Erkennungsstrukturen gefunden, so dass ein gemeinsames *clpCB*-Transkript wahrscheinlich ist. Die Gene für die kanonischen LysR-Regulatoren sind in entgegengesetzter Leserichtung zu den regulierten Strukturgenen angeordnet (Schell 1993). Das trifft auch für die Chlorcatechol-Gencluster in *C. necator* JMP 134 und *Pseudomonas* sp. P51 zu, für Stamm S1^T, *Sphingomonas* sp. TFD44 und *Rhodococcus opacus* jedoch nicht oder nur teilweise (vgl. Abb. 8 und Übersicht in Thiel et al. 2005).

ClpC wurde kloniert, in *E. coli* exprimiert und der Umsatz von 3,5-Dichlorcatechol im Rohextrakt nachgewiesen (unpublizierte Ergebnisse). Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte die höchste Ähnlichkeit zu Chlorcatechol-1,2-dioxygenasen von *Sphingomonas* sp. TFD44 (Gene beider *tfd*-Gencluster) und *S. herbicidovorans* MH (Gencluster 1) (Abb. 8). Ein

Stammbaum von (Chlor)catechol-1,2-dioxygenasen demonstrierte, dass alle bekannten Chlorcatechol-1,2-dioxygenasen (CCDO) der Alphaproteobakterien tiefer von der Entwicklungslinie der CCDO der Gram-negativen Bakterien abzweigen, wobei ClpC von Stamm S1^T dem gemeinsamen Vorfahren mit den (Chlor)catechol-1,2-dioxygenasen Gram-positiver Bakterien am nächsten steht (Thiel et al. 2005).

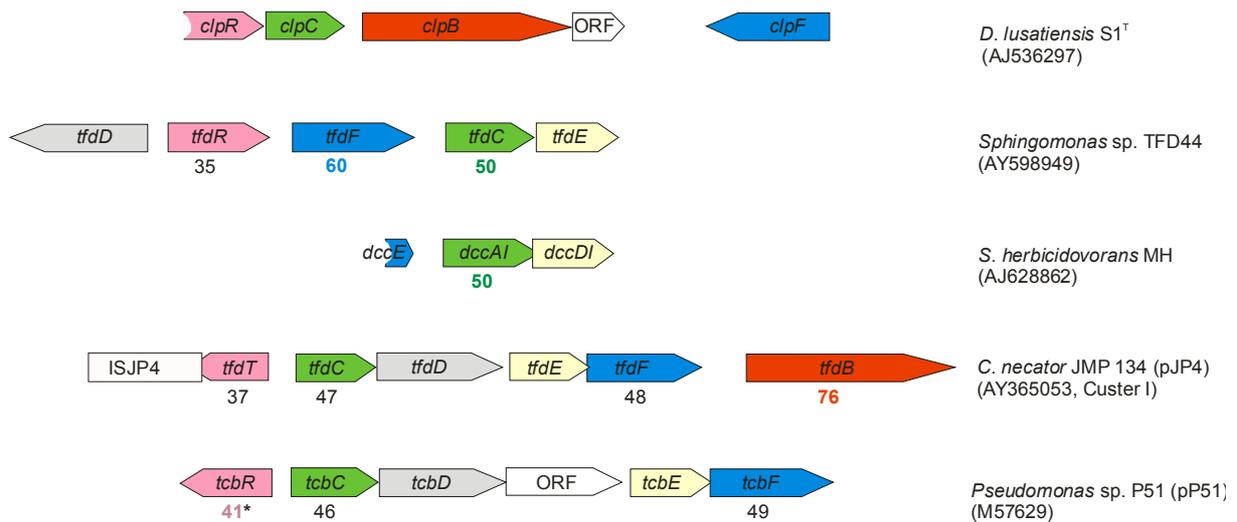


Abb. 8: Anordnung von Genen für die 2,4-DCPH (*clpB*, *tfdB*; rot) und von, den modifizierten *ortho*-Weg codierenden, Genclustern in *D. lusatiensis* S1^T und anderen Bakterien. Dargestellt sind Gencluster, die Gene mit der höchsten Homologie zu einem der entsprechenden Gene von Stamm S1^T besitzen (% Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ist unter den Genen angegeben; farbig hervorgehoben: höchste Identität zu Clp-Proteinen). Gene für Chlorcatechol-1,2-dioxygenasen: *clpC*, *tfdC*, *dccAI*, *tcbC* (grün), Chlormuconatcycloisomerasen: *tfdD*, *tcbD* (grau), Dienlactonhydrolasen: *tfdE*, *dccD*, *tcbE* (gelb), Maleylacetatreduktasen: *clpF*, *tfdF*, *dccE*, *tcbE* (blau), LysR-Typ-Regulatoren: *clpR*, *tfdR*, *tfdT*, *TcbR* (rosa). *Folgende, von Chlorcatechol-katabolen Genclustern codierten LysR-Typ-Regulatoren sind ebenfalls 41 % identisch mit ClpR: MocpR (*A. xylooxidans* A8, pA81; AJ515144), TetR (*P. chloraphis* RW71; AJ271325), CbnR (*C. necator* NH9, pENH91, AB019032), TfdR (*Df. acidovorans* 4a, AY078159) und TfdR/S (*C. necator* JMP 134, pJP4, AY496436).

Auch ClpF war den Maleylacetatreduktasen von *Spingomonas* sp. TFD44 am ähnlichsten (Abb. 8), gefolgt von TfdF von *A. xylooxidans* EST4001 (pEST4011). Phylogenetisch bilden sie eine eigene Entwicklungslinie gegenüber den Maleylacetatreduktasen der Chlorcatechol-Abbauege auf den Plasmiden pP51, pJP4 oder in *Pseudomonas* sp. B13 (Thiel et al. 2005). Auch die Aminosäuresequenzen der bisher bekannten Chlormuconatcycloisomerasen und Dienlactonhydrolasen von *Spingomonas* unterscheiden sich deutlich von denen der Beta-

und *'Gammaproteobacteria'*, wobei nur die vom Gencluster II auf pJP4 codierten Proteine relativ eng verwandt sind. Das Fehlen von Hybridisierungssignalen mit *tfd_I*-abgeleiteten Sonden könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein von eher *Sphingomonas* (bzw. *'Alphaproteobacteria'*)-ähnlichen Genen in Stamm S1^T sein.

Bereits Fulthorpe et al. (1995) hatten an einer Reihe von 2,4-D-abbauenden Isolaten gezeigt, dass nur Vertreter von Beta- und Gammaproteobakterien Gene besaßen, die mit *tfdB*- und *tfdC* (pJP4)-abgeleiteten Sonden unter hochstringenten Bedingungen hybridisierten. Eine Reihe von *Sphingomonas*-Isolaten, darunter auch TFD44, zeigten dagegen keine Hybridisierung mit *tfdC* und nur eine schwache mit *tfdB*. Die Untersuchung der evolutionären Verwandtschaft von den modifizierten *ortho*-Weg codierenden Genen weist darauf hin, dass die Alphaproteobakterien ursprünglichere und möglicherweise diversere Gene für den Abbau von Chloraromaten besitzen. Es fällt auf, dass die Gencluster weniger „geordnet“ und die Gene der Abbausequenz z.T. über das Genom verstreut sind im Vergleich zu den z.B. auf den Plasmiden pJP4, pP51 oder dem Transposon in *Df. acidovorans* 4a (Hoffmann et al. 2003) lokalisierten Genen. Das Vorhandensein von IS-Elementen und Transposase-Genen (Müller et al. 2004, Thiel et al. 2005) bei den Alphaproteobakterien spricht auch hier für die Mobilisierbarkeit der Abbaugene. Mit selbstübertragbaren Plasmiden wie pJP4, die alle notwendigen Gene für den Chloraromatenabbau in einer Operonstruktur und sogar als Duplikat besitzen, mögen Beta- und Gammaproteobakterien jedoch ein Instrument für eine allochthone Lebensweise besitzen, die ihnen eine schnelle Anpassung an die Verwertung von Chloraromaten erlaubt. Der Transfer von pJP4 im Boden scheint hauptsächlich innerhalb von Vertretern der Beta- und Gammaproteobakterien zu erfolgen (Newby et al. 2000), so dass die Alphaproteobakterien von den Vorteilen des Plasmidtransfers nicht profitieren. Ihr Vorteil mag der Besitz von relativ stabilen, chromosomal codierten Abbauwegen sein, der ihnen jederzeit Wachstum auf Chloraromaten erlaubt. Die größeren Astlängen der 2,4-DCPHs (Abb. 7) und CCDOs (Abb. 5 in Thiel et al. 2005) von *'Alphaproteobacteria'* deuten auf die Existenz einer hohen genetischen Vielfalt und damit möglicherweise auf ein bedeutendes Anpassungspotential an verschiedene Verbindungen hin. So wurde berichtet, dass vier von fünf 2,4-D-abbauenden Bakterien, die aus ursprünglichem Vulkanboden isoliert wurden, zu *Bradyrhizobium* gehörten (Kamagata et al. 1997).

3 Reduktive Dehalogenierung von chlorierten aromatischen Verbindungen

Bisher ist der reduktive Dehalogenierungsprozess der einzige bekannte biologische Mechanismus, der unter anaeroben Bedingungen hoch chlorierte, persistente Verbindungen wie PCB, PCDD/F oder Hexachlorbenzen angreift und sie damit in Verbindungen überführt, die durch andere Mikroorganismen weiter oder vollständig umgesetzt werden können. Obwohl auch cometabolische Dehalogenierungsreaktionen durch acetogene oder methanogene Prokaryoten bzw. deren Cofaktoren wie Coenzym B12 oder F430 in ihrer Relevanz für Umweltprozesse nicht zu unterschätzen sind (Übersicht in Holliger et al. 2003), besitzt die Dehalogenierung als terminaler elektronenakzeptierender Schritt in der Dehalorespiration vermutlich eine größere Bedeutung für den Umsatz von Chlororganika. Bakterien, die über entsprechende reduktive Dehalogenasen verfügen, haben in Gegenwart von halogenierten Verbindungen einen Selektionsvorteil, so dass ihre natürliche Anreicherung in kontaminierten Habitaten erfolgen kann. Dies kann man sich z.B. für die Sanierung anaerober Grundwasserleiter zunutze machen (Lendvay et al. 2003).

Bei der Dehalorespiration (Holliger et al. 1999, Mohn & Tiedje 1992) werden zwei Elektronen auf die halogenierte Verbindung übertragen und der Halogensubstituent wird als Anion abgespalten (Abb. 9). Das Redoxpotential der Akzeptor-Redoxpaare $R-Cl_n/R-Cl_{n-1}$ liegt für Chlorphenole in einem Bereich von + 271 (2,3,4,6-TeCP/2,3,4-TCP) bis + 455 mV (PCP/2,3,4,6-TeCP) (Dolfing 1995), für PCDD in einem Bereich von + 298 (1,7-DiCDD/2-MCDD) bis + 492 mV (1,2,3,4-TeCDD/1,2,4-TrCDD) (Huang et al. 1996). Die Elektronen stammen aus der Oxidation eines Elektronendonors wie Wasserstoff, Formiat oder anderen organischen Säuren, werden entlang der Membran transportiert und reduzieren die halogenierte Verbindung durch die Aktivität der membranständigen Dehalogenase. Durch Komponenten der Elektronentransportkette wie z.B. Menachinon wird ein Protonengradient erzeugt (Schumacher & Holliger 1996), der die Energiekonservierung durch eine membrangebundene ATPase erlaubt (Mohn & Tiedje 1991). Chloraromaten-dehalogenierende Bakterien erreichten bei Wachstum mit Formiat oder Wasserstoff als Elektronendonoren Ertragskoeffizienten von 1,4 bis 2 g Protein (mol freigesetztes Chlorid)⁻¹ (Holliger et al. 2003).

Die terminalen Enzyme dieses Atmungsprozesses sind reduktive Dehalogenasen. Sie bestehen aus der katalytischen Untereinheit (RdhA) und einem kleinen hydrophoben Protein (RdhB), das vermutlich als Membrananker dient. Bis auf wenige Ausnahmen (Boyer et al. 2003, Ni et al. 1995), besitzt die katalytische Untereinheit reduktiver Dehalogenasen ein Corrinoid und

zwei Eisen-Schwefel-Zentren (Maillard et al. 2003, Neumann et al. 1996, van de Pas et al. 1999). Der für Chlorethene postulierte Reaktionsmechanismus involviert ein superreduziertes Vitamin B12 [Cob(I)alamin], das eine Co-C-Bindung ausbildet. Die Elektronenübertragung auf den Alkylrest führt zur Chloridfreisetzung und zur Oxidation des Cobalts [Cob(III)alamin]. Die Regenerierung des reduzierten Co (I) erfordert die Anlieferung von zwei Elektronen auf unterschiedlichem Redoxpotentialniveau [Cob(III)alamin/Cob(II)alamin: + 204 mV; Cob(II)alamin/Cob(I)alamin: - 606 mV] (Miller et al. 1996, Wohlfahrt & Diekert 1997). Der letztere Schritt erklärt, dass die verwendeten Elektronendonatoren ein sehr niedriges Redoxpotential besitzen sollten und vermutlich ein reverser, durch den elektrochemischen Gradienten getriebener Elektronentransport vom membranständigen (noch nicht identifizierten) primären Elektronenakzeptor zum Fe-S-Zentrum der Dehalogenase erforderlich ist. Für Chloraromaten-Dehalogenasen wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Katalyse ohne Ausbildung einer Co-C-Bindung verläuft, wobei Cob(I)alamin ebenfalls als Elektronendonator fungiert (Krasotkina et al. 2001). Die prinzipielle Eignung von Cob(I)alamin als Cofaktor für die Dehalogenierung wird durch den Nachweis der nichtbiologischen Dechlorierung von Chloraromaten durch Vitamin B12-Derivate unterstützt (Gantzer & Wackett 1991, Smith & Woods 1994).

Die folgenden corrinoidhaltigen Chloraromaten-Dehalogenasen wurden bisher gereinigt und charakterisiert: die 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat-Dehalogenase von *Desulfitobacterium (Ds.) hafniense* DCB-2 (Christiansen et al. 1998), *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenasen von *Ds. dehalogenans* (van de Pas et al. 1999), *Ds. chlororespirans* (Krasotkina et al. 2001) und *Ds. hafniense* PCP-1 (Boyer et al. 2003) und eine *meta*-Chlorphenol-Dehalogenase von *Ds. hafniense* PCP-1 (Thibodeau et al. 2004). Alle gereinigten Chloraromaten-Dehalogenasen unterschieden sich z.B. im Substratspektrum, Molekulargewicht oder in der N-terminalen Sequenz. Im Unterschied zu den Tetrachlorethen-Dehalogenasen, wurden bisher alle Chloraromaten-Dehalogenasen aus der Membranfraktion isoliert. Eine Chlorbenzen-Dehalogenase-Aktivität von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 wurde ebenfalls in der Membranfraktion nachgewiesen (Hölscher et al. 2003). Experimente mit Methylviologen als künstlichem Elektronendonator, das die Cytoplasmamembran kaum durchdringt, wiesen zudem auf eine periplasmatische Lokalisierung hin. Das wird unterstützt durch die Tatsache, dass alle *rdhA*-Gene eine *Twin-Arginine*-Signalsequenz aufweisen, so dass ein *Twin-Arginine*-Translokon (TAT)-abhängiger Transport in das Periplasma wahrscheinlich ist. Die Assoziation mit der Membran könnte durch *RdhB* vermittelt werden. *RdhA*- und *rdhB*-Gene befinden sich meist in unmittelbarer Nachbarschaft im Genom, meist in der Anordnung

rdhA/rdhB. Interessanterweise sind die Gene für *ortho*-Chlorphenoldehalogenasen in *Desulfitobacterium*-Arten in umgekehrter Reihenfolge angeordnet (z.B. van de Pas et al. 1999). Auf die erstaunliche Multiplizität von Dehalogenase-Genen im Genom (Kube et al. 2005) und ihre möglichen Funktionen wird in Kapitel 3.2 näher eingegangen.

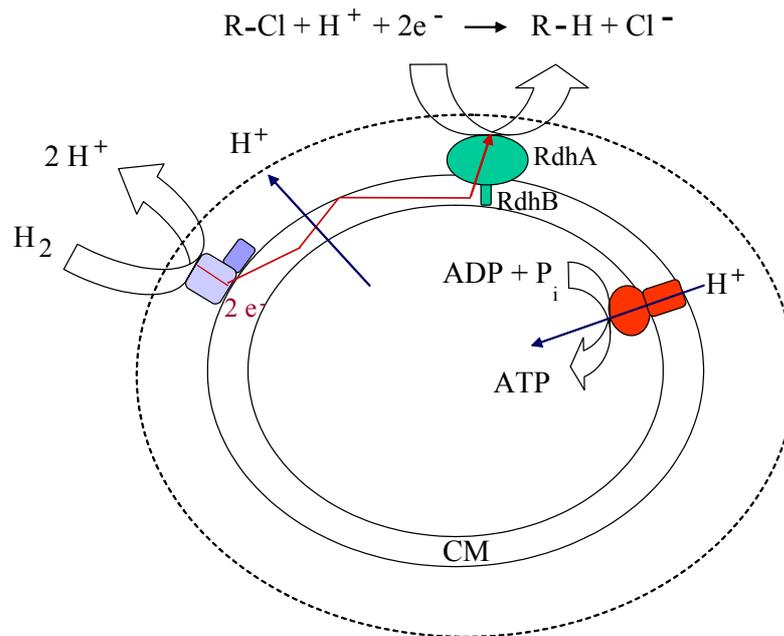


Abb. 9: Schema der Dehalorespiration. R: aromatischer oder aliphatischer Rest; RdhA: Katalytische Untereinheit, RdhB: putativer Membrananker der reduktiven Dehalogenase. Als Elektronendonator kann eine Hydrogenase fungieren (links). Die Energiekonservierung durch die ATPase (rechts) wird durch den Protonengradienten getrieben, der durch Elektronentransport und Hydrogenaseaktivität entsteht.

Desulfomonile (Dm.) tiedjei, ein Deltaproteobakterium, war das erste Isolat, für das die Kopplung der reduktiven Dechlorierung von 3-Chlorbenzoat mit der Synthese von ATP nachgewiesen wurde (Mohn & Tiedje 1991). Inzwischen sind einige Reinkulturen beschrieben, die zur Dehalorespiration mit verschiedenen halogenierten Aliphaten oder Aromaten befähigt sind. Sie gehören zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, den '*Delta*- und *Epsilonproteobacteria*' und den '*Chloroflexi*' (Abb. 10). Eine Vielzahl von Mischkulturen ist beschrieben worden, die unterschiedliche halogenierte Aromaten wie z.B. Pestizide, Chloraniline, Chlorcatechole u.a. reduktiv dehalogenieren

können (Mohn & Tiedje 1992). Die Mehrzahl der bisher isolierten Reinkulturen wurde jedoch auf Halobenzoaten oder -phenolen angereichert. Interessant ist, dass die beiden einzigen bekannten 3-Chlorbenzoat-reduzierenden Isolate zur Gattung *Desulfomonile* (*Dm. tiedjei*, *Dm. limimaris*) gehören (DeWeerd et al. 1990, Sun et al. 2001). Die Fähigkeit zur Dehalorespiration mit Halophenolen ist dagegen in der Gram-positiven Gattung *Desulfitobacterium* stark ausgeprägt (Bouchard et al. 1996, Christiansen & Ahring 1996, Gerritse et al. 1996, Sanford et al. 1996, Utkin et al. 1994, Finneran et al. 2002, Breitenstein et al. 2001; V), aber auch für die Deltaproteobakterien *Desulfovibrio dechloracetivorans* (Sun et al. 2000), *Desulfovibrio* sp. TBP-1 (Boyle et al. 1999) und *Anaeromyxobacter dehalogenans* (Sanford et al. 2002) nachgewiesen.

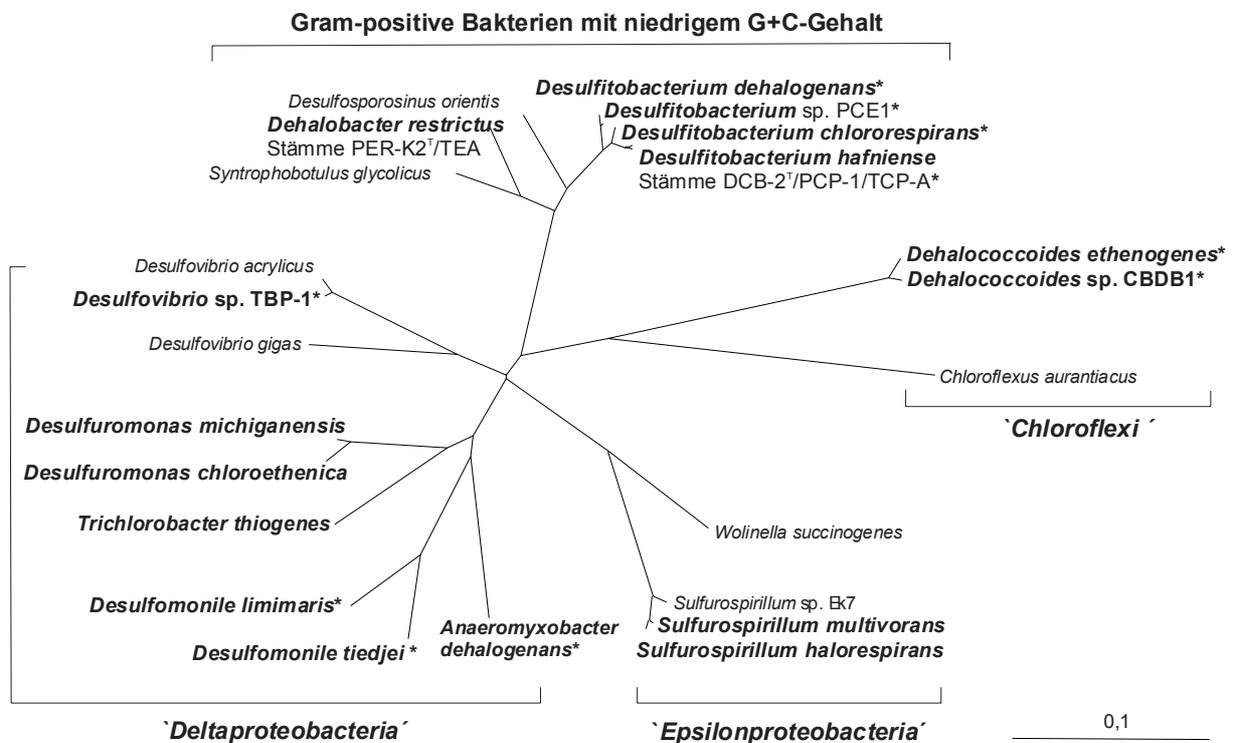


Abb. 10: PHYLIP-Stammbaum (erstellt mit den Programmen DNADIST und NEIGHBOR, Felsenstein 1993) auf der Grundlage von 16S rRNA-Gen-Sequenzen zur Demonstration der phylogenetischen Position von dehalorespirierenden Bakterien (fett hervorgehoben). *Bakterien, die Halogenaromaten wie Chlorbenzoate, -phenole, -benzene, PCB oder Dioxine als Elektronenakzeptor in der Dehalorespiration nutzen. Maßstab: 0,1 Basenaustausche pro Sequenzposition.

Nur zwei Reinkulturen sind bisher bekannt, die nicht durch Hydroxy- oder Carbonylreste aktivierte Verbindungen wie polychlorierte Benzene, Biphenyle, Naphthalene oder Dioxine dechlorieren können. Beide gehören zur Gattung *Dehalococcoides* (*Dh.*) im Phylum

'*Chloroflexi*' und wurden mit chlorierten Benzenen (Adrian et al. 2000) bzw. Tetrachlorethen angereichert und isoliert (Fennell et al. 2004, Maymo-Gatell et al. 1997). Die Isolierung einer Reinkultur aus PCB-dechlorierenden Mischkulturen gelang bisher nicht. Durch Anwendung von molekularen Methoden wurden jedoch zwei Bakterien (o-17 und DF-1) in Mischkulturen identifiziert, die für die positionsspezifische Dechlorierung von Tetrachlorbiphenylen verantwortlich sind (Cutter et al. 2001, Wu et al. 2002). Beide gehören ebenfalls zu den '*Chloroflexi*', aber nicht zum *Dehalococcoides*-Cluster (Sekiguchi et al. 2003), während eine Aroclor 1260-dechlorierende Mischkultur *Dehalococcoides* enthält (Bedard et al. 2006).

3.1 Aspekte der Anreicherung von Chlorphenol-dechlorierenden Bakterien

Ein Problem bei der Anreicherung und Isolierung von Chloraromaten-dehalogenierenden Bakterien besteht in der Toxizität von Ausgangsverbindung und Produkt(en) sowie der geringen Wasserlöslichkeit. Dadurch können nur niedrige Konzentrationen eingesetzt werden, so dass der anreichernde Effekt der Zielverbindung gering ist. Konzentrationserhöhungen sind in manchen Fällen, wie bei Chlorbenzenen (Holliger et al. 1992), durch Dosierung über eine Hexadekanphase möglich, aus der sich stets geringe Konzentrationen nachlösen. Für Chlorphenole und PCDD/F ist dies jedoch ungünstig, da das Verteilungsgleichgewicht der Chlorphenole zu sehr im wäßrigen Bereich, das der Dioxine zu sehr im Lösungsmittelbereich (z.B. $\log K_{\text{Octanol/Wasser}}$ von 1,2,4-TrCDD ist 6.35; Shiu et al. 1988) liegt, so dass in dem einen Fall die Toxizität im Medium zu hoch ist, im anderen zu hohe (und somit unbezahlbare) Konzentrationen von Dioxinen in die Hexadekanphase gegeben werden müßten, damit sich nennenswerte Mengen in die Wasserphase verteilen. Da die chlorierte Verbindung als Elektronenakzeptor dienen soll, müssen außerdem Elektronendonoren und C-Quelle zugesetzt werden. Wenn es sich dabei um organische Verbindungen handelt, werden zugleich auch gärende Organismen co-angereichert. Gibt man Wasserstoff als Elektronendonoren, so vermehren sich im Carbonat-gepufferten Medium auch acetogene Bakterien oder Methanogene.

Die Anreicherung einer 2,4,6-Trichlorphenol (2,4,6-TCP)-dechlorierenden Mischkultur gelang aus Saalesediment (Breitenstein et al. 2001; V). 2,4,6-TCP wurde über 2,4-DCP zu 4-Monochlorphenol (MCP) als Endprodukt dechloriert. Beim Versuch der Isolierung des dechlorierenden Bakteriums aus Weichagarverdünnungsreihen besaßen die isolierten Einzelkolonien zwar Dechlorierungsaktivität, waren aber mikroskopisch heterogen. Die bei der Isolierung von anderen *ortho*-Chlorphenol-dechlorierenden Bakterien in Konzentrationen

von 1-10 mM eingesetzten, weniger toxischen Surrogate 3-Chlor-4-hydroxyphenylacetat (3Cl-4OHPA) (Utkin et al. 1994) oder 3-Chlor-4-hydroxybenzoat (Sanford et al. 1996) wurden nicht durch unsere Mischkultur dechloriert. Die folgende Strategie führte schließlich trotzdem zur Isolierung des dechlorierenden Bakteriums. Zwei aus isolierten Einzelkolonien hervorgegangene Mischkulturen wurden molekularbiologisch untersucht. Die Amplifikation, Klonierung, Restriktionsanalyse (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*: ARDRA) und Sequenzierung von 16S rRNA-Genen zeigte die Anwesenheit verschiedener Clostridien, darunter *Clostridium (Cl.) celerecrescens*, *Cl. propionicum* und ein mit *Cl. hydroxybenzoicum* (Zhang et al. 1994) verwandtes Bakterium. Dot-Blot-Analysen beider Klonbibliotheken zeigten außerdem, dass jeweils ein Klon von 56 bzw. 136 Klonen das 16S rRNA-Gen von *Desulfitobacterium (Ds.)* sp. trug. Da Thiosulfat und Sulfit alternative Elektronenakzeptoren dieser putativ dechlorierenden Bakterien sind, wurde den Weichagerverdünnungsreihen 20 mM Thiosulfat zugesetzt. Die vermutlich aufgrund des gebildeten Sulfids dunkel gefärbten Kolonien wurden isoliert und erwiesen sich durch 16S rRNA-Gen-Analyse als *Desulfitobacterium* mit höchster Ähnlichkeit zu den damals als *Ds. frappieri* beschriebenen Stämmen PCP-1 (Bouchard et al. 1996) und TCE1 (Gerritse et al. 1999) und dechlorierten 2,4,6-TCP zu 4-MCP (Breitenstein et al. 2001; V).

Die Möglichkeit, Thiosulfat generell als Substrat zur Anreicherung von Vertretern der Gattung *Desulfitobacterium* aus der Umwelt einzusetzen, wurde an Chlororganika belasteten Sedimenten der beiden Flüsse Spittelwasser (Bunge et al. 2006; I) und Kymijoki, Finnland untersucht. Das Kymijoki-Sediment enthält bis zu 190 mg (kg d.w.)⁻¹ PCDD und 0,7 mg (kg d.w.)⁻¹ Chlorphenole, die aus einer am Oberlauf gelegenen Produktion des Fungizids Ky-5 stammten (Verta et al. 1999). Das Vorkommen von *Desulfitobacterium* wurde durch Amplifikation der 16S rRNA-Gene, anschließende *nested* PCR mit *Desulfitobacterium*-spezifischen Primern und Sequenzierung in beiden Sedimenten nachgewiesen (Lechner 2001, Vogler 2000, Bunge et al. 2006; I). Anschließend wurden Sedimentproben mit 30 mM Pyruvat und 10 mM Thiosulfat anaerob kultiviert und jeweils nach wenigen Tagen 10 %ig in zwei weitere Passagen überführt. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) zeigte, wie zu erwarten, eine Anreicherung von Gram-negativen, sulfatreduzierenden Bakterien (Sonde SRB385, Manz et al. 1998) auf bis zu 20-40 % der Gesamtzellzahl in der dritten Passage. *Desulfitobacterium* war jedoch mit einer für die Gattung spezifischen, Fluorescein (6-FAM)-markierten Sonde DES-1 (5'-CTG TCT TCA GGG ACG AAG GG-3' [*E. coli*-Nummerierung 434-455]) nicht nachweisbar. Deshalb wurden zur Hemmung der sulfatreduzierenden Bakterien drei weitere Passagen unter Zusatz von 2 mM Molybdat

(Inhibitor der ATP-Sulfurylase, Lie et al. 1999) inkubiert. Dadurch wurden die SRB385-positiven Bakterien vollständig unterdrückt, aber *Desulfitobacterium* wurde mit einem durchschnittlichen Anteil von 10-13 % detektierbar (Abb. 11). Erst in der letzten Passage wurde die Befähigung zur reduktiven Dechlorierung getestet. Eine Anreicherungskultur aus dem Kymijoki dechlorierte 100 μM 2,4,6-TCP nach kurzer lag-Phase vollständig zu 4-MCP, während die vier Anreicherungskulturen aus dem Spittelwasser 2,4,6-TCP nicht (Vogler 2000), aber einige davon 3Cl-4OHPA dechlorieren konnten. Dies zeigt 1.) das ubiquitäre Vorkommen von Desulfitobakterien in Flusssedimenten, 2.) ihr unterschiedliches Dechlorierungspotential und 3.) eine Möglichkeit ihrer schnellen Anreicherung mit Thiosulfat als Elektronenakzeptor.

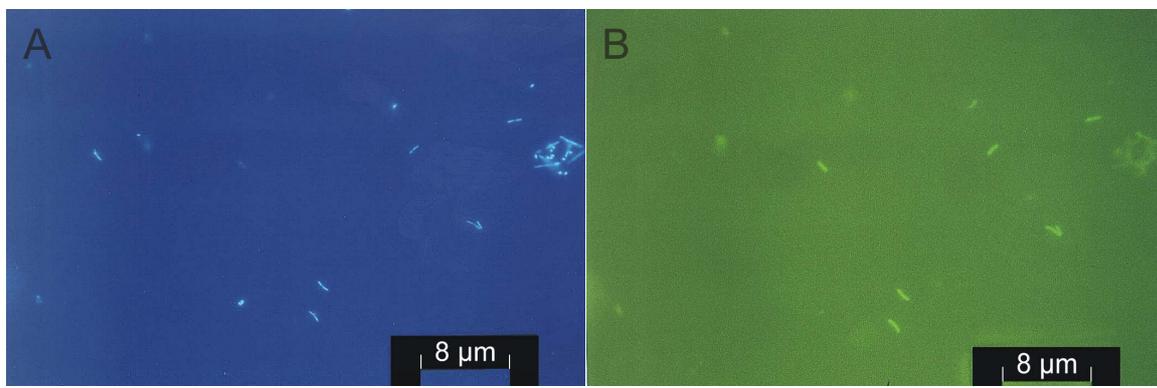


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahme der 6. Passage der Anreicherungskultur aus Sediment des Kymijoki (Finnland) mit 30 mM Pyruvat, 10 mM Thiosulfat und Zusatz von 2 mM Molybdat in den Passagen 3-6 (Vogler 2000). (A) Anfärbung mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol) und (B) entsprechende FISH-Abbildung: Anfärbung von *Desulfitobacterium* mit der Sonde 6-FAM-DES-1.

3.2 Vielseitigkeit der Gattung *Desulfitobacterium*

Innerhalb der Gattung *Desulfitobacterium* wurden bisher folgende Arten beschrieben: *Ds. dehalogenans* (Utkin et al. 1994), *Ds. hafniense* (Christiansen & Ahring 1996), *Ds. frappieri* (Bouchard et al. 1996), *Ds. chlororespirans* (Sanford et al. 1996), *Ds. metallireducens* (Finneran et al. 2002) und *Ds. dichloroeliminans* (De Wildeman et al. 2003). Ein Dendrogramm der 16S rRNA-Gensequenzen einiger Desulfitobakterien (Breitenstein et al. 2001; V, Abb. 1B) zeigt jedoch, dass die *Ds. frappieri*-Stämme mit dem Typstamm von *Ds. hafniense* ein gemeinsames Cluster bilden. Durch DNA-DNA-Reassoziierungsexperimente wurden die Stämme *Ds. 'frappieri'* PCP-1 und *Ds. hafniense* DCB-2^T in eine Art eingeordnet (Niggemyer et al. 2001). Aufgrund der etwas früheren Beschreibung von Stamm DCB-2^T wurden alle *Ds. frappieri*-Isolate in *Ds. hafniense* umbenannt. Inzwischen werden die

folgenden weiteren Stämme, zumeist aufgrund der hohen Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gene, zu *Ds. hafniense* gezählt: TCE1 (Gerritse et al. 1999), DP7 (van de Pas et al. 2001c), PCE-S (Granzow 1998), Y51 (Nonaka et al. 2006), GBFH (Niggemyer et al. 2001) und unser Isolat TCP-A (Breitenstein et al. 2001, V). Die in den Datenbanken hinterlegten 16S rRNA-Gene von *Ds. hafniense*-Stämmen zeigen mit Ausnahme des Typstamms DCB-2^T eine 120 bis 139 bp große Insertion in der variablen Region 1 (V1) (*E. coli*-Positionen 75-94) (van de Pas et al. 2001b, van de Pas et al. 2001c, Breitenstein et al. 2001, V). Eine vorläufige Untersuchung verschiedener *Desulfitobacterium*-Arten und -Stämme ergab jedoch, dass das Vorkommen solcher Insertionen nicht auf *Ds. hafniense* beschränkt ist. Alle untersuchten Arten besaßen mindestens zwei unterschiedliche 16S rRNA-Gene, die sich durch unterschiedlich große Sequenzen innerhalb der V1 unterschieden (Ebersbach et al. 2000). Eine ähnliche Mikroheterogenität in der V1 wurde für die fünfzehn 16S rRNA-Gene von *Cl. paradoxum* beschrieben (Rainey et al. 1996). Das Vorkommen von vergrößerten V1-Bereichen ist vermutlich innerhalb der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt weiter verbreitet, da auch für *Desulfotomaculum*-Arten (Patel et al. 1992, Redburn & Patel 1993), thermophile Clostridien (Rainey et al. 1993) und *Gelria glutamica* (Plugge et al. 2002) ungewöhnlich große V1-Bereiche publiziert wurden.

Für die Gattung ist charakteristisch, dass sie sehr vielseitig in der Verwendung terminaler Elektronenakzeptoren ist. So werden generell nicht nur Thiosulfat sondern meist auch Sulfit, Fumarat, Nitrat und Selenat genutzt (Luijten et al. 2004, Breitenstein et al. 2001; V). Die *Ds. hafniense*-Stämme DCB-2^T, PCP-1, GBFH und TCE1 reduzieren auch Arsenat, Eisen (III) und Manganat mit Lactat als Elektronendonator (Luijten et al. 2004, Niggemyer et al. 2001), aber der Stamm DP7 kann Arsenat nicht und Eisen(III) nur eingeschränkt reduzieren. Die Vielfalt der terminalen Reduktasen offenbart sich auch in der ersten vollständigen Genomsequenz eines *Ds. hafniense*-Stammes (Y51) (Nonaka et al. 2006). Neben einer Sulfitreduktase codiert das Genom auch eine Sulfatreduktase, 59 Paraloge der Molybdopterin-bindende Untereinheiten von DMSO-Reduktasen, 31 Paraloge für die Flavoprotein-Untereinheit der Fumaratreduktase, Nitrat- und Nitritreduktasen, aber nur zwei reduktive Dehalogenasen. Eine davon ist PceA, eine Tetrachlorethen-Dehalogenase (Suyama et al. 2002), die andere ähnelt der *ortho*-Chlorphenol-Reduktase von *Ds. hafniense* PCP-1 (Boyer et al. 2003). Dagegen sind in der partiellen Genomsequenz von *Ds. hafniense* DCB-2^T (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/desha/desha.home.html) neun putative Dehalogenase-Gene vorhanden (Nonaka et al. 2006). Es ist offensichtlich, dass die

enzymatische Ausstattung zur reduktiven Dechlorierung selbst innerhalb der Art *Ds. hafniense* sehr unterschiedlich ist. Während von DP7 bisher kein chlorierter Elektronenakzeptor bekannt ist (van de Pas et al. 2001c), dehalogeniert Stamm TCE1 Tetra- und Trichlorethen, aber weder Chlorphenole noch 3Cl-4OHPA (Gerritse et al. 1999). Stamm PCE-S dechloriert sowohl Chlorethene als auch Chlorphenole (Granzow 1998), während die Stämme DCB-2^T, PCP-1 und TCP-A nur chlorierte Phenole effektiv dehalogenieren und darunter nur Stamm DCB-2^T in der Lage ist, auch 3Cl-4OHPA umzusetzen. Diese drei Stämme unterscheiden sich aber auch im Spektrum der genutzten Chlorphenole. PCP-1 ist der einzige Stamm, der Pentachlorphenol bis zum 3-MCP umsetzt, und damit die Befähigung zur Dechlorierung in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position besitzt. TCP-A kann als einziger *Ds. hafniense*-Stamm 2-MCP teilweise zu Phenol dechlorieren und dechloriert auch 2,3-DCP zu 3-MCP nach Induktion durch 2,4,6-TCP (Breitenstein et al. 2001; V). Die *Ds. hafniense*-Stämme DCB-2^T, PCP-1 und TCP-A sind die bisher einzigen, für die eine Dechlorierung der Chlorphenole in *meta*-Position gezeigt wurde (Madsen & Licht 1992, Bouchard et al. 1996, Breitenstein et al. 2001; V). Durch Translationshemmung mit Chloramphenicol wurde für PCP-1 (Dennie et al. 1998) und TCP-A (Batzke 2002) die Induzierbarkeit von unterschiedlichen *ortho*- und *meta*-Chlorphenol-Dehalogenasen nachgewiesen. Die *ortho*- und *meta* (plus *para*)-Chlorphenol-Dehalogenasen von Stamm PCP-1 wurden gereinigt und die entsprechenden Gene identifiziert (Boyer et al. 2003) bzw. (Thibodeau et al. 2004). Interessanterweise zeigten beide Enzyme kaum Homologie zu der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase von *Ds. dehalogenans* (van de Pas et al. 1999) oder der 3Cl-4OHPA-Dehalogenase von *Ds. hafniense* DCB-2^T (Christiansen et al. 1998). Beide Enzyme besitzen in ihrem Substratspektrum einen wesentlichen Unterschied: sie können im Gegensatz zu dem PCP-1-Enzym neben *ortho*-chlorierten Phenolen auch 3Cl-4OHPA dehalogenieren und wurden nach Anzucht auf 3Cl-4OHPA gereinigt. In der partiellen Genomsequenz von DCB-2^T können nun aufgrund von Sequenzvergleichen drei von putativen neun Dehalogenase-Genen Funktionen zugewiesen werden: 1.) eine 3Cl-4OHPA-Dehalogenase durch Identifizierung des publizierten N-Terminus (Christiansen et al. 1998), 2.) eine *meta*-Chlorphenol-Dehalogenase mit identischer Sequenz zu der von PCP-1 und 3.) eine sich um eine Aminosäure von dem PCP-1-Enzym unterscheidende *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase. Diese Dehalogenasen erklären das bisher beobachtete Spektrum von halogenierten Elektronenakzeptoren von Stamm DCB-2^T. Die Existenz weiterer Dehalogenase-Gene läßt jedoch ein viel breiteres, noch nicht erkanntes Potential zur Dehalogenierung verschiedener halogener Verbindungen erwarten. Die Lokalisierung von Tetrachlorethen-Dehalogenase-

Genen zusammen mit Genen für einen Regulator (PceC) und einen Triggerfaktor (PceT) auf einem Transposon in Stamm TCE1 und die Identifizierung identischer Sequenzen in den Stämmen PCE-S und Y51 weist auf die leichte Übertragbarkeit von Dehalogenase-Genen hin (Maillard et al. 2005). Das große Repertoire an reduktiven Dehalogenasen verbunden mit genetischer Flexibilität, die strikte Regulation der Expression spezifischer Dehalogenasen durch das chlorierte Substrat (Smidt et al. 2000) und die relative Unempfindlichkeit gegenüber niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (Madsen & Licht 1992, Niggemyer et al. 2001) lassen die Gattung *Desulfitobacterium* sehr interessant erscheinen für die Sanierung von mit Chloraromaten bzw. -aliphaten kontaminierten anaeroben Bereichen.

3.3 *Sedimentibacter* – ein häufiger Begleiter in reduktiv dechlorierenden Mischkulturen

Die aus Saalesediment angereicherte, 2,4,6-TCP dechlorierende Mischkultur enthielt ein mit *Cl. hydroxybenzoicum* verwandtes Bakterium in relativ hohem Anteil gemessen an der Häufigkeit des Vorkommens seines 16S rRNA-Gens in zwei Klonbibliotheken (Breitenstein 2001). Die 16S rRNA-Gensequenz des isolierten Bakteriums ZF2^T besaß 94,4 % Identität zu der von *Cl. hydroxybenzoicum* JW/Z-1^T, das als Hydroxybenzoat-decarboxylierendes bzw. Phenol-carboxylierendes und Aminosäuren verwertendes Bakterium beschrieben wurde (Zhang et al. 1994). Phylogenetisch besitzt es eine Sonderstellung innerhalb der Clostridien zwischen Vertretern der Cluster XII- (z.B. *Cl. acidurici*, *Cl. purinolyticum*) und Cluster XIII-Clostridien, die inzwischen zur Familie 'Peptostreptococcaceae' zählen (Garrity et al. 2004) (Abb. 12). Da sich die Gattung *Clostridium* als polyphyletisch herausgestellt hat (Collins et al. 1994), bot sich mit der Isolierung eines zweiten verwandten Bakteriums an, der besonderen Stellung der beiden Stämme Rechnung zu tragen und sie als Vertreter einer neuen Gattung zu beschreiben. *Cl. hydroxybenzoicum* wurde in *Sedimentibacter* (*Se.*) *hydroxybenzoicus* umbenannt und das Isolat aus der Saale als neue Art *Se. saalensis* beschrieben (Breitenstein et al. 2002; VI). *Se. saalensis* ist ein stäbchenförmiges, peritrich begeißeltes Bakterium, das bis zu 130 µm lange Filamente bilden kann. Es kann nicht, wie *Se. hydroxybenzoicus*, Phenol carboxylieren bzw. Hydroxybenzoate decarboxylieren. Die Substratverwertung beider Stämme ist sonst ähnlich: sie können keine Kohlenhydrate verwerten, vergären aber Pyruvat zu Acetat und Butyrat. Glycin oder Lysin werden ebenfalls zu Acetat bzw. Acetat plus Butyrat fermentiert. Glycin kann auch als Elektronenakzeptor und Arginin oder Lysin als Elektronendonator in der Stickland-Reaktion dienen. Beide benötigen den Zusatz von Hefeextrakt (0,01-1,5 %) zum Wachstum.

Inzwischen wurden zwei weitere mit *Se. saalensis* verwandte Stämme isoliert, Stamm BRS2 aus einer Vinylchlorid-dehalogenierenden Kultur (Frank Löffler, Atlanta, Georgia, USA, pers. Mitteilung) und *Sedimentibacter* sp. aus einer β -HCH dechlorierenden Kultur (van Doesburg et al. 2005). Außerdem wurde in einer PCB-dechlorierenden Kultur durch 16S rRNA-Gen-Analyse *Sedimentibacter* mit einem geschätzten Anteil an der Bakteriengemeinschaft von 2,5-7 % nachgewiesen (Bedard et al. 2006). ARDRA-Profile von Dioxin-dechlorierenden Mischkulturen, die aus Spittelwassersediment angereichert wurden, enthielten regelmäßig mit *Se. saalensis* verwandte Sequenzen (Bunge 2004, Wagner 2004).

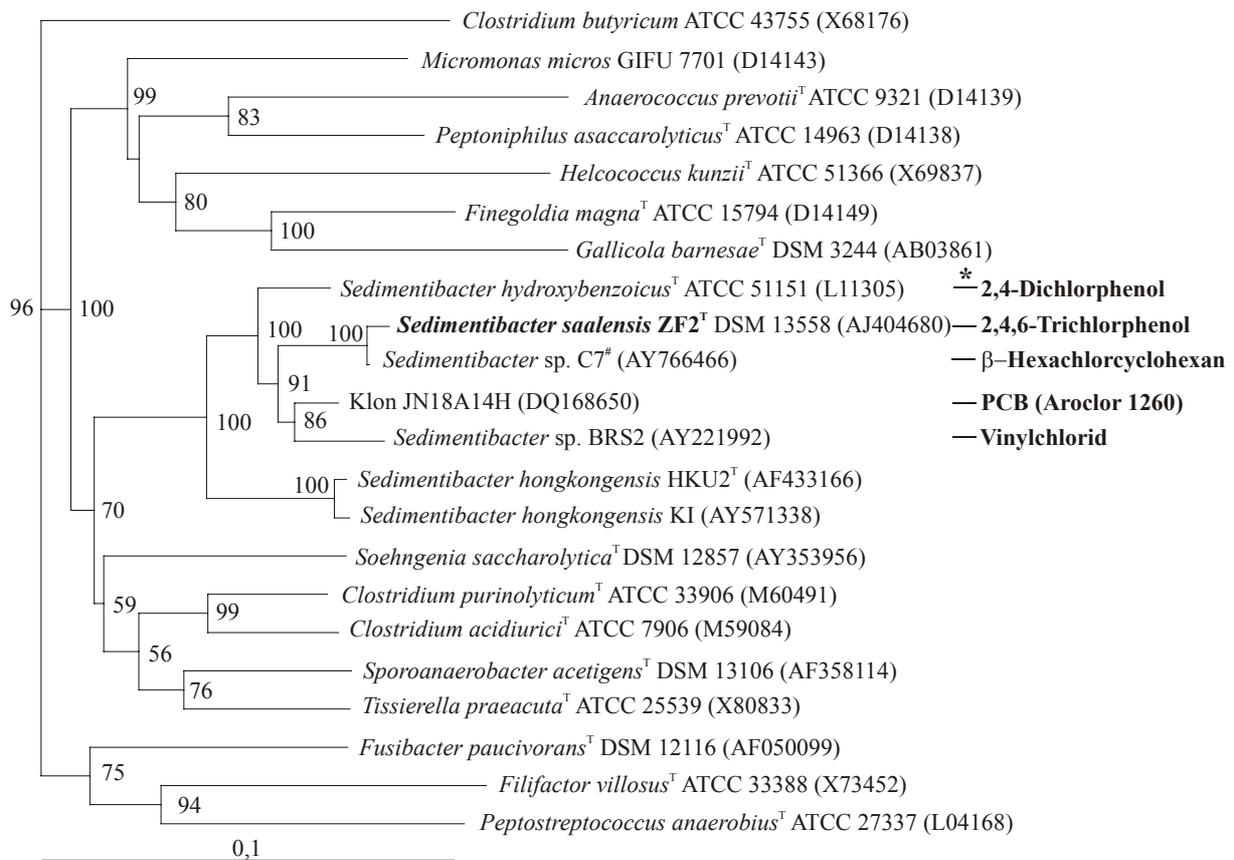


Abb. 12: Neighbor-joining-Dendrogramm (Felsenstein 1993) zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der *Sedimentibacter*-Stämme innerhalb der Familie 'Peptostreptococcaceae' und zu den Vertretern der Cluster XII-Clostridien *Cl. acidurici* und *Cl. purinolyticum*. *Cl. butyricum* wurde als *Outgroup* verwendet. Bootstrap-Werte aus 100 Wiederholungen. Maßstab: 0,1 Basenaustausche pro Sequenzposition. *Chlorierte Verbindungen, mit denen die Anreicherungskulturen versetzt waren; # aus *Sedimentibacter* sp. amplifizierte und klonierte 16S rRNA-Gensequenz (Klon C7).

Es ist interessant, dass die mit dehalogenierenden Mischkulturen assoziierten *Sedimentibacter*-Stämme ein eigenes Cluster bilden (Abb. 12), deutlich verschieden von zwei als *Se. hongkongensis* beschriebenen Isolaten. Letztere wurden aus Blut (Stamm HKU2^T,

(Woo et al. 2004) bzw. das Cyanophycin-abbauende Bakterium KI (Obst et al. 2005) aus Teichsediment isoliert. Über die Gründe des Vorkommens von *Sedimentibacter* in reduktiv dechlorierenden Anreicherungskulturen kann bisher nur spekuliert werden. Es liegt nahe, dass *Sedimentibacter* von den in allen Fällen zugesetzten komplexen Medienbestandteilen (0,01-0,1 % Hefeextrakt oder 0,005 % Pepton) profitierte. Auch Acetat, das das Wachstum von *Se. hydroxybenzoicus* stimuliert (Zhang et al. 1994), wurde entweder zugesetzt oder entstand durch Vergärung von Pyruvat. Kürzlich wurde jedoch in der β -HCH-dechlorierenden Co-Kultur erstmals eine Abhängigkeit des dechlorierenden Bakteriums *Dehalobacter* sp. von *Sedimentibacter* gezeigt. Die Eliminierung von *Sedimentibacter* führte zum Verlust der Dechlorierungsaktivität (van Doesburg et al. 2005). Als Vermittler der stimulierenden Wirkung kann Wasserstoff ausgeschlossen werden, da *Sedimentibacter* bei Wachstum auf Pyruvat oder Hefeextrakt keinen bildet (Breitenstein et al. 2002; VI). Vermutlich könnte die Aufklärung dieser speziellen Interaktion sehr zur Verbesserung von Strategien für die Isolierung von reduktiv dechlorierenden Bakterien beitragen.

3.4 Reduktive Dehalogenierung von polychlorierten Dioxinen und die Rolle von *Dehalococcoides*

Die ersten Hinweise, dass PCDD/F *in situ* reduktiv dehalogeniert werden, wurden aus Vergleichen der Konzentrationen bestimmter Kongenere in datierten Sedimentkernen des Ketelmeeres (Niederlande) mit einer archivierten, 18 Jahre alten Oberflächenprobe gewonnen (Beurskens et al. 1993). Während die Konzentration von höher chlorierten 2,3,7,8-substituierten Kongeneren relativ zur archivierten Probe abgenommen hatte, war eine Anreicherung von 2,3,7,8-TeCDD zu verzeichnen. Eine in Queensland, Australien, vorhandene, natürliche Dioxinbelastung von aquatischen Sedimenten, die durch Ablagerung von angeschwemmten dioxinbelasteten Schwebstoffen über Jahrhunderte entstanden ist, unterliegt ebenfalls Dechlorierungsprozessen mit einer spezifischen Anreicherung von lateral dechlorierten Kongeneren (Gaus et al. 2002). Die Arbeitsgruppe von Peter Adriaens hat eine Reihe abiotischer Dechlorierungsreaktionen von Dioxinen nachgewiesen (Adriaens et al. 1996, Barkovskii & Adriaens 1998, Fu et al. 1999) (zusammengefasst in Adrian & Lechner 2004; VII), aber auch den ersten Nachweis der Beteiligung von Mikroorganismen an dem Dechlorierungsprozeß erbracht (Adriaens et al. 1995, Adriaens & Grbic-Galic 1994). Seitdem wurde die mikrobielle reduktive Dechlorierung von zugesetzten Einzelkongeneren oder vorhandenen Sedimentbelastungen in einigen Mikrokosmen und Anreicherungskulturen

nachgewiesen. Mit Ausnahme einer Aquiferprobe (Adriaens & Grbic-Galic 1994) stammten alle Kulturen aus aquatischen Sedimenten folgender Regionen: Ketelmeer-See, Sedimentationszone des Rheins in den Niederlanden (Beurskens et al. 1995); Hudson-River, Fort Edward, NY, USA (Adriaens et al. 1995, Adriaens & Grbic-Galic 1994); Passaic River, in der Nähe einer früheren 2,4,5-T-produzierenden Fabrik, NJ, USA (mit $21 \mu\text{g kg}^{-1}$ 2,3,7,8-TeCDD sehr hoch belastet) (Albrecht et al. 1999, Barkovskii & Adriaens 1996, Fu et al. 2001, Fu et al. 2005); Wilde Saale, Halle (Ballerstedt et al. 1997; XIII, Ballerstedt et al. 2004; X); Mulde und Leine, Kreis Bitterfeld (Bunge et al. 1999); Spittelwasser, Kreis Bitterfeld (Bunge et al. 2001; IX); Arthur Kill-Ästuar, NJ, USA (Vargas et al. 2001); San Diego-Bucht, CA, USA und Tuckerton, NJ, USA (Ahn et al. 2005); Suwa-See, Japan (Hiraishi et al. 2005a, Hiraishi et al. 2005b); PCDD/F-kontaminierter Fluß, Japan (Yoshida et al. 2005).

3.4.1 Dioxindechlorierende Anreicherungskulturen und Regiospezifität der reduktiven Dechlorierung

Die genannten Untersuchungen zur reduktiven Dechlorierung von Dioxinen unterschieden sich prinzipiell in der Zielstellung. Während z.B. Barkovskii & Adriaens (1996) auf den Umsatz hochchlorierter Dioxine in relativ niedrigen Konzentrationen (nM) durch möglichst ursprüngliche Sedimentproben bzw. daraus eluierte Bakterien fokussierten, d.h. vor allem die möglichen Dechlorierungswege einer (realen) Dioxinkontamination aufklären wollten, interessierten wir uns vor allem für Unterschiede in der Regiospezifität der Dechlorierung durch Mischkulturen verschiedener Herkunft und die Anreicherung und Identifizierung der verantwortlichen Bakterien. Deshalb wurde in Anlehnung an Beurskens et al. (1995) 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,4-TeCDD) als Elektronenakzeptor verwendet, das zu vertretbarem Preis als Reinsubstanz zu beziehen und in relativ hohen Konzentrationen (μM) eingesetzt werden konnte. Diese nur an einem Ring chlorierte Verbindung besitzt eine wesentlich geringere Toxizität verglichen mit 2,3,7,8-substituierten Kongeneren. Außerdem war die Zahl der möglichen Dechlorierungsprodukte auf neun begrenzt (1,2,3- und 1,2,4-TrCDD, 1,2-, 1,3-, 1,4-, 2,3-DiCDD, 1-MCDD, 2-MCDD, Dibenzo-*p*-dioxin), so dass die Dechlorierung analytisch leichter zugänglich war. In einem ersten Screening wurden Proben von dioxinbelasteten Böden aus Bitterfeld, Mineralöl-kontaminiertem Aquifer-Material, Boden von einem Herbizid-Lagerplatz, Faulschlammproben aus kommunalen Abwasseranlagen und eine Sedimentprobe aus der Wilden Saale, Halle, 1 : 1 mit anaerobem Mineralmedium, $50 \mu\text{M}$ 1,2,3,4-TeCDD und je 5 mM Pyruvat, Acetat, Benzoat und Fumarat

versetzt und über ca. 1 Jahr beprobt (Ballerstedt et al. 1997; XIII). Dechlorierungsprodukte wurden nur in der Sedimentprobe und erstmals nach drei Monaten nachgewiesen. Neben Spuren beider TrCDDs war am Ende der Inkubation etwa 30 mol-% 1,3-DiCDD gebildet worden. Zur Untersuchung des Dechlorierungsweges wurden Subkulturen mit den beiden möglichen intermediären TrCDDs angelegt. Bei Inkubation mit 1,2,4-TrCDD trat als ausschließliches dichloriertes Intermediat 1,3-DiCDD auf, während 1,2,3-TrCDD zu 2,3- und 1,3-DiCDD dechloriert wurde. In beiden Kulturen wurden auch geringe Mengen 2-MCDD, aber kein Dibenzo-*p*-dioxin nachgewiesen. Daraus wurde ein Dechlorierungsweg für 1,2,3,4-TeCDD mit einem lateralen und zwei aufeinander folgenden peripheren Dechlorierungsschritten (in den Positionen 1 und 4) über 1,2,4-TrCDD, 1,3-DiCDD zu 2-MCDD abgeleitet (Ballerstedt et al. 1997; XIII, Abb. 5). Die ersten beiden Schritte entsprechen den jeweils thermodynamisch günstigsten Reaktionen mit ΔG^0 -Werten von – 175 bzw. – 153 kJ (Huang et al. 1996). Die Dechlorierung von 1,2,3-TrCDD erfolgte jedoch gleichzeitig an einer lateralen und einer peripheren Position (- 165 bzw. - 152 kJ pro Reaktion), mit leichter Bevorzugung der letzteren, was thermodynamisch nicht zu begründen ist. Eine zwei Jahre später mit einer Sedimentprobe von der gleichen Stelle angeimpfte Kultur zeigte nicht nur das gleiche Dechlorierungsmuster, sondern auch die gleiche lag-Phase (Werner 1997). Die lange lag-Phase bis zum Beginn der reduktiven Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCDD deutet auf die geringe Zahl vorhandener dioxindechlorierender Bakterien im Sediment hin, was eventuell mit der geringen Konzentration von PCDD/F im Saalesediment (12 ng I-TEQ [kg d.w.]⁻¹) zusammenhängen könnte.

Sedimente der Mulde (Proben M1 und M3 bei Muldenstein), der Leine (bei Greppin) und des Spittelwassers, alle aus der Region Bitterfeld, besitzen deutlich erhöhte PCDD/F-Gehalte (464, 44, 70 bzw. 80 000 ng TEQ [kg d.w.]⁻¹). Sie wurden ebenfalls als Inokulum für primäre Anreicherungskulturen unter Zusatz von 25 μ M 1,2,3,4-TeCDD verwendet. Aus dem Spittelwasser wurden jeweils drei Sedimentschichten aus zwei benachbarten Sedimentkernen (A, B) untersucht. Nach ca. 8 Monaten waren in allen Ansätzen Dechlorierungsprodukte entstanden (Bunge & Lechner 2001). Die stärkste Dechlorierung war in zwei Spittelwasserproben mit 90 und 79 mol-% Umsatz des zugesetzten 1,2,3,4-TeCDD nachweisbar (Bunge et al. 2001; IX) und damit höher als zu dem vergleichbaren Zeitpunkt in der Saale-Anreicherungskultur. Besonders interessant war das Auftreten verschiedener Produktspektren. Die anschließend in Subkulturen mit 1,2,3- und 1,2,4-TrCDD untersuchten Dechlorierungswege ließen sich zu drei Dechlorierungsmustern zusammenfassen (siehe Abb. 3 in Adrian & Lechner 2004; VII). Das Muster „S“ entspricht dem oben beschriebenen aus

der Saale-Kultur und wurde ebenfalls in einer der Mulde-Proben (M1) identifiziert. Es ist durch vorzugsweise periphere Dechlorierungsschritte charakterisiert. Dieses Muster wurde auch für Sedimentproben des Hudson-River-Ästuars vor Arthur Kill nach einer dreijährigen Vorinkubation mit Monobromphenolen beschrieben (Vargas et al. 2001). Im Unterschied dazu ist das Muster „M“ durch die gleichzeitige Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCDD an peripheren und lateralen Positionen charakterisiert, was sich in der Bildung von 1,3- und 2,3-DiCDD äußerte. Es wurde sowohl in einer Mulde (M3)-, der Leine- und zwei Spittelwasserproben identifiziert und wurde erstmals für eine mit Hexachlorbenzen aus dem Ketelmeer-Sediment angereicherte Mischkultur beschrieben (Beurskens et al. 1995). Das dritte Muster „SP“ wurde nur in Proben aus zwei Schichten des Spittelwassersedimentes beobachtet: die Chlorid-Eliminierung erfolgte nur von C-Atomen, die beidseitig von ebenfalls chlosubstituierten C-Atomen flankiert waren, sich also an lateralen Positionen befanden (Abb. 13). Entsprechend wurde 1,2,3,4-TeCDD nur zum 1,2,4-TrCDD dechloriert. Auch in den Subkulturen wurde 1,2,4-TrCDD nicht umgesetzt, während 1,2,3-TrCDD an der doppelt flankierten Position zu 1,3-DiCDD dechloriert wurde (Bunge et al. 2001; IX). Eine ebenso strikte Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCDD zu 1,2,4-TrCDD wurde kürzlich für relativ unbelastetes Ästuar-Sediment beschrieben (Ahn et al. 2005).

Die Redoxpotentiale der Paare 1,2,3,4-TeCDD/1,2,4-TrCDD und 1,2,3-TrCDD/1,3-DiCDD gehören mit zu den höchsten für Dioxine berechneten (Huang et al. 1996). Dies entspricht dem Postulat, dass der Dechlorierungsweg den Redoxpaaren folgt, deren Dechlorierung den höchsten energetischen Ertrag verspricht (Dolfing & Harrison 1993). Interessanterweise trifft für 2,3,7,8-substituierte Dioxine aller Homologengruppen zu, dass die Dechlorierung in lateralen, doppelt flankierten Positionen jeweils den niedrigsten $\Delta G^{0'}$ bzw. höchsten E_0' -Wert besitzt. Der Nachweis von Bakterien dieses Dechlorierungstyps im Spittelwassersediment deutet auf die Existenz eines effizienten Entgiftungsprinzips hin, da bereits ein Dechlorierungsschritt für die Bildung einer wesentlich weniger toxischen Verbindung ausreicht. Trotz der möglicherweise höheren energetischen Effizienz hat der strikt an doppelt flankierte Chloratome gebundene Dechlorierungsschritt einen erheblichen Nachteil: er entzieht das Dioxinkongener sofort weiteren Dechlorierungsschritten. Ein entsprechend geringeres Wachstum der dehalogenierenden Bakterien könnte die Ursache dafür sein, dass die Dechlorierungsaktivität nach dem weiteren 10 %igen Transfer in Subkulturen nicht erhalten blieb.

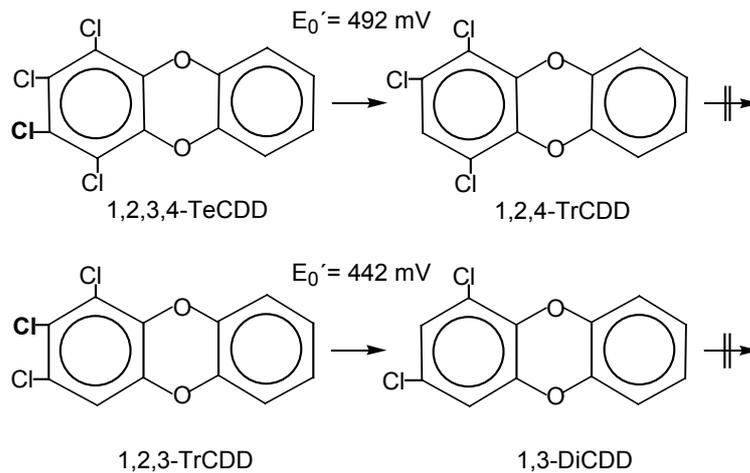


Abb. 13: Strikt laterales Dechlorierungsmuster „SP“ in Anreicherungskulturen aus Spittelwassersediment: die eliminierten, doppelt Chlor-flankierten Chloratome sind fett hervorgehoben.

Die anderen Kulturen wurden entweder mit 1,2,4-TrCDD oder 1,2,3-TrCDD weiter in Subkulturen überführt. Die Anreicherungskultur aus Saalesediment wurde ca. zwanzig Mal, die anderen Anreicherungskulturen fünf bis sieben Mal transferiert und behielten Dechlorierungsaktivität auch in Abwesenheit komplexer Sedimentbestandteile. Dabei veränderte sich allerdings das ursprüngliche komplexe Dechlorierungsmuster „M“. Eine Anreicherungskultur aus dem Oberflächensediment des Spittelwassers verlor z.B. nach sechs Transfers auf 1,2,4-TrCDD, das stets in peripherer Position dechloriert wurde, die Fähigkeit zur lateralen Dechlorierung fast vollständig, d.h. nach sechs Transfers angebotenes 1,2,3-TrCDD wurde ausschließlich zu 2,3-DiCDD umgesetzt. Das deutet auf die Beteiligung unterschiedlicher dechlorierender Bakterien an der Ausprägung komplexer Dechlorierungswege hin und zeigt, dass bestimmte Dechlorierungsschritte durch den Einsatz geeigneter Substrate gefördert werden können. Für Bakterien aus Passaic-River-Sediment wurde z.B. beschrieben, dass bei Zusatz von 2-Bromdibenzo-*p*-dioxin die reduktive Dechlorierung einer historischen Dioxinbelastung (Albrecht et al. 1999) oder des zugesetzten 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD nicht nur in einem größeren Ausmaß erfolgte (Fu et al. 2005), sondern auch der Anteil des intermediären 2,3,7,8-TeCDD sank, was auf die Stimulierung lateraler Dechlorierungsschritte hinweist. Dieser auch als „Priming“ bezeichnete stimulierende Effekt (Bedard et al. 1998) wurde kürzlich ebenfalls für die Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCDD und 1,2,3,4-Tetrachlordibenzofuran durch Zusatz von 1,2,3,4-Tetrachlorbenzen oder 2,3,4,5-Tetrachloranisol beobachtet (Ahn et al. 2005). Es ist zu vermuten, dass der „Halo-Primer“, der meist in einer höheren Konzentration als die Zielverbindung zugesetzt wird, das Wachstum der dehalogenierenden Bakterien fördert, so dass die Effizienz des Umsatzes der

Zielverbindung aufgrund der höheren Zellzahl steigen kann. Dieser Gedanke wird durch die Existenz von Dehalogenasen mit unterschiedlichen Substratspektren in einem Bakterium (Magnuson et al. 1998, van de Pas et al. 2001a) gestützt. Ob das „Priming“ eine Komponente von Sanierungsverfahren werden kann, hängt von den Verbindungen ab, die als „Halo-Primer“ in Frage kommen. Während die Ausbringung von hochchlorierten, selbst relativ persistenten Aromaten als „Primer“ undenkbar ist, gibt es den Nachweis der Stimulierung der PCB-Dechlorierung z.B. durch bromierte Benzoate, die selbst dehalogeniert und im Folgenden vollständig mineralisiert wurden (DeWeerd & Bedard 1999). Das intermediäre Benzoat kann möglicherweise als zusätzliche Quelle für Reduktionsäquivalente für den Dechlorierungsprozess dienen, wie für ein 3-Chlorbenzoat-abbauendes Konsortium beschrieben wurde (Mohn & Tiedje 1992).

3.4.2 Mikrobielle Zusammensetzung von dioxindechlorierenden Mischkulturen

Um erste Informationen über die am Dechlorierungsprozess beteiligten Bakterien zu erhalten, wurde zunächst die Rolle bestimmter Bakteriengruppen in den sedimentfreien Anreicherungskulturen aus Saalesediment untersucht. Durch Pasteurisation und Einsatz von Hemmstoffen gegen Methanogene, sulfatreduzierende oder Gram-positive Bakterien wurde festgestellt, dass Methanogene nicht an der Dechlorierung beteiligt und die dechlorierenden Bakterien hitzeempfindlich, Vancomycin-resistent und keine Sulfatreduzierer sind (Ballerstedt et al. 2004; X). Obwohl in der Saale-Anreicherungskultur *Desulfitobacterium* nachgewiesen wurde, war also die Beteiligung des Gram-positiven Endosporenbildners an der Dioxindechlorierung unwahrscheinlich. Dem entsprach das Ergebnis der Untersuchung von drei *Desulfitobacterium*-Reinkulturen PCE1, *D. dehalogenans* JW/IU-DC1^T und *D. hafniense* DCB-2^T, die weder 1,2,3,4-TeCDD noch TrCDDs dechlorieren konnten.

Einzelne Mitglieder der Mischkultur wurden aus Weichagarverdünnungsreihen isoliert. Einige entnommene Einzelkolonien dechlorierten 1,2,4-TrCDD. Ein daraus isoliertes Bakterium, EK7, wurde als *Sulfurospirillum* sp. identifiziert und näher charakterisiert. Da es die oben genannten, prinzipiellen Eigenschaften besaß und auf der Basis der 16S rRNA eng verwandt mit den Tetrachlorethen-dechlorierenden Arten *Sulfurospirillum* (früher *Dehalospirillum*) *multivorans* (Scholz-Muramatsu et al. 1995) und *Sulfurospirillum halorespirans* (Luijten et al. 2003) ist, schien es als dioxindechlorierendes Bakterium prädestiniert. Die Reinkultur war jedoch weder zur Dechlorierung verschiedener Dioxinkongenere noch zur Dechlorierung von Tetrachlorethen oder HCB in der Lage. Die

Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung der Kultur durch ARDRA hatte einen relativ hohen Anteil der *Sulfurospirillum*-16S rRNA-Gene in der Mischkultur ergeben, was sich jedoch vermutlich aus der typischen Befähigung von *Sulfurospirillum* zur Atmung oder Gärung mit Fumarat, einem Bestandteil des Elektronendonator-Gemisches, erklärt. Der ebenfalls als Reinkultur isolierte und als häufigste Komponente im ARDRA-Profil nachgewiesene *Trichococcus*-Stamm nutzte wahrscheinlich das zugesetzte Pyruvat. Auch *Acetobacterium*, ein acetogenes Bakterium, wurde als Mitglied der Mischkultur identifiziert. Obwohl ARDRA einen schnellen und kultivierungsunabhängigen Zugang zur mikrobiellen Diversität von Mischkulturen liefert, hat diese Methode den Nachteil, nur einen der Größe der Klonbibliothek entsprechenden Ausschnitt der Mischkultur zu repräsentieren und Bakterien mit geringerer Zellzahl nicht zu erfassen. Um die Anwesenheit verschiedener bekannter Bakterien mit einem prinzipiellen Dechlorierungspotential in den Anreicherungskulturen zu untersuchen, wurden die 16S rRNA-Gene aus der Mischkultur mit Bacteria-spezifischen Primern amplifiziert und das PCR-Produkt in *nested*-PCR-Ansätzen mit spezifischen Primern zur Detektion von *Dehalobacter restrictus*, *Desulfomonile tiedjei*, *Sulfurospirillum multivorans*, *Desulfuromonas chloroethenica*, *Desulfitobacterium* spp. and *Dehalococcoides* spp. eingesetzt. Erhaltene PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung überprüft (Bunge & Lechner 2001, Ballerstedt et al. 2004; X). Bis auf *Desulfomonile tiedjei* wurden alle Organismen in zwei oder mehr Anreicherungskulturen nachgewiesen (zusammengefasst in Adrian & Lechner 2004; VII, Tabelle 1). Ein Zusammenhang des Auftretens bestimmter Bakterien mit dem beobachteten Dechlorierungsweg oder eingesetzten TrCDD bestand nicht. Interessant war jedoch, dass in allen Kulturen sowohl *Desulfitobacterium* als auch *Dehalococcoides* nachgewiesen wurden. Da *Desulfitobacterium* aus den oben genannten Gründen ausschied, richtete sich unser Interesse auf *Dehalococcoides*. Das etwa 600 bp lange Amplikon des 16S rRNA-Gens war in allen Kulturen identisch mit der Sequenz von *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1, ein aus der Saale isoliertes, Trichlorbenzen als Elektronenakzeptor nutzendes Bakterium (Adrian et al. 2000).

3.4.3 Reduktive Dechlorierung von Dioxinen durch *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1

In Zusammenarbeit mit Dr. Lorenz Adrian, TU Berlin, wurde die reduktive Dechlorierung ausgewählter Dioxinkongenere durch Stamm CBDB1 untersucht (Bunge et al. 2003, XI). Die auf 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzen (TCB) angezogenen Zellen wurden in Mineralmedium ohne komplexe Zusätze (Adrian et al. 2000) mit Wasserstoff als Elektronendonator, Acetat als

C-Quelle und einem der Dioxinkongeneren 1,2,4-TrCDD, 1,2,3-TrCDD, 1,2,3,4-TeCDD oder 2,3-DiCDD überführt. Nach einer lag-Phase von 20 bis 30 Tagen setzte die Dechlorierung ein und führte in jedem Fall zu 2-MCDD als Endprodukt. Die Produkt- und Intermediatbildung entsprach einem modifizierten Muster „M“: Das Hauptprodukt des Umsatzes von 1,2,3,4-TeCDD war 2,3-DiCDD, das nur aus 1,2,3-TrCDD als Intermediat entstehen kann. Beim Umsatz von 1,2,3-TrCDD entstand ebenfalls mehr 2,3- als 1,3-DiCDD. Gegenüber dem klassischen Muster „M“ (siehe Adrian & Lechner 2004; VII, Abb. 2) bestand die Modifizierung in einer bevorzugten Dechlorierung an peripheren Positionen, wie sie auch in den späteren Passagen der Anreicherungskultur aus Oberflächensediment des Spittelwassers beobachtet wurde. Dies spricht dafür, dass durch die gewählten Bedingungen, eine Stamm CBDB1 sehr ähnliche *Dehalococcoides*-Population aus Spittelwassersediment angereichert worden war. Unterschiede der Dechlorierungswege von Stamm CBDB1 und dem in der Mischkultur enthaltenen *Dehalococcoides*-Stamm bestehen in der Befähigung von CBDB1 zur Eliminierung eines lateralen Chloratoms von 2,3-DiCDD, während die mit 1,2,4-TrCDD angereicherte Mischkultur diese Befähigung nicht mehr besitzt, was sich in der fast stöchiometrischen Akkumulation von 2,3-DiCDD beim Umsatz von 1,2,3-TrCDD zeigte (Ewald 2005). Um das Potential zur Dechlorierung von an beiden Ringen halogenierten Dioxinen, insbesondere von 2,3,7,8-substituierten, zu testen, wurde Stamm CBDB1 mit 1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin inkubiert. Auch diese Verbindung wurde durch Stamm CBDB1 dechloriert, wenn auch sehr langsam (ca. 80 nM innerhalb von 104 Tagen). Der aus den gebildeten Intermediaten abgeleitete Dechlorierungsweg (siehe Bunge et al. 2003; XI, Abb. 3b) spiegelte den Dechlorierungsprozess von 1,2,3-TrCDD bzw. 2,3-DiCDD wider, d.h. zuerst wurde das periphere Chloratom unter Bildung von 2,3,7,8-TeCDD eliminiert und anschließend wurde jeweils eines der beiden einfach flankierten lateralen Chloratome beider Ringe abgespalten, so dass als Endprodukt ein DiCDD entstand.

Somit gelang der erste Nachweis der reduktiven Dechlorierung von Dioxinen durch eine Reinkultur. Beobachtungen aus Mikrokosmen, die höher chlorierte 2,3,7,8-substituierte Kongenere umsetzten (Albrecht et al. 1999), können jetzt durch die Aktivitäten eines einzigen Bakteriums erklärt werden: durch vorwiegend periphere Dechlorierungsschritte (entgegen den thermodynamischen Vorhersagen) entsteht intermediär das toxische 2,3,7,8-TeCDD, das jedoch durch anschließende Dechlorierung in lateralen Positionen zu niedrig chlorierten Kongeneren umgewandelt wird. Erst kürzlich wurden semi-anaerobe Mikrokosmos-Experimente publiziert, die nicht nur die reduktive Dechlorierung von PCDD/F in anaerobem Sediment beschreiben, sondern, gestützt auf die Gesamtabnahme der Dioxine und die Bildung

von Catechol und Salicylat in den Mikrokosmen, auf einen anschließenden vollständigen (aeroben) Abbau hindeuten (Hiraishi et al. 2005a, Yoshida et al. 2005).

Das besondere Potential von *Dehalococcoides* und verwandten Bakterien zur reduktiven Dechlorierung von PCDD/F wurde inzwischen dadurch belegt, dass auch *Dh. ethenogenes* Stamm 195 zur Dechlorierung von 1,2,3,4-TeCDD befähigt ist (Fennell et al. 2004). Allerdings setzte dieser Stamm weder 2,3,7,8-TeCDD noch 2,3-DiCDD um, scheint also zur Dechlorierung von lateralen Chloratomen nicht befähigt zu sein. Auch die oben genannten semi-anaeroben Mikrokosmen enthielten verschiedene Vertreter der '*Chloroflexi*', auf 16S rRNA-Ebene entfernt verwandt mit *Dehalococcoides* (Yoshida et al. 2005) bzw. identisch mit *Dehalococcoides* sp. Stamm CBDB1 (Hiraishi et al. 2005a), ein Beleg dafür, dass *Dehalococcoides* Überlebenschancen auch in relativ oberflächennahen, sauerstoffexponierten Schichten findet.

3.4.4 Ausblick

Identifizierung von Dioxin-Dehalogenasen

Die Existenz einer Dioxin-dechlorierenden Reinkultur eröffnet die Möglichkeit, die Regulation und Biochemie der reduktiven Dechlorierung von PCDD/F zu untersuchen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Vorhersage und das Verständnis der *in situ* ablaufenden Dechlorierungsprozesse und ihrer Grenzen. Vor dem Hintergrund der publizierten Genomsequenzen von zwei *Dehalococcoides*-Stämmen (Kube et al. 2005, Seshadri et al. 2005) erscheinen solche Untersuchungen besonders reizvoll, da die Vielfalt der putativen Dehalogenase-Gene (17 in Stamm 195 bzw. 32 in Stamm CBDB1) und der benachbarten Gene für MarR-Typ- oder Zweikomponenten-Regulatoren viele Fragen nach der individuellen Funktion der Dehalogenasen, ihrer Regulation und dem vermutlich noch verborgenen Spektrum dehalogenierbarer Substanzen aufwirft. Konventionelle biochemische Untersuchungen sehen sich jedoch dem Problem ausgesetzt, dass aufgrund der hohen Verdopplungszeiten und der Schwierigkeit, große Mengen von den toxischen und schwer löslichen Elektronenakzeptoren zu applizieren, nur geringe Zellmengen gewonnen werden können. So wurden die TCE- und PCE-Dehalogenasen von Stamm 195 aus einer leichter zu gewinnenen Mischkultur gereinigt und charakterisiert (Magnuson et al. 2000, Magnuson et al. 1998). Experimentell leichter zugänglich, da auf weniger Zellmaterial angewiesen, erscheint zur Zeit die vergleichende Transkriptionsanalyse von Dehalogenase-Genen. Auf diese Weise wurden eine Vinylchlorid-Dehalogenase identifiziert (Krajmalnik-Brown et al. 2004) und das

Dehalogenase-Transkriptionsmuster in TCE-, *cis*-DCE und VC-dechlorierenden Mischkulturen untersucht (Waller et al. 2005). Im Vorfeld für Transkriptionsanalysen der Dioxin-Dehalogenase(n) wurden inzwischen neun Primerpaare entwickelt, um alle 32 Dehalogenasegene oder cDNA ihrer Transkripte aus Stamm CBDB1 amplifizieren zu können. Als Methode für eine schnelle, quantitative Differenzierung der in jeder amplifizierten Gruppe enthaltenen Dehalogenasegene oder -transkripte hat sich terminale Restriktionsfragmentlängenanalyse (t-RFLP) bewährt (Wagner et al. 2006). Damit gelang auch der Nachweis von insgesamt 21 Genen für putative Dehalogenasen in der dioxindechlorierenden Mischkultur aus dem Spittelwasser, die meist Orthologe in Stamm CBDB1, aber z. T. auch in *Dh. ethenogenes* 195 und *Dehalococcoides* sp. BAV1 besitzen. Das nächste Ziel ist die Identifizierung von Chlorbenzen- und Dioxin-Dehalogenasen durch Transkriptionsanalysen von entsprechend angezogenen Zellen. Dies würde neue Perspektiven für die molekularbiologisch-biochemische Untersuchung der Regulation als auch für die Analyse des Dechlorierungspotentials in kontaminierten Habitaten durch Nachweis der entsprechenden funktionellen Gene eröffnen.

Erfassung der Dioxin-dechlorierenden Aktivität an belasteten Standorten

Das komplexe Kongenerenmuster einer Dioxinkontamination und die geringen Umsatzraten erschweren die Beobachtung von *in situ* ablaufenden Dechlorierungsprozessen. Vor kurzem wurde jedoch gezeigt, dass die reduktive Dechlorierung von chlorierten Ethenen (Nijenhuis et al. 2005), und Benzenen (Griebler et al. 2004) zu einer Kohlenstoffisotopenfraktionierung führt. Chloratome werden vorzugsweise von ^{12}C -Atomen abgespalten, so dass die Ausgangsverbindung im Dechlorierungsprozess ^{13}C -angereichert und damit schwerer wird, während das entstehende Produkt isotopisch leichter ist. Mit GC-C-IRMS (*Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry*) steht eine Technik zur Verfügung, mit der Änderungen der Isotopenzusammensetzung von Xenobiotica in Umweltproben erfasst werden können. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Ewald 2005) wurde gezeigt, dass auch Dioxine, in diesem Fall 1,2,4-TrCDD, während der reduktiven Dechlorierung einer Kohlenstoffisotopenfraktionierung unterliegen. Diese war trotz des ungünstigen Verhältnisses der Anzahl von Kohlenstoffatomen (12) zur Zahl der von der Dechlorierung betroffenen Positionen (2) gut meßbar und ließ sich insbesondere in der Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ausgangsverbindung und Endprodukt ausdrücken (hier ca. 3 ‰). Es ist zu erwarten, dass das Durchlaufen mehrerer Dechlorierungsschritte von einem höher chlorierten Kongener zum monochlorierten Endprodukt eine weitere ^{13}C -Abreicherung

des Endproduktes bewirkt. Daher könnte die GC-C-IRMS-Analyse monochlorierter Dioxine in einer dioxinbelasteten Probe einen wichtigen Hinweis auf *in situ*-Dechlorierungsaktivität liefern.

4 Literaturverzeichnis

- Adriaens, P, Chang, P R & Barkovskii, A L (1996) Dechlorination of PCDD/F by organic and inorganic electron transfer molecules in reduced environments. *Chemosphere* 32, 433-441.
- Adriaens, P, Fu, Q & Grbic-Galic, D (1995) Bioavailability and transformation of highly chlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in anaerobic soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2252-2260.
- Adriaens, P & Grbic-Galic, D (1994) Reductive dechlorination of PCDD/F by anaerobic cultures and sediments. *Chemosphere* 29, 2253-2259.
- Adrian, L & Lechner, U (2004) Reductive dehalogenation of polychlorinated benzenes and dioxins. In Nakano, M MZuber, P, Strict and facultative anaerobes. Medical and environmental aspects, Horizon Bioscience, Norfolk, England, pp. 303-315.
- Adrian, L, Szewzyk, U, Wecke, J & Görisch, H (2000) Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408, 580-583.
- Ahn, Y B, Häggblom, M M & Fennell, D E (2005) Co-amendment with halogenated compounds enhances anaerobic microbial dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,4-tetrachlorodibenzofuran in estuarine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2775-2784.
- Albrecht, I D, Barkovskii, A L & Adriaens, P (1999) Production and dechlorination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in historically contaminated estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 33, 737-744.
- Alexander, M (1965) Biodegradation: Problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. *Adv. Appl. Microbiol.* 7, 35-80.
- Anchel, M (1952) Identification of drosophilin A as *p*-methoxytetrachlorophenol. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2943.
- Ando, K, Kato, A & Suzuki, S (1970) Isolation of 2,4-dichlorophenol from a soil fungus and its biological significance. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 39, 1104-1107.
- Anonym (2002) 2,4,6-Trichlorophenol. *Rep. Carcinog.* 10, 247-248.
- Ashworth, R B & Cormier, M J (1967) Isolation of 2,6-dibromophenol from the marine hemichordate, *Balanoglossus biminiensis*. *Science* 155, 1558-1559.
- Balajee, S & Mahadevan, A (1990) Dissimilation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Azotobacter chroococcum*. *Xenobiotica* 20, 607-617.
- Ballerstedt, H, Hantke, J, Bunge, M, Werner, B, Gerritse, J, Andreesen, J R & Lechner, U (2004) Properties of a trichlorodibenzo-*p*-dioxin-dechlorinating mixed culture with a *Dehalococcoides* as putative dechlorinating species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 223-234.
- Ballerstedt, H, Kraus, A & 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.
- Ballschmiter, K (2003) Pattern and sources of naturally produced organohalogens in the marine environment: biogenic formation of organohalogens. *Chemosphere* 52, 313-324.
- Ballschmiter, K & Bacher, R (1996) Dioxine. VCH-Verlag, Weinheim.
- Bambauer, A, Rainey, F A, Stackebrandt, E & Winter, J (1998) Characterization of *Aquamicrobium defluvii* gen. nov. sp. nov., a thiophene-2-carboxylate-metabolizing bacterium from activated sludge. *Arch. Microbiol.* 169, 293-302.
- Barkovskii, A L & Adriaens, P (1996) Microbial dechlorination of historically present and freshly spiked chlorinated dioxins and diversity of dioxin-dechlorinating populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4556-4562.
- Barkovskii, A L & Adriaens, P (1998) Impact of humic constituents on microbial dechlorination of polychlorinated dioxins. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1013-1020.
- Bartels, I, Knackmuss, H J & Reineke, W (1984) Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 500-505.
- Batzke, A (2002) *Ortho*- und *meta*-Chlorphenol-Dehalogenierung durch *Desulfitobacterium frappieri* TCP-A und Identifizierung putativer Dehalogenase.-Gene. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Beadle, C A & Smith, A R W (1982) The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. *Eur. J. Biochem.* 123, 323-329.

- Beck, A (1939) Magnesium und seine Legierungen. Springer, Berlin.
- Becker, D, Schröder, T & Andreesen, J R (1997) Two-component flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. Eur. J. Biochem. 249, 739-747.
- Bedard, D L, Bailey, J J, Reiss, B L & Van Slyke Jerzak, G (2006) Development and characterization of stable sediment-free anaerobic bacterial enrichment cultures that dechlorinate Aroclor 1260. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2460-2470.
- Bedard, D L, van Dort, H & Deweerdt, K A (1998) Brominated biphenyls prime extensive microbial reductive dehalogenation of Aroclor 1260 in Housatonic River sediment. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1786-1795.
- Berger, R S (1972) 2,6-Dichlorphenol, sex pheromone of the lone star tick. Science 177, 704-705.
- Bergt, C, Pennathur, S, Fu, X, Byun, J, O'Brien, K, McDonald, T O, Singh, P, Anantharamaiah, G M et al. (2004) The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 13032-13037.
- Bertazzi, P A, Bernucci, I, Brambilla, G, Consonni, D & Pesatori, A C (1998) The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. Environmental Health Perspectives 106, 625-633.
- Beurskens, J E M, Mol, G A J, Barrefeld, H L, van Munster, B & Winkels, H J (1993) Geochronology of priority pollutants in a sedimentation area of the Rhine river. Environ. Toxicol. Chem. 12, 1549-1566.
- Beurskens, J E M, Toussaint, M, De Wolf, J, Van der Steen, J M D, Slot, P C, Commandeur, L C M & Parsons, J R (1995) Dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic microbial consortium from sediment. Environ. Toxicol. Chem. 14, 939-943.
- Bhat, M A, Tsuda, M, Horiike, K, Nozaki, M, Vaidyanathan, C S & Nakazawa, T (1994) Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV 90. Appl. Environ. Microbiol. 60, 307-312.
- Bitterfeld/Spittelwasser Site. Case Study (2000), vorgestellt auf der Konferenz "ConSoil 2000, Seventh International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil", Leipzig, 18-22. September 2000.
- Bitterfelder Chronik (1993) 100 Jahre Chemiestandort Bitterfeld-Wolfen. Vorstand der Chemie AG (Hrsg.), Bitterfeld-Wolfen.
- Bloedorn, I (1991) Verwertung von Phenoxyherbiziden durch bakterielle Mischpopulationen in Modellabwässern. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Bollag, J-M, Helling, C S & Alexander, M (1968) 2,4-D Metabolism. Enzymatic hydroxylation of chlorinated phenols. J. Agr. Food Chem. 16, 826-828.
- Bouchard, B, Beaudet, R, Villemur, R, McSween, G, Lepine, F & Bisailon, J G (1996) Isolation and characterization of *Desulfotobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 1010-1015.
- Boyer, A, Page-BeLanger, R, Saucier, M, Villemur, R, Lepine, F, Juteau, P & Beaudet, R (2003) Purification, cloning and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol from *Desulfotobacterium frappieri* PCP-1. Biochem. J. 373, 297-303.
- Boyle, A W, Phelps, C D & Young, L Y (1999) Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4,6-tribromophenol. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1133-1140.
- Brack, W, Altenburger, R, Ensenbach, U, Möder, M, Segner, H & Schüürmann, G (1999) Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - a contribution to hazard assessment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 164-174.
- Brack, W, Kind, T, Schrader, S, Möder, M & Schüürmann, G (2003) Polychlorinated naphthalenes in sediments from the industrial region of Bitterfeld. Environ. Poll. 121, 81-85.
- Breitenstein, A (2001) Reduktive Dechlorierung von 2,4,6-Trichlorphenol durch eine anaerobe Mischkultur - phylogenetische Analyse und mikrobiologische Charakterisierung einiger Mitglieder. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Breitenstein, A, Saano, A, Salkinoja-Salonen, M, Andreesen, J R A & Lechner, U (2001) Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfotobacterium frappieri* strain TCP-A. Arch. Microbiol. 175, 133-142.
- Breitenstein, A, Wiegel, J, Haertig, C, Weiss, N, Andreesen, J R & Lechner, U (2002) Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 801-807.
- Brzuzy, L P & Hites, R A (1996) Global mass balance for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. Environ. Sci. Technol. 30, 1797-1804.
- Büchen, W (1995) Die deutsche Magnesiumgewinnung von 1886 bis 1945 - ein Rückblick. Erzmetall 48, 462-470.
- Bunge, M (2004) Dioxin-dechlorierende Bakterien in anaeroben Kulturen aus kontaminierten Flußsedimenten. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Bunge, M, Adrian, L, Kraus, A, Opel, M, Lorenz, W G, Andreesen, J R, Görisch, H & Lechner, U (2003) Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. Nature 421, 357-360.

- Bunge, M, Ballerstedt, H & Lechner, U (1999) Different regioselectivities of reductive dioxin-dehalogenation by anaerobic bacteria from river sediments of the Bitterfeld district. *Organohalogen Compounds* 41, 387-390.
- Bunge, M, Ballerstedt, H & 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.
- Bunge, M, Kähkönen, M A, Rämisch, W, Opel, M, Vogler, S, Walkow, F, Salkinoja-Salonen, M & Lechner, U (2006) Biological activity in a heavily organohalogen-contaminated sediment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (Online First: DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/espr.03.298>),
- Bunge, M & Lechner, U (2001) Anaerobic transformation of dioxins by bacteria from contaminated sediments: diversity of the dehalogenating community, *In* Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Technische Universität Berlin, Bd. 15: Anaerobic dehalogenation, pp. 69-81.
- Cai, M & Xun, L (2002) Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *J. Bacteriol.* 184, 4672-4680.
- Chow, Y S, Wang, C B & Lin, L C (1975) Identification of a sex pheromone of the female brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68, 485-488.
- Christiansen, N & Ahring, B K (1996) *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 442-448.
- Christiansen, N, Ahring, B K, Wohlfarth, G & Diekert, G (1998) Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*. *FEBS Lett.* 436, 159-162.
- Collins, M D, Lawson, P A, Willems, A, Cordoba, J J, Fernandez-Garayzabal, J, Garcia, P, Cai, J, Hippe, H et al. (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812-826.
- Corgiat, J M, Dobbs, F C, Burger, M W & Scheuer, P J (1993) Organohalogen constituents of the acorn worm *Ptychodera bahamensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 83-86.
- Cutter, L A, Watts, J E M, Sowers, K R & 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.
- Czaplicka, M (2006) Photo-degradation of chlorophenols in the aqueous solution. *J Hazard Mater* 134, 45-59.
- Dai, M, Rogers, J B, Warner, J R & Copley, S D (2003) A previously unrecognized step in pentachlorophenol degradation in *Sphingobium chlorophenolicum* is catalyzed by tetrachlorobenzoquinone reductase (PcpD). *J. Bacteriol.* 185, 302-310.
- Dairi, T, Nakano, T, Aisaka, K, Katsumata, R & Hasegawa, M (1995) Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 1099-1106.
- Dauberger, M (1990) Dioxine. *Klinisch-toxikologische Stoffmonographien*. Ecomed, Landsberg.
- de Jong, E & Field, J A (1997) Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and biodegradation of organohalogenes by Basidiomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 375-414.
- de Jong, E, Field, J A, Spinnler, H-E, Wijnberg, J B P A & de Bont, J A M (1994) Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 264-270.
- De Wildeman, S, Diekert, G, Van Langenhove, H & Verstraete, W (2003) Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5643-5647.
- Dennie, D, Gladu, I, Lepine, F, Villemur, R, Bisailon, J-G & Beaudet, R (1998) Spectrum of reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4603-4606.
- DeWeerd, K A & Bedard, D L (1999) Use of halogenated benzoates and other halogenated aromatic compounds to stimulate the microbial dechlorination of PCBs. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2057-2063.
- DeWeerd, K A, Mandelco, L, Tanner, R S, Woese, C R & Suflita, J M (1990) *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 154, 23-30.
- Ditzelmüller, G, Loidl, M & Streichsbier, F (1989) Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 93-96.
- Dolfing, J (1995) Letter to the editor. Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin B₁₂s. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2450-2451.
- Dolfing, J & Beurskens, J E M (1995) The microbial logic and environmental significance of reductive dehalogenation. *In* Jones, J G, *Advances in Microbial Ecology*, Bd. 14, Plenum Press, New York, pp. 143-206.
- Dolfing, J & Harrison, B K (1992) Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2213-2218.
- Dolfing, J & Harrison, B K (1993) Redox and reduction potentials as parameters to predict the degradation pathway of chlorinated benzenes in anaerobic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13, 23-30.
- Dong, C, Flecks, S, Unversucht, S, Haupt, C, van Pee, K H & Naismith, J H (2005) Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science* 309, 2216-9.

- Ebersbach, H, Breitenstein, A & Lechner, U (2000) All species of *Desulfotobacterium* contain two types of 16S rRNA genes of different length. BIOSpektrum Sonderausgabe, 157 (Poster-Abstract 15.P.13.01).
- Eggink, G, Engel, H, Vriend, G, Terpstra, P & Witholt, B (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. J. Mol. Biol. 212, 135-142.
- Egland, P G, Gibson, J & Harwood, C S (2001) Reductive, coenzyme A-mediated pathway for 3-chlorobenzoate degradation in the phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1396-1399.
- Eisner, T, Hendry, L B, Peakall, D B & Meinwald, J (1971) 2,5-Dichlorophenol (from ingested herbicide?) in defensive secretion of grasshopper. Science 172, 277-278.
- Eulberg, D, Kourbatova, E M, Golovleva, L A & Schlömann, M (1998) Evolutionary relationship between chlorocatechol catabolic enzymes from *Rhodococcus opacus* 1CP and their counterparts in proteobacteria: sequence divergence and functional convergence. J. Bacteriol. 180, 1082-1094.
- Ewald, E-M (2005) Isotopenfraktionierung in Dioxin-dechlorierenden Mischkulturen und ihre Reaktion auf Schwefelverbindungen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Felsenstein, J (1993), PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c. Verbreitet durch den Autor, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fennell, D E, Nijenhuis, I, Wilson, S F, Zinder, S H & Häggblom, M M (2004) *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 reductively dechlorinates diverse chlorinated aromatic pollutants. Environ. Sci. Technol. 38, 2075-2081.
- Ferrario, J B, Byrne, C J & Cleverly, D H (2000) 2,3,7,8-Dibenzo-p-dioxins in mined clay products from the united states: evidence for possible natural origin. Environ. Sci. Technol. 34, 4524-4532.
- Ferraroni, M, Seifert, J, Travkin, V M, Thiel, M, Kaschabek, S, Scozzafava, A, Golovleva, L A, Schlömann, M et al. (2005) Crystal structure of the hydroxyquinol 1,2-dioxygenase from *Nocardioides simplex* 3E, a key enzyme involved in polychlorinated aromatics biodegradation. J. Biol. Chem. 280, 21144-21154.
- Fiedler, H & Hutzinger, O (1991) Literaturstudie: Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF), Eco-Inforna Press, Bayreuth.
- Filer, K & Harker, A R (1997) Identification of the inducing agent of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pathway encoded by plasmid pJP4. Appl. Environ. Microbiol. 63, 317-320.
- Finneran, K T, Forbush, H M, VanPraagh, C V & Lovley, D R (2002) *Desulfotobacterium metallireducens* sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1929-1935.
- Fritsche, K (1998) Molekularbiologische Untersuchungen zum Chlorphenolabbau durch Stamm S1, ein Proteobacterium der alpha-2-Untergruppe. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Fritsche, K, Auling, G, Andreesen, J R & Lechner, U (1999) *Defluvibacter lusatiae* gen. nov., sp. nov., a new chlorophenol-degrading member of the α -2-subgroup of Proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol. 22, 197-204.
- Fritsche, K & Lechner, U (1998) Molecular biology of chlorophenol degradation catalyzed by a bacterium of the *Rhizobiaceae* group. Beitrag zur Konferenz "Microbiology of polluted aquatic ecosystems", UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Leipzig, 4.-5. Dezember 1997, Tagungsband pp. 102-108.
- Fu, Q S, Barkovskii, A L & Adriaens, P (1999) Reductive transformation of dioxins: an assessment of the contribution of dissolved organic matter to dechlorination reactions. Environ. Sci. Technol. 33, 3837-3842.
- Fu, Q S, Barkovskii, A L & Adriaens, P (2001) Dioxin cycling in aquatic sediments: the Passaic River Estuary. Chemosphere 43, 643-648.
- Fu, Q S, Barkovskii, A L & Adriaens, P (2005) Microbial dechlorination of dioxins in estuarine enrichment cultures: effects of respiratory conditions and priming compound on community structure and dechlorination patterns. Mar. Environ. Res. 59, 177-195.
- Fulthorpe, R R, McGowan, C, Maltseva, O V, Holben, W E & Tiedje, J M (1995) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3274-3281.
- Gantzer, C J & Wackett, L P (1991) Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes. Environ. Sci. Technol. 25, 715-722.
- Garrity, G M, Bell, J A & Liburn, T G (2004), Taxonomic outline of the Prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology, Release 5.0. Springer, New York.
- Gaus, C, Brunskill, G J, Connell, W, Prange, J, Müller, J F, Pöpke, O & Weber, R (2002) Transformation processes, pathways, and possible sources of distinctive polychlorinated dibenzo-p-dioxin signatures in sink environments. Environ. Sci. Technol. 36, 3542-3549.
- Gaus, C, Pöpke, O, Dennison, N, Haynes, D, Shaw, G R, Connell, D W & Müller, J F (2001) Evidence for a widespread PCDD source in coastal sediments and soils from Queensland, Australia. Chemosphere 43, 549-558.

- Gerritse, J, Drzyzga, O, Kloestra, G, Keijmel, M, Wiersum, L P, Hutson, R, Collins, M D & Gottschal, J C (1999) Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5212-5221.
- Gerritse, J, Renard, V, Pedro Gomes, T M, Lawson, P A, Collins, M D & Gottschal, J C (1996) *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.* 165, 132-140.
- Geyer, H J, Rimkus, G G, Scheunert, I, Kaune, A, Schramm, K-W, Kettrup, A, Zeemann, M, Muir, D C G et al. (2000) Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (ECDs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. *In* Beek, B, The handbook of environmental chemistry, Bd. 2, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1-178.
- Gisi, M R & Xun, L (2003) Characterization of chlorophenol 4-monoxygenase (TftD) and NADH:flavin adenine dinucleotide oxidoreductase (TftC) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Bacteriol.* 185, 2786-2792.
- Göbel, M, Kassel-Cati, K, Schmidt, E & Reineke, W (2002) Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: cloning, characterization, and analysis of sequences encoding 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.* 184, 216-223.
- Golovleva, L A, Zaborina, O, Pertsova, R, Baskunov, B, Schurukhin, Y & Kuzmin, S (1992) Degradation of polychlorinated phenols by *Streptomyces rochei* 303. *Biodegradation* 2, 201-208.
- Gorlatov, S N & Golovleva, L A (1992) Effect of cosubstrates on the dechlorination of selected chlorophenolic compounds by *Rhodococcus erythropolis* 1CP. *J. Basic Microbiol.* 32, 177-184.
- Götz, R & Lauer, R (2003) Analysis of sources of dioxin contamination in sediments and soils using multivariate statistical methods and neural networks. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5559-5565.
- Götz, R, Steiner, B, Friesel, P, Roch, K, Walkow, F, Maaß, V, Reincke, H & Stachel, B (1996) Dioxin (PCDD/F) in the River Elbe - investigations of their origin by multivariate statistical methods. *Organohalogen compounds* 27, 440-444.
- Götz, R, Steiner, B, Friesel, P, Roch, K, Walkow, F, Maaß, V, Reincke, H & Stachel, B (1998) Dioxin (PCDD/F) in the River Elbe - investigations of their origin by multivariate statistical analysis. *Chemosphere* 37, 1987-2002.
- Granzow, S (1998) Isolierung und Charakterisierung eines neuen Tetrachlorethen dechlorierenden strikt anaeroben Bakteriums, *Desulfitobacterium frappieri* Stamm PCE-S. Dissertation. Universität Stuttgart.
- Greer, C W, Hawari, J & Samson, R (1990) Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch. Microbiol.* 154, 317-322.
- Gribble, G W (1998) Chlorinated compounds in the biosphere, natural production. *In* Meyers, R A, *Encyclopedia of environmental analysis and remediation*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 972-1035.
- Gribble, G W (1999) The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chem. Soc. Rev.* 28, 335-346.
- Gribble, G W (2003) The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere* 52, 289-297.
- Griebler, C, Adrian, L, Meckenstock, R U & Richnow, H H (2004) Stable carbon isotope fractionation during aerobic and anaerobic transformation of trichlorobenzene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 313-321.
- Hackenholz, D (2004) Die elektrochemischen Werke in Bitterfeld 1914-1945. *In* Rupieper, H-JHertner, P (Hrsg.) *Forschungen zur neuesten Geschichte*, Bd. 3, LIT Verlag Münster, Münster.
- Hägglblom, M M & Bossert, I D (2003) Dehalogenation. *Microbial processes and environmental applications*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, USA.
- Hägglblom, M M, Nohynek, L J & Salkinoja-Salonen, M S (1988) Degradation and O-methylation of chlorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3043-3052.
- Hägglblom, M M, Rivera, M D & Young, L Y (1993) Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1162-1167.
- Hägglblom, M M & Young, L Y (1999) Anaerobic degradation of 3-halobenzoates by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 171, 230-236.
- Harayama, S, Kok, M & Neidle, E L (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 565-602.
- Heipieper, H J, Keweloh, H & Rehm, H J (1991) Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1213-1217.
- Hiraishi, A, Kaiya, S, Miyakoda, H & Futamata, H (2005a) Biotransformation of polychlorinated dioxins and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. *Microbe Environ.* 20, 227-242.
- Hiraishi, A, Sakamaki, N, Miyakoda, H, Maruyama, T, Kato, K & Futamata, H (2005b) Estimation of "*Dehalococcoides*" populations in lake sediment contaminated with low levels of polychlorinated dioxins. *Microbe Environ.* 20, 216-226.

- Hjelm, O, Johansson, E & Öberg, G (1999) Production of organically bound halogens by the litter-degrading fungus *Lepista nuda*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1509-1515.
- Hoekstra, E J, De Weerd, H, De Leer, E W B & Brinkman, U A T (1999) Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a Douglas fir forest. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2543-2549.
- Hoffmann, D, Kleinsteuber, S, Müller, R H & Babel, W (2003) A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. *Microbiology* 149, 2545-2556.
- Hofmann, B, Tölzer, S, Pelletier, I, Altenbuchner, J & van Pee, K H (1998) Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases. *J. Mol. Biol.* 279, 889-900.
- Holliger, C, Regard, C & Diekert, G (2003) Dehalogenation by anaerobic bacteria. In Häggblom, M M, Bossert, I D (Hrsg.) *Dehalogenation. Microbial processes and environmental applications*, Kluwer Acad. Publ., Norwell, Massachusetts, USA, pp. 115-157.
- Holliger, C, Schraa, G, Stams, A J M & Zehnder, A J B (1992) Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1636-1644.
- Holliger, C, Wohlfahrt, G & Diekert, G (1999) Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 383-398.
- Hölscher, T, Görisch, H & Adrian, L (2003) Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2999-3001.
- Huang, C-L, Harrison, B K, Madura, J & Dolfing, J (1996) Gibbs free energy of formation of PCDDs: Evaluation of estimation methods and application for predicting dehalogenation pathways. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 824-836.
- Jobst, H & Aldag, R (2000) Dioxine in Lagerstätten-Tonen. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.* 12, 2-4.
- Jordan, A, Harnisch, J, Borchers, R, Le Guern, F & Shinohara, H (2000) Volcanogenic halocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1122-1124.
- Kamagata, Y, Fulthorpe, R R, Tamura, K, Takami, H, Forney, L J & Tiedje, J M (1997) Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2266-2272.
- Kamei, I & Kondo, R (2005) Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 560-566.
- Kamei, I, Suhara, H & Kondo, R (2005) Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 358-366.
- Kaschabek, S R, Kasberg, T, Müller, D, Mars, A E, Janssen, D B & Reineke, W (1998) Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *J. Bacteriol.* 180, 296-302.
- Keene, W C (1999) The natural chemistry of inorganic chlorine in the lower atmosphere: a potential source for organochlorine compounds. In *The natural chemistry of chlorine in the environment*, Eurochlor (Hrsg.) Brüssel, pp. 5-6.
- Keppler, F, Eiden, R, Niedan, V, Pracht, J & Schöler, H F (2000) Halocarbons produced by natural oxidation processes during degradation of organic matter. *Nature* 403, 298-301.
- King, M G (1986) Inhibition of microbial activity in marine sediments by a bromophenol from a hemichordate. *Nature* 323, 257-259.
- Kirner, S, Hammer, P E, Hill, D S, Altmann, A, Fischer, I, Weislo, L J, Lanahan, M, van Pee, K-H et al. (1998) Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180, 1939-1943.
- Kiyohara, H, Hatta, T, Ogawa, Y, Kakuda, T, Yokoyama, H & Takizawa, N (1992) Isolation of *Pseudomonas pickettii* strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and their dechlorination of chlorophenols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1276-1283.
- Knackmuss, H J & Hellwig, M (1978) Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13. *Arch. Microbiol.* 117, 1-7.
- Krajmalnik-Brown, R, Hölscher, T, Thomson, I N, Saunders, F M, Ritalahti, K M & Löffler, F E (2004) Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6347-6351.
- Krasotkina, J, Walters, T, Maruya, K A & Ragsdale, S W (2001) Characterization of the B₁₂- and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*. *J. Biol. Chem.* 276, 40991-40997.
- Kube, M, Beck, A, Zinder, S H, Kuhl, H, Reinhardt, R & Adrian, L (2005) Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat. Biotechnol.* 23, 1269-1273.

- Labbé, N, Parent, S & Villemur, R (2004) *Nitratireductor aquibiodomus* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium from the marine denitrification system of the Montreal Biodome (Canada). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 269-273.
- Laemmli, C M, Leveau, J H, Zehnder, A J & van der Meer, J R (2000) Characterization of a second tfd gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* 182, 4165-4172.
- Lechner, U (2001) Einschätzung des Potentials anaerober Bakterien zur reduktiven Dechlorierung von Dioxinen und ihr Beitrag zur langfristigen Senkung der Dioxinbelastung im Spittelwasser (Landkreis Bitterfeld). Forschungsbericht zum Projekt 76213/03/98/H des Landes Sachsen-Anhalt, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lechner, U, Baumbach, R, Becker, D, Kitunen, V, Auling, G & Salkinoja-Salonen, M (1995) Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. *Biodegradation* 6, 83-92.
- Ledger, T, Pieper, D H & Gonzalez, B (2006) Chlorophenol hydroxylases encoded by plasmid pJP4 differentially contribute to chlorophenoxyacetic acid degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2783-2792.
- Lee, J Y & Xun, L (1997) Purification and characterization of 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone chlorohydrolase from *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723. *J. Bacteriol.* 179, 1521-1524.
- Lee, K B, Liu, C T, Anzai, Y, Kim, H, Aono, T & Oyaizu, H (2005) The hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1907-1919.
- Lendvay, J M, Löffler, F E, Dollhopf, M, Aiello, M R, Daniels, G, Fathepure, B Z, Gebhard, M, Heine, R et al. (2003) Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1422-1431.
- Li, D-Y, Eberspächer, J, Wagner, B, Kuntzer, J & Lingens, F (1991) Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Azotobacter* sp. strain GP1. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1920-1928.
- Lie, T J, Godchaux, W & Leadbetter, E R (1999) Sulfonates as terminal electron acceptors for growth of sulfite-reducing bacteria (*Desulfitobacterium* spp.) and sulfate-reducing bacteria: effects of inhibitors of sulfidogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4611-4617.
- Liu, T & Chapman, P J (1984) Purification and properties of a plasmid encoded 2,4-dichlorophenylhydroxylase. *FEBS Lett.* 173, 314-319.
- Liu, W, Zheng, M, Wang, D, Xing, Y, Zhao, X, Ma, X & Qian, Y (2004) Formation of PCDD/Fs and PCBs in the process of production of 1,4-dichlorobenzene. *Chemosphere* 57, 1317-1323.
- Louie, T M, Webster, C M & Xun, L (2002) Genetic and biochemical characterization of a 2,4,6-trichlorophenol degradation pathway in *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.* 184, 3492-3500.
- Luijten, M L G C, de Weert, J, Smidt, H, Boschker, H T S, de Vos, W M, Schraa, G & Stams, A J M (2003) Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 787-793.
- Luijten, M L G C, Weelink, S A B, Godschalk, B, Langenhoff, A A M, Eekert, M H A, Schraa, G & Stams, A J (2004) Anaerobic reduction and oxidation of quinone moieties and the reduction of oxidized metals by halorespiring and related organisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 145-150.
- Lyytikäinen, M (2004) Transport, bioavailability and effects of Ky-5 and CCA wood preservative components in aquatic environments. Dissertation. University of Joensuu, Joensuu, Finland.
- Madsen, T & Licht, D (1992) Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2874-2878.
- Magnuson, J K, Romine, M F, Burris, D R & Kingsley, M T (2000) Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and substrate range characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5141-5147.
- Magnuson, J K, Stern, R V, Gossett, J M, Zinder, S H & Burris, D R (1998) Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1270-1275.
- Maillard, J, Regeard, C & Holliger, C (2005) Isolation and characterization of *Tn-Dha1*, a transposon containing the tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1. *Environ. Microbiol.* 7, 107-117.
- Maillard, J, Schumacher, W, Vazquez, F, Regeard, C, Hagen, W R & Holliger, C (2003) Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4628-4638.
- Makdessi, K & Lechner, U (1997) Purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a bacterium of the α -2 subgroup of the Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 95-100.
- Manji, S & Ishihara, A (2004) Screening of tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-degrading fungi capable of producing extracellular peroxidases under various conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 438-444.

- Manz, W, Eisenbrecher, M, Neu, T R & Szewzyk, U (1998) Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 43-61.
- Maymo-Gatell, X, Chien, Y, Gossett, J M & Zinder, S H (1997) Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276, 1568-1571.
- McAllister, K A, Lee, H & Trevors, J T (1996) Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* 7, 1-40.
- McFall, S M, Parsek, M R & Chakrabarty, A M (1997) 2-Chloromuconate and ClcR-mediated activation of the *clcABD* operon: in vitro transcriptional and DNase I footprint analyses. *J. Bacteriol.* 179, 3655-3663.
- Meharg, A A & Killham, K (2003) A pre-industrial source of dioxins and furans. *Nature* 421, 909-910.
- Meharg, A A & Osborn, D (1995) Dioxins released from chemical accidents. *Nature* 375, 353-354.
- Messerschmidt, P, Prade, L & Wever, R (1997) Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis* by X-ray structures of the native and peroxide form. *Biol. Chem.* 378, 309-315.
- Miller, E, Wohlfarth, G & Diekert, G (1996) Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 166, 379-387.
- Modellhafte Machbarkeitsstudie zur Sedimentsanierung des Spittelwassers im Landkreis Bitterfeld (1993), Landratsamt Bitterfeld (Auftraggeber), Bitterfeld.
- Mohn, W W & Tiedje, J M (1991) Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. *Arch. Microbiol.* 157, 1-6.
- Mohn, W W & Tiedje, J M (1992) Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* 56, 482-507.
- Moschel, W (1930) Verfahren zur Gewinnung von wasser- und oxydfreiem Chlormagnesium aus Magnesit oder magnesithaltigen Gesteinen. Patent, Deutsches Reich, DRP 506276, pp. 1-3.
- Müller, R H & Babel, W (1996) Measurement of growth at very low rates ($\mu \geq 0$) - an approach to study the energy requirement for the survival of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 147-151.
- Müller, R H, Jorks, S, Kleinstüber, S & Babel, W (1998) Degradation of various chlorophenols under alkaline conditions by gram-negative bacteria closely related to *Ochrobactrum anthropi*. *J. Basic Microbiol.* 38, 269-281.
- Müller, R H, Jorks, S, Kleinstüber, S & Babel, W (1999) *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. *Microbiol. Res.* 154, 241-246.
- Müller, T A, Byrde, S M, Werlen, C, van der Meer, J R & Kohler, H P (2004) Genetic analysis of phenoxyalkanoic acid degradation in *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6066-6075.
- Neidleman, S L & Geigert, J (1986) Biohalogenation: principles, basic roles and applications. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.
- Neujahr, H Y (1991) Phenol hydroxylase. In Müller, F, Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, Bd. II, CRC Press, Boca Raton, pp. 65-85.
- Neumann, A, Wohlfarth, G & Diekert, G (1996) Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J. Biol. Chem.* 271, 16515-16519.
- Newby, D T, Josephson, K L & Pepper, I L (2000) Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 290-296.
- Ni, S, Fredrickson, J K & Xun, L (1995) Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *J. Bacteriol.* 177, 5135-5139.
- Nicholas, R A & Ordal, G W (1978) Inhibition of bacterial transport by uncouplers of oxidative phosphorylation. Effects of pentachlorophenol and analogues in *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 176, 639-647.
- Niggemyer, A, Spring, S, Stackebrandt, E & Rosenzweig, R F (2001) Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5568-5580.
- Nijenhuis, I, Andert, J, Beck, K, Kästner, M, Diekert, G & Richnow, H H (2005) Stable isotope fractionation of tetrachloroethene during reductive dechlorination by *Sulfurospirillum multivorans* and *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S and abiotic reactions with cyanocobalamin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3413-3419.
- Nonaka, H, Keresztes, G, Shinoda, Y, Ikenaga, Y, Abe, M, Naito, K, Inatomi, K, Furukawa, K et al. (2006) Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J. Bacteriol.* 188, 2262-2274.
- Nordin, K, Unell, M & Jansson, J K (2005) Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6538-6544.

- Nordmeyer, T, Wang, W, Ragains, M L & Finlayson-Pitts, B J (1997) Unique products of the reaction of isoprene with atomic chlorine: potential markers of chlorine atom chemistry. *Geophysical Research Letters* 24, 1615-1618.
- O'Hagan, D, Schaffrath, C, Cobb, S L, Hamilton, J T G & Murphy, C D (2002) Biosynthesis of an organofluorine molecule. *Nature* 416, 279-.
- Öberg, L G & Rappe, C (1992) Biochemical formation of PCDD/Fs from chlorophenols. *Chemosphere* 25, 49-52.
- Öberg, L G, Wagman, N, Andersson, R & Rappe, C (1993) De novo formation of PCDD/Fs in compost and sewage sludge - a status report. *Organohalogen Compounds* 11, 297-302.
- Obst, M, Krug, A, Luftmann, H & Steinbüchel, A (2005) Degradation of cyanophycin by *Sedimentibacter hongkongensis* strain KI and *Citrobacter amalonaticus* strain G isolated from an anaerobic bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3642-52.
- Oehme, M, Manø, S & Bjerke, B (1989a) Formation of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by production processes for magnesium and refined nickel. *Chemosphere* 18, 1379-1389.
- Oehme, M, Manø, S, Brevik, E M & Knutzen, J (1989b) Determination of polychlorinated dibenzofuran (PCDF) and dibenzo-p-dioxin (PCDD) levels and isomer patterns in fish, crustacea, mussel and sediment samples from a fjord region polluted by Mg-production. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 335, 987-997.
- Ohtake, F, Takeyama, K, Matsumoto, T, Kitagawa, H, Yamamoto, Y, Nohara, K, Tohyama, C, Krust, A et al. (2003) Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.
- Paasivirta, J, Knuutinen, J, Maatela, P, Paukku, R, Soikkeli, J & Särkkä, J (1988) Organic chlorine compounds in lake sediments and the role of the chlorobleaching effluents. *Chemosphere* 17, 137-146.
- Patel, B K C, Love, C A & Stackebrandt, E (1992) Helix 6 of the 16S rRNA of bacterium *Desulfotomaculum australicum* exhibits an unusual structural idiosyncrasy. *Nucleic Acids Res.* 20, 5483.
- Perkins, E J, Gordon, M P, Caceres, O & Lurquin, P F (1990) Organization and sequence analysis of the 2,4-dichlorophenol hydroxylase and dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 172, 2351-2359.
- Pieper, D H, Engesser, K H & Knackmuss, H J (1989) Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch. Microbiol.* 151, 365-371.
- Pieper, D H, Reineke, W, Engesser, K H & Knackmuss, H J (1988) Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch. Microbiol.* 150, 95-102.
- Pignatello, J J, Martinson, M M, Steiert, J G, Carlson, R E & Crawford, R L (1983) Biodegradation and photolysis of pentachlorophenol in artificial freshwater streams. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1024-1031.
- Pirae, M, White, R L & Vining, L C (2004) Biosynthesis of the dichloroacetyl component of chloramphenicol in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: genes required for halogenation. *Microbiology* 150, 85-94.
- Pistor, G (1958) Hundert Jahre Griesheim 1856-1956. Tegernsee/Obb.
- Plugge, C M, Balk, M, Zoetendal, E G & Stams, A J (2002) *Gelria glutamica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligately syntrophic, glutamate-degrading anaerobe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 401-407.
- Poh, R P, Smith, A R & Bruce, I J (2002) Complete characterisation of Tn5530 from *Burkholderia cepacia* strain 2a (pIJB1) and studies of 2,4-dichlorophenoxyacetate uptake by the organism. *Plasmid* 48, 1-12.
- Pohland, A E & Yang, G C (1972) Preparation and characterization of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *J. Agr. Food Chem.* 20, 1093-1099.
- Radjendirane, V, Bhat, M A & Vaidyanathan, C S (1991) Affinity purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from *Pseudomonas cepacia*. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 169-176.
- Rainey, F A, Ward, N L, Morgan, H W, Toalster, R & Stackebrandt, E (1993) Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J. Bacteriol.* 175, 4772-4779.
- Rainey, F A, Ward, N L, Janssen, P H, Hippe, H & Stackebrandt, E (1996) *Clostridium paradoxum* DSM 7308^T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* 142, 2087-2095.
- Ramondetta, M & Repossi, A (1998) Seveso 20 years after. Fondazione Lombardia per l'Ambiente, Milano.
- Rappe, C (1994) Dioxin, patterns and source identification. *Fresenius J. Anal. Chem.* 348, 63-75.
- Redburn, A C & Patel, B K (1993) Phylogenetic analysis of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 113, 81-86.
- Reineke, W (2001) Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. Beek, B (Hrsg.) *The Handbook of environmental chemistry. Biodegradation and persistence.* Bd. 2 Part K, Springer, Berlin, pp. 1-161.
- Sanford, R A, Cole, J R, Löffler, F E & Tiedje, J M (1996) Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3800-3808.

- Sanford, R A, Cole, J R & Tiedje, J M (2002) Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 893-900.
- Schell, M A (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 597-626.
- Schichtel, G (1954) *Magnesium-Taschenbuch*. VEB Verlag Technik, Berlin.
- Schlömann, M (1994) Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. *Biodegradation* 5, 301-321.
- Schlömann, M (2002) Two chlorocatechol catabolic gene modules on plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* 184, 4049-4053.
- Scholz-Muramatsu, H, Neumann, A, Messmer, M, Moore, E & Diekert, G (1995) Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* 163, 48-56.
- Schumacher, W & Holliger, C (1996) The proton/electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in "*Dehalobacter restrictus*". *J. Bacteriol.* 178, 2328-2333.
- Seibert, V, Stadler-Fritzsche, K & Schlömann, M (1993) Purification and characterization of maleylacetate reductase from *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 175, 6745-6754.
- Sekiguchi, Y, Yamada, T, Hanada, S, Ohashi, A, Harada, H & Kamagata, Y (2003) *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain *Bacteria* at the subphylum level. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1843-1851.
- Seshadri, R, Adrian, L, Fouts, D E, Eisen, J A, Phillippy, A M, Methe, B A, Ward, N L, Nelson, W C et al. (2005) Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science* 307, 105-108.
- Shiu, W Y, Doucette, W, Gobas, F A P C, Andren, A & Mackay, D (1988) Physical-chemical properties of chlorinated dibenzo-*p*-dioxins. *Environ. Sci. Technol.* 22, 651-658.
- Smidt, H, van Leest, M, van der Oost, J & de Vos, W M (2000) Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Bacteriol.* 182, 5683-5691.
- Smith, M H & Woods, S L (1994) Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin B (12s). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4111-4115.
- Song, B, Kerkhof, L J & Häggblom, M M (2002) Characterization of bacterial consortia capable of degrading 4-chloro- and 4-bromobenzoate under denitrifying conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 213, 183-188.
- Song, B, Palleroni, N J & Häggblom, M M (2000a) Description of strain 3CB-1, a genomovar of *Thauera aromatica*, capable of degrading 3-chlorobenzoate coupled to nitrate reduction. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 2, 551-558.
- Song, B, Palleroni, N J & Häggblom, M M (2000b) Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3446-3453.
- Staib, K (1927) Verfahren zur Herstellung von wasserfreiem Magnesiumchlorid. Patent, Deutsches Reich, DRP 450979, pp. 1-3.
- Stellman, J M, Stellman, S D, Christian, R, Weber, T & Tomasallo, C (2003) The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam. *Nature* 422, 681-687.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) (2001) Stockholm, 22 May 2001.
- Stringer, R & Johnston, P (2002) *Chlorine and the environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sun, B, Cole, J & Tiedje, J (2001) *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 365-371.
- Sun, B, Cole, J R, Sanford, R A & Tiedje, J M (2000) Isolation and characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a marine dechlorinating bacterium growing by coupling the oxidation of acetate to the reductive dechlorination of 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2408-2413.
- Sundaramoorthy, M, Terner, J & Poulos, T L (1998) Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chem. Biol.* 5, 461-473.
- Suntio, L R, Shiu, W Y & Mackay, D (1988) A review of the nature and properties of chemicals present in pulp mill effluents. *Chemosphere* 17, 1249-1290.
- Suyama, A, Yamashita, M, Yoshino, S & Furukawa, K (2002) Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J. Bacteriol.* 184, 3419-3425.
- Takada, S, Nakamura, M, Matsueda, T, Kondo, R & Sakai, K (1996) Degradation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4323-4328.
- Takeuchi, M, Sawada, H, Oyaizu, H & Yokota, A (1994) Phylogenetic evidence for *Sphingomonas* and *Rhizomonas* as nonphotosynthetic members of the alpha-4 subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bact.* 44, 308-314.
- Teunissen, P J M, Swarts, H J & Field, J A (1997) The de novo production of drosophilin A (tetrachloro-4-methoxyphenol) and drosophilin A methyl ether (tetrachloro-1,4-dimethoxybenzene) by ligninolytic basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 695-700.

- Thibodeau, J, Gauthier, A, Duguay, M, Villemur, R, Lepine, F, Juteau, P & Beaudet, R (2004) Purification, cloning, and sequencing of a 3,5-dichlorophenol reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4532-4537.
- Thiel, M, Kaschabek, S R, Groning, J, Mau, M & Schlömann, M (2005) Two unusual chlorocatechol catabolic gene clusters in *Sphingomonas* sp. TFD44. *Arch. Microbiol.* 183, 80-94.
- Tropel, D & van der Meer, J R (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 68, 474-500.
- Tyler, J E & Finn, R K (1974) Growth rates of a pseudomonad on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol. *Appl. Microbiol.* 28, 181-183.
- Uchino, Y, Hirata, A, Yokota, A & Sugiyama, J (1998) Reclassification of marine *Agrobacterium* species: Proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 201-210.
- Uotila, J S, Kitunen, V H, Coote, T, Saastamoinen, T, Salkinoja-Salonen, M & Apajalahti, J H A (1995) Metabolism of halo-hydroquinones in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. *Biodegradation* 6, 119-126.
- Uotila, J S, Kitunen, V H, Saastamoinen, T, Coote, T, Häggblom, M M & Salkinoja-Salonen, M S (1992) Characterization of aromatic dehalogenases of *Mycobacterium fortuitum* CG-2. *J. Bacteriol.* 174, 5569-5675.
- Uotila, J S, Salkinoja-Salonen, M S & Apajalahti, J H (1991) Dechlorination of pentachlorophenol by membrane bound enzymes of *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. *Biodegradation* 2, 25-31.
- Utkin, I, Woese, C & Wiegel, J (1994) Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 612-619.
- Utkina, N K, Denisenko, V A, Scholokova, O V, Virovaya, M V, Gerasimenko, A V, Popov, D Y, Krasokhin, V B & Popov, A M (2001) Spongiadioxins A and B, two new polybrominated dibenzo-*p*-dioxins from an Australian marine sponge *Dysidea dendyi*. *J. Nat. Prod.* 64, 151-153.
- Valli, K, Wariishi, H & Gold, M H (1992) Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 174, 2131-2137.
- van de Pas, B A, Gerritse, J, de Vos, W M, Schraa, G & Stams, A J M (2001a) Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and chlorophenol reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1. *Arch. Microbiol.* 176, 165-169.
- van de Pas, B A, Harmsen, H J M, Raangs, G C, de Vos, W M, Schraa, G & Stams, A J (2001b) A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols: Erratum. *Arch. Microbiol.* 176, 391-392.
- van de Pas, B A, Harmsen, H J M, Raangs, G C, de Vos, W M, Schraa, G & Stams, A J M (2001c) A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols. *Arch. Microbiol.* 175, 389-394.
- van de Pas, B A, Smidt, H, Hagen, W R, van der Oost, J, Schraa, G, Stams, A J & de Vos, W M (1999) Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halo-respiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J. Biol. Chem.* 274, 20287-20292.
- van der Meer, J R (1997) Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Ant. Leeuwenhoek* 71, 159-178.
- van der Woude, B J, de Boer, M, van der Put, N M, van der Geld, F M, Prins, R A & Gottschal, J C (1994) Anaerobic degradation of halogenated benzoic acids by photoheterotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 199-208.
- van Doesburg, W, Eekert, M H A, Middeldorp, P J M, Balk, M, Schraa, G & Stams, A J (2005) Reductive dechlorination of β -hexachlorocyclohexane (HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54, 87-95.
- van Pee, K H (2001) Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch. Microbiol.* 175, 250-258.
- van Pee, K-H & Lingens, F (1985) Purification of a bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*. *J. Bacteriol.* 161, 1171-1175.
- van Pee, K-H & Unversucht, S (2003) Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* 52, 299-312.
- van Wageningen, A M A, Kirkpatrick, P N, Williams, D H, Harris, B R, Kershaw, J K, Lennard, N J, Jones, M, Jones, S et al. (1998) Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* 5, 155-162.
- Vandamme, P & Coenye, T (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2285-2289.
- Vargas, C, Fennell, D & Häggblom, M M (2001) Anaerobic reductive dechlorination of chlorinated dioxins in estuarine sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 786-790.

- Vargas, C, Song, B, Camps, M & Häggblom, M M (2000) Anaerobic degradation of fluorinated aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 342-347.
- Vedler, E, Koiv, V & Heinaru, A (2000) TfdR, the LysR-type transcriptional activator, is responsible for the activation of the *tfdCB* operon of *Pseudomonas putida* 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pEST4011. *Gene* 245, 161-168.
- Vedler, E, Vahter, M & Heinaru, A (2004) The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring *tfd* genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. *J. Bacteriol.* 186, 7161-7174.
- Verhagen, F J M, Swarts, H J, Wijnberg, J B P A & Field, J A (1998a) Biotransformation of the major fungal metabolite 3,5-dichloro-*p*-anisyl alcohol under anaerobic conditions and its role in formation of bis(3,5-dichloro-4-hydroxyphenyl)methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3225-3231.
- Verhagen, F J M, van Assema, F B J, Boekema, B K H L, Swarts, H J, Wijnberg, J B P A & Field, J A (1998b) Dynamics of organohalogen production by the ecologically important fungus *Hypholoma fasciculare*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158, 167-178.
- Verta, M, Korhonen, M, Lehtoranta, J, Salo, S, Vartiainen, T, Kiviranta, H, Kukkonen, J, Hämäläinen, H et al. (1999) Ecotoxicological and health effects caused by PCPs, PCDEs, PCDDs, and PCDFs in river Kymijoki sediments, south-eastern Finland. *Organohalogen Compounds* 43, 239-242.
- Vogler, S (2000) Die Gattung *Desulfitobacterium*: Vorkommen, Anreicherungsverfahren und Veränderung des zellulären Fettsäuremusters als ein Anpassungsmechanismus. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Wagenknecht, H-A & Woggon, W-D (1997) Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chem. Biol.* 4, 367-372.
- Wagner, A (2004) Untersuchung der Struktur dioxindechlorierender Mischkulturen durch terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP) und Real-Time-PCR. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Wagner, A, Junick, J, Adrian, L & Lechner, U (2006) Detection of *rdhA* genes of a *Dehalococcoides* strain in a dioxin-dechlorinating mixed culture. *BIOspektrum*, Sonderausgabe, Posterbeitrag auf der VAAM-Jahrestagung, Jena.
- Wagner, D (1999) Innovation und Standort. Hessisches Wirtschaftsarchiv e.V., Darmstadt.
- Waller, A S, Krajmalnik-Brown, R, Löffler, F E & Edwards, E A (2005) Multiple reductive-dehalogenase-homologous genes are simultaneously transcribed during dechlorination by *Dehalococcoides*-containing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8257-8264.
- Warner, J R, Lawson, S L & Copley, S D (2005) A mechanistic investigation of the thiol-disulfide exchange step in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase. *Biochemistry* 44, 10360-10368.
- Werner, B (1997) Reduktive Dechlorierung von polychlorierten Biphenylen und Dibenzo-*p*-dioxinen in anaeroben Mischkulturen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wierenga, R K, Terpstra, P & Hol, W G J (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187, 101-107.
- Wilken, M, Walkow, F, Jäger, E & Zeschmar-Lahl, B (1994) Flooding area and sediment contamination of the River Mulde (Germany) with PCDD/F and other organic pollutants. *Chemosphere* 29, 2237-2252.
- Wittich, R-M (1998) Biodegradation of dioxins and furans. Springer, Heidelberg.
- Wittsiepe, J, Kullmann, Y, Schrey, P, Selenka, F & Wilhelm, M (2000) Myeloperoxidase-catalyzed formation of PCDD/F from chlorophenols. *Chemosphere* 40, 963-968.
- Wohlfahrt, G & Diekert, G (1997) Anaerobic dehalogenases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 290-295.
- Woo, P C, Teng, J L, Leung, K W, Lau, S K, Wong, M K & Yuen, K Y (2004) Bacteremia in a patient with colonic carcinoma caused by a novel *Sedimentibacter* species: *Sedimentibacter hongkongensis* sp. nov. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50, 81-87.
- Wu, Q, Watts, J E M, Sowers, K R & 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.
- Wynands, I & van Pee, K H (2004) A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 and detection of in vitro halogenase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 363-367.
- Yoon, K S, Chen, Y P, Lovell, C R, Lincoln, D E, Knapp, L W & Woodin, S A (1994) Localization of the chloroperoxidase of the capitellid polychaete *Notomastus lobatus*. *Biol. Bull.* 187, 215-222.
- Yoshida, N, Takahashi, N & Hiraishi, A (2005) Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin-dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4325-4334.
- Yu, B-W, Jin, G-Z, Moon, Y-H, Kim, M-K, Kyoung, J-D & Chang, Y-S (2006) Emission of PCDD/F and dioxin-like PCBs from metallurgic industries in S. Korea. *Chemosphere* 62, 494-501.

- Zaborina, O, Daubaras, D L, Zago, A, Xun, L, Saïdo, K, Klem, T, Nikolic, D & Chakrabarty, A M (1998) Novel pathway for conversion of chlorohydroxyquinol to maleylacetate in *Burkholderia cepacia* AC1100. J Bacteriol 180, 4667-4675.
- Zhang, X, Mandelco, L & Wiegel, J (1994) *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic freshwater pond sediment. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 214-222.
- Zhong, W H, Sun, M, GQ, H, Feng, X S & Yu, Z N (2004) Isolation of 2,4-dichlorophenol degrading bacterium strain and cloning and expression of its 2,4-dichlorophenol hydroxylase gene (in chinesisich). Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 20, 209-214.

5 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Jan R. Andreesen für die Möglichkeit zum Aufbau eines eigenen Forschungsgebietes, das er durch großes Interesse und anregende Diskussionen begleitete und unterstützte. Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Frau Prof. Gunhild Straube, Herrn Prof. Heinz Weide und Frau Prof. Mirja Salkinoja-Salonen (Helsinki), die mich in verschiedenen Abschnitten meiner Laufbahn förderten.

Für die jahrelange gute Zusammenarbeit bei der Lösung analytischer Probleme danke ich Frau Dr. Angelika Kraus (Fachbereich Chemie) und Herrn Dr. Matthias Opel (GfA mbH, Labor Hamburg). Bei Herrn Prof. Georg Auling (Universität Hannover) bedanke ich mich für vielfältige Anregungen auf dem Gebiet der Bakterientaxonomie. Für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung des Dioxin-dechlorierenden Bakteriums danke ich herzlich PD Dr. Lorenz Adrian (TU Berlin).

Mein besonderer Dank gilt den jetzigen und früheren Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, einschließlich vieler Diplomandinnen und Diplomanden, für ihre engagierte Arbeit und ihre Begeisterung für umweltrelevante Bakterien. Besonders danken möchte ich den ehemaligen bzw. jetzigen Doktorandinnen und Doktoranden Kathrin Fritsche, Hendrik Ballerstedt, Antje Breitenstein, Michael Bunge und Anke Wagner für den Elan und den „langen Atem“ bei der Arbeit mit unseren schwierigen Bakterien.

Bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie bedanke ich mich für die vielfältige Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Diese Arbeit wurde finanziell von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dem Land Sachsen-Anhalt, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

6 Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten der Verfasserin zum Thema der Habilschrift

- I. Bunge, M., Kähkönen, M. A., Rämisch, W., Opel, M., Vogler, S., Walkow, F., Salkinoja-Salonen, M. & Lechner, U.* (2007) Biological activity in a heavily organohalogen-contaminated river sediment. *ESPR – Environ. Sci. & Poll. Res.* 14, Special Issue 1, 3-10;
OnlineFirst: DOI: <http://dx.doi.org/10.1065/espr.03.298>.
- II. Lechner, U.*, Baumbach, R., Becker, D., Kitunen, V., Auling, G. & Salkinoja-Salonen, M. (1995) Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. *Biodegradation* 6, 83-92.
- III. Makdessi, K. & Lechner, U.* (1997) Purification and characterization of 2,4-dichlorophenol hydroxylase isolated from a bacterium of the α -2 subgroup of the *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 157, 95-101.
- IV. Fritsche, K., Auling, G., Andreesen, J. R. & Lechner, U.* (1999) *Defluviobacter lusatieae* gen. nov., sp. nov., a new chlorophenol-degrading member of the α -2 subgroup of the Proteobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 197-204.
- V. Breitenstein, A., Saano, A., Salkinoja-Salonen, M., Andreesen, J. R. & Lechner, U.* (2001) Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating mixed culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* strain TCP-A. *Arch. Microbiol.* 175, 133-142.
- VI. Breitenstein, A., Wiegel, J., Haertig, C., Weiss, N., Andreesen, J. R., Lechner, U.* (2002) Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 801-807.
- VII. Adrian, L.* & Lechner, U. (2004) Reductive dehalogenation of polychlorinated benzenes and dioxins. In Nakano, M. M. & Zuber, P., *Strict and facultative anaerobes. Medical and environmental aspects*, Horizon Bioscience, Norfolk, England, pp. 303-315.
- VIII. Ballerstedt, H.*, Kraus, A., & 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.
- IX. Bunge, M.*, Ballerstedt, H., 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.
- X. Ballerstedt, H., Hantke, J., Bunge, M., Werner, B., Gerritse, J., Andreesen, J. R. & Lechner, U.* (2004) Properties of a trichlorodibenzo-*p*-dioxin-dechlorinating mixed culture with a *Dehalococcoides* as a putative dehalogenating species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 223-234.
- XI. Bunge, M.*, Adrian, L., Kraus, A., Opel, M., Lorenz, W. G., Andreesen, J. R., Görisch, H. & Lechner, U. (2003) Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature*, 421, 357-360.

*Korrespondierender Autor

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ute Lechner
 Adresse: Howorkastr. 18, 06118 Halle
 Geburtsdatum: 23. November 1953 in Roßlau (Elbe)
 Familienstand: verheiratet mit Wilfried Matzdorf,
 Tochter: Sabine (1977)

Schulbildung

1960 – 1964 Grundschule in Wendisch Rietz
 1964 – 1968 Polytechnische Oberschule in Lindenberg
 1968 – 1972 Erweiterte Oberschule in Beeskow; Abitur

Universitäts-Ausbildung

1972 – 1977 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Diplom.
 Titel der Diplomarbeit: „Bakterieller Abbau von Herbiziden mit Phenylamid-Struktur“
 1976-1981 Forschungsstudium am Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg (Prof. Dr. Wolfgang Fritsche); Dissertation.
 Titel der Dissertation: „Seitenkettenhydrolyse und Spaltung des aromatischen Ringes von Phenylamid-Pestiziden durch bakterielle Isolate“

Wissenschaftlicher Werdegang

1981 – 1985 Wissenschaftliche Assistentin am Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg
 1985 – 1991 Wissenschaftliche Assistentin am Biotechnikum, Institut für Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg
 1991 – 1993 Kommissarische Leiterin des Instituts für Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg
 1993 - Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mikrobiologie der Universität Halle-Wittenberg, seit Ende 1996 in permanenter Position
 1991/1996 Forschungsaufenthalte an der Universität Helsinki, Finnland

Halle, den 1. 9. 2006

Ute Lechner

8 Eidesstattliche Erklärung

Diese Habilitationsschrift wurde selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als Zitate gekennzeichnet.

Halle, den 1. 9. 2006

Ute Lechner