

Zusammenfassung

Über die Identität Dioxin-dehalogenerender Bakterien ist noch wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Anwendung von molekularen Methoden der mikrobiellen Ökologie erstmalig ein Hinweis auf die Beteiligung eines *Dehalococcoides*-Stammes an der Dioxin-Dehalogenierung erhalten. In nachfolgenden Versuchen wurde der für die Dehalogenierung von Chlorbenzolen bekannte *Dehalococcoides*-Stamm CBDB1 als erstes Dioxine-dechlorierendes Bakterium identifiziert.

Als Voraussetzung für diese Arbeiten wurden zunächst Anreicherungskulturen mit Sedimenten des stark mit polychlorierten Dioxinen und Furanen (PCDD/F)-kontaminierten Flusses Spittelwasser angesetzt und auf ihre Fähigkeit untersucht, chlorierte Dioxine unter strikt anaeroben Bedingungen zu dechlorieren. In diesem Teil der Arbeit war es zunächst wichtig, die Transformationswege anhand spezieller Modellverbindungen aufzuklären. Die Kulturen aus verschiedenen Schichten zweier Sedimentkerne waren in der Lage, 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (1,2,3,4-TeCDD), 1,2,3-Trichlordibenzo-*p*-dioxin (1,2,3-TrCDD) und 1,2,4-Trichlordibenzo-*p*-dioxin (1,2,4-TrCDD) reduktiv zu dehalogenieren. Dabei wurden unterschiedliche Dechlorierungswege gefunden, die sich ausgehend von den eingesetzten Dioxinen besonders in der Bildung der dichlorierten Kongenere 1,3- und 2,3-Dichlordibenzo-*p*-dioxin (DiCDD) unterschieden. In nachfolgenden Versuchen wurden Anreicherungskulturen von weniger PCDD-belasteten Flußsedimenten angelegt. Wie gezeigt werden konnte, waren diese Kulturen ebenfalls in der Lage chlorierte Dioxine zu dehalogenieren. Für eine erfolgreiche Anreicherung ist die historische Kontamination der Sedimente offenbar keine Voraussetzung.

Zum selektiven Nachweis von Bakterien, die für ihre Fähigkeit bekannt sind, verschiedene halogenierte Verbindungen zu transformieren, wurden PCR-Primerpaare abgeleitet. Mit einem speziellen *nested* PCR-Verfahren konnte das Vorhandensein einiger dieser Bakterien in den Kulturen gezeigt werden. Besonders interessant war der Befund, dass in allen untersuchten Kulturen Organismen der Gattungen *Desulfitobacterium* und *Dehalococcoides* nachgewiesen werden konnten. Das amplifizierte *Dehalococcoides*-16S rRNA-Genfragment war identisch mit der Sequenz des Stammes CBDB1. Dieser Stamm war zuvor als Tri- bis Hexachlorbenzol-Dechlorierer isoliert und charakterisiert worden (Adrian *et al.* 2000, *Nature* 408: 580-583) und wurde in der vorliegenden Arbeit für Versuche zur Dioxin-Dechlorierung eingesetzt. Der Stamm CBDB1 konnte die getesteten Verbindungen 1,2,3,4-TeCDD, 1,2,3-TrCDD, 1,2,4-TrCDD und 2,3-DiCDD zu niedriger chlorierten Verbindungen dehalogenieren. Die Verbindung 2-Monochlordibenzo-*p*-dioxin war das vorläufige Endprodukt. Bemerkenswert war die Transformation der unter umwelttoxikologischen Aspekten relevanten Verbindung 1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-*p*-dioxin. Während der Dehalogenierung reicherte sich 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin an, welches aber durch diese Reinkultur weiter bis zu 2,7- oder 2,8-DiCDD umgesetzt wurde.

Ein primäres Problem für die Charakterisierung und Isolierung von Dioxin-dechlorierenden Bakterien ist ihr geringer Anteil in Mischkulturen, der zum Teil durch die geringe Wasserlöslichkeit und Verfügbarkeit der Substrate bedingt ist. Der Anteil der Dioxin-dechlorierenden Population an der Gesamtzellzahl wurde mit etwa 0,01 % bestimmt. Im Rahmen der Arbeit wurde daher versucht, mit alternativen chlorierten Verbindungen eine Anreicherung von Dioxin-Dehalogenierern zu erreichen. 1,2,3-Trichlorbenzol, welches über ein Zweiphasensystem mit Hexadekan zugesetzt wurde, konnte

durch die Mischkulturen zu 1,3-Dichlorbenzol dechloriert werden. Dabei nahm die Zahl der Dioxin-dehalogenierenden Bakterien um drei Grössenordnungen zu. Die Änderung der Populationsstruktur während des Anreicherungs-schrittes mit Trichlorbenzol wurde mit 16S rDNA-basierten Methoden dokumentiert. Durch Restriktionsfragmentlängen-Analyse von 16S rRNA-Genbanken konnte die Zunahme von zehn verschiedenen Restriktionsmustern während der 1,2,3-Trichlorbenzol-Dechlorierung gezeigt werden. Abgeleitet aus der starken Zunahme der entsprechenden Sequenzen in der Genbank deutete dies auf die Anreicherung eines mit *Dehalococcoides* sp. CBDB1 verwandten Stammes und eines Bakteriums der *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*-Gruppe hin. Mit einer anderen 16S-basierten Methode, *Single-Strand Conformation Polymorphism*, konnte ausserdem die Anreicherung eines *Trichlorobacter thiogenes*-ähnlichen Bakteriums (δ -*Proteobacteria*) dokumentiert werden.

Die Interaktionen zwischen dechlorierenden Bakterien und anderen Populationen innerhalb von Mischkulturen sind wenig untersucht, könnten aber von entscheidender Bedeutung für die Isolierung von Dioxin-dechlorierenden Bakterien sein. Es war interessant, dass in den Anreicherungskulturen, die mit einem Gemisch von organischen Säuren inkubiert wurden, ein Vertreter der Gattung *Syntrophus* identifiziert werden konnte. Seine mögliche Rolle bei der Bereitstellung von Wasserstoff als direktem Elektronendonator für die reduktive Dechlorierung wird diskutiert.