

**Charakterisierung des Abbaus von Bisphenol A
durch *Cupriavidus basilensis*
und
Bewertung der cytotoxischen Wirkung dieses Schadstoffs anhand
von Membranlipidanalysen in *Pseudomonas putida***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Janett Fischer

geboren am 06.10.1979

in Halle/ Saale

Greifswald, 15.01.2009

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Fesser

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Frieder Schauer

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. Nat. Matthias Kästner

Tag der Promotion: 10.06.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Vorkommen von Bisphenol A	1
1.2	Eigenschaften von Bisphenol A.....	1
1.3	Bisphenol A in der Umwelt	3
1.4	Toxizität von Bisphenol A.....	4
1.5	Endokrine Wirkung von Bisphenol A	5
1.6	Abbau von Bisphenol A	6
1.6.1	Photodegradation.....	6
1.6.2	Transformation von Bisphenol A durch Pflanzen, Tiere und Pilze	7
1.6.3	Bakterieller Abbau von Bisphenol A.....	9
1.6.4	Abbauwege in Bakterien	10
1.7	Anpassung von Bakterien an Stress.....	14
1.7.1	Sättigungsgrad von Fettsäuren	15
1.7.2	<i>cis-trans</i> -Isomerisierung ungesättigter Fettsäuren	15
1.8	Ziel der Arbeit.....	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Mikroorganismen	18
2.1.2	Medien	18
2.1.3	Sandsäulen.....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Bestimmung der Sauerstoffkonzentration/-sättigung	22
2.2.2	Adsorptionstests	23
2.2.3	Stammhaltung.....	24
2.2.4	Kulturbedingungen.....	24
2.2.5	Bestimmung der optischen Dichte	25
2.2.6	Vorkulturen	25

2.2.7	Toxizitätstests in Schüttelkulturen.....	25
2.2.8	Erfassung der zeitlichen Veränderung der Toxizitätswirkung	26
2.2.9	Berechnung der Wachstumsparameter	27
2.2.10	Toxizitätstests in Sandsäulen.....	28
2.2.11	Analyse der Fettsäuren.....	29
2.2.11.1	Probenvorbereitung.....	29
2.2.11.2	Fettsäureextraktion.....	29
2.2.11.3	Derivatisierung mit Bortrifluorid.....	30
2.2.11.4	FID-Gaschromatographie	31
2.2.11.5	Berechnung der Parameter für die Adaption der Membran	32
2.2.12	Wachstum mit Bisphenol A	33
2.2.12.1	Bisphenol A als einzige C-Quelle	33
2.2.12.2	Bisphenol A und Phenol als C-Quellen.....	33
2.2.12.3	Wachstum in Sandsäulen.....	34
2.2.12.4	Bestimmung der Bisphenol A-Konzentration	34
2.2.13	Extraktion extrazellulärer Intermediate mit Diethylether.....	36
2.2.14	Festphasen-Extraktion (SPE)	36
2.2.15	Derivatisierung der BPA-Extrakte und Gaschromatographie/ Massenspektrometrie	37
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Abbau von Bisphenol A	38
3.1.1	Isolationsversuch	38
3.1.2	Identifikation des Isolats RW4.....	39
3.1.3	Charakterisierung von <i>C. basilensis</i> RW4.....	40
3.1.4	Wachstum von <i>C. basilensis</i> RW4 mit Succinat als C-Quelle.....	43
3.1.5	Toxischer Effekt von Bisphenol A auf <i>C. basilensis</i> RW4	44
3.1.6	Wachstum von <i>C. basilensis</i> mit Bisphenol A als C-Quelle	45
3.1.7	Charakterisierung von Intermediaten des BPA-Abbaus.....	46
3.1.8	Abbau von Bisphenol A mit Phenol als zusätzlicher C-Quelle	51
3.1.8.1	Toxische Wirkung von Phenol auf <i>C. basilensis</i> RW4	52
3.1.8.2	Wachstum von <i>C. basilensis</i> RW4 mit Phenol als C-Quelle	53

3.1.8.3	Abbau von BPA und Phenol in Schüttelkulturen	54
3.1.9	Kultivierung von <i>C. basilensis</i> RW4 in Sandsäulen	55
3.1.9.1	Adsorption von BPA und Phenol an Sand	56
3.1.9.2	Abbau von Bisphenol A in Sandsäulen.....	59
3.2	Membrantoxische Wirkung von Bisphenol A	62
3.2.1	Konzentrationsabhängige Effekte von BPA auf <i>P. putida</i> P8	63
3.2.2	Zeitabhängige Effekte von BPA auf <i>P. putida</i> P8	66
3.2.3	Konzentrationsabhängige Effekte von BPA auf <i>P. putida</i> P8 mit Phenol als C-Quelle.....	68
3.2.4	Zeitabhängige Effekte von BPA auf <i>P. putida</i> P8 mit Phenol als C-Quelle	70
3.2.5	Toxische Wirkung von Bisphenol A im Säulensystem.....	72
3.2.5.1	Bestimmung von Wasser- und Sauerstoffgehalt im Säulensystem.....	72
3.5.2.2	Zeitabhängige Effekte von Bisphenol A in den Sandsäulen.....	75
3.5.2.3	Konzentrationsabhängige Effekte von BPA im Sandmikrokosmos	78
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Identifikation und Charakterisierung von <i>Cupriavidus basilensis</i> RW4	81
4.2	Abbau von Bisphenol A durch <i>C. basilensis</i> RW4	83
4.3	Abbauweg von Bisphenol A.....	84
4.4	Abbau von BPA mit Phenol als zusätzliches Wachstumssubstrat.....	86
4.5	Abbau von Bisphenol A im Sandmikrokosmos	87
4.6	Toxisches Potential von Bisphenol A.....	89
4.7	Einfluss von BPA auf die Membranzusammensetzung von <i>P. putida</i> P8.....	90
4.8	Charakterisierung der toxischen Zonen in den Sandsäulen	93
4.9	<i>Cis-trans</i> -Isomerisierung als Biomarker.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	97
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	99
7	ANHANG	118

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Wachstumsrate
μg	Mikrogramm
μM	Mikromol
¹⁴ C	Kohlenstoffatom mit der Massenzahl 14
16S rRNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribosomal ribonucleic acid</i>) der kleinen Ribosomenuntereinheit (S = Sedimentationseinheit)
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
4-IPP	4-Isopropylphenol
4-OH-	4-Hydroxy-
A. dest.	destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua destillare</i>)
Abb.	Abbildung
ad	auf (lat.)
ADP	Adenosindiphosphat
API	biochemische Reihe zur Identifikation von Mikroorganismen anhand von standardisierten und miniaturisierten Assimilations- und Fermentationsreaktionen (Firma BIOMERIUEX, Nürtingen)
ATP	Adenosintriphosphat
BCF	Biokonzentrationsfaktor (engl.: <i>bioconcentration factor</i>)
BF ₃	Bortrifluorid
BIOLOG	Firma, die Testkits zur Charakterisierung und Identifizierung von Mikroorganismen über phänotypische Eigenschaften herstellt (Vertrieb über OXOID GmbH, Wesel)
BIOTOOL	Biological procedures for diagnosing the status and predicting evolution of polluted environments
BP	Bisphenol(e)
BPA	Bisphenol A
BPA-d ¹⁴	14fach deuteriertes Bisphenol A
BPA-monoGlc	Bisphenol A-4'-β-D-Glycopyranosid

C	Kohlenstoff
<i>C. basilenisis</i>	<i>Cupriavidus basilensis</i>
C16:0	Hexadecansäure (Palmitinsäure)
C16:1 Δ 11	Palmitelaidinsäure
C16:1 Δ 9	Palmitoleinsäure
C16:1 <i>cis</i>	<i>cis</i> -Isomer der Palmitelaidinsäure
cy17:0	cyclische Heptadecansäure
C18:0	Octadecansäure (Stearinsäure)
C18:1 Δ 11	Vaccensäure
C18:1 Δ 9	Ölsäure
CAS-Nummer	eindeutiger Zahlenindex für jede chemische Verbindung (engl. <i>Chemical-Abstract-Service</i>)
cm	Zentimeter
Cti	<i>cis-trans</i> -Isomerase
Cy	Cyclopropylverzweigung
d	Tag
D	Durchflussrate
DC	Dünnschichtchromatographie
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(<i>p</i> -chlorphenyl)-ethan
<i>de novo</i> -Synthese	Neusynthese
DGGE	Denaturierende Gelelektrophorese
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	exponentiell
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1-4	Ebenen der Sandsäule
EC ₅₀	effektive Konzentration (engl.: <i>estimated concentration</i>), bei der 50 % des Wachstums gehemmt wird; toxikologische Größe
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (Komplexbildner)
ER α , ER β , ncmER,	Östrogenrezeptoren
ERR- γ	
et al.	und andere (lat.: <i>et altera</i>)
EU	Europäische Union
FAME	Fettsäuremethylester (engl.: <i>fatty acid methyl ester</i>)

Fe ²⁺ , Fe ³⁺	oxidiertes Eisen
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung (engl.: <i>g-force</i>)
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
h	Stunde
H	Henry-Konstante
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	Inhibierungskonzentration (engl.: <i>inhibition concentration</i>) bei der 50 % des Wachstums gehemmt wird
Kb	Kilobasenpaare
K _{oc}	Boden-Sorptions-Konstante (engl.: <i>organic carbon adsorption coefficient</i>); charakterisiert die Verteilung eines Stoffes in der festen und flüssigen Phase des Bodens, welche die Mobilität im Boden bestimmt
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani (Medium)
LC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % der Organismen sterben (engl.: <i>lethal concentration</i>), toxikologische Größe
ln(x)	natürlicher Logarithmus (gr.: <i>logarithmus naturalis</i>)
log _{ow}	Octanol-Wasser-Koeffizient
/log-Phase	logarithmische Wachstumsphase
logP _{ow}	entspricht log _{ow} (engl.: <i>partitioning</i>)
m	Meter
m/z	Massenzahl
mg	Milligramm
MIC	Letale Dosis, minimale Hemmkonzentration (engl.: <i>minimal inhibition concentration</i>)
min	Minute

mm	Millimeter
MM	Mineralsalzmedium
mM	Millimol
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule, Druckeinheit
MSD	Massenselektiver Detektor
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
MW	Molekulargewicht
m/z	Massenzahl
N.	Nummer (engl.: <i>number</i>)
NAD(P) ⁺	oxidiertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(Phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(Phosphat)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus, Ende eines Proteins, welches eine Aminosäure mit freier Aminogruppe hat
OD _x	Optische Dichte bei x nm
OH-Gruppe	Hydroxylgruppe
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PB-LC/MS	Partikellichtstrahl- Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFLA	Phospholipidfettsäuren (engl.: <i>phospho lipid fatty acid</i>)
PFR	Testreaktor für Pflanzenkläranlagen (engl.: <i>Planted Fixed Bed Reactor</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pK _a	Dissoziationskonstante
POF	Polymerfaser
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RT	Retentionszeit (engl.: <i>retention time</i>)
SAM	S-Adenosylmethionin
sec	Sekunde
sp.	<i>species</i> (lat. für Art)

SPE	Festphasenextraktion (engl.: <i>solid phase extraction</i>)
t1-t4	Zeitpunkt 1 bis 4
Tab.	Tabelle
t _D	Verdopplungszeit
TGGE	Temperaturgradientengelelektrophorese
T-RFLP	Terminale Restriktionsfragmentanalyse
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
UGT	Glucuronosyltransferase
UV	ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
V	Verweilzeit
V79-Zellen	Chinesische Hamster-Fibroblasten-Zellen
Δ	Position der Doppelbindung vom Carboxylende aus
λ	Wellenlänge (gr.: <i>lambda</i>)
ω	Position der Doppelbindung vom aliphatischen Ende aus

1 EINLEITUNG

Bisphenol A ist ein Umweltschadstoff, der in zahlreichen Plastikmaterialien und Lebensmittelverpackungen vorkommt und aufgrund seiner weiten Verbreitung in der Umwelt, seiner Persistenz und vor allem der endokrinen Effekte auf tierische Organismen von zunehmender Bedeutung ist.

1.1 Vorkommen von Bisphenol A

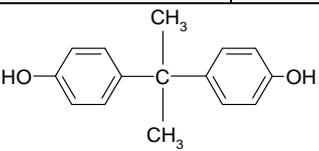
Bisphenol A ist ein wichtiger Bestandteil bei der Herstellung von chemischen Produkten. Circa 90% des Bisphenol A werden für die Erzeugung von Polycarbonat und Epoxydharzen verwendet. In geringerer Menge wird es als Intermediat zur Produktion von Flammschutzmitteln eingesetzt (Staples et al. 1998, Staples et al. 2002, Suzuki et al. 2004). Diese Materialien finden eine breite Anwendung bei der Synthese weiterer Produkte. So werden die Harze unter anderem für Autoteile, Klebstoffe, Wände von Wasserleitungen sowie für die Oberflächenbeschichtung von Lebensmitteldosen genutzt. Das Polycarbonat wird als Baumaterial, Umhüllung von elektronischen Teilen bei Fahrzeugen und Haushaltsgeräten verwendet. Bei der Herstellung von Nahrungsmittelverpackungen und Plastikflaschen spielt es ebenfalls eine große Rolle (Staples et al. 1998).

1.2 Eigenschaften von Bisphenol A

Bei Raumtemperatur bildet das feste Bisphenol A Kristalle und Flocken. Der Schmelzpunkt liegt bei 150-155°C. Nach Howard (1989) und Dorn et al. (1987) sind 120 mg bzw. 300 mg BPA in einem Liter Wasser löslich. Die Dissoziationskonstante pK_a liegt bei 9,6-10,2. Unter normalen pH-Wert-Bedingungen beträgt der Oktanol-Wasser-Koeffizient $\log K_{ow}$ bzw. $\log P_{ow}$ 3,40 (Staples et al. 1998). Das bedeutet, dass Bisphenol A zur Gruppe von Stoffen gehört, die in erhöhter Konzentration schädigend auf Zellmembranen wirken (Heipieper et al. 1994). Für die Boden-

Sorptions-Konstante K_{oc} errechnete Howard (1989) Werte von 314 bis 1524, die durch Cousins et al. (2002) auf 640-930 eingeschränkt wurden. Mit diesem Adsorptionspotential stellt der Boden eine Senke für freigesetztes Bisphenol A dar. Mit einem Dampfdruck von $4,0E-8$ mm Hg und einer Henry-Konstante (H) von $1,0E-10$ $\text{atm}^{-m^3}/\text{mol}$ (Howard 1989) verflüchtigt sich Bisphenol A nur gering. Der Biokonzentrationsfaktor (BCF), der das Potential einer Substanz beschreibt, sich in Wasserorganismen zu akkumulieren, liegt bei 5 bis 65. Damit ist dieser niedriger als man vom $\log P_{ow}$ ausgehend erwarten würde (Staples et al. 1998). In der Tabelle 1-1 sind weitere physikalisch-chemische Eigenschaften von Bisphenol A zusammengefasst.

Tab. 1-1: Physikalische und chemische Eigenschaften von Bisphenol A

Parameter	Werte	Referenz
CAS Nummer	80-05-7	Staples et al. 1998
Chemische Struktur		
Molekulargewicht	228 g/mol	Staples et al. 1998
Formel	$C_{15}H_{16}O_2$	Staples et al. 1998
Siedepunkt	220°C	Howard 1989
Schmelzpunkt	150-155°C	Howard 1989
pK_a	9,6-10,2	Staples et al. 1998
Wasserlöslichkeit	120-300 mg/l	Howard 1989, Dorn et al. 1987
Dampfdruck	$4,0E-8$ mm Hg	Howard 1989
$\log P_{ow}$	3,40	Staples et al. 1998
K_{oc}	314-1524 640-930	Howard 1989 Cousins et al. 2002
Henry-Konstante	$1,0E-10$ $\text{atm}^{-m^3}/\text{mol}$	Howard 1989
BCF	5-65	Staples et al. 1998

1.3 Bisphenol A in der Umwelt

Zu Beginn der 90er Jahre betrug die jährliche Produktion von Bisphenol A rund 420.000 t weltweit (Lobos et al. 1992). Im Jahr 2001 steigerte sich diese um 83% auf fast 2,5 Millionen Tonnen (Staples et al. 2002). Die Hauptproduktionsgebiete sind jedoch auf die Regionen der Vereinigten Staaten von Amerika (48 %), Westeuropa (32 %) und Japan (20 %) begrenzt (Cousins et al. 2002).

Im Lebensmittelbereich gibt es eine Richtlinie, die regelt, wie viel Bisphenol A aus Verpackungen freigesetzt werden darf (EEC 1993, CEC 1994). Für BPA als Zusatz in Kunststoffen, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen, legte die EU-Kommission im „Synoptic Document No. 7“ (CEC 1994) einen Migrationswert von 3 mg/kg Lebensmittel fest.

Während der Herstellung, der Behandlung und des Transports kann Bisphenol A über diffuse Emissionen in die Luft gelangen. Jedoch geschieht dies aufgrund der geringen Flüchtigkeit nur auf sehr niedrigem Niveau. Eine direkte Abgabe in die Umwelt kann über die Einleitung von industriellem Abwasser in Oberflächengewässer und durch Ablagerung von Abfällen erfolgen.

Eine bedeutende Quelle stellt die Auswaschung des während Verwitterungsprozessen aus industriellen und kommunalen Abfällen freigesetzten Bisphenol A dar. Das auf diese Weise freigewordene BPA wird in Böden oder Oberflächengewässer eingetragen und akkumuliert sich dort (Cousins et al. 2002).

Auch über die biologische reduktive Dehalogenierung von Tetrabrombisphenol A kann Bisphenol A entstehen, welches in die Umgebung freigesetzt wird (Ronen und Abeliovich 2000).

Bei mehreren Probennahmen wurden in natürlichen Gewässern in Japan 0,71 µg/l und in den USA 12 µg/l BPA nachgewiesen. In Europa war Bisphenol A meist undetektierbar (Suzuki et al. 2004).

Eine vielfach höhere Konzentration der Substanz wurde im Sickerwasser von Sondermülldeponien (1,3-17,2 mg/l; Yamamoto et al. 1999, Suzuki et al. 2004) und im Klärschlamm (0,004-1,36 mg/kg Trockengewicht; Fromme et al. 1999) gefunden.

Für den Nachweis von nicht über GC/MS detektierbaren BPA-Mengen nutzte man die Partikellichtstrahl-Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (PB-LC/MS) (Staples et al. 1998). Markham et al. (1998) entwickelten eine Technik, die aus einer

Kombination von gekühlter Säulen-Injektion, Gaschromatographie, Elektronenstoßionisation und Massenspektrometrie bestand, um Bisphenol A in Oberflächengewässern zu analysieren.

Aufgrund der weit verbreiteten Belastung kann Bisphenol A in geringen Konzentrationen auch in pflanzlichen und tierischen Organismen nachgewiesen werden. Als Beispiele dienen hier die Studien an Süßwasserschnecken von Kang und Kondo (2006) und verschiedenen Fischarten (Lindholst et al. 2001, Belfroid et al. 2002). Ein Vorkommen der Chemikalie in humanen Flüssigkeiten wie Urin, Serum und Muttermilch aufgrund der Anreicherung in Nahrungsmitteln ist somit keine Besonderheit (Ouchi und Watanabe 2002, Calafat et al. 2005, Volkel et al. 2005).

1.4 Toxizität von Bisphenol A

In der Verwaltungsvorschrift für wassergefährdende Stoffe (VwVwS) vom 17. Mai 1999 ordnete das Umweltbundesamt Bisphenol A aufgrund seines toxischen, östrogenwirksamen und bioakkumulativen Potentials in die Gefährdungsklasse 2 ein. Der Einfluss von Bisphenol A auf das Wachstum bzw. die Sterblichkeit wurde in diversen Studien an unterschiedlichen Arten verschiedener Organismen im Süß- und Salzwasser untersucht.

So ermittelte man für einige Mikroorganismen, Algen und Invertebraten die mittlere Effektkonzentration EC_{50} , für limnische und marine Fische die mittlere letale Konzentration LC_{50} . Die Tabelle 1-2 zeigt dazu einige Beispiele.

Laut Staples et al. (1998; 2002) ist Bisphenol A aufgrund der bei EC_{50} - bzw. LC_{50} -Bestimmungen ermittelten Konzentrationen von 1000-320.000 $\mu\text{g/l}$ als mäßig toxisch zu bewerten.

Tab. 1-2: Toxizität von Bisphenol A an ausgewählten Beispielen (Staples et al. 1994)

Organismus	Test-Typ	Endpunkt	Menge (µg/l)
<u>Mikroorganismen</u>			
<i>Pseudomonas putida</i>	18-h EC ₅₀	10% weniger Wachstum	>320.000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	IC ₅₀	Wachstumshemmung	54.500
<u>Grünalgen</u>			
<i>Selanastrum capricornutum</i>	96-h EC ₅₀	Zellzahl/Zellvolumen	2700/3100
<i>Skletonema costatum</i>	96-h EC ₅₀	Zellzahl/Zellvolumen	2500/1000
<u>Invertebraten</u>			
<i>Daphnia magna</i> Wasserfloh	48-h EC ₅₀	Immobilisierung	3900 - 10.000
<u>Fische</u>			
<i>Pimphales promelas</i> Dickkopf-Elritze	96-h LC ₅₀	Sterblichkeit	4700
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenbogenforelle	96-h LC ₅₀	Sterblichkeit	3000 - 4000
<i>Menidia menidia</i> Mondährenfisch	96-h LC ₅₀	Sterblichkeit	9400
<i>Cyprinodon variegatus</i> Schafkopf-Elritze	96-h LC ₅₀	Sterblichkeit	7500

Mit Hilfe des Ames-Tests (Anderson et al. 1978, Schweikl et al. 1998). und des *umu*-Tests (Chen et al. 2002) an *Salmonella typhimurium* bzw. V79-Zellen konnte gezeigt werden, dass Bisphenol A nicht mutagen wirkt. Jedoch war eine Zytotoxizität durch chromosomale Aberrationen bei Eizellen des Chinesischen Hamsters zu beobachten (Hilliard et al. 1998). Zudem wirkt Bisphenol A toxisch auf das Immunsystem und reduziert die unspezifische Immunabwehr von Mäusen (Sugita-Konishi et al. 2003).

1.5 Endokrine Wirkung von Bisphenol A

Die endokrine Wirksamkeit von Bisphenol A hat starkes Interesse in der Öffentlichkeit hervorgerufen. BPA kann sich an Östrogenrezeptoren, z.B. ER α , ER β , ncmER und ERR- γ von Wirbeltieren binden und die östrogen-abhängigen Gene beeinflussen (Nadal et al. 2000, 2004, Takayanagi et al. 2006, Wetherill et al. 2007, Matsushima et al. 2007). Die Aktivität und Bindungsaffinität mit dem Östrogenrezeptor sind jedoch *in vitro* 1.000-5.000-fach geringer als die des natürlichen Effektormoleküls 17- β -Östradiol (Dodge et al. 1996, Steinmetz et al.

1997). Verschiedene Studien zeigten, dass Bisphenol A auch als Antagonist zum Androgenrezeptor wirkt (Bonefeld-Jorgensen et al. 2007). Eine Interaktion mit den Thyroidhormonrezeptoren (Moriyama et al. 2002, Jung et al. 2007, Fini et al. 2007) und die Hemmung der Enzymaktivität der Aromatase, welche Testosteron zu Estradiol konvertiert, ist ebenfalls möglich (Bonefeld-Jorgensen et al. 2007, Benachour et al. 2007).

Lindholst et al. (2001) zeigten die Akkumulation von Bisphenol A in den Leber- und Muskelzellen von Vertebraten. Zudem konnte ein nachteiliger Effekt der Substanz auf die Reproduktionsfähigkeit festgestellt werden. So verursacht Bisphenol A bei männlichen Fischen eine verstärkte Produktion von östrogenreguliertem Vitellogenin, einem Protein, das die Spermienbildung negativ beeinflusst. Vitellogenin wird normalerweise nur von den weiblichen Tieren gebildet. Eine Reduktion der Hodengröße wurde ebenfalls beobachtet. (Lindholst et al. 2001, Sohoni et al. 2001, Iguchi et al. 2001). Andere Vertebraten wie der Breitschnauzenkaiman *Caiman latirostris* zeigten Geschlechtsumwandlungen und veränderte Gonadenstrukturen (Stoker et al. 2003). Des Weiteren berichteten Jobling et al. (2003) von einer Stimulation der Ei- und Embryobildung bei Mollusken (z.B. *Potamopyrgus antipodarum*) durch BPA.

Wegen einer möglichen Verursachung von Brustkrebs, Endometriose und Unfruchtbarkeit wird Bisphenol A als Gefahr für den Menschen angesehen (Colborn und Clement 1992, Stone 1994).

1.6 Abbau von Bisphenol A

Aufgrund des hohen Gefährdungspotentials von Bisphenol A für Mensch und Umwelt besteht erhebliches Interesse an der Untersuchung des Abbaus der Verbindung. Dieser kann durch biotische und abiotische Prozesse bedingt sein.

1.6.1 Photodegradation

Im Wasser und in der Atmosphäre erfolgt die Photodegradation über Photolyse oder Photooxidation. Bei der Photolyse absorbiert der in Wasser gelöste Stoff das

Sonnenlicht (Wellenlängen >290 nm), wodurch Bindungen im Molekül gespalten werden. Nach Howard (1989) zeigt Bisphenol A eine signifikante UV-Licht-Absorption bei 290 nm in basischer Methanol-Lösung; in sauren und neutralen Bereichen ist die Absorption geringer. Deshalb wird angenommen, dass BPA in Oberflächenwasser photolysieren kann. Jedoch haben der pH-Wert, die Wasserturbulenz, die Menge des eingestrahlt Sonnenlichts und weitere Eigenschaften des Wassers einen großen Einfluss auf die Effizienz der photolytischen Spaltung.

Photooxidation hingegen beruht auf der Interaktion der Substanz mit Hydroxid-Radikalen oder anderen Oxidationsmitteln. Hier liegen die Halbwertszeiten von Bisphenol A in Luft bei 0,74-7,4 h und in Wasser bei 66 h-160 d. Als Nebenprodukte der Photodegradation können Phenol, 4-Isopropylphenol und Semi-Chinon-Derivate des BPAs auftreten (Howard 1989).

1.6.2 Transformation von Bisphenol A durch Pflanzen, Tiere und Pilze

Pflanzen, Tiere und Pilze können Bisphenol A durch Bildung von Konjugaten oder Polymerisierungsreaktionen aus den kontaminierten Habitaten entfernen. Jedoch wird der Schadstoff durch diese Mechanismen nur detoxifiziert und als transformierte Verbindung gespeichert oder in die Umwelt entlassen.

Die Konjugatbildung erfolgt in Pflanzen hauptsächlich durch Glycosylierung und in Tieren durch Sulfatierung bzw. Glucuronisierung.

So beschrieben Hamada et al. (2002), dass Zellkulturen aus *Eucalyptus perriniana* eine regioselektive Hydroxylierung in *ortho*-Position und Glycosylierung der Hydroxylgruppen von Bisphenol A durchführen. Bei den Mikroalgen *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus quadricauda* und *Coelastrum reticulatum* wurde dieser Prozess, welcher durch die Glycosyltransferase realisiert wird, ebenfalls nachgewiesen (Nakajima et al. 2007). Andere Pflanzen wie der Konvolvulus (*Ipomoea aquatica*), die Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) und die Wasserhyazinthe (*Eichornia crassipes*) besitzen die Fähigkeit, Bisphenol A aus kontaminiertem Wasser zu absorbieren, zu β -Glycosiden (BPA-Mono-Glycopyranoside, Abb. 1-1) zu transformieren und diese Verbindungen in den Wurzeln zu speichern (Nakajima et al. 2002, Nouredin et al. 2004, Kang und Kondo 2006).

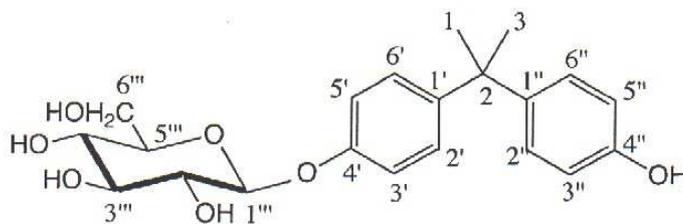


Abb. 1-1: Struktur von BPA-4'-β-D-Glycopyranosid (BPA monoGlc, Nouredin et al. 2004)

In Tieren erfolgt die Bildung von BPA-Transformationsprodukten durch die Ausscheidungsmechanismen. So wird in Säugetieren das Bisphenol A durch die UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) glucuronisiert (Yokota et al. 1999, Matsumoto et al. 2002). Dadurch wird das Bisphenol A löslicher in Wasser und kann einfacher über den Urin eliminiert werden. Die Sulfotransferase übernimmt die Sulfatierung des BPAs zu einem BPA-Sulfat-Konjugat (Suiko et al 2000, Nishiyama et al. 2002). Dieses Produkt wird über die Galle ausgeschieden. In Fischen, wie z.B. dem Zebrafisch (*Danio rerio*) konnten die gleichen Transformationsprodukte nachgewiesen werden (Lindholst et al. 2003).

Die Polymerisierung von Bisphenol A findet mit Hilfe der ligninolytischen Enzyme Laccase und Manganperoxidase von im Boden lebenden Pilzen statt. Als Modellobjekte dienen vor allem die Enzyme der Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* (Tsutsumi et al. 2001), *Pleurotus ostreatus* (Hirano et al. 2000) und *Trametes villosa* (Fukuda et al. 2001).

Bei der Laccase handelt es sich um eine Multikupferoxidase. Sie katalysiert unter anderem die Oxidation von Polyphenolen, methoxysubstituierten Phenolen, Lignin und vielen anderen Stoffen in einer Ein-Elektronen-Reaktion (Mayer und Harel 1979, Reinhammer und Malmstrom 1981, Mayer 1987). Die Manganperoxidase katalysiert ebenfalls Oxidationen phenolischer und nicht-phenolischer Verbindungen in Gegenwart von Mangan und H_2O_2 (Wariishi et al. 1992). Aufgrund ihrer breiten Substratspektren, wurde angenommen, dass die beiden Enzyme auch in der Lage sind Bisphenol A umzusetzen (Fukuda et al. 2001, Tsutsumi 2001, Uchida et al. 2001). So wurden durch eine Laccase-Behandlung 70 % des eingesetzten BPA (0,22 mM) innerhalb einer Stunde transformiert. Es wurden vor allem Polymerisationsprodukte z. B. 5,5'-Bis-[1-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]-biphenyl-

2,2'-diol gebildet (Uchida et al. 2001). Eine Behandlung mit der Manganperoxidase war sogar noch effektiver. Hier wurde bei gleich hoher Ausgangskonzentration bereits nach einer Stunde kein BPA mehr gefunden (Tsutsumi et al. 2001). Somit sind neben dem bakteriellen Abbau hauptsächlich die Laccasen und Manganperoxidasen aus Basidiomyceten für die Beseitigung von Bisphenol A und dessen Detoxifikation von Bedeutung.

1.6.3 Bakterieller Abbau von Bisphenol A

Obwohl Pflanzen, Tiere und Pilze in der Lage sind, komplexe organische Verbindungen wie Bisphenol A zu transformieren, entstehen durch diese Reaktionen vielfach nur Konjugate und Polymerisierungsprodukte. Offenbar sind vor allem Bakterien befähigt, solche Moleküle effektiv zu mineralisieren und einen weitgehend vollständigen Abbau zu unterziehen.

Der bakterielle Abbau von Bisphenol A erfolgt im Boden und im Wasser in der Regel durch ubiquitär verbreitete Mikroorganismen. Die Bakterienpopulationen sind in der Lage, sich an BPA anzupassen und dieses zu transformieren oder abzubauen (Klečka et al. 2001, Fent et al. 2003). Durch Versuche mit ^{14}C -markiertem Bisphenol A wurden im Boden zwei Ursachen für das Verschwinden der Substanz gefunden. Ein Teil des Stoffes wird durch die Bodenmikroorganismen abgebaut; die Halbwertszeit beträgt hierbei weniger als 3 d. Der überwiegende Anteil von Bisphenol A wird jedoch aufgrund der starken Affinität an die organische Bodenmatrix gebunden. Die so entstandenen nicht-extrahierbaren Komplexe – möglicherweise auch durch Polymerbildung bedingt - weisen nur eine geringe Bioverfügbarkeit auf und werden daher nur sehr langsam mikrobiell (nur ca. 20% in 120 Tagen) abgebaut (Fent et al. 2003). Im Wasser konnte unter aeroben Bedingungen im Verlauf mehrerer Studien für BPA eine Halbwertszeit von 2-4 d bestimmt werden (Dorn et al. 1987, Klečka et al. 2001, Kang und Kondo 2002).

Es konnten verschiedene BPA-abbauende Bakterien isoliert werden. Dabei handelt es sich unter anderem um *Sphingomonas sp.* AO1 (Sasaki et al. 2005) bzw. *Sphingomonas bisphenolicum* (Oshiman et al. 2006), die unidentifizierten Gram-negativen Bakterienstämme MV1 (Lobos et al. 1992) und WH1 (Ronen und

Abeliovich 2000), *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4 (Ike et al. 1995, Ike et al. 2002) und *Pseudomonas monteilii* N-502 (Masuda et al. 2006). Jedoch scheint ihre Fähigkeit zum Abbau höherer Bisphenol A-Konzentrationen begrenzt. Es wird angenommen, dass unter anaeroben Verhältnissen kein Abbau von Bisphenol A erfolgt. Bei entsprechenden Versuchen war selbst nach drei Monaten keine Abnahme zu erfassen (Ronen und Abeliovich 2000, Kang und Kondo 2002).

1.6.4 Abbauewege in Bakterien

Eine Möglichkeit des bakteriellen Abbaus von Bisphenol A wurde von Spivack et al. (1994) und Lobos et al. (1992) am Beispiel des nicht näher charakterisierten Gram-negativen Bakteriums MV1, beschrieben. Anhand von so genannten „Schlüssel-Metaboliten“ (4-Hydroxyacetophenon, 4-Hydroxybenzoesäure, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol und 2,3-Bis-(4-hydroxyphenyl)-1,2-propandiol) konnte ein Haupt- und Nebenweg des Abbaus postuliert werden (Abb. 1-2).

Über den Hauptweg werden 80-95 % des eingesetzten Bisphenol A durch hydrolytische Spaltung zu 1,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-2-propanol (Triol II) umgesetzt (Abb. 1-2 und Abb. 1-3). Das Triol II wird bei neutralen pH-Wert-Bedingungen schnell zu 4,4'-Dihydroxy- α -methylstilben dehydriert. In einer anschließenden oxidativen Spaltung entstehen 4-Hydroxyacetophenon und 4-Hydroxybenzaldehyd. Das entstandene 4-Hydroxybenzaldehyd wird zu 4-Hydroxybenzoesäure oxidiert. Die beiden Endprodukte 4-Hydroxyacetophenon und 4-Hydroxybenzoesäure werden komplett zu Protocatechuat umgesetzt. Protocatechuat wird weiter über den *meta*-Abbaueweg metabolisiert und für das Zellwachstum genutzt.

Aus den restlichen 15-20 % Bisphenol A entsteht im Nebenabbaueweg 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol (Triol I). Durch simultane Oxidation und Umstrukturierung bildet sich 2,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-1,2-propandiol. Diese Reaktion ähnelt der Methylhydroxylierung von *p*-Kresol durch *Pseudomonas putida*. 2,3-Bis-(4-hydroxyphenyl)-1,2-propandiol ist mit circa 90 % der Hauptmetabolit dieses Abbaueges. Es folgt eine langsame Biotransformation zu 2-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-ethanon und 4-Hydroxybenzoesäure. Die verbleibenden 10 % vom Triol I werden an der ersten Hydroxylgruppe zu 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-

propansäure oxidiert. Weder 2-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-ethanon noch 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propansäure dienen als Wachstumssubstrat für MV1.

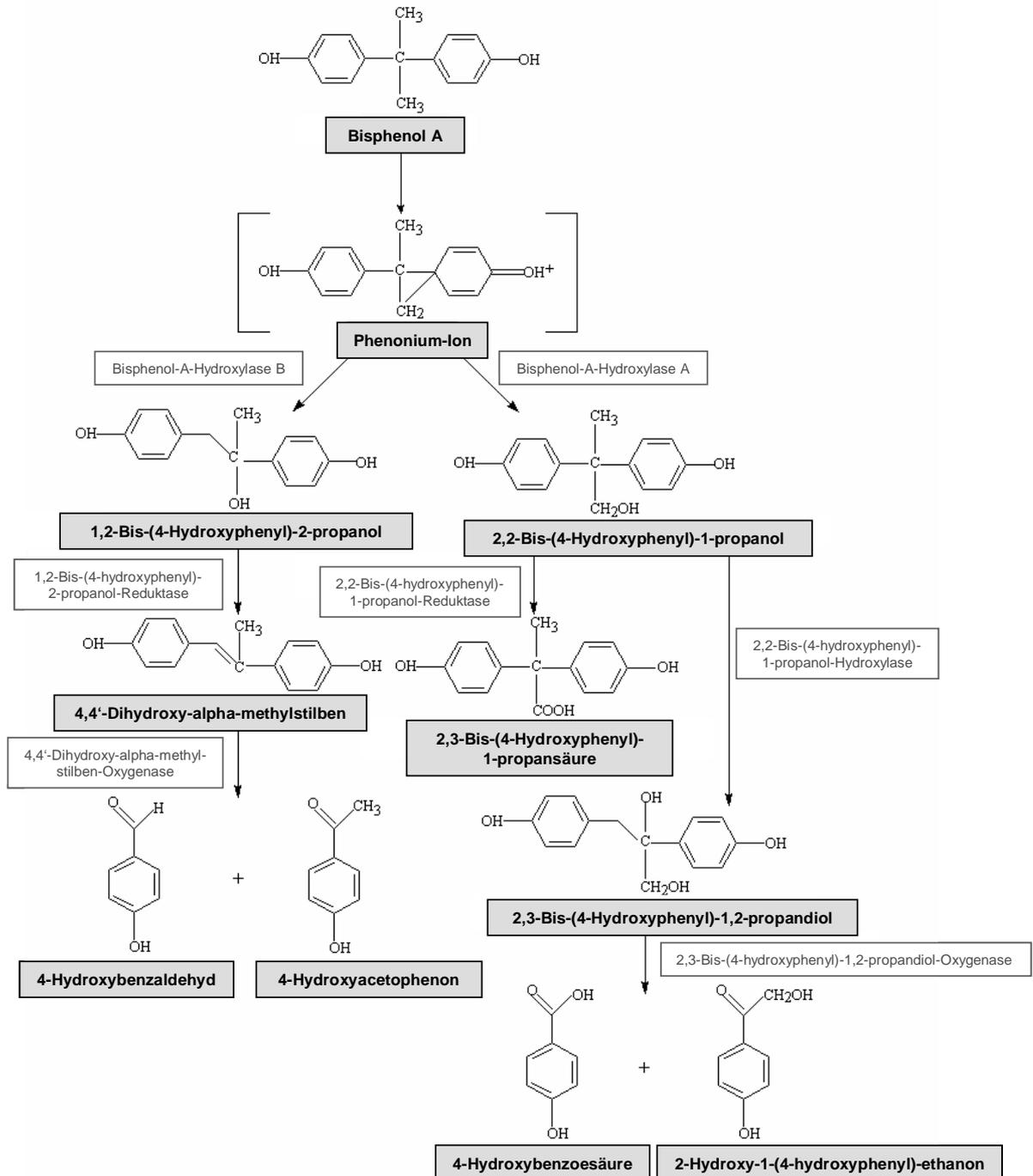


Abb. 1-2: Abbau von Bisphenol A (Kotharu 2002, University of Minnesota, <http://umbbd.ahc.umn.edu/bpa>, verändert).

Spivack et al. (1994) nehmen an, dass Haupt- und Nebenabbauweg über ein gemeinsames intermediäres Phenonium-Ion miteinander verbunden sind. Dieses

wird direkt aus Bisphenol A durch Oxidation gebildet. Abhängig von der Position des nukleophilen Angriffs am neu entstandenen dritten Ring wird durch hydrolytische Spaltung entweder 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol oder 1,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-2-propanol gebildet. Der erste Metabolit entsteht durch Angriff an der Methyleng-Position, beim zweiten wird an der Benzyl-Position angegriffen (Abb. 1-3). Jin et al. (1996) konnten den gleichen Abbauweg von Bisphenol A auch für den Bakterienstamm *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4 beschreiben.

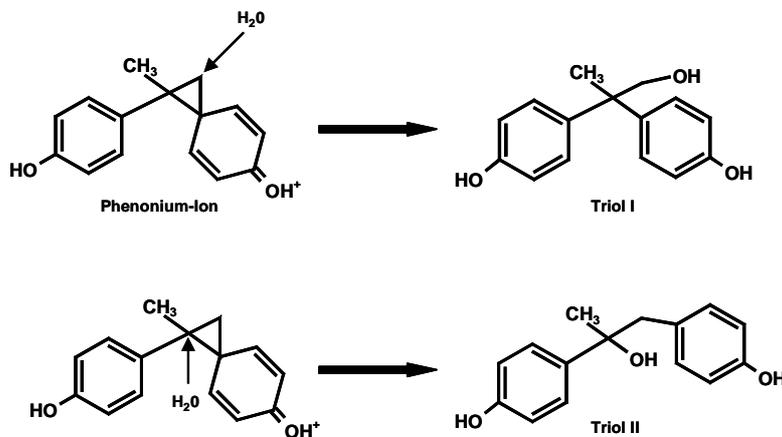


Abb. 1-3: Bildung von Triol I und Triol II durch Hydrolyse des intermediären Phenonium-Ions (Spivack et al. 1994).

Sasaki et al. (2005) nahmen eine Beteiligung des Cytochrom P450-Systems bei der Umsetzung von Bisphenol A durch den Bakterienstamm *Sphingomonas* sp. AO1 an. Dieses System ist bei der Hydroxylierung, Dehalogenierung und Epoxidbildung verschiedener Xenobiotika involviert (Munro und Lindsay 1996, Wong 1998). Es besteht aus drei Komponenten. Die Elektronen werden vom NAD(P)H durch eine Reduktase, welche FAD und ein kleines Schwefelprotein enthält, zum Cytochrom P450 transportiert (Lewis und Hlavica 2000). In der Studie von Sasaki et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass NAD(P)⁺ oder NAD(P)H in den ersten Stufen des BPA-Abbauweges notwendig ist (Abb. 1-4).

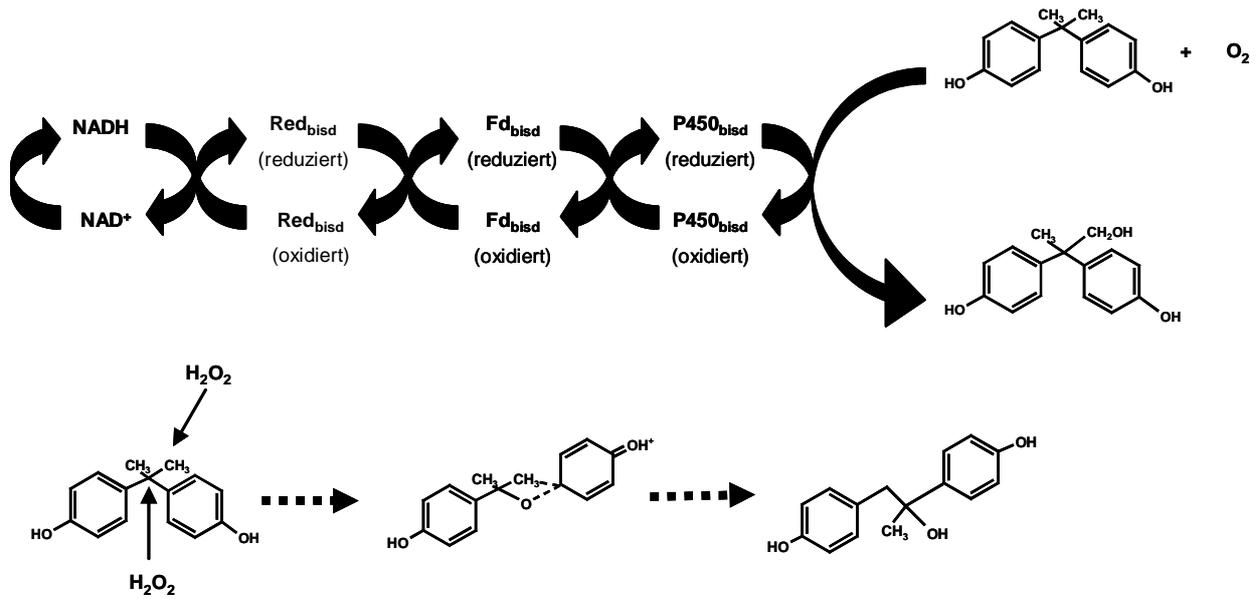


Abb.1-4: Elektronentransport im BPA-Hydroxylierungs-System und die postulierte enzymatische Reaktion des P450_{bisd}-Monooxygenase-Systems (oben)
Das BPA kann auch durch H₂O₂ über zwei Wege angegriffen werden (unten, Sasaki et al. 2005).

Die hohe Persistenz von Bisphenol A steht im Gegensatz zu den beschriebenen relativ kurzen Halbwertszeiten dieser Verbindung im Boden und den erfolgreichen Isolationsversuchen von Bakterien mit Abbaupotential. Aufgrund des ungehinderten Durchflusses der Substanz durch kommunale Kläranlagen gelangt sie in viele Oberflächengewässer. Die ubiquitäre Präsenz von BPA ist vor allem verantwortlich für Schädigungen auf endokriner Ebene im Ökosystem.

Somit besteht hinsichtlich der Charakterisierung des mikrobiellen Abbaus dieser Verbindung nach wie vor ein hoher Forschungsbedarf. Bisphenol A steht deshalb in einer Linie mit anderen endokrin wirksamen Verbindungen wie Nonylphenol oder Pestiziden wie etwa 1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(*p*-chlorphenyl)-ethan (DDT), Atrazin und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Ungeachtet der biologische Abbaubarkeit besteht auch bezüglich dieser Substanzen - bedingt durch die hohe Persistenzen - eine Gefahr für die Umwelt (Nonylphenol: Chang et al. 2004, Yuan et al. 2004; DDT: Lal und Saxena 1982; Atrazin: Wackett et al. 2002, Neumann et al. 2004; 2,4-D: Sandmann et al. 1988, Smith and Lafond et al. 1990).

1.7 Anpassungsmechanismen von Bakterien an Stress

Bisphenol A besitzt ein relativ hohes toxisches Potential gegenüber Mikroorganismen, welches vermutlich ebenfalls für die hohe Persistenz der Verbindung verantwortlich ist. Durch die toxische Wirkung der Substanz werden verschiedene bakterielle Stressantworten hervorgerufen. Damit unter Stress das Überleben von Bakterien gewährleistet ist, sind diese Organismen in der Lage, sich den verschiedenen Bedingungen in einem gewissen Rahmen anzupassen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren die Anpassungsreaktionen der Bakterienzelle auf Ebene der Zellmembran im Zentrum des Interesses. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass die Membran der Hauptangriffspunkt von verschiedenen Verbindungen ist, um toxische Wirkungen zu verursachen. Diese Schadstoffe können sich in der Membran akkumulieren und die natürliche Funktion als Permeabilitätsgrenze, Reaktionsmatrix und Energiezentrum stören. Das kann zu Schäden im zellulären Metabolismus, zu Wachstumshemmungen und schließlich zum Tod der Bakterienzelle führen (Isken und de Bont 1998). Die Akkumulation in der Membran wurde besonders bei Lösungsmitteln mit einem logP-Wert von 1 bis 4 beobachtet (Heipieper et al. 1994). Bisphenol A hat einen logP-Wert von 3,40 (Staples et al. 1998) und kann deshalb ebenfalls membrantoxisch wirken. Durch Veränderung der Membranzusammensetzung sind Bakterien in der Lage, den toxischen Effekten entgegenzuwirken. Somit sind Mechanismen zur Kontrolle der Fluidität und Viskosität der Membran und zum Aufrechterhalten der Gelphase der Lipid-Doppelschicht essentiell. Für diese Dissertation sind vor allem zwei Hauptmechanismen von Bedeutung – die Veränderung des Sättigungsgrades von Fettsäuren der Phospholipide und die *cis-trans*-Isomerisierung von Fettsäuren (Abb. 1-5, Isken und de Bont 1998, Neumann 2006).

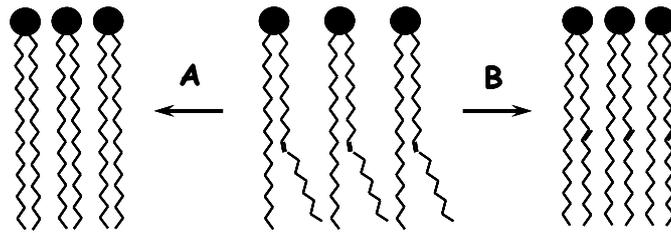


Abb. 1-5 Schematische Darstellung von zwei Adaptionsmechanismen auf Membranebene (Neumann 2006). A) Erhöhung des Sättigungsgrads (Heipieper und de Bond 1997) B) Isomerisierung der *cis*-Isomere ungesättigter Fettsäuren (Mitte) in die *trans*-Form (rechts) (Heipieper et al. 1992, Ramos et al. 1997)

1.7.1 Sättigungsgrad von Fettsäuren

Viele Bakterien versuchen sich an die toxischen Effekte von organischen Lösungsmitteln anzupassen, indem sie den Sättigungsgrad der Fettsäuren in den Phospholipiden erhöhen und so der durch die Stressoren gesteigerten Fluidität der Membran entgegenwirken. Durch mehr gesättigte lineare Fettsäuren besitzt die Lipid-Doppelschicht eine dichtere Packung und somit geringere Permeabilitätseigenschaften. Die Veränderung des Sättigungsgrads ist ein energieabhängiger Prozess, welcher eine Neubildung von Phospholipiden in der Membran erfordert. Dadurch kann diese Antwort auf Stresseinwirkungen nur durch wachsende Zellen in einem längerfristigen Zeitraum realisiert werden (Isken und de Bont 1998, Heipieper et al. 2007).

1.7.2 *Cis-trans*-Isomerisierung ungesättigter Fettsäuren

Unter normalen Wachstumsbedingungen kommen in der Bakterienmembran hauptsächlich Phospholipide mit ungesättigten Fettsäuren in der *cis*-Isomerform vor. Aufgrund Ihrer sterischen Struktur sind die Moleküle in der Lipiddoppelschicht der Membran nicht sehr eng nebeneinander gepackt. Bei Stresseinwirkung sind einige Bakterien, hauptsächlich Vertreter der Gattung *Pseudomonas* und *Vibrio* in der Lage, die *cis*-Isomere der ungesättigten Fettsäuren in deren *trans*-Form umzuwandeln. Dadurch kommt es zu einer dichteren Packung der Fettsäuren, welche eine Verhärtung der Membran ermöglicht. (Heipieper et al. 2003). Es konnte gezeigt, dass die *cis-trans*-Isomerisierung keine Energie benötigt und unabhängig vom

Zellwachstum und der *de novo*-Biosynthese von Fettsäuren ist (Heipieper et al. 1992, Morita et al. 1993). Das verantwortliche Enzym ist die im Periplasma lokalisierte *cis-trans*-Isomerase (Cti, Holtwick et al. 1999, von Wallbrunn et al. 2003).

Heipieper et al. (1994) konnten zeigen, dass es eine direkte Korrelation zwischen der Hydrophobizität von organischen Verbindungen (logP), der Hemmung des Wachstums durch steigende Konzentrationen und dem *trans/cis*-Verhältnis von ungesättigten Fettsäuren gibt. Jedoch können auch Hungerbedingungen, die Anwesenheit von Antibiotika oder Schwermetallen sowie andere Stressfaktoren die *cis-trans*-Isomerisierung aktivieren (Heipieper et al. 2003).

Bedingt durch die direkte Abhängigkeit der CTI-Reaktion von der Toxizität lässt sich das *trans/cis*-Verhältnisses als Biomarker für Stress nutzen (Heipieper et al. 1996, de Bont 1998). In mehreren Studien wurde erkannt, dass die meisten Umweltproben ein *trans/cis*-Verhältnis von $<0,1$ aufweisen (Volkman und Johns 1977, Perry et al. 1979, Gillan und Hogg 1984, Guckert et al. 1985). Ist dieses Verhältnis signifikant größer, kann es einen Marker für Stress darstellen (Guckert et al. 1986 und 1991).

1.10 Ziel der Arbeit

Aufgrund seiner weltweiten Verbreitung besitzt Bisphenol A ein erhebliches Gefährdungspotential für Gewässer, Sedimente und kommunalen Abwässer. Informationen, nach denen diese Verbindung einem relativ schnellen mikrobiellen Abbau unterliegt, sind im Hinblick auf die Abbau- und Wachstumsraten zumindest in Bezug auf reelle Bedingungen fragwürdig. Zudem sind bisher nur sehr wenige Mikroorganismen bekannt, die Bisphenol A als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. Dies gilt ebenso für den Abbauweg von BPA. Lediglich der von Lobos et al. (1992) und Spivack et al. (1994) vorgestellte Abbauweg für den Bakterienstamm MV1 ist hier von maßgebender Bedeutung.

Somit lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Isolierung von Bakterien, welche in der Lage sind, Bisphenol A als einziges Wachstumssubstrat zu nutzen. Dabei sollte die Physiologie des Abbaus eingehend studiert und auftretende Intermediate qualitativ über verschiedene Analyseverfahren erfasst werden, um den möglichen Abbauweg der Verbindung zu analysieren.

Eine Charakterisierung dieser Bakterien und die Beschreibung ihrer Physiologie sind für eine Optimierung der Bioremediation von mit Bisphenol A kontaminierten Habitaten von Bedeutung. Durch eine Weiterentwicklung der Verfahren könnte eine Anwendung dieser Mikroorganismen im Bereich der Abwasserreinigung und der Sanierung von BPA-belasteten Oberflächengewässern ermöglicht werden.

Da die vorliegende Arbeit im Rahmen des EU-Projektes BIOTOOL (<http://www.gbf.de/biotools/>) angefertigt wurde, welches sich auch mit der Entwicklung von Verfahren zur Überwachung von Bioremediationsprozessen mittels Lipiden als Biomarkern beschäftigte, lag ein weiteres Augenmerk auf der Untersuchung der Adaptionreaktionen von Bakterien an Bisphenol A auf der Membranebene. Anhand der Quantifizierung der *cis-trans*-Isomerisierung von Membranfettsäuren beim Standardorganismus *Pseudomonas putida* P8 sollte überprüft werden, ob das *trans/cis*-Verhältnis als Marker zur Beurteilung des toxikologischen Status eines mit Bisphenol A kontaminierten Standortes genutzt werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Mikroorganismen

Cupriavidus basilensis RW4 wurde aus dem Wasser eines *Planted Fixed Bed Reactors* (PFR) des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) isoliert. Die Identifizierung erfolgte mittels Analyse der 16S rRNA (Sequenz siehe Anhang Abb. 7-1). Der Bakterienstamm kann Bisphenol A und weitere aromatische und aliphatische Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen.

Pseudomonas putida P8 stammt aus der Mikroorganismen-Sammlung des UFZ und wurde für nachfolgende Versuche zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Medien

Mineralsalzmedium

Das Mineralsalzmedium setzte sich aus 100 ml Mineralsalzlösung (10-fach konzentriert), 2 ml Spurenelementelösung (500-fach konzentriert) und 896 ml destilliertes Wasser zusammen. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Mineralsalzlösung (10-fach konzentriert)

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	70,0	g/l
KH ₂ PO ₄	28,0	g/l
NaCl	5,0	g/l
NH ₄ Cl	10,0	g/l
A. dest.	ad 1000,0	ml

Spurenelementelösung (500-fach konzentriert)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	50,0 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	5,0 g/l
MnSO ₄ x H ₂ O	2,5 g/l
Zn Cl ₂	3,2 g/l
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 g/l
BaCl ₂	0,3 g/l
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,18 g/l
H ₃ BO ₃	3,25 g/l
EDTA	5,0 g/l
HCl (37 %)	73,0 ml (2 M)
A. dest.	ad 1000,0 ml

Als Kohlenstoffquelle wurde vor dem Autoklavieren entweder Succinat (Endkonzentration 25 mM), Phenol (2 mM) bzw. Bisphenol A (0,2 mM) zugegeben.

Vitaminlösung nach Owen (10-fach konzentriert)

Aufgrund einer Vitaminabhängigkeit von *Cupriavidus basilensis* RW4 wurde eine Vitaminstammlösung in einer Konzentration von 4 ml/l zum Mineralsalzmedium mit BPA als Kohlenstoffquelle gegeben.

Biotin	20,0 mg/l
Folsäure	20,0 mg/l
Riboflavin	50,0 mg/l
Thiamin (HCl)	50,0 mg/l
Nicotinsäure	50,0 mg/l
Pantothensäure	50,0 mg/l
Vitamin B12	1,0 mg/l
<i>p</i> -Aminobenzoessäure	50,0 mg/l
Pyridoxamin	100,0 mg/l
Liponsäure	50,0 mg/l

Wegen der großen Hitzeempfindlichkeit der Vitamine konnte die Lösung nicht autoklaviert werden, sondern wurde sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter Qualilab, MERCK, 0,22 µm CM-Membran).

LB-Agar

Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
Agar	20,0 g
A. dest.	ad 1000,0 ml

Nach dem Autoklavieren konnten die Platten bei ca. 60°C gegossen werden.

Mineralsalz-Agar

Komponente 1:

Mineralsalzlösung (10-fach)	100,0 ml
A. dest.	ad 500,0 ml

Komponente 2:

Agar-Agar	20,0 g
A. dest.	ad 500,0 ml

Beide Komponenten wurden nach dem Autoklavieren bei ca. 60°C vereinigt.

Anschließend wurden 2 ml der 500-fach konzentrierten Spurenelementelösung sowie 4 ml Phenol-Stammlösung (4,25 mM) bzw. 0,4 ml Bisphenol A-Stammlösung (Endkonzentration 0,2 mM) zugeben und die Agarplatten gegossen.

Stammlösungen

Bisphenol A (in Aceton)	100,0 g/l
Phenol (in Aceton)	100,0 g/l

Kaliumphosphatlösung 50 mM

KH ₂ PO ₄	6,8 g
A. dest.	ad 1000,0 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

2.1.3 Sandsäulen

Eine Glassäule mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Höhe von 16 cm wurde mit 300 g Siligran-Quarz 0,7–1,2 mm (EUROQUARZ GmbH, Ottendorf-Okrilla) gefüllt. Das Mineralsalzmedium mit der Kohlenstoffquelle wurde aus einer Vorratsflasche von oben über einen Schlauch (Durchmesser = 0,25 mm) mittels einer Mehrkanal-Pumpe (IPC, ISMATEC, Wertheim-Mondfeld) kontinuierlich zugeführt. Die Zuflussrate betrug 6,2 ml/h. Nachdem das Medium die Sandsäule passiert hatte, wurde es am unteren Ende der Glassäule in einem Behälter aufgefangen. Es erfolgte keine Rückführung des Mediums in die Vorratsflasche (Abb. 2-1). Die Inkubation erfolgte unter aeroben Wachstumsbedingungen und bei Raumtemperatur (20-25 °C).



Abb.2-1: Darstellung von drei parallel verwendeten Sandsäulen

Formeln:

Durchflussrate: $D = \text{Volumenwechsel pro Stunde}$

$$D = \frac{\text{Zuflussrate}}{\text{Flüssigkeit in der Säule}}$$

bei kontinuierlichen Säulen Durchflussrate D = Wachstumsrate (μ)

$$\text{Verweilzeit: } V = \frac{1}{\text{Durchflussrate}}$$

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration/-sättigung

Die Messung der Sauerstoffkonzentration in den Sandsäulen erfolgte mit der Fibox 3, einem Minisensor und Sauerstoff-sensiblen Punkten der Firma PreSens GmbH (Regensburg). Der Minisensor besteht aus einer 2 mm dicken optischen Polymerfaser (POF), welche isoliert ist. Die Sauerstoff-sensiblen Punkte mit einem Durchmesser von 3 mm wurden im Inneren der Säule in 4 verschiedenen Höhen (2 cm, 6 cm, 10 cm und 14 cm) auf die Glaswand mit Silikonkleber geklebt.

Das Messprinzip beruht auf der Erfassung von Lumineszenz. Diese wird verursacht durch Zusammenstöße zwischen molekularem Sauerstoff und lumineszierenden Farbstoffmolekülen im angeregten Zustand. Die Lumineszenzintensität ist somit proportional zur Sauerstoffkonzentration. Die Messung wird durch Lichtquellen beeinflusst, deshalb ist eine Abdeckung der Sensoren notwendig.

Vor jeder Messung wurde eine Zwei-Punkt-Kalibrierung durchgeführt.

Bei 1,0123 bar Luftdruck und 22°C Temperatur:

100 % Sauerstoffsättigung:	20,924 % Volumenanteil in der Luftphase 8,25 mg/l Wasser gelöster Sauerstoff
0 % Sauerstoffsättigung:	0 % Sauerstoff in der Luftphase kein gelöster Sauerstoff

2.2.2 Adsorptionstests

Als Vorlage diente die Methode von Ying & Kookana (2005), welche für die folgenden Experimente abgewandelt wurde.

Adsorptionstest I

In 200-ml-Kulturflaschen mit Teflonverschluss wurden 2 g Quarzsand in 200 ml A. dest. jeweils 4 x mit 0,09 mM, 0,18 mM und 0,35 mM BPA bzw. 0,11 mM, 0,3 mM und 1,1 mM Phenol versetzt. Dann wurden die Flaschen liegend für 2 h bei 20°C und 200 rpm auf dem Rundschüttler (UNIEQUIP Unitwist 400, München). Danach wurden Sand und Flüssigkeit durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm und anschließender Filtration durch einen WHATMAN GF/F Filter separiert.

Von der flüssigen Phase wurde 1 ml vor und nach der Inkubation entnommen und in ein HPLC-Fläschchen gefüllt. Der Quarzsand wurde auf Petrischalen gegeben, für 24 h bei 80°C getrocknet, in 2-ml-Eppendorfgefäße überführt und für eine spätere Extraktion bei -20°C gelagert.

Für die Sandextraktion wurden 1,5 g Quarzsand in ein Zentrifugenröhrchen mit Deckel eingewogen. Nach der Zugabe von 3 ml Methanol wurde das Gemisch für 1 h auf dem Vortex (Genie 2, Scientific Industries, New York) geschüttelt. Anschließend wurde diese Mischung für 10 min bei 13.000 rpm (EPPENDORF Zentrifuge 5415D, Hamburg) zentrifugiert und 1 ml in ein HPLC-Vial pipettiert.

Adsorptionstest II

Die Verteilung und Adsorption von Bisphenol A innerhalb der Sandsäulen wurde erfasst. Mineralsalzmedium wurde mit 0,87 mM BPA aus einer Vorratsflasche von oben durch die 16 cm hohe Sandsäule geleitet. Während des Zeitraums von 16 h war der Zufluss kontinuierlich und betrug 6,2 ml/h. Die Säule wurde von oben nach unten in vier Ebenen unterteilt, die jeweils eine Höhe von 4 cm hatten: E1 0-4 cm, E2 4-8 cm, E3 8-12 cm und E4 12-16 cm. In jeder Ebene befanden sich ca. 88 g Sand.

Am Ende erfolgte eine Probenahme am Abfluss sowie die Bestimmung des BPA-Gehaltes in den einzelnen Schichten der Sandsäule.

Dafür wurden ca. 2 x 5 g Sand aus den jeweiligen Ebenen entnommen und in ein 10-ml-Glasgefäß gegeben. Das Gewicht vom Sand und des Behälters wurden mittels Feinwaage bestimmt und notiert. Anschließend trocknete der Sand für 48 h bei 80°C. Nach dem Abkühlen wurde das Trockengewicht ermittelt. Danach erfolgten die Zugabe von 4 ml Wasser und ein 2-stündiges Ausschütteln auf dem Vortex (Genie 2, Scientific Industries, New York). Am Ende wurde 1 ml der Flüssigkeit entnommen und in ein 1-ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde für 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert (EPPENDORF Zentrifuge 5415D, Hamburg), der Überstand in ein HPLC-Vial pipettiert und vermessen. Die Konzentration wurde pro ml Medium und pro g Sand berechnet.

2.2.3 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Cupriavidus basilensis* und *Pseudomonas putida* P8 wurde auf LB-Agarplatten vorgenommen. So konnten diese bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert werden. Eine selektive Kultivierung erfolgte mit Phenol- bzw. Bisphenol A-Agar. Gelegentlich wurde per Vereinzelausstrich kontrolliert, ob die Stämme noch in Reinkultur vorlagen.

Um auch eine längerfristige Konservierung und eine Sicherheitsreserve zu gewährleisten, wurden die Bakterienstämme in der Stammsammlung des UFZ mit dem Kryoprotektiv Glycerin bei -70°C aufbewahrt.

2.2.4 Kulturbedingungen

Für die Anzucht im Flüssigmedium wurden die Bakterien von den BPA- bzw. Phenol-Agarplatten abgetragen und als Inokulum verwendet. Die Kultivierung in Weithals-Erlenmeyerkolben erfolgte im Dunkeln bei 30°C in einem Schüttelwasserbad (SW23, Firma JULABO, Seelbach) bzw. in einem Rundschüttler (UNIEQUIP Unitwist 400, München) mit Inkubationshaube (UNIHOOD 650“E“, München) bei einer Schüttelfrequenz von 180 rpm.

2.2.5 Bestimmung der optischen Dichte

Zu Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm wurde ein Lambda EZ 201 UV/VIS-Spektrometer (PERKIN ELMER, Jügesheim) genutzt. Ab einer OD von 0,5 wurde mit Mineralsalzmedium verdünnt.

2.2.6 Vorkulturen

Für die verschiedenen Wachstums- und Biotransformationsversuche wurden Zellen von *Cupriavidus basilensis* RW4 und *Pseudomonas putida* P8 mit einer Inkubationszeit von 16-20 Stunden vorkultiviert. Dazu wurden Zellen von einer LB-Agarplatte je zwei 500-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit 200 ml Mineralsalzmedium (MM), das 25 mM Succinat als C-Quelle und 0,4 ml der 500-fach konzentrierten Spurenelementelösung enthielt, angeimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte im Wasserbadschüttler (SW23, Firma JULABO, Seelbach) bei 30°C und 180 rpm.

2.2.7 Toxizitätstests in Schüttelkulturen

Um die cytotoxischen Effekte von Bisphenol A (BPA) und Phenol zu prüfen, wurden Toxizitätstest durchgeführt. Gleichzeitig konnten dadurch die optimalen Substratkonzentrationen für die Wachstumsversuche ermittelt werden.

Zum Animpfen der 50 ml Mineralsalzmedium mit 25 mM Succinat bzw. 2 mM Phenol und 0,1 ml der 500-fach konzentrierten Spurenelementelösung wurden die Vorkulturen, wie unter 2.2.6 beschrieben kultiviert, verwendet. Der eingestellte Zelltitel in den Ansätzen entsprach einer OD_{560nm} von 0,06-0,08. Die weitere Inkubation fand erneut in 100-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben bei 30°C und 180 rpm statt.

Unter optimalen Wachstumsbedingungen wurde eine stündliche Messung der OD bei 560 nm vorgenommen. Nachdem die Kulturen eine OD_{560nm} von 0,4-0,6 (Succinat) bzw. 0,16-0,2 (Phenol) erreicht hatten, erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen als

Stammlösung (in Aceton). Ein Kontrollansatz ohne Schadstoff wurde mitgeführt, um das Wachstum zu überprüfen bzw. später Wachstumsraten ermitteln zu können. Erneut fanden stündliche Messungen der OD_{560nm} statt.

2.2.8 Erfassung der zeitlichen Veränderung der Toxizitätswirkung

Die Vorkulturen von *Pseudomonas putida* P8 wurden wie unter 2.2.6 inkubiert. Nach 20 Stunden wurden diese in sterile 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 min bei 10.000 rpm (HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS, Hanau) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2,5 ml MM ohne Kohlenstoffquelle resuspendiert.

Mit diesen Zellen wurden 4 x 250 ml Mineralsalzmedium mit 25 mM Succinat bzw. 2 mM Phenol und 0,5 ml der Spurenelementlösung in 500ml-Weithals-Erlenmeyerkolben beimpft. Der Zelltiter lag etwa bei einer OD_{560nm} von 0,2. Die Kultivierung erfolgte erneut bei 30°C und 180 rpm. Durch stündliche OD_{560nm} -Messung wurde das Wachstum erfasst. Nach Erreichen einer OD_{560nm} von 0,3-0,4 (Succinat) bzw. 0,18-0,2 (Phenol) wurden jeweils 20 ml der Flüssigkeit mit einer sterilen Pipette entnommen und abzentrifugiert (HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS, 10 min bei 10.000 rpm). Dieser Zeitpunkt stellt den Startpunkt t_0 des Toxizitätsversuchs dar. Es folgte die Applikation des Schadstoffs BPA in das Medium von 3 Kolben. Der verbleibende Kolben ohne BPA sollte als Wachstumskontrolle dienen.

Zu den Zeitpunkten t_1 (30'), t_2 (60'), t_3 (120') und t_4 (180') wurden erneut jeweils 20 ml der Suspension geerntet und das Wachstum anhand der OD_{560nm} überprüft.

Die Zellpellets wurden nach dem Zentrifugieren mit 2 ml Kaliumphosphatlösung gewaschen, in 2-ml-Eppendorfgefäße überführt und abermals für 5 min bei 13.000 rpm (EPPENDORF Zentrifuge 5415D, Hamburg) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets bei -20 °C eingefroren.

2.2.9 Berechnung der Wachstumsparameter

Während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien (*log-Phase*). Als Berechnungsgrundlagen dienten die unten aufgeführten Formeln.

Die Wachstumsrate μ bezieht sich auf die Bakterienmasse x und wurde indirekt über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt.

$$\text{Wachstumsrate } \mu \text{ (h}^{-1}\text{): } \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0}$$

Mit Hilfe des natürlichen Logarithmus $\ln 2$ (= 0,693) ließ sich die Verdopplungszeit t_D bestimmen.

$$\text{Verdopplungszeit } t_D \text{ (h): } \frac{\ln 2}{\mu}$$

Die Berechnung der Wachstumshemmung durch die eingesetzten Schadstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen war ebenfalls mit den oben aufgeführten Wachstumsparametern möglich. Die Schadstoffzugabe sollte im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien erfolgen.

Nach Zugabe der Verbindungen wurde das verminderte, exponentielle Wachstum der Kulturen weiter verfolgt. Zur Bestimmung der prozentualen Hemmung des Bakterienwachstums galt jeweils eine mitgeführte Kontrollkultur ohne Toxinzugabe als Bezugsgröße.

$$\text{Wachstumshemmung (\%): } \frac{\mu_1 \text{ (+ Schadstoff)}}{\mu_0 \text{ (Kontrolle)}} \times 100$$

Bei sehr hohen Konzentrationen waren diese Methoden der Bestimmung einer Wachstumshemmung nicht anwendbar. Obwohl die Bakterien absterben und Zellyse auftritt, welche in einer Abnahme der optische Dichte und Gesamtzellzahl sichtbar war, kann keine Aussage über die Lebendzellzahl gemacht werden. Diese wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

2.2.10 Toxizitätstest in Sandsäulen

Die 200-ml-Vorkultur mit *P. putida* P8 (siehe 2.2.6) wurde für 15 min bei 10.000 rpm (HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS, Hanau) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml MM mit 2 mM Phenol resuspendiert. Dann wurden 4 x 50 ml MM mit 2 mM Phenol und 0,1 ml Spurenelementelösung in 100-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit Zellen des Pellets beimpft und die optische Dichte auf ungefähr einer OD_{560nm} von 1,0 eingestellt.

Anschließend erfolgte das Animpfen der Sandsäulen (Aufbau siehe 2.1.3) mit je 50 ml der Zellsuspension, wobei jede Säule oberhalb der Sandebene geöffnet und die Lösung aufgetragen wurde. Die Zellzahl wurde so eingestellt, dass pro Gramm Sand ca. $3,5 \times 10^5$ Zellen zu finden waren. Als Nährmedium für die 16-stündige Inkubation der Bakterienzellen bei 22 °C diente MM mit 2 mM Phenol plus Spurenelemente

Nach den 16 Stunden wurden die Vorratsflaschen bei 3 Säulen gewechselt um die Schadstoffzufuhr einzuleiten. Als Schadstoff wurde Bisphenol A verwendet und dem Mineralmedium mit dem 2 mM Phenol beigemischt. Zur Kontrolle blieb eine Säule ohne BPA-Zugabe. Die Inkubation mit BPA erfolgte für 8, 16 20 und 24 Stunden. Danach wurde der Sand aus den 4 Ebenen der Säulen (Abb. 2-1) entnommen und davon jeweils 2 x 20-25 g in 250-ml-Kulturflaschen für die anschließende Fettsäureextraktion überführt und sofort eingefroren. Der restliche Sand aus den jeweiligen Ebenen wurde in 50-ml-Falcon-Röhrchen für die spätere Bestimmung der BPA-Konzentration bei -20 °C gelagert. Die Weiterbehandlung des Sandes zur Vermessung mittels HPLC erfolgte analog zum Adsorptionstest II.

2.2.11 Analyse der Fettsäuren

2.2.11.1 Probenvorbereitung

Für die Analyse der Fettsäuren wurden die Kulturen aus den Toxizitätstests (siehe 2.2.5) verwendet. Nach 3-stündiger Inkubation in Gegenwart der zugegebenen Schadstoffe (Bisphenol A und Phenol) wurden die Zellen abzentrifugiert (HERAEUS-Sepatech Contifuge 17RS, Hanau, 15 min, 10.000 rpm). Als Waschschrift erfolgte eine Resuspension des Pellets in 2 ml Kaliumphosphatlösung (50 mM, pH 7,0) in 2-ml-Eppendorf-Gefäßen. Danach wurde die Zentrifugation der Zellen wiederholt (EPPENDORF Zentrifuge 5415D, 13.200 rpm, 5 min). Der Puffer-Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C für eine spätere Extraktion und anschließende gaschromatographischen Untersuchung eingefroren.

2.2.11.2 Fettsäureextraktionen

Fettsäureextraktion I

Die Extraktion der Fettsäuren erfolgte mit einem Methanol-Chloroform-Wasser-Gemisch nach einer von Blich und Dyer (1959) entwickelten Methode. Etwa 15 mg Trockengewicht an Biomasse (das entspricht ungefähr 10^{10} - 10^{11} Zellen) wurden in 0,5 ml A. dest. suspendiert und anschließend mit 1 ml Methanol und 1,75 ml Chloroform versetzt. Der Extraktionsansatz wurde 3 min auf dem Vortex (Genie 2, Scientific Industries, New York) geschüttelt. Danach wurden 0,5 ml A. dest. dazugegeben und wieder auf dem Vortex (Genie 2, Scientific Industries, New York) für 30 sec durchmischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 1000 g (HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS, 3000 rpm) konnte die Chloroform-Phase (unten) mit Hilfe einer Pasteur-Glas-Pipette entnommen und in 2-ml-HPLC-Fläschchen überführt werden. Das Chloroform verdampfte während der Volumeneinengung mit Stickstoff, die extrahierten Lipide waren danach für die Derivatisierung bereit.

Fettsäureextraktion II

Zweimal 20-25 g Quarzsand pro Säulenebene wurden eingewogen und in 250-ml-Kulturflaschen mit Teflonverschluss überführt. Danach wurden 3 ml A. dest, 6 ml Methanol und 5,25 ml Chloroform dazugegeben. Es folgte eine Extraktionsinkubation auf dem Rundschüttler (UNIEQUIP Unitwist 400, München) für 2 Stunden bei 200 rpm und 25 °C. Anschließend wurden wieder 3 ml A. d est. und 5,25 ml Chloroform hinzugefügt und der Extraktionsansatz einige Sekunden kräftig geschüttelt. Dann wird die flüssige Phase mittels einer Pasteur-Glas-Pipette in ein 10-ml-Glasvial überführt. Zur besseren Trennung der Wasser-Chloroform-Phase wurden die Glasvials über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag konnte die Chloroform-Phase in die 2-ml-HPLC-Flaschen pipettiert und unter Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt werden.

2.2.11.3 Derivatisierung mit Bortrifluorid

Für die gaschromatographische Erfassung der Fettsäuren erfolgte eine Abspaltung von den Lipiden und Derivatisierung zu den jeweiligen Methylestern. Hierfür kam eine abgewandelte Vorschrift von Morrison und Smith (1964) zur Anwendung.

Der gewonnene Lipidextrakt wurde mit 0,6 ml des Methylierungsmittels Bortrifluorid (BF_3) versetzt und im Wasserbad bei 80°C für 15 min ink ubiert. Anschließend wurden jeweils 0,3 ml A. dest. und 0,5 ml Hexan (Lösungsmittel) dazugegeben. Der Ansatz wurde für 60 sec auf dem Vortex (Genie 2, Scientific Industries, New York) geschüttelt. Danach erfolgte die Überführung der Hexan-Phase (oben) mit einer Pasteur-Glas-Pipette in GC-Fläschchen. Zur Konzentrierung wurde erneut mit Stickstoff das Volumen eingengt. Dann wurde die Probe in 0,5 ml Hexan aufgenommen. Im Falle der Sandextraktion wurden nur 0,15 ml Hexan verwendet. Die Probe stand nun für eine gaschromatographische Analyse zur Verfügung.

2.2.11.4 Gaschromatographie

Die Fettsäuremethylester (engl. *fatty acid methyl ester*, FAME) wurden mit einem Agilent Technologies (Waldbronn) 6890N Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt. Die Aufzeichnung der Chromatogramme und die Integration der Peakflächen erfolgten mit Hilfe der Software Agilent ChemStation. Die FAME-Standards für die Identifizierung Fettsäuremethylester stammten von der Firma SIGMA-ALDRICH (München). Die eingesetzte Silica-Säule ist für die Messung von FAMEs besonders geeignet. In Tab. 2-2 sind die Parameter für die Gerätekonfigurationen dargestellt.

Tab. 2-1: Parameter für die GC-Messungen

Säule:	Chromopack Capillary Column (Firma VARIAN, Darmstadt) CP7488 (CP-SIL 88 für FAME) 50 m Länge; 0,25 mm Innendurchmesser 0,2 µm Filmdicke
Mobile Phase:	Helium
Split:	splitlos
Injektortemperatur:	240°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektortemperatur:	270°C
Einspritzvolumen:	1 µl
Fluss:	2,0 ml/min
Temperaturprogramm:	Start: 40°C isotherm für 2 min Steigerung: 8°C/min auf 220°C isotherm: 220°C für 5 min
Druck:	Start: 27,7 psi für 2 min Steigerung von 0,82 psi/min auf 45,7 psi isobar 8,6 min

2.2.11.5 Berechnung der Parameter für die Adaption der Membran

Das Verhältnis der beiden gesättigten Fettsäuren (16:0, 18:0) zu den ungesättigten Fettsäuren (16:1 Δ 9*trans*, 16:1 Δ 9*cis*, 18:1 Δ 11*trans*, 18:1 Δ 11*cis*) der gemessenen Membranextrakte bestimmt den Sättigungsgrad der Membranfettsäuren. Für den Grad der Adaption werden die *trans*-ungesättigten Fettsäuren mit zu den gesättigten gezählt (Heipieper et al. 1992, 1994). Adaptions- und Sättigungsgrad sind erhöht, wenn mehr gesättigte Fettsäuren in die Membran eingebaut werden. Dadurch wird die Membranstabilität gesteigert und dem toxischen Effekt des Schadstoffs entgegengewirkt.

$$\text{Sättigungsgrad} = \frac{(16:0 + 18:0)}{(16:1\Delta 9\textit{trans} + 16:1\Delta 9\textit{cis} + 18:1\Delta 11\textit{trans} + 18:1\Delta 11\textit{cis})}$$

$$\text{Adaptionsgrad} = \frac{(16:0 + 18:0 + 16:1\Delta 9\textit{trans} + 18:1\Delta 11\textit{trans})}{(16:1\Delta 9\textit{cis} + 18:1\Delta 11\textit{cis})}$$

Das *trans/cis*-Verhältnis der Membranfettsäuren wurde definiert als das Verhältnis der beiden *trans*-ungesättigten Fettsäuren (16:1 Δ 9*trans*, 18:1 Δ 11*trans*) zu den *cis*-ungesättigten Fettsäuren (16:1 Δ 9*cis*, 18:1 Δ 11*cis*) der gemessenen Membranextrakte.

$$\textit{trans/cis}\text{-Verhältnis} = \frac{(16:1\Delta 9\textit{trans} + 18:1\Delta 11\textit{trans})}{(16:1\Delta 9\textit{cis} + 18:1\Delta 11\textit{cis})}$$

2.2.12 Wachstum mit Bisphenol A

2.2.12.1 BPA als einzige C-Quelle

Zum Animpfen von 250 ml Mineralsalzmedium mit 0,2 mM BPA, 0,5 ml Spurenelementelösung und 1 ml der 10-fach konzentrierten Vitaminlösung in 500-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben wurden 16 h alte Vorkulturen, kultiviert wie unter 2.2.6 beschrieben, verwendet. Die Ernte der so vorkultivierten Zellen erfolgte über Zentrifugation (HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS) bei 10.000 rpm, 15 min. Nach einem Waschschrift mit Mineralsalzmedium (MM) ohne C-Quelle und erneuter Resuspension der Pellets mit 20 ml MM konnten die Zellen in das neue Medium übertragen werden. Am Anfang sollte der Zelltiter einer OD_{560nm} von ca. 0,08 entsprechen. Die Bakterienstämme wurden bei 30°C und 180 rpm für 267 Tage kultiviert. Ein Ansatz mit Medium ohne Zellen wurde als Negativkontrolle mitgeführt. In unterschiedlichen Zeitabständen wurde das Wachstum über Messung der OD_{560nm} ermittelt und jeweils 1-ml-Proben der Kulturflüssigkeit entnommen. Diese wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und anschließend bei 13.000 rpm für 5 min (EPPENDORF Zentrifuge 5415D, Hamburg) zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße übertragen und bei -20°C für eine spätere Bestimmung der BPA-Konzentration mittels HPLC gelagert.

2.2.12.2 BPA und Phenol als C-Quellen

Die 16-stündigen Vorkulturen von *C. basilensis* RW4 (siehe 2.2.6) wurden für 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert ((HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS). Nach Resuspension des Zellpellets mit MM ohne C-Quelle wurden die Zellen zum Animpfen von 500-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben mit 250 ml MM mit 0,2 mM BPA und 2 mM Phenol als Co-Substrat, sowie 0,5 ml Spurenelementelösung und 1 ml Vitaminlösung verwendet. Zu Beginn wurde die optische Dichte auf 0,05 eingestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 225 Tage bei 30°C und 180 rpm. Das Wachstum wurde mittels Bestimmung der OD_{560nm} erfasst. Zu diesen Zeitpunkten erfolgte ebenfalls die Entnahme von 1 ml Flüssigkeit zur Ermittlung der Phenol- und BPA-Konzentration im Medium. Die Proben wurden wie unter 2.2.11.1 behandelt.

2.2.12.3 Wachstum in Sandsäulen

Die Zellen von *C. basilensis* RW4 wurden wie unter 2.2.6 vorkultiviert. Nach 16 Stunden wurden 200 ml der Vorkultur für 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert (HERAEUS Sepatech Contifuge 17RS). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml MM mit 2 mM Phenol resuspendiert. Dann wurden in 50 ml MM mit 1,5 mM Phenol, 0,1 ml Spurenelementelösung und 0,2 ml Vitaminlösung in 100-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben beimpft und die optische Dichte auf ungefähr einer OD_{560nm} von 1,0 eingestellt.

Anschließend wurde die Sandsäule (Abb. 2-1) mit den 50 ml der Zellsuspension beimpft. Dabei wurde die Säule oberhalb der Sandebene geöffnet und die Lösung aufgetragen. Als Nährmedium für die mehrstündige Inkubation der Bakterienzellen diente MM mit 0,21 mM BPA und 1,5 mM Phenol supplementiert mit Spurenelementen und Vitaminen. Das Medium wurde wie unter 2.1.3 beschrieben aus einer Vorratsflasche über einen Schlauch kontinuierlich von oben auf den Mikrokosmos gegeben. Nachdem die Flüssigkeit die gesamte Sandsäule passiert hatte, wurde diese am unteren Abfluss in einen Behälter aufgefangen. Hier erfolgte ebenfalls die Probenahme zur Bestimmung der BPA- und Phenolkonzentration.

Die Versuche wurden bei einer Raumtemperatur von ca. 22°C innerhalb eines Zeitraums von 150 Stunden durchgeführt.

2.2.12.4 Bestimmung der Bisphenol A-Konzentration mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Konzentration von Bisphenol A im Medium und deren Abnahme während des Abbaus durch den isolierten Bakterienstamm *C. basilensis* RW4 wurde mittels HPLC bestimmt. Diese Methode war besonders gut zur qualitativen und quantitativen Analyse von Vielkomponentengemischen in flüssiger Phase geeignet, da die Proben direkt ohne aufwendige Aufbereitung vermessen wurden.

Es wurde die Anlage der Firma SHIMADZU (Bad Homburg) verwendet. Dabei handelt es sich um ein LC-20AB Pumpensystem mit SIL-20A Autosampler und SPD-M20A Diodenarraydetektor (Tab. 2-4). Die Chromatogramm-Aufzeichnung erfolgte

mit der Software SHIMADZU LC Solution Version 1.1. Für die Eichung des Gerätes wurden Standardlösungen in Methanol genutzt (Abb. 2-2).

Tab. 2-2: Parameter für die HPLC-Messung

Degaser:	DGU 20AB
Säule:	LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18 end-capped, 5 µm (MERCK, Darmstadt)
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	15 µl
Gradient:	<p>BPA:</p> <p>0 min 30 % Methanol : 70 % H₃PO₄ (0,1 %_{g/v})</p> <p>12 min 90 % Methanol</p> <p>14 min 100 % Methanol</p> <p>16-18 min 30% Methanol</p> <p>Phenol:</p> <p>0 min 10% Methanol : 90 / H₃PO₄ (0,1%_{g/v})</p> <p>11 min 100% Methanol</p> <p>12-15 min 10% Methanol</p>

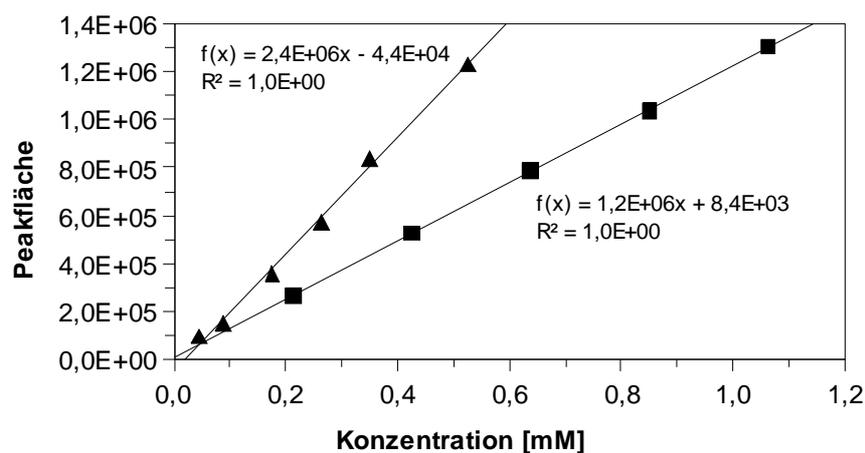


Abb. 2-2: HPLC-Eichreihen mit Regressionsgeraden und Gleichungen berechnet aus den Standardlösungen in Methanol: Phenol ■ und BPA ▲

2.2.13 Extraktion extrazellulärer Intermediate mit Diethylether

Vier Ansätze mit *C. basilensis* RW4 in 500 ml MM mit 0,2 mM BPA, supplementiert mit Spurenelementen und Vitaminen, wurden nach 2, 5, 9, 16 und 23 Tagen für 15 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils in 100-ml-Weithals-Erlenmeyerkolben überführt und das Zellpellet verworfen. Das Ausschütteln der Intermediate erfolgte mit 3 x 50 ml peroxidfreiem Diethylether für 3-5 min in 250-ml-Glasscheidetrichern. Der pH-Wert wurde dabei auf pH 9,0 mit KOH und pH 7,0 bzw. pH 2,0 mit HCl eingestellt.

Anschließend wurden die Etherextrakte mit Natriumsulfat (Na_2SO_4 , wasserfrei) getrocknet, in 100-ml-Spitzkolben gefüllt und im Vakuumrotationsverdampfer (40°C, 850 mbar) auf ein Volumen von ca. 0,2 ml eingengt. Danach wurden die Extrakte in GC-Vials überführt, unter Stickstoffstrom getrocknet und die Rückstände in 1 ml Hexan aufgenommen.

2.2.14 Festphasen-Extraktion (SPE)

Zur besseren Extraktion und Aufkonzentrierung von intermediären Produkten aus geringen Probenvolumina wurden BAKERBOND speTM Kartuschen (MALLINCKRODT BAKER B.V., Deventer) verwendet. Diese waren gepackt mit 500 mg reversed phase Octadecylsilan (C_{18}), welches gebunden an Silica Gel (40 μm ADP, 60 Å) war. Das Fassungsvermögen betrug 3 ml.

Zuerst wurde die Extraktionssäule mit 2 x 6 ml Acetonitril und 2 x 6 ml A. bidest konditioniert ohne Austrocknen des Sorptionsmittels. Danach erfolgte das Auftragen der Proben (5-10 ml des Überstands aus den Versuchen 2.2.13) bzw. von Wasser als Extraktionskontrolle auf das Sorbens. Nach einem Waschschrift mit A. bidest. wurden die Kartuschen für ca. 30 min im Vakuum getrocknet. Der zurückgehaltene Analyt wurde mit 2 x 1 ml Acetonitril eluiert und in ein 4-ml-Glasvial aufgefangen. Anschließend wurde das Volumen des Extraktes unter Stickstoffstrom auf 1 ml eingengt und in ein GC-Vial überführt.

2.2.15 Derivatisierung der BPA-Extrakte und Analyse mittels Gaschromatographie/ Massenspektrometrie

Zur Erhöhung die Stabilität der Substanzen und zur besseren Erfassung mittels GC-MS war die Derivatisierung der Extrakte von Vorteil. Aus den verschiedenen Methoden wurde die Silylierung der freien Hydroxylgruppen ausgewählt.

Hierbei wurden die 1 ml Hexan bzw. Acetonitril mit 50 µl N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) versetzt und für 20 min bei 70 °C inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur erfolgte die Vermessung in der GC/MS.

Für die Analyse von Bisphenol A und intermediärer Produkte wurde das 6890 Series GC System mit dem 5973 Mass Selective Detektor und der Software HP Chemstation der Firma HEWLETT PACKARD (Bad Homburg) genutzt (Tab. 2-3).

Tab. 2-3: Parameter für die GC/MS

Säule:	BPX-5 0.2 x (Firma SGE, Darmstadt) 27,7 m Länge 0,32 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Filmdicke
Mobile Phase:	Helium
Split:	1:5
Injektortemperatur:	50 °C
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)
Detektortemperatur:	320°C
Einspritzvolumen:	1,0 µl
Fluss:	2,0 ml/min
Temperaturprogramm:	Start: 50 °C für 2 min Steigerung: 158 °C/min auf 320 °C isotherm: 320 °C für 10 min
Druck:	isobar; 5,6 psi

3 ERGEBNISSE

3.1 Abbau von Bisphenol A

3.1.1 Isolationsversuch

Zur Isolation von Bakterien, die Bisphenol A als Wachstumssubstrat nutzen können, wurden 5 ml einer Mischkultur, welche aus einer Rückstellprobe des Reaktorwassers vom unter 2.1. erwähnten *Planted Fixed Bed Reactor* stammte, in 50 ml Mineralsalzmedium mit 0,2 mM BPA plus Vitamine inkubiert. Nach einigen Tagen Kultivierung konnte eine zunehmende Trübung des Mediums beobachtet werden. Anschließend wurden jeweils 0,1 ml der Kultur auf Agarplatten mit 0,2 mM BPA plus und ohne Vitamine ausgespatelt. Nach 4-tägiger Inkubation im Brutschrank bei 30°C wuchsen auf den Platten einige weiße Kolonien, jedoch bei denen mit Vitaminzusatz besser. Diese wurden per Vereinzlungsausstrich mehrfach auf MM-Agarplatten mit BPA als C-Quelle übertragen. Auf den Platten mit dem Bisphenol A war erneut ein Wachstum des Isolats, das als RW4 bezeichnet wurde, zu beobachten (Abb. 3-1). Auf den MM-Platten ohne C-Quelle konnte nur Restwachstum verzeichnet werden.

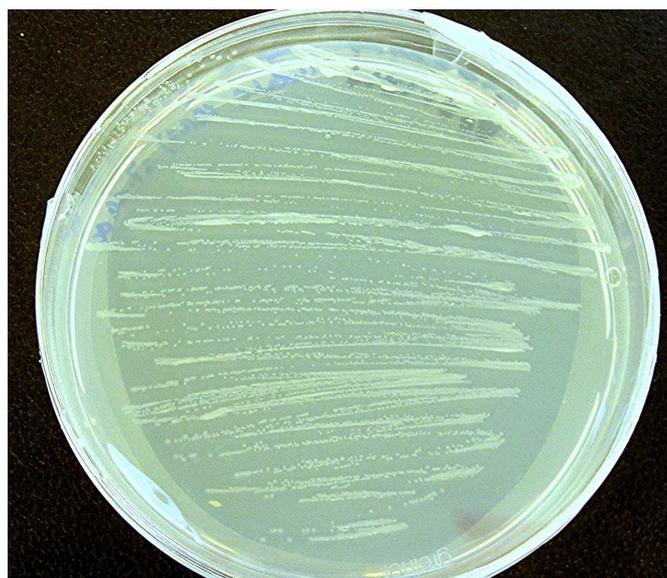


Abb. 3-1: Mit dem Isolat (RW4) bewachsene MM-Agarplatte mit 0,2 mM Bisphenol A als C-Quelle plus Vitaminstammlösung nach 4-tägiger Inkubation.

3.1.2 Identifikation des Isolats RW4

Nachdem das Isolat RW4, wie unter 2.2.15.2 beschrieben, in einer Flüssigkultur mit 25 mM Succinat für 48 Stunden kultiviert wurde, konnte nach anschließender Abtrennung der Zellen und Isolation der rRNA eine 16S rRNA-Analyse durchgeführt werden.

Ein BLAST-Vergleich (Basic Local Alignment Search Tool) der DNA Sequenzen (siehe Anhang) mit den GenBank+EMBL+DDBJ+PDB Datenbanken (National Center for Biotechnology Information - NCBI) ergab eine Eingruppierung des Isolats in die Ordnung *Burkholderiales*. Diese Ordnung gehört zur Klasse der *Betaproteobacteria*. In der Tabelle 3-1 ist eine Auswahl der Taxa mit den höchsten Homologiegraden der 16S rRNA-Sequenzen aufgeführt.

Tab. 3-1: Auswahl von Arten mit dem höchsten Grad an 16S rRNA-Homologien

Taxon	% 16S rRNA-Homologie mit dem Isolat
<i>Ralstonia basilensis</i> M91-3	99,8
<i>Wautersia basilensis</i> NE-6	99,8
<i>Burkholderia</i> sp. SE-10	99,8
<i>Ralstonia eutropha</i> HAMB12380	97,6
<i>Wautersia</i> sp. mapud10.1	96,6

Die Familien *Burkholderiaceae* und *Ralstoniaceae* sind phylogenetisch eng miteinander verwandt. Dadurch besteht eine starke Homologie zwischen den konservierten Regionen der 16S rRNA. Somit ist es schwierig, nur mittels 16S rRNA-Analyse eine eindeutige Aussage darüber zu machen, ob es sich bei dem Isolat RW4 um *Ralstonia basilensis* oder um *Burkholderia* sp. handelt. Nach einer Arbeit von Vaneechouette et al. (2004) wurden *Ralstonia eutropha* und verwandte Arten – somit auch *Ralstonia basilensis* - in der neuen Gattung *Wautersia* zusammengefasst. Die Gattung wurde durch Vandamme und Coenye (2004) erneut in *Cupriavidus* umbenannt.

3.1.3 Charakterisierung von *C. basilensis* RW4

Bei dem Isolat RW4 handelt es sich um aerobes Gram-negatives stäbchenförmiges Bakterium. Nach 48 h Inkubation bei 30°C bildete es auf LB-Agarplatten kleine weiße runde Kolonien mit einer glatten Oberfläche. Wurden die beimpften Platten länger inkubiert (bis zu 5 Tagen) veränderte sich die Koloniemorphologie. Die Kolonien waren nun unregelmäßig gerandet.

Die Charakterisierung von RW4 erfolgte über physiologisch-biochemische Merkmale mittels Testkits der Firma BIOLOG (Hayward, USA). Der Organismus zeigte eine negative Reaktion bei der Urease, Arginindihydrolase und β -Galactosidase. Er lysiert weder Gelatine noch Esculin und kann kein Nitrat reduzieren. Das Bakterium ist in der Lage organische Säuren wie Gluconat, Caprat (Caprylsäure), Adipat, Malat, Citrat, Succinat und Phenylacetat zu verwerten. Es erfolgte keine Fermentation von Zuckern. Die Substanzen Arabinose, Glucose, Mannit, Maltose, Mannose, *N*-Acetylglucosamin können nicht als C-Quelle genutzt werden.

Die Resultate der durchgeführten BIOLOG-Tests zur Charakterisierung des Bakterienstammes verweisen ebenfalls auf das Taxon *Ralstonia basilensis* oder nach Vaneechouette et al. (2004) auf *Wautersia basilensis* bzw. *Cupriavidus basilensis* (Vandamme und Coenye, 2004). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 3-2.

Tab. 3-2: Phänotypische Eigenschaften von *C. basilensis* RW4

Substrat	Wachstum/Reaktion	
	positiv	negativ
Adipat	X	
Arabinose		X
Caprat (Caprylsäure)	X	
Citrat	X	
Glucose		X
Malat	X	
Maltose		X
Mannit		X
Mannose		X
N-Acetylglucosamin		X
Phenylacetat	X	
Succinat	X	
β -Galactosidase		X
Arginindihydrolase		X
Urease		X
Nitratreduktion		X
Lysierung von Esculin		X
Lysierung von Gelatine		X

Zusätzlich zu den allgemein üblichen Wachstumssubstraten wurde auch die Verwertung von anderen aliphatischen und aromatischen Verbindungen überprüft. So kann *C. basilensis* RW4 die aliphatischen Substanzen wie Methanol, Ethanol, 1-Oktanol oder 1-Dekanol für das Wachstum nutzen. Zu den verwerteten aromatischen Verbindungen gehören zum Beispiel Phenol, Monobenzoessäuren und Dihydroxyaromaten (Zusammenfassung in Tabelle 3-3). Die Wachstumskurven zu den einzelnen Verbindungen sind dem Anhang zu entnehmen.

C. basilensis RW4 wuchs mit 3-Hydroxy- und 4-Hydroxybenzoessäure als C-Quelle schneller als mit 2-Hydroxybenzoessäure. Mit den ersten beiden Verbindungen erreichte das Bakterium bereits nach 8 Stunden die stationäre Phase (OD_{560nm} 0,5 –

0,6), bei der letzteren benötigte es 24 Stunden. Das Wachstum mit zweifach hydroxylierten Aromaten war noch langsamer und geringer. Am besten wurden Brenzkatechin und 2,5-Dihydroxybenzoesäure umgesetzt. Die halogenierte aromatische Verbindung 4-Chlorphenol (eingesetzt 0,3 mM, EC₅₀ bei 0,58 mM) konnte von *C. basilensis* RW4 nicht abgebaut werden.

Tab. 3-3: Charakterisierung des Wachstums von *C. basilensis* RW4

Verbindung	Wachstum
Methanol	++
Ethanol	++
1-Oktanol	++
1-Dekanol	++
Toluol	+
o-Hydroxybenzoesäure	+
p-Hydroxybenzoesäure	++
m-Hydroxybenzoesäure	++
Brenzkatechin	++
2,5-Dihydroxybenzoesäure	+
3,4-Dihydroxybenzoesäure	+
p-Hydrochinon	+
4-Hydroxyacetophenon	(+)
4-Chlorphenol	-

- ++ starkes Wachstum
 + Wachstum
 (+) sehr geringes Wachstum
 - kein Wachstum

3.1.4 Wachstum von *C. basilensis* RW4 mit Succinat als C-Quelle

Die Analyse des Wachstumsverhaltens des isolierten Bakteriums *C. basilensis* RW4 in Mineralsalzmedium mit 25 mM Succinat als einziger C-Quelle diente als Basis für den nachfolgenden Versuch zur Bestimmung der Hemmkonzentration von Bisphenol A. Das Wachstum wurde über einen Zeitraum von 25 h erfasst (Abb. 3-2).

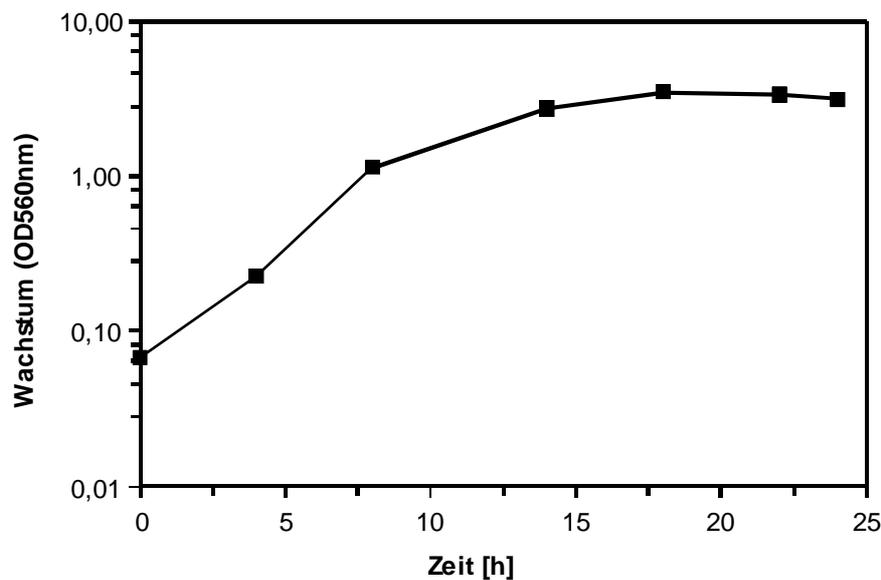


Abb. 3-2: Wachstum von *C. basilensis* RW4 mit 25 mM Succinat. Die Kultivierung erfolgte in MM bei 30 °C und 180 rpm.

Für RW4 konnten in der logarithmischen Wachstumsphase eine maximale Wachstumsrate $\mu_{\max} = 0,4 \text{ h}^{-1}$ ermittelt werden. Dies entspricht einer Verdopplungszeit t_D von 1,7 Stunden. Die maximale $OD_{560\text{nm}}$ lag bei 3,7. Die stationäre Wachstumsphase wurde nach ca. 15 Stunden erreicht.

3.1.5 Toxischer Effekt von Bisphenol A auf *C. basilensis* RW4

Vor Beginn des Wachstumsversuchs mit Bisphenol A als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wurde die toxische Wirkung von BPA auf das Zellwachstum des Isolats *C. basilensis* RW4 überprüft. Im Toxizitätstest wurden die Bakterienzellen in Mineralsalzmedium mit 25 mM Succinat bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte die Applikation des Bisphenol A.

In Abb. 3-3 wird deutlich, dass mit steigender BPA-Endkonzentration (0-0,2 mM) eine zunehmende Wachstumshemmung stattfand.

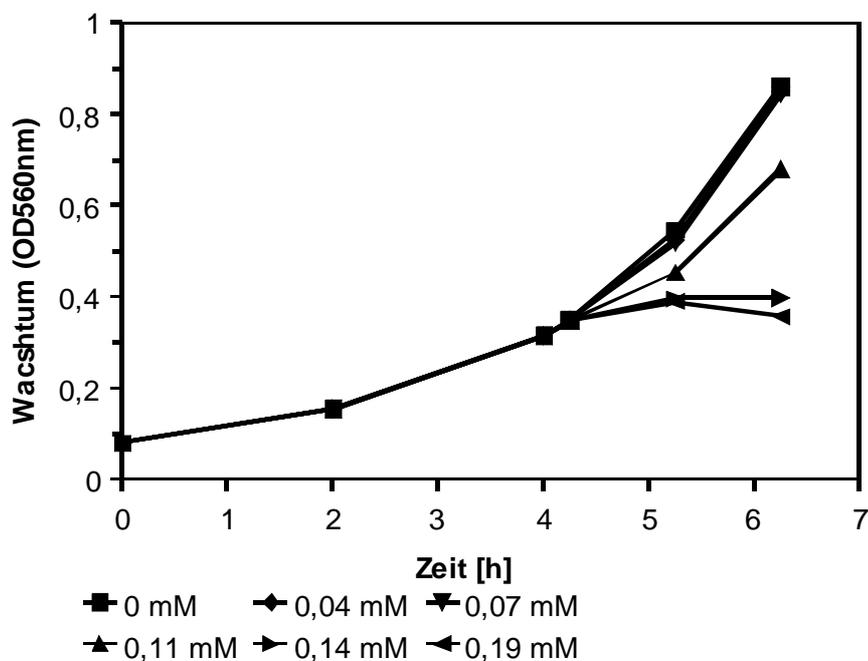


Abb. 3-3: Einfluss von Bisphenol A auf das Wachstum von *C. basilensis* RW4. Die Zugabe von BPA erfolgte nach 4,25 Stunden. Die Bakterienzellen wurden in MM mit 25 mM Succinat bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

Anhand der berechneten Wachstumsraten konnte durch Vergleich mit einer toxfreien Kontrolle der Effekt von Bisphenol A auf das Wachstum quantifiziert werden (Abb. 3-4).

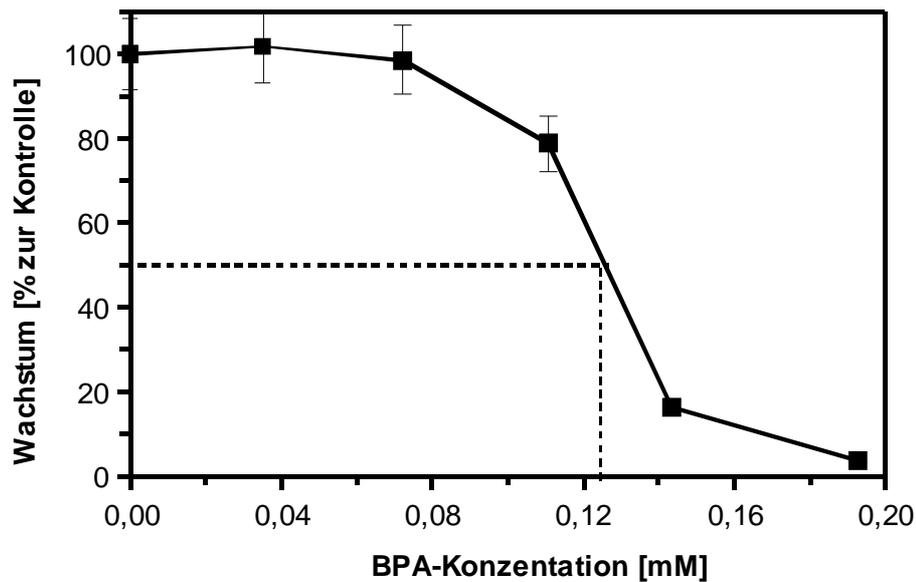


Abb. 3-4: Toxische Wirkung von Bisphenol A. Die Zugabe von BPA erfolgte im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase. Die gestrichelte Linie zeigt die EC_{50} .

Die EC_{50} von *C. basilensis* RW4 wurde bei einer BPA-Endkonzentration von ca. 0,125 mM Bisphenol A erreicht. Ein völliger Wachstumsstopp trat bei mehr als 0,2 mM BPA im Medium ein.

3.1.6 Wachstum von *C basilensis* RW4 mit Bisphenol A als C-Quelle

Im Anschluss an die Ermittlung der halbmaximalen Hemmkonzentration des Wachstums erfolgte die Untersuchung des Wachstums von RW4 mit Bisphenol A als einzige C-Quelle, um eine Abbaukinetik erstellen zu können. Es wurde eine BPA-Konzentration ausgewählt, die über der EC_{50} lag, aber dennoch von den Bakterien toleriert werden konnte. Erst bei dieser Konzentration war eine Erfassung des Wachstums möglich. Das Isolat wurde in 200 ml Medium für 267 Tage kultiviert. Während der gesamten Versuchszeit war nur ein geringes Wachstum zu verzeichnen. Die Zellzahl stieg innerhalb der 267 Tage von $5,7 \times 10^7$ auf 4×10^8 an. Die Bestimmung der BPA-Konzentration im Kulturüberstand erfolgte mittels HPLC. Der Umsatz von Bisphenol A durch die Zellen des Isolats erfolgte unter den

gewählten Bedingungen extrem langsam, jedoch kontinuierlich. Nach 100 Tagen Inkubation wurde ein Bisphenol A-Gehalts von 0,1 mM gemessen. In den folgenden 100 Tagen verringerte sich die Konzentration um weitere 23% auf 0,06 mM. Am Ende des Versuchs (267 Tage) konnten noch 0,036 mM BPA im Medium nachgewiesen werden (Abb. 3-5).

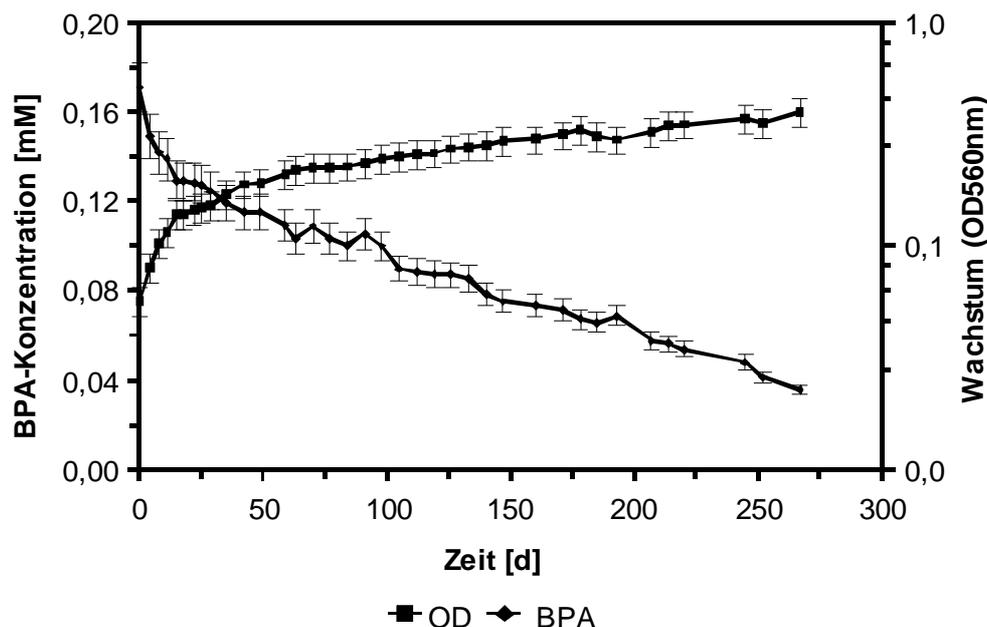


Abb. 3-5: Wachstumskurve von *C. basilensis* RW4 mit 0,17 mM Bisphenol A als C-Quelle und Darstellung der Konzentrationsabnahme von BPA

3.1.7 Charakterisierung von Intermediaten des BPA-Abbaus

Zur Erfassung von intermediären Abbauprodukten wurden vier Ansätze mit je 500 ml Mineralsalzmedium und 0,2 mM BPA, supplementiert mit Spurenelementen und Vitaminen, mit Zellen von *C. basilensis* RW4 beimpft. Nach 2, 5, 9, 16 und 23 Tagen wurden vom Überstand der Zellkulturen 50 ml für die Etherextraktion bzw. 5 ml für die Festphasenextraktion (SPE) entnommen. Die Extrakte wurden in Acetonitril aufgenommen und mit MSTFA derivatisiert. Anschließend erfolgte die Vermessung der Extrakte im Gaschromatographen/ Massenspektrometer (GC/MS). Die Abbildung 3-6 zeigt das Gaschromatogramm einer analysierten Probe.

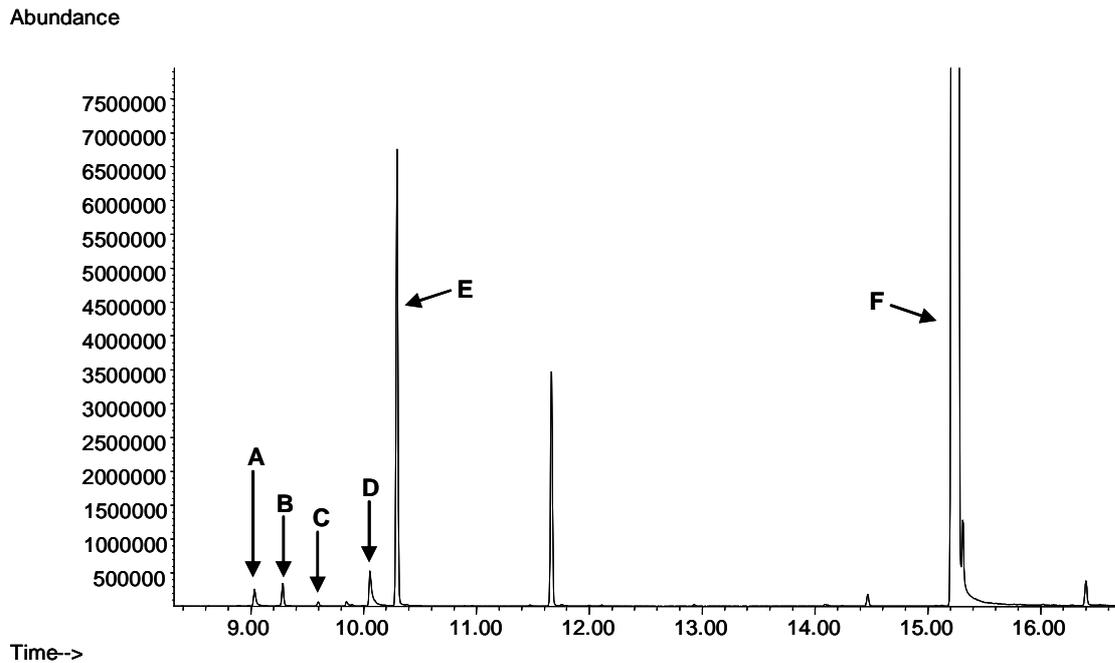


Abb. 3-6: Gaschromatographische Darstellung eines Extraktes nach der Festphasenextraktion und Derivatisierung mit MSTFA. A) 4-Isopropenylphenol, B) *p*-Hydrochinon, C) Metabolit M1, D) 4-Hydroxyacetophenon, E) Etherstabilisator, F) Bisphenol A

Der Peak für Bisphenol A bei 15,313 min ist sehr stark ausgeprägt aufgrund der eingesetzten Ausgangskonzentration. Durch Derivatisierung mit zwei Silylgruppen (m/z 73) besitzt das BPA eine Massenzahl von 372 (Massenspektrum siehe Anhang Abb. 7-6).

Im Chromatogramm sind deutlich zusätzliche Peaks bei kürzeren Retentionszeiten zu erkennen. Einige dieser Peaks tauchten nur bei den Extrakten von den Kulturen mit Zellen von *Cupriavidus basilensis* RW4 auf, welche Bisphenol A als C-Quelle nutzen sollten. Sowohl in der zellfreien Kontrolle als auch in Zellkulturen ohne BPA waren diese nicht nachzuweisen. Daraus lässt sich schließen, dass es sich hier um intermediäre Abbauprodukte handelt. Drei Intermediate konnten mittels der Massenspektrometrie und dem Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert werden: 4-Isopropenylphenol (m/z 206, $RT=9,034$ min), *p*-Hydrochinon (m/z 254, $RT=9,293$ min) und 4-Hydroxyacetophenon (m/z 208, $RT=10,075$ min). Die Massenspektren sind in Abb. 3-7 bis Abb. 3-9 dargestellt.

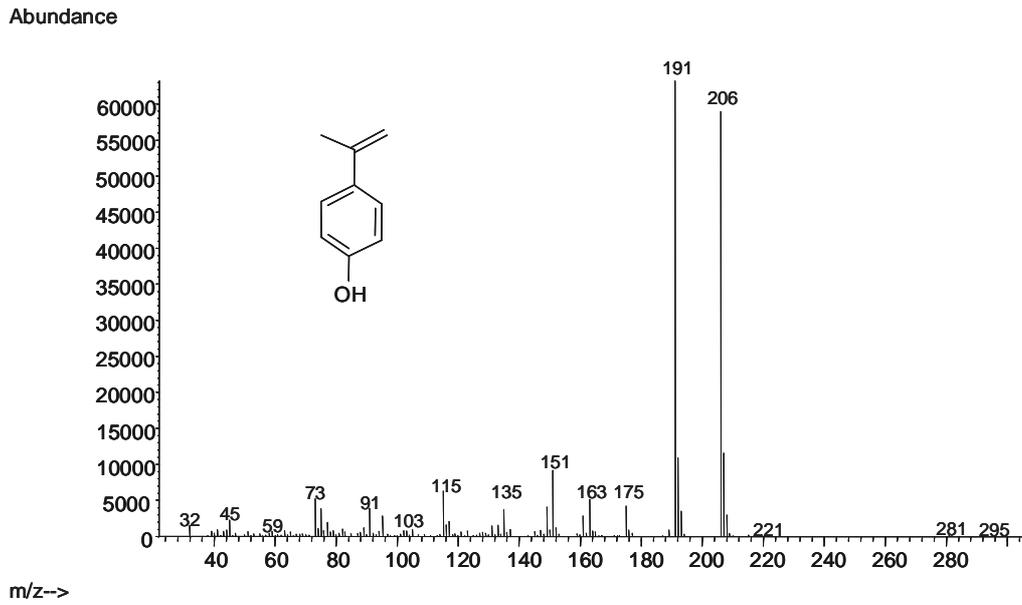
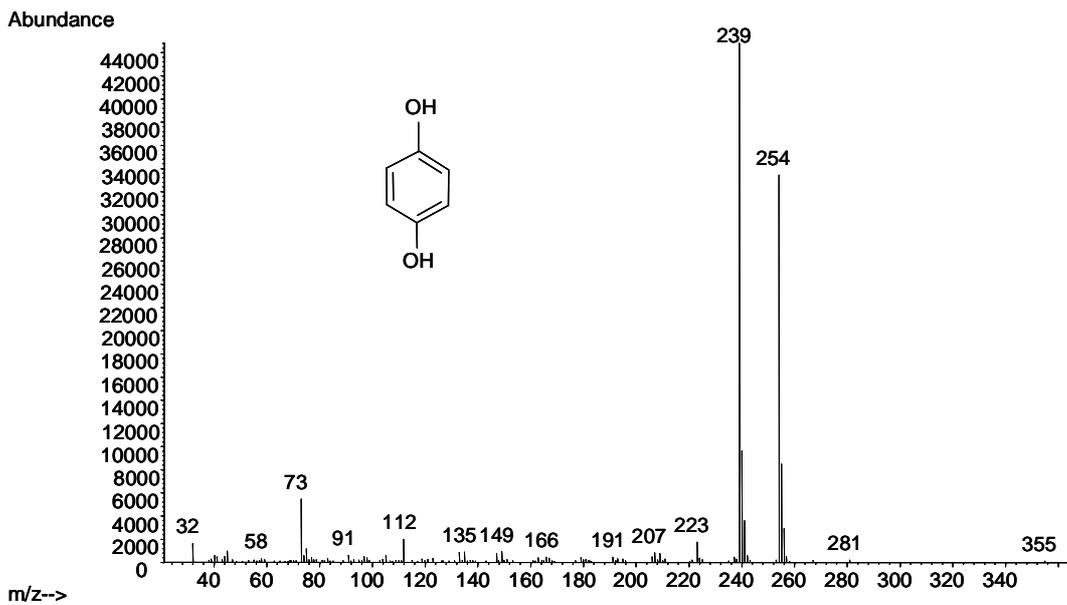


Abb. 3-7: Massenspektrum (silyliert) und Strukturformel von 4-Isopropenylphenol

Abb. 3-8: *p*-Hydrochinon. Massenspektrum (silyliert) und Strukturformel

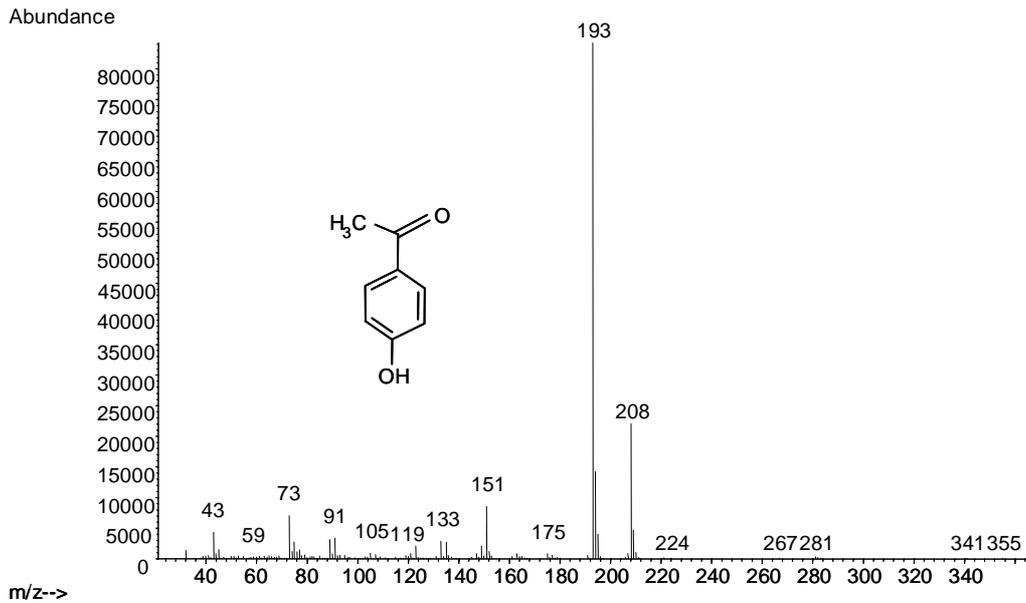


Abb. 3-9: Massenspektrum von einfach silyliertes 4-Hydroxyacetophenon plus Strukturformel

Für eine weitere Verbindung konnte die Massenzahl ermittelt werden, eine eindeutige Identifikation anhand von Standardsubstanzen war nicht möglich. Dieser Metabolit wurden deshalb mit M1 (m/z 224, RT=9,849 min) bezeichnet. Die angegebenen Massenzahlen ergeben sich aus der Massenzahl der Substanz plus Silylgruppen. Die Abb. 3-10 zeigt das Massenspektren dieses Metaboliten.

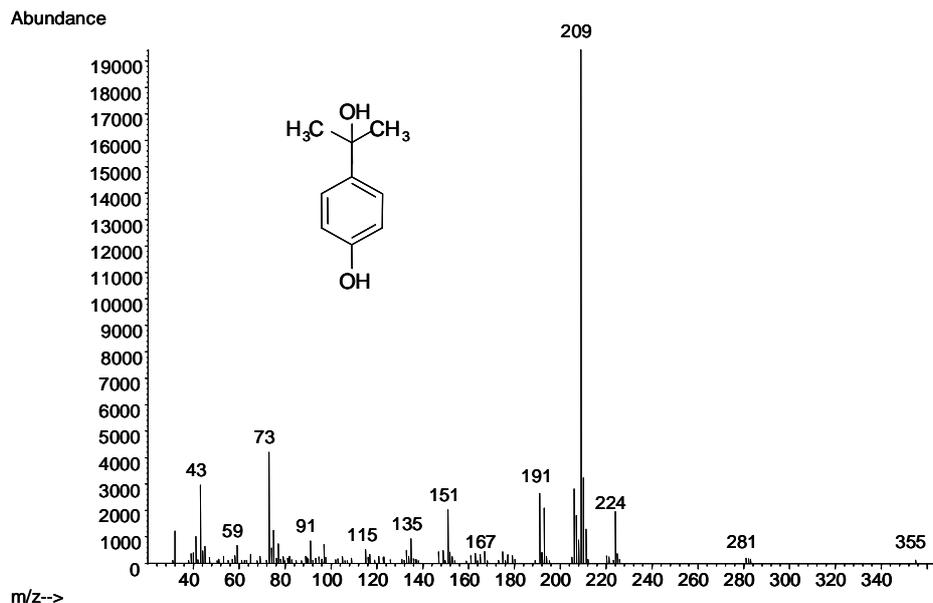


Abb. 3-10: Massenspektrum des Metaboliten M1 (silyliert) mit Strukturvorschlag

Der Metabolit M1 weist Bruchstücke mit Massenzahlen von aromatischen Strukturen auf; m/z plus Silylgruppe: 224, 209 (-CH₃), 191 (Methylphenol), 161 (Phenol) und 151. Bei silylierten Verbindungen kann es vorkommen, dass der eigentliche Molpeak nicht nachweisbar ist, dafür aber ein Fragment mit einer um m/z 15 verminderten Masse. Wahrscheinlich trifft dies auf M1 zu. Daher handelt es sich bei dieser Verbindung um 4-(2-Propanol)-phenol [4-(1-Hydroxy-1-methyl-ethyl)-phenol].

Während der Vermessung von BPA-Proben in der HPLC konnten zusätzlich 4-Hydroxybenzoesäure (RT=3,31 min) und 4-Hydroxybenzaldehyd (RT=3,701 min) als Abbauprodukte erfasst werden.

In der Tabelle 3-4 sind die Ergebnisse der GC/MS-Analyse noch einmal zusammengefasst dargestellt.

Tab. 3-4: Retentionszeiten und Massenzahl der Verbindungen, die mittels GC-MS detektiert wurden

Substanz	Retentionszeit (min)	Massenzahl (m/z) silyliert	Massenzahl (m/z)
4-Isopropenylphenol	9,034	206	133
p-Hydrochinon	9,293	254	182
M1 (4-(2-Propanol)-phenol)	9,849	224	152
4-Hydroxyacetophenon	10,075	208	136
Bisphenol A	15,313	372	228

Die gefundenen intermediären Abbauprodukte geben einen Hinweis auf einen neuen Abbauweg von Bisphenol A durch den Bakterienstamm *Cupriavidus basilensis* RW4, der in der Diskussion entwickelt wird.

In weiteren Wachstumsversuchen konnte festgestellt werden, dass *C. basilensis* RW4 gut mit p-Hydrochinon und 4-Isopropenylphenol wachsen kann. Mit 4-Hydroxyacetophenon als C-Quelle wurde nur sehr geringes Wachstum erfasst.

3.1.8 Abbau von Bisphenol A mit Phenol als zusätzlicher C-Quelle

Weil der Abbau von Bisphenol A durch *C. basilensis* RW4 sehr langsam war, wurde eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen als notwendig erachtet. Durch Veränderung der Inkubationstemperatur bzw. des pH-Wertes des Mediums konnte jedoch keine Steigerung des BPA-Umsatzes und des Wachstums von RW4 erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Zwei Möglichkeiten, die zu einer Verbesserung des Abbaus führten, werden in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt. Bei beiden Varianten diene Phenol als Co-Substrat. Grundlage der Überlegung war, dass während des Abbaus von Aromaten verschiedene Mono- und Dioxygenasen involviert sind. Diese Enzyme werden sowohl für den Umsatz von BPA als auch von Phenol benötigt. Jedoch kann Phenol aufgrund der einfacheren Struktur viel schneller angegriffen werden.

In weiteren Versuchen sollte das Phenol als zusätzliche Nährstoffquelle eingesetzt werden, um das Wachstum von *C. basilensis* RW4 zu stimulieren und die Mono- bzw. Dioxygenasen zu aktivieren. Durch die erhöhte Aktivität der Enzyme sollte der Abbau von Bisphenol A gesteigert und die Umsatzzeit reduziert werden, wobei sowohl Schüttelkulturen als auch Sandsäulen eingesetzt wurden. Durch Erhöhung der Komplexität stellen die Sandsäulen dabei eine Weiterentwicklung der Abbauversuche dar. Der Aufbau dieser Versuche wurde unter 2.1.3. beschrieben.

3.1.8.1 Toxische Wirkung von Phenol auf *C. basilensis* RW4

Da Phenol in den folgenden Abschnitten auch als Wachstumssubstrat eingesetzt werden sollte, war ebenfalls die Überprüfung des Einfluss der Substanz auf das Wachstum von *C. basilensis* RW4 im Toxizitätstest notwendig. Der Test wurde analog zum Versuch 3.5. durchgeführt.

Auch hier wird deutlich, dass mit Anstieg der Phenolendkonzentration (0-14 mM) im Medium das Wachstum der Bakterienzellen zunehmend gehemmt wird. Die halbmaximale Hemmkonzentration (EC_{50}) wurde bei ca. 5,8 mM erzielt. Zum Erreichen der minimalen Hemmkonzentration (MIC) müssen mehr als 14 mM Phenol appliziert werden (Abb. 3-11)

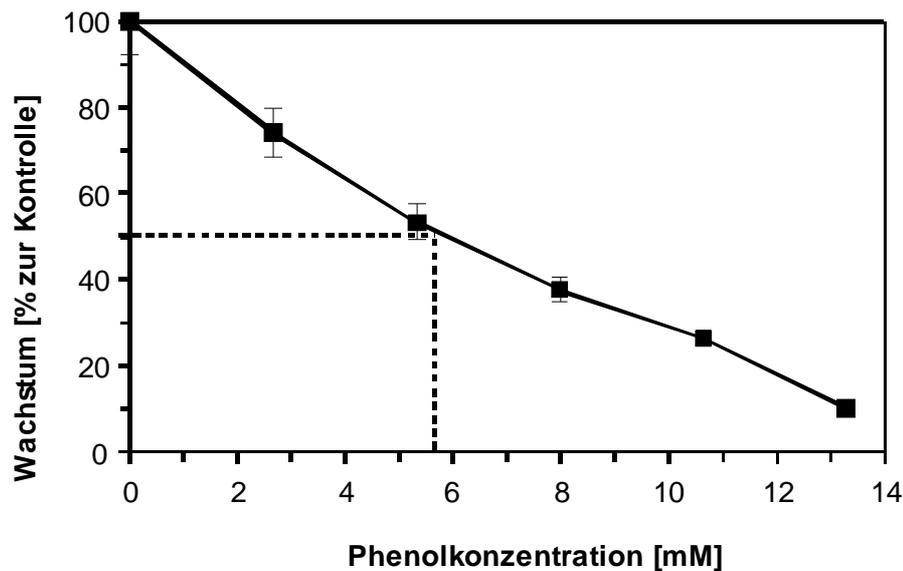


Abb. 3-11: Hemmung des Wachstums von RW4 durch Phenol. Die Kultivierung erfolgte in MM mit 25 mM Succinat bei 30°C und 180 rpm. Das Phenol wurde im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase zugegeben. Die gestrichelte Linie zeigt die EC_{50}

3.1.8.2 Wachstum von *C. basilensis* RW4 mit Phenol als C-Quelle

Bevor Phenol als Co-Substrat während des Wachstums von *C. basilensis* RW4 mit Bisphenol A zum Einsatz kam, wurden zunächst für die Verbindung einige Wachstums- und Abbaukurven aufgenommen. Die Bakterienzellen wurden in Mineralsalzmedium mit 1 mM und 2 mM Phenol bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

Die Abbildung 3-12 zeigt, dass beide Konzentrationen durch *C. basilensis* RW4 verringert wurden.

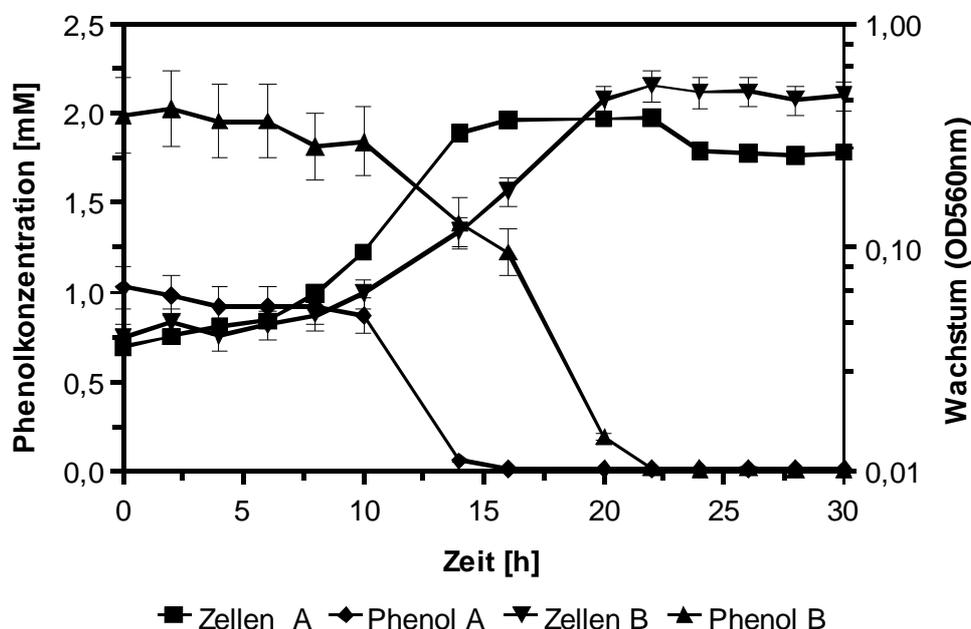


Abb. 3-12: Wachstum von *C. basilensis* RW4 mit Phenol als C-Quelle, in zwei verschiedenen Endkonzentrationen: A) 1 mM und B) 2 mM. Die Bakterienzellen wurden bei 30°C und 180 rpm inkubiert.

Die logarithmische Wachstumsphase begann mit 1 mM Phenol eher als mit 2 mM Phenol und erreichte bereits nach 14 h die stationäre Phase. Mit der höheren Phenolkonzentration verzögerte sich das Wachstum und der Eintritt in die stationäre Phase fand erst nach 22 h statt. Dennoch konnte für beide Phenolkonzentrationen in der logarithmischen Wachstumsphase eine maximale Wachstumsrate vom $\mu_{\max} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ermittelt werden. Aufgrund der größeren Menge an Substrat konnte eine höhere Zellzahl erzielt werden. Während der lag-Phase nahm das Phenol im Medium bei beiden Ausgangskonzentrationen nur minimal ab. Mit Zunahme der Zellzahl erhöhte

sich die Abbaugeschwindigkeit, und die Konzentration nahm schnell ab, bis nach Erreichen der stationären Wachstumsphase kein Phenol mehr nachweisbar war.

3.1.8.3 Abbau von BPA und Phenol in Schüttelkulturen

Die Zellen von *C. basilensis* RW4 wurden in Mineralmedium mit 0,17 mM BPA und 1,7 mM Phenol als Co-Substrat kultiviert. Das Phenol sollte das Wachstum der Bakterienkultur stimulieren. Bereits nach 2 Stunden Inkubation wurde eine optische Dichte von 2,0 gemessen und im Medium konnte aufgrund des schnellen Abbaus kein Phenol nachgewiesen werden. Die BPA-Konzentration verringerte sich in diesem Zeitraum nur geringfügig von 0,17 mM auf 0,165 mM. Nachdem das Phenol als Wachstumssubstrat verbraucht war, nahm das Bisphenol A im Medium schneller ab. Durch die hohe Zellzahl konnte der Abbau gesteigert werden. Die Inkubationszeit wurde verkürzt, bereits nach 225 Tagen waren nur noch 0,017 mM BPA detektierbar (Abb. 3-13). Dennoch war der BPA-Abbau sehr langsam.

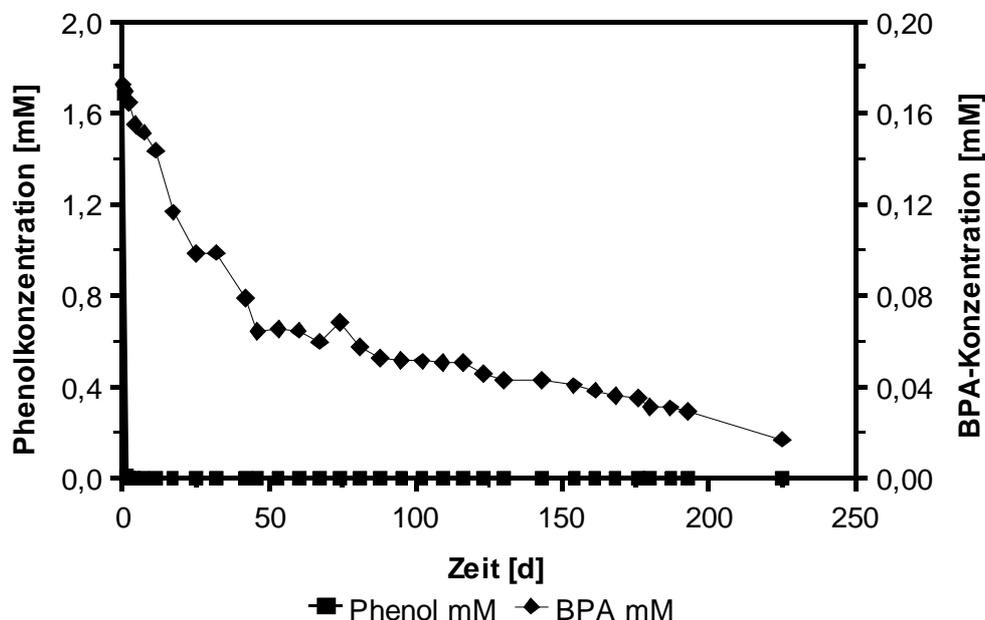


Abb. 3-13: Abnahme der Phenol- und BPA-Konzentration im Medium während der Kultivierung von *C. basilensis* RW4 bei 30°C und 180 rpm. Beide Verbindungen wurden zusammen als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt.

3.1.9 Kultivierung von *C. basilensis* RW4 in Sandsäulen

Aufgrund des extrem langsamen Wachstums von *C. basilensis* RW4 und der geringen BPA-Abbauraten in den Flüssigkulturen, wurde eine Veränderung der Kultivierung notwendig. Wahrscheinlich waren die Bedingungen für eine Mineralisierung von Bisphenol A durch *C. basilensis* RW4 suboptimal. Deshalb musste eine neue Kultivierungsmethode entwickelt werden. Durch den Einsatz von komplexeren Sandsäulen sollte eine Steigerung des Abbaus von Bisphenol A und eine Verkürzung des Versuchszeitraums erzielt werden.

Der Aufbau der selbstentwickelten Säulensysteme ist in 2.1.3. beschrieben und die Abbildung 3.14. zeigt ein Schema einer Sandsäule. Jede Säule wurde in vier Sandebenen E1 (oben) bis E4 (unten) unterteilt. Jede Ebene hatte eine Höhe von 4 cm.

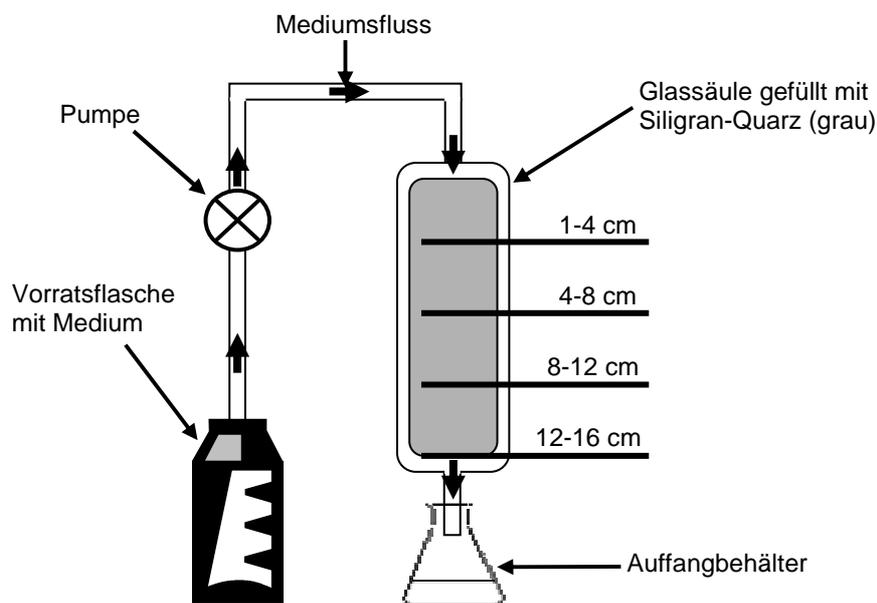


Abb. 3-14: Schematische Darstellung des Säulenkomplexes. Die Unterteilung erfolgte in 4 Ebenen mit einer Höhe von 4 cm.

3.1.9.1 Adsorption von Phenol und BPA an Sand

Für Boden wurde je nach Typ eine Sorptionskonstante K_{OC} von 314-1524 (Howard 1998) bzw. 640-930 (Cousins et al. 2002) errechnet. Das BPA wird aufgrund seiner starken Affinität bzw. Hydrophobizität an die organische Bodenmatrix gebunden und bildet nicht-extrahierbare Komplexe (Fent et al. 2003). Das gebundene BPA ist somit für die Bakterien nicht mehr verfügbar. Da Phenol und Bisphenol A in späteren Versuchen als Wachstumssubstrate in Sandsäulen eingesetzt wurden, war zunächst eine Überprüfung der Adsorptionsfähigkeit beider Verbindungen an Sand erforderlich. Es sollte sichergestellt werden, dass die Abnahme der Konzentration allein auf Abbau der Substanzen durch *C. basilensis* RW4 beruht.

Als erstes wurde ein Sorptionstest nach einer abgewandelten Methode von Ying und Lookana (2005) durchgeführt. Hierbei wurden 2 g Sand in 200 ml destilliertes Wasser gegeben, welches mit Phenol (96,7 μM , 496,02 μM , 1026,56 μM) und Bisphenol A (40,3 μM , 68,24 μM und 148,23 μM) versetzt wurde. Anschließend wurde der Sand für 2 h bei 20 °C geschüttelt und danach die Konzentration beider Verbindungen im Überstand mittels HPLC bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine Sandextraktion mit Methanol um das BPA und Phenol zu erfassen, welches möglicherweise am Sand adsorbiert war.

Die Abbildung 3-15 zeigt, dass die Konzentrationen von Bisphenol A im Überstand (39,99 μM , 66,45 μM und 139,64 μM) nach der 2-stündigen Inkubation nur geringfügig niedriger war als die eingesetzten Ausgangskonzentrationen. Durch Einsatz von Methanol konnten weitere 3-11 μM BPA vom Sand extrahiert werden. Dies bedeutet, dass ca. 5 % vom applizierten BPA adsorbiert waren.

Im Falle des Phenols konnte keine Adsorption an Sand festgestellt werden. Die Konzentrationen im Überstand waren vor und nach Inkubation gleich (Abb. 3-16). Nach der Extraktion war in den Proben auch kein Phenol nachzuweisen.

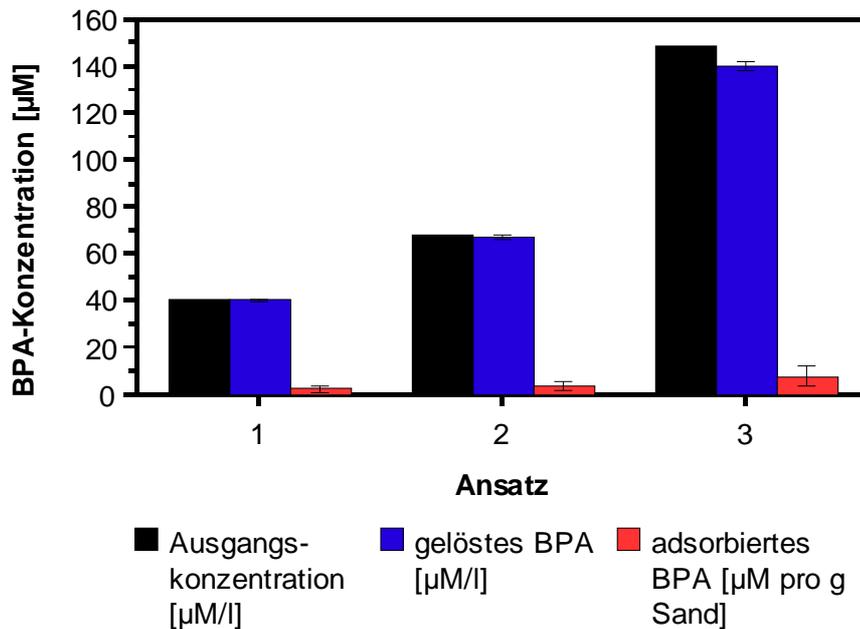


Abb. 3-15: Adsorption von Bisphenol A in μM pro Gramm Sand. 200 ml Wasser wurden mit $40,3 \mu\text{M}$, $68,24 \mu\text{M}$ und $148,23 \mu\text{M}$ BPA und 2 g Sand versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation auf dem Schüttler (20°C) wurde die BPA-Konzentration im Überstand ermittelt. Anschließend erfolgte die Extraktion des am Sand adsorbierten BPAs mit Methanol und dessen Analyse.

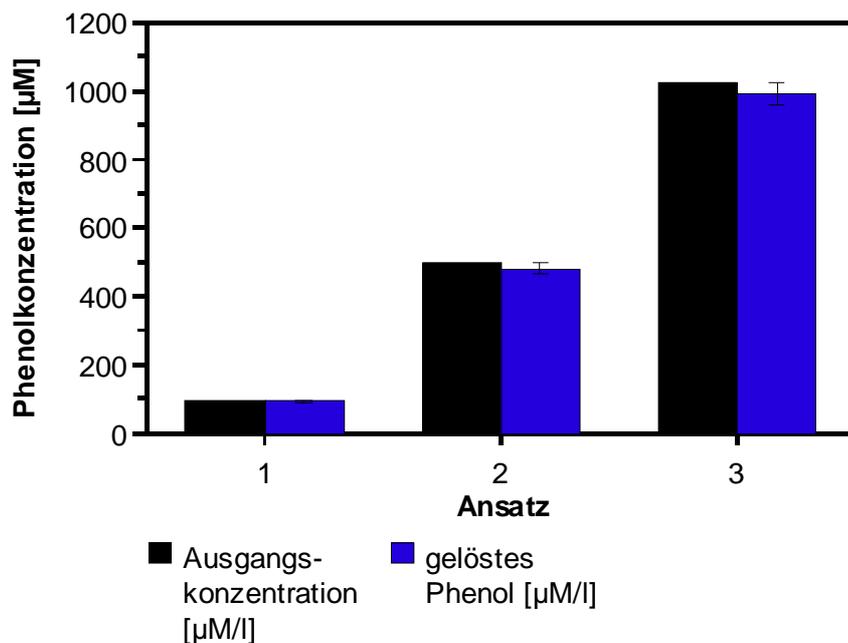


Abb. 3-16: Adsorption von Phenol in μM pro Gramm Sand. 200 ml Wasser und 2 g Sand wurden mit je $96,7 \mu\text{M}$, $496,02 \mu\text{M}$, $1026,56 \mu\text{M}$ Phenol für 2 h bei 20°C geschüttelt. Danach wurde die Phenolkonzentration im Überstand ermittelt.

Die Sandpartikel hatten eine Größe von 0,7 mm-1,2 mm, mit einer mittleren Korngröße von 0,83 mm. Laut Antizar-Ladislao et al. (2000) ist Sand mit einer Korngröße von 0,81 mm für eine optimale Verteilung von Phenol innerhalb der ganzen Säule am besten geeignet. Deshalb wurde zusätzlich die Verteilung und Adsorption von Bisphenol A innerhalb der Sandsäulen erfasst. Dafür wurde Mineralsalzmedium mit 0,87 mM BPA aus einer Vorratsflasche von oben durch die 16 cm hohe Sandsäule geleitet. Der Zufluss war während der 16-stündigen Versuchsdauer kontinuierlich und betrug 6,2 ml/h. Am Ende erfolgte eine Probenahme am Abfluss sowie die Bestimmung des BPA-Gehaltes in der Sandsäule. Diese wurde von oben nach unten in 4 Ebenen unterteilt, die jeweils eine Höhe von 4 cm hatten: E1 0-4 cm, E2 4-8 cm, E3 8-12 cm und E4 12-16 cm. In jeder Ebene befanden sich ca. 88 g Sand.

In der Abbildung 3-17 sind die BPA-Konzentrationen in den einzelnen Ebenen sowie in Zu- und Abfluss dargestellt. Man kann erkennen, dass die Verteilung von Bisphenol A in der Sandsäule gut war. In allen 4 Schichten konnte die Verbindung nachgewiesen werden. Die Konzentration nahm von oben nach unten geringfügig ab. In E1 wurden 0,88 mM, in E2 0,85 mM, in E3 0,83 mM und in E4 0,75 mM gemessen. Im Abfluss konnten 0,78 mM BPA erfasst werden.

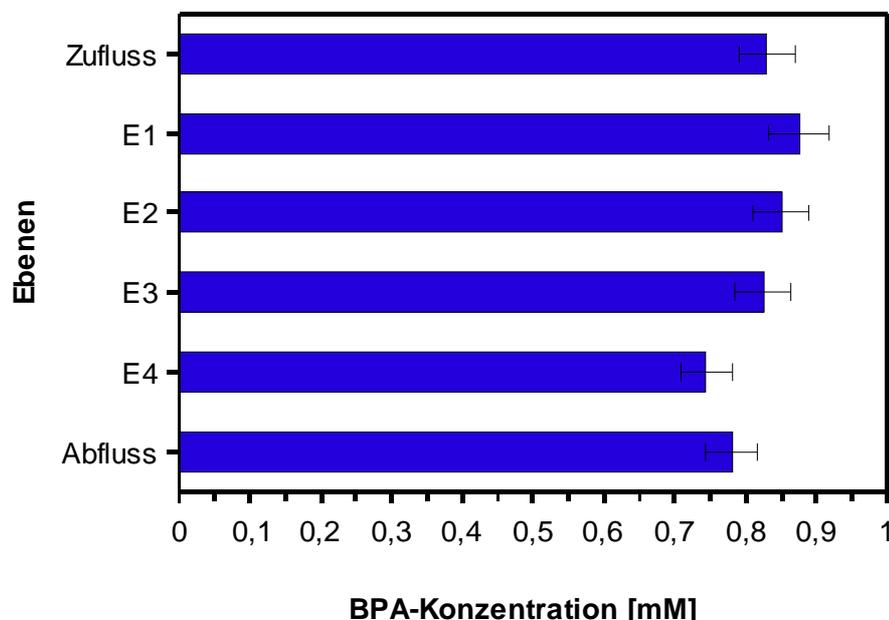


Abb. 3-17: BPA-Konzentration am Zu- bzw. Abfluss und in den verschiedenen Ebenen der Sandsäule nach 16-stündiger Inkubation bei 22°C.

Wie in späteren Versuchen festgestellt wurde, war es möglich, die Unterschiede zwischen den einzelnen Ebenen auszugleichen. Somit war Bisphenol A in der gesamten Sandsäule in ausreichender Menge vorhanden und konnte im nachfolgenden Versuch als Nährstoffquelle für *C. basilensis* RW4 dienen.

3.1.9.2 Abbau von Bisphenol A in Sandsäulen

Aufgrund der guten Verteilung von Bisphenol A in der Sandsäule und des geringen Adsorptionspotentials von Phenol und BPA an Sand, war ein Einsatz beider Verbindungen in den unter 2.1.3 beschriebenen Sandsäulen möglich.

Die 350 g Sand wurden mit 50 ml Übernachtkultur von *C. basilensis* RW4 in Mineralsalzmedium mit 1,5 mM Phenol beimpft, so dass pro Gramm Sand eine Zelldichte von 3×10^5 Zellen erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Zufuhr von Medium mit 1,5 mM Phenol und 0,21 mM BPA von oben aus einer Vorratsflasche. Die BPA-Konzentration war so hoch, weil bis zu 5 % des eingesetzten BPAs an den Sand adsorbieren können, und somit den Bakterienzellen nicht mehr zur Verfügung standen. Der Fluss war kontinuierlich und Zuflussrate betrug 6,2 ml/h. Die Durchflussrate des Säulensystems war 0,124 und die Verweilzeit lag bei 8 h. Die Inkubation fand bei ca. 22°C statt. Nach Passage der beimpften Sandsäule wurden am Abfluss Proben der Flüssigkeit entnommen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden die Konzentrationen von Phenol und BPA im Überstand mittels HPLC bestimmt.

Die Phenolkonzentration startete zum Zeitpunkt 0 h mit 1,5 mM, weil der Sand bereits mit Medium beimpft wurde, welches so viel Phenol enthielt. Aufgrund der Verweilzeit konnte erst nach 8 Stunden die Konzentration erfasst werden, die von außen zugeführt wurde. Doch bereits nach dieser kurzen Zeit wurde eine geringe Abnahme des Phenolgehalts beobachtet. *C. basilensis* RW4 verwertete das Phenol sehr gut, so dass die Konzentration schnell reduziert wurde. Nach 28 h Inkubation konnte kein Phenol mehr im Abfluss detektiert werden.

Nach der Verweilzeit wurde eine hohe BPA-Konzentration von fast 0,21 mM BPA im Abfluss erfasst. Bis ca. 55 h blieb diese dann konstant. Erst zu diesem Zeitpunkt

begann *C. basilensis* RW4 das BPA abzubauen, da mit steigender Zelldichte Phenol als alleiniges Wachstumssubstrat nicht mehr ausreichte. Der Abbau verlief kontinuierlich aber langsam, jedoch viel schneller als bei den Schüttelkulturen (siehe 3.1.11). Nach 150 h wurde im Abfluss eine Konzentration von 0,14 mM gemessen. Das bedeutet eine Reduktion um fast die Hälfte in nur ca. 100 h. Ab 145 Stunden konnte wieder Phenol im Abfluss nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Wachstum der Zellen in der Säule gestört war und das Phenol nicht mehr verwertet wurde.

Die Abbildung 3-18 zeigt, wie sich am Abfluss die Konzentrationen beider Verbindungen während eines Zeitraums von 150 h veränderten.

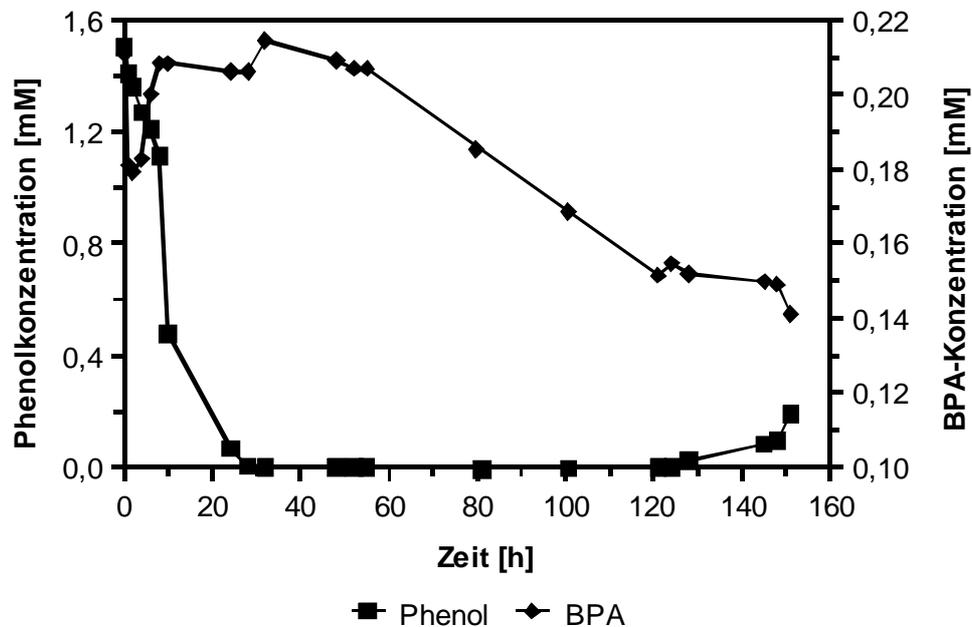


Abb. 3-18: Phenol- und BPA-Konzentration im Medium am Ablauf des Säulensystems nach Passage der Sandsäule, welche mit Zellen von *C. basilensis* RW4 versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (22°C).

In einer Zusammenfassung der Ergebnisse aus den vorhergegangenen Versuchen wird deutlich (Tab. 3-5), dass der Abbau von Bisphenol A durch *C. basilensis* RW4 aufgrund der Veränderung der Kultivierungsbedingungen gesteigert werden konnte. Die Abbauzeit bei der 50% der Ausgangskonzentration umgesetzt wurden, reduzierte sich deutlich. Während *C. basilensis* RW4 in einer Schüttelkultur mit BPA als einzige C-Quelle für eine 50%-ige Reduktion noch 133 Tage benötigte, verringerte sich die Zeit durch die Zugabe von Phenol um 70%. Die besten Resultate bezüglich der Halbwertszeit konnten in den Sandsäulen mit BPA und Phenol als C-Quelle erzielt werden.

Tab.3-5: Zusammenfassung der Halbwertszeiten von BPA

Kultivierungsmethode	BPA-Halbwertszeit (50%ige Reduktion)
<u>Schüttelkultur:</u>	
BPA	133 d
BPA plus Phenol	42 d
<u>Sandsäule:</u>	
BPA	∞
BPA plus Phenol	4 d

∞ keine Abnahme zu beobachten

3.2 Membrantoxische Wirkung von Bisphenol A

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes BIOTOOL (<http://www.gbf.de/biotools/>) angefertigt, das sich mit dem biologischen Abbau organischer Schadstoffe und der Entwicklung von Verfahren zur Überwachung von Bioremediationsprozessen beschäftigte. Somit lag das Augenmerk der Arbeit neben der Isolierung und Charakterisierung von Bakterien zum Abbau von Bisphenol A auch in der Untersuchung von Adaptionsreaktionen von Bakterien auf der Membranebene mit dem Ziel, Lipide als Biomarker zur Beurteilung des toxikologischen Status eines mit BPA kontaminierten Standortes zu entwickeln.

Aufgrund seines logP-Wertes von 3,40 (Staples et al. 1998) und seiner recht hohen Wasserlöslichkeit (300 mg/l, Dorn 1987, Howard 1989) gehört BPA zu der Gruppe organischer Lösungsmittel, die als äußerst membrantoxisch einzustufen sind. Besonders Lösungsmittel mit einem logP-Wert von 1 bis 4 reichern sich in extrem hohen Konzentrationen in der Membran an und führen dort zu erheblichen Störungen der unterschiedlichen Funktionen dieser wichtigen Zellstruktur (Heipieper et al. 1994, 2007). Allerdings sind viele Bakterien in der Lage, sich innerhalb gewisser Grenzen an ein Toxin auf der Ebene der Membran anzupassen, um so die Membranfunktion und das Wachstum unter den veränderten Umweltbedingungen aufrecht zu erhalten (Isken und de Bont 1998, Neumann 2006). Veränderungen in der Membranzusammensetzung bei Bakterien stellen daher eine Möglichkeit dar, über bestimmte Markerfettsäuren den toxikologischen Status eines kontaminierten Standortes zu ermitteln. Eine dieser Biomarkerreaktion ist dabei die Synthese von *trans*-ungesättigten Fettsäuren mit Hilfe der *cis-trans*-Isomerase und dem daraus resultierenden Anstieg des Verhältnisses von *trans*- zu *cis*-einfach ungesättigten C16:1-Fettsäuren. Der Adaptionsmechanismus ist ein guter Marker für die membrantoxische Wirkung von Verbindungen. Jedoch ist dieser hauptsächlich bei der Gattung *Pseudomonas* zu finden (Heipieper et al 1996, de Bont 1998) und konnte bei *Cupriavidus basilensis* RW4 nicht detektiert werden.

Deshalb wurde in enger Absprache mit den Partnern des BIOTOOL-Projektes beschlossen, alle weiteren Untersuchungen zum Test des *trans/cis*-Verhältnisses als Toxizitätsmarker zur Beurteilung von kontaminierten Böden mit dem phenolabbauenden Bakterienstamm *Pseudomonas putida* P8 (Bettman und Rehm 1984)

durchzuführen. Das Bakterium ist der Standardorganismus für die Untersuchung von toxischen Effekten verschiedener Verbindungen (Heipieper et al. 1992, Loffeld and Keweloh 1996).

Die verschiedenen toxischen Zonen innerhalb eines Bodensystems, welches mit Bisphenol A kontaminiert wurde, sollten mit Hilfe der Sandsäulen simuliert werden. Anhand der Anpassungsreaktionen von *P. putida* P8 erfolgte dann die Charakterisierung der Bedingungen und Wachstumsverhältnisse in den Sandsäulen.

3.2.1 Konzentrationsabhängige Effekte von BPA auf *P. putida* P8

Die Zellen von *P. putida* P8 wurden in Mineralsalzmedium mit 25 mM Succinat bei 30° bei 180 rpm kultiviert. Im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte die Applikation von Bisphenol A in ansteigender Konzentration.

Die Zellzahl wurde mittels Messung der optischen Dichte bei 560 nm bestimmt. Das Wachstum der Parallelkulturen vor Zugabe des BPA verlief gleichmäßig. Nach 2,5 h wurde BPA in ansteigenden Endkonzentrationen zugegeben. Ein Ansatz verblieb ohne Schadstoff als Wachstumskontrolle. Nach Schadstoffzugabe wurde die Inkubation für zwei Stunden fortgesetzt.

Durch Einwirkung der Verbindung wurde das Wachstum von *P. putida* P8 gehemmt. Es kommt zu einer Auffächerung der Wachstumskurven. Der Ansatz ohne Toxin wächst ungehindert weiter, während bei den anderen mit steigender BPA-Konzentration die Hemmung des Wachstums zunimmt bis hin zum Wachstumstopp. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert und die Phospholipidfettsäuren aus den Zellen extrahiert und mittel GC-FID analysiert.

Die Abbildung 3-19 zeigt die Wachstumskurven eines solchen Versuchs.

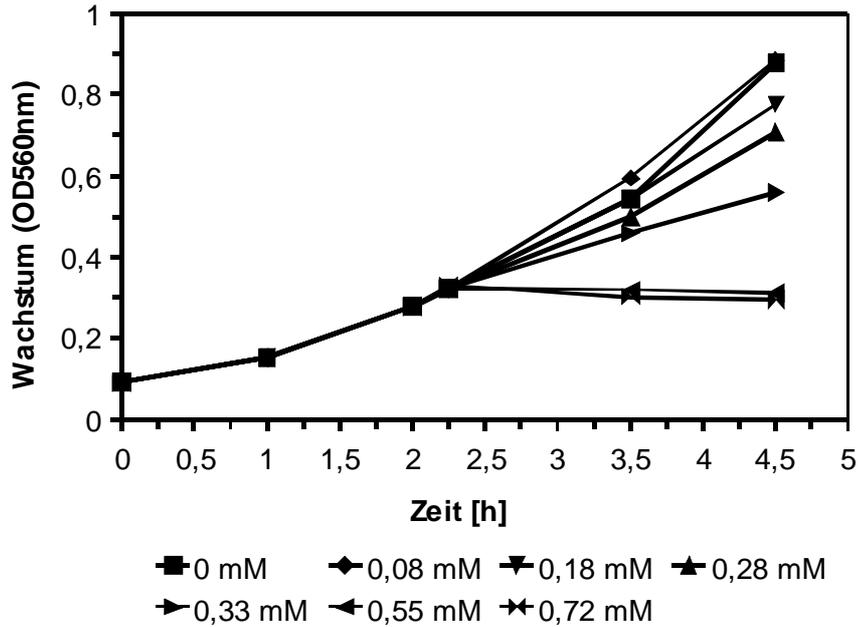


Abb. 3-19: Einfluss von Bisphenol A auf das Wachstum von *P. putida* P8. Die Zugabe der Substanz erfolgte nach 2,25 Stunden. Die Bakterienzellen wurden in MM mit 25 mM Succinat bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

In Abb. 3-20 ist die Wachstumshemmung durch Bisphenol A im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle dargestellt.

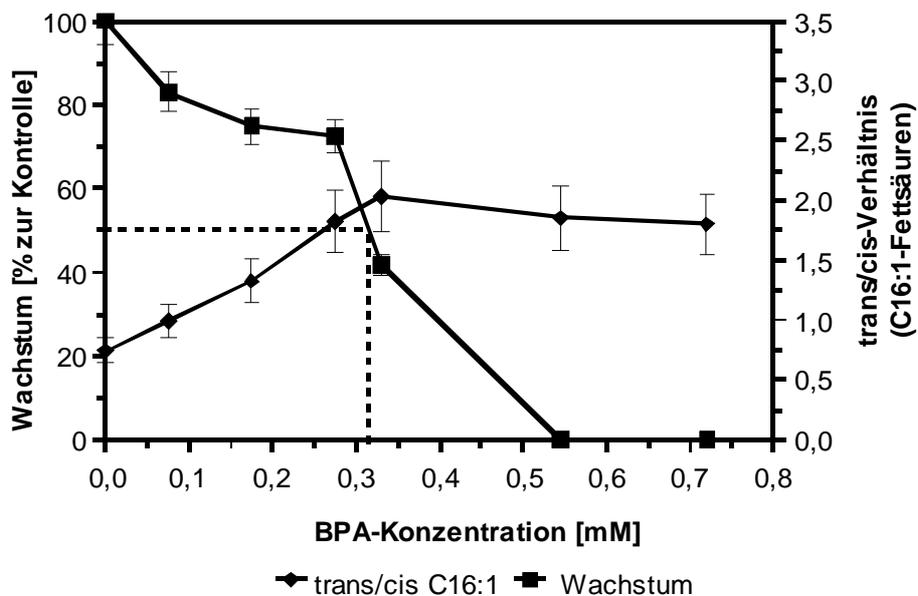


Abb. 3-20 Hemmung des Wachstums von *P. putida* P8 durch Bisphenol A und Veränderung des *trans/cis*-Verhältnisses der ungesättigten C16-Fettsäuren. Die gestrichelte Linie zeigt die EC_{50} .

Die effektive Konzentration (EC_{50}), bei der nur noch 50 % der Zellen von *P. putida* P8 gewachsen waren, lag bei ca. 0,31 mM BPA. Ab 0,55 mM BPA war kein Wachstum mehr zu verzeichnen. Aufgrund der Isomerisierung von *cis*-ungesättigten Fettsäuren zur *trans*-Form stieg bis zu einer Konzentration von ca. 0,35 mM BPA das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren an. Es wurden Werte bis ca. 2,03 erreicht. Als der Bisphenol A-Gehalt im Medium weiter erhöht wurde, war ein geringer Abfall des *trans/cis*-Verhältnisses für C16:1 auf 1,8 festzustellen. Dieser hohe Wert blieb erhalten, obwohl kein Wachstum der Zellen stattfand.

Hinsichtlich des Grades der Sättigung bzw. der Adaption konnten zwei unterschiedliche Entwicklungen beobachtet werden, welche auf die jeweiligen Berechnungsmethoden zurückzuführen sind.

$$\text{Sättigungsgrad} = \frac{(16:0 + 18:0)}{(16:1\Delta 9\textit{trans} + 16:1\Delta 9\textit{cis} + 18:1\Delta 11\textit{trans} + 18:1\Delta 11\textit{cis})}$$

$$\text{Adaptionsgrad} = \frac{(16:0 + 18:0 + 16:1\Delta 9\textit{trans} + 18:1\Delta 11\textit{trans})}{(16:1\Delta 9\textit{cis} + 18:1\Delta 11\textit{cis})}$$

Die Berechnung des Adaptionsgrades berücksichtigt die physiko-chemischen Eigenschaften der *trans*-ungesättigten Fettsäuren, die eher denen der gesättigten Fettsäuren entsprechen (Heipieper et al. 2003, 2007, Zhang und Rock 2008). Bei hohem Adaptionsgrad werden verstärkt gesättigte Fettsäuren in die Membran eingebaut bzw. *trans*-ungesättigte Fettsäuren gebildet. Somit wird eine Stabilisierung der Membran erreicht.

Während der Sättigungsgrad nur geringfügig zunahm, stieg der Adaptionsgrad deutlich an. Der Kurvenverlauf war ähnlich dem des *trans/cis*-Verhältnisses (Abb. 3-21).

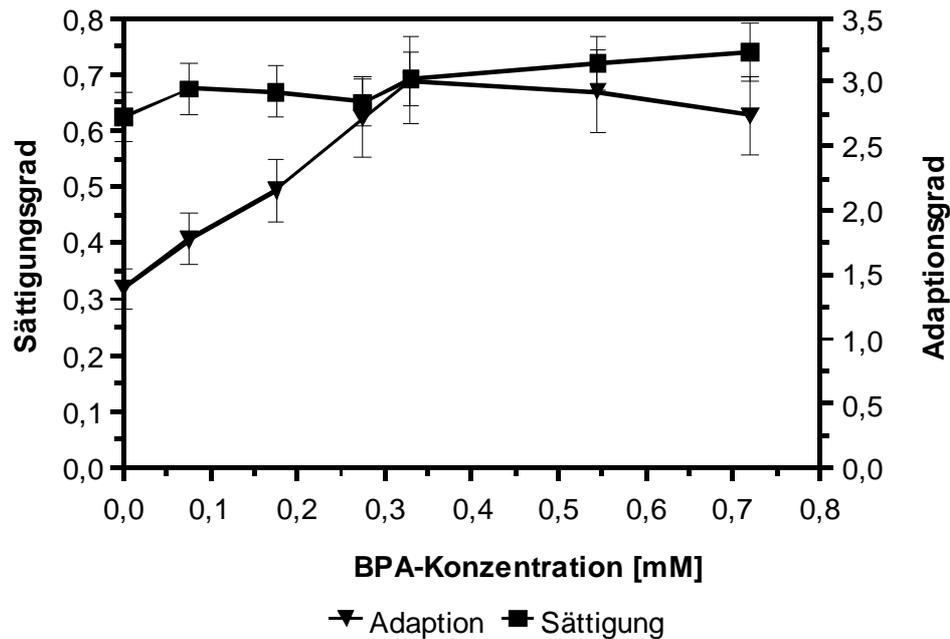


Abb. 3-21: Veränderung des Adpations und Sättigungsgrads der Membranfettsäuren in *P. putida* P8 nach Einwirken von BPA

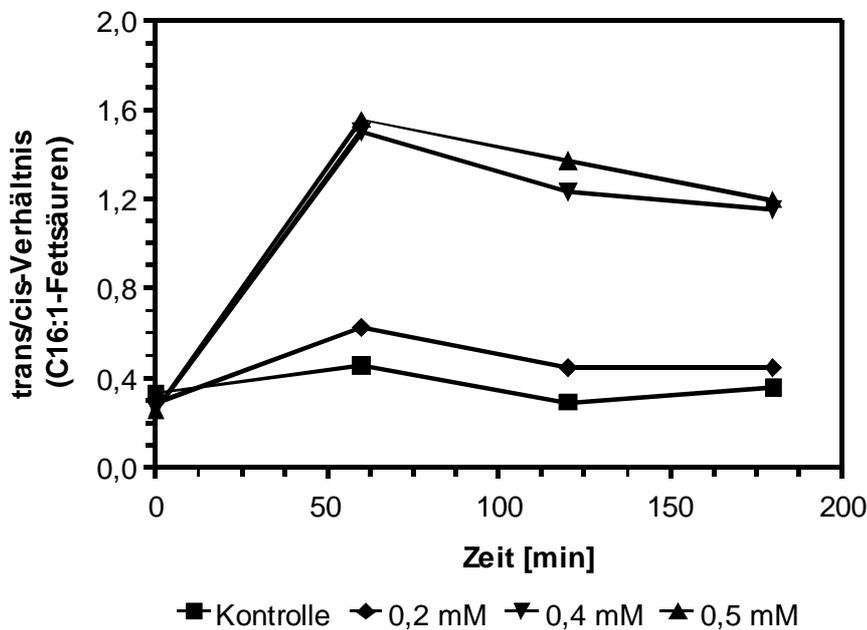
Der Adaptionsgrad nahm bis 0,35 mM BPA zu und erreichte Werte bis 3. Mit weiterem Anstieg der BPA-Konzentrationen wurde der Adaptionsgrad etwas niedriger, jedoch waren die Werte immer noch stark erhöht.

3.2.2 Zeitabhängige Effekte von BPA auf *P. putida* P8

In den vorhergegangenen Versuchen wurde deutlich, dass durch Bisphenol A in ansteigender Konzentration verschiedene Reaktionen bei *P. putida* P8 ausgelöst wurden, die auch mit einer Anpassung an den Schadstoff verbunden waren. Nun sollte überprüft werden, ob diese Effekte nicht nur abhängig von der Konzentration im Medium sondern auch von der Einwirkzeit sind. Dafür wurden drei verschiedene BPA-Konzentrationen (0,2 mM, 0,4 mM und 0,5 mM) ausgewählt und das Bisphenol A erneut im ersten Drittel der logarithmischen Wachstumsphase appliziert. Als Kontrolle diente wieder ein Ansatz ohne Toxinzugabe. Die Zellen wurden vor der BPA-Applikation sowie 60 min, 120 min und 180 min danach geerntet und die Fettsäuren extrahiert.

Vor Zugabe von Bisphenol A waren das *trans/cis*-Verhältnis der ungesättigten C16-Fettsäuren mit ca. 0,25 und der Grad der Adaption mit 1,1 relativ niedrig. Bereits nach 60-minütigem Einwirken konnte ein drastischer Anstieg beider Werte bei 0,4 mM und 0,5 mM BPA beobachtet werden. Das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren erreichte 1,5 und der Adaptionsgrad lag zwischen 2,6 und 3. Für die niedrigste BPA-Konzentration (0,2 mM) konnte ebenfalls eine Zunahme verzeichnet werden, jedoch fiel diese deutlich geringer aus. Dennoch waren die Werte höher als bei der Kontrolle. Nach 120 Minuten Einwirkzeit nahm *cis-trans*-Isomerisierung bei allen drei Konzentrationen ab. Die *trans/cis*-Werte sanken bei den höheren BPA-Konzentrationen bis auf 1,1 ab. Bei 0,2 mM BPA konnte eine Abnahme de *trans/cis*-Verhältnisses bis fast zum Startwert beobachtete werden. Der Adaptionsgrad verringerte sich nur bei 0,4 mM etwas, ansonsten blieb dieser auch 180 min nach Toxinzugabe relativ konstant. Der Sättigungsgrad veränderte sich während der Versuchszeit nicht, deshalb wurden die Werte nicht grafisch dargestellt. Die Abbildungen 3-22 A und B zeigen die Ergebnisse.

A)



B)

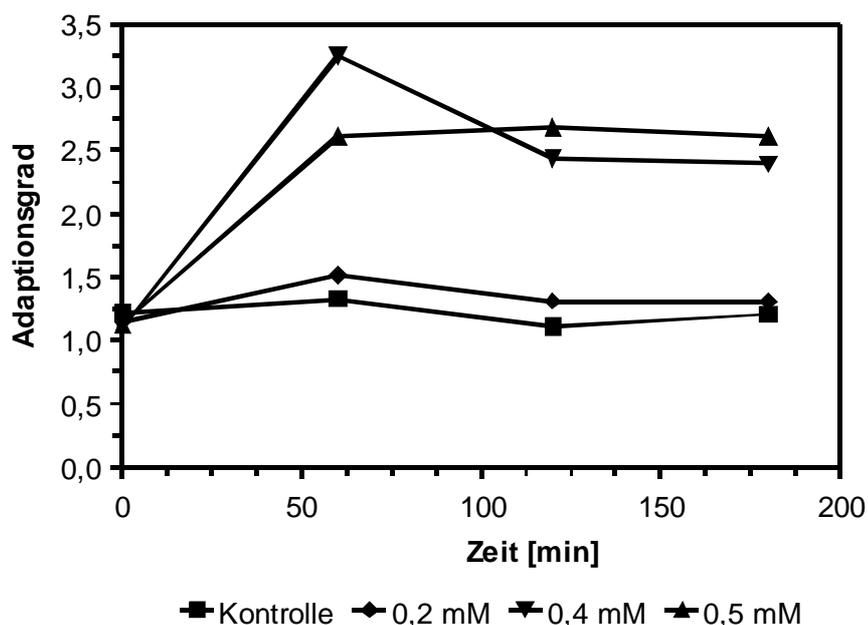


Abb. 3-22: Zeitliche Veränderung der A) *trans/cis*-Verhältnis der ungesättigten C16-Fettsäuren und des B) Adaptionsgrad von *P. putida* P8. Die Applikation von Bisphenol A erfolgte zum Zeitpunkt 0. Zellproben wurden nach 0 min, 60 min, 120 min und 180 min entnommen. Der Bakterienstamm wuchs mit Succinat bei 30°C und 180 rpm.

3.2.3 Konzentrationsabhängige Effekte von BPA auf *P. putida* P8 mit Phenol als C-Quelle

Zur Überprüfung der toxischen Effekte von Bisphenol A in den komplexen Sandsäulen, die auch den Abbau der Verbindung in dem System beeinflussen können, wurde Phenol als Wachstumssubstrat eingesetzt. Aufgrund der oft beobachteten Übertragbarkeit der Adaptionsmechanismen war zu erwarten, dass eine Vorinkubation mit Phenol eine erhöhte Toleranz auch gegenüber anderen membranschädigenden Substanzen bewirkt. Deshalb sollte zuerst in einfachen Schüttelkulturen überprüft werden, ob durch den Einsatz von Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle die toxische Wirkung von BPA beeinflusst wird und ob die Anpassungsreaktionen von *P. putida* P8 hinsichtlich des *trans/cis*-Verhältnisses der ungesättigten C16-Fettsäuren und des Sättigungs- bzw. Adaptionsgrades der Membranfettsäuren verändert wurden.

Der Versuchsablauf erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben, nur dienten nunmehr 2 mM Phenol als C-Quelle. Im Gegensatz zum Toxizitätstest mit Succinat als Substrat musste mehr Bisphenol A appliziert werden, um eine Wachstumshemmung zu verzeichnen. So lag die EC_{50} -Konzentration bei ca. 0,63 mM BPA. Ein Stopp des Wachstums wurde erst mit mehr als 1,2 mM BPA erreicht.

Die Abbildung 3-23 zeigt, dass hinsichtlich des *trans/cis*-Verhältnisses der ungesättigten C16-Fettsäuren und des Adaptiongrades deutliche Veränderungen auftraten.

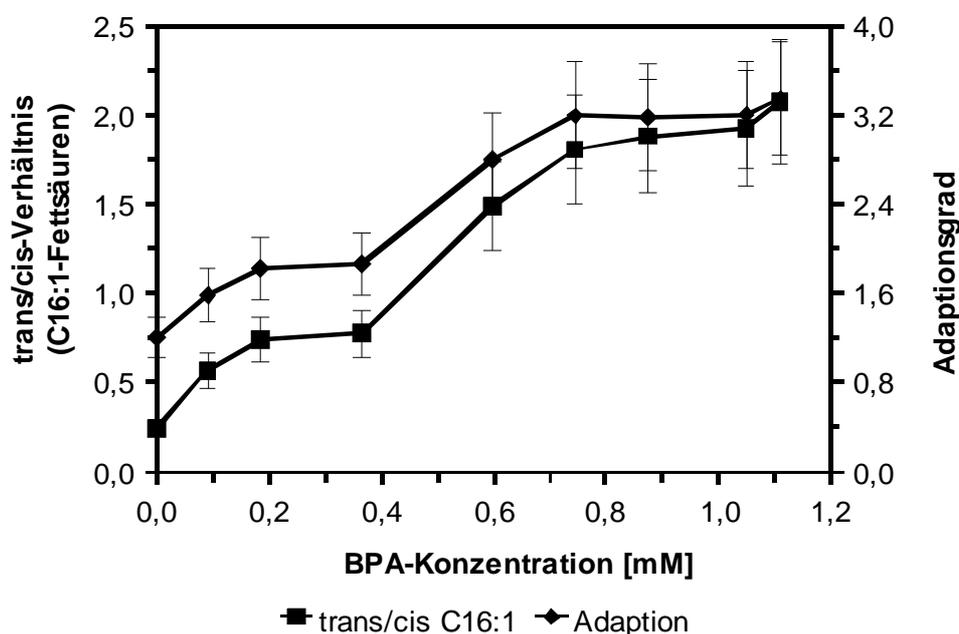


Abb. 3-23: Einfluss von Bisphenol A auf die Membranzusammensetzung von *P. putida* P8. Veränderung der *trans/cis*-Verhältnis der ungesättigten C16-Fettsäuren und des Adaptiongrades mit Phenol als C-Quelle.

Mit steigender BPA-Konzentration nahm das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren zu und erreichte Werte von 1,88 bis 2,07. Jedoch war gegenüber den Versuchen von 3.2.1 eine Verschiebung hin zu deutlich höheren BPA-Konzentrationen zu beobachten. So wurden die Höchstwerte erst bei ca. 0,75 mM BPA erreicht und nicht schon bei 0,35 mM. Danach blieb *cis-trans*-Isomerisierung konstant auf hohem Niveau. Der Grad der Adaption erhöhte sich ebenfalls und verlief ähnlich dem des *trans/cis*-Verhältnisses. So stieg der Adaptiongrad bis auf 3,2 an und blieb dann ab 0,75 mM BPA konstant. Bezüglich der Sättigung konnte erneut keine Änderung bzw. ein eindeutiger Trend gesehen werden. Die Werte schwankten nach Toxinzugabe zwischen 0,82 und 0,85.

3.2.4 Zeitabhängige Effekte von BPA auf *P. putida* P8 mit Phenol als C-Quelle

Analog zu den in 3.2.2. beschriebenen Experimenten sollte die Zeitabhängigkeit der Effekte untersucht werden, welche durch Bisphenol A in *P. putida* P8 ausgelöst wurden. Die Zellen wurden mit 2 mM Phenol kultiviert und BPA wurde zu exponentiell wachsenden Zellen gegeben. Die Zellernte erfolgte vor der Toxinzugabe sowie 30 min, 60 min, 120 min, 180 min und 240 min danach.

Zu Beginn des Versuchs war das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren in allen Kulturen mit einem Wert von 0,2 relativ niedrig. Bereits nach 30 Minuten Einwirkzeit konnte durch einen Anstieg der *trans*-ungesättigten C16-Fettsäuren eine Erhöhung des *trans/cis*-Verhältnisses verzeichnet werden. Nach 60 Minuten wurden die höchsten Werte erreicht, was besonders bei der höchsten BPA-Konzentration (0,56 mM) mit ca. 1,6 deutlich wird. Mit längerer Einwirkung von Bisphenol A auf die Zellen nahm die *cis-trans*-Isomerisierung langsam wieder ab. Während nach 240 min das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren bei 0,17 mM und 0,38 mM BPA fast wieder den Ausgangswert erreicht hatte, war bei 0,58 mM BPA zwar ein Absinken der Werte zu erfassen, jedoch blieben diese auf einem höheren Niveau (Abb. 3-24).

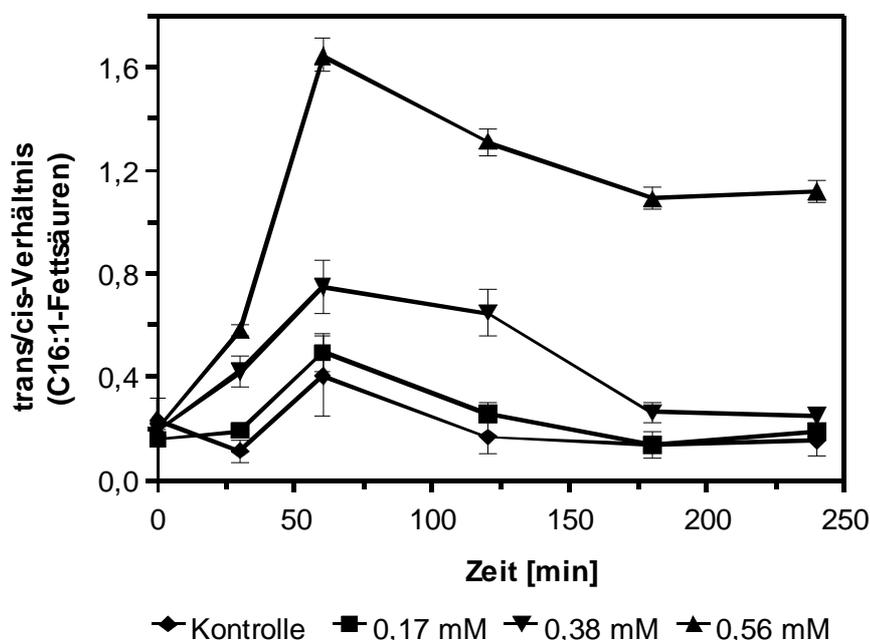


Abb. 3-24: Zeitliche Veränderung der *trans/cis*-Verhältnis der ungesättigten C16-Fettsäuren von *P. putida* P8. Die BPA-Zugabe erfolgte zum Zeitpunkt 0. Probenahme war nach 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min und 240 min. Der Bakterienstamm wuchs mit Phenol als C-Quelle bei 30°C und 180 rpm.

Für den Grad der Adaption konnten ähnliche Tendenzen festgestellt werden (Abb. 3-25).

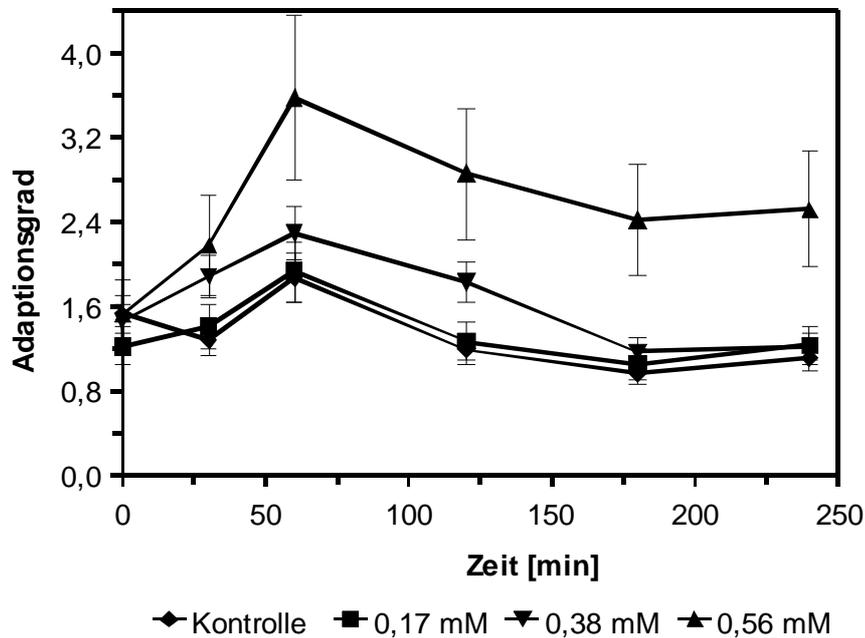


Abb. 3-25: Adaptionsgrad von *P. putida* P8. Die Applikation von Bisphenol A erfolgte zum Zeitpunkt 0. Zellen wurden nach 0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min und 240 min entnommen. Der Bakterienstamm wuchs mit Phenol als C-Quelle bei 30°C und 180 rpm.

Bis 60 Minuten nach Zugabe des Schadstoffs, stieg der Adaptionsgrad bei 0,17 mM BPA auf 1,9, bei 0,38 mM BPA auf 2,3 und bei 0,58 mM BPA auf 3,6 an. Bis auf die höchste Konzentration erfolgte später bei den anderen ebenfalls ein Abfall der Werte zurück auf den Ausgangswert. Der Adaptionsgrad verblieb bei 0,58 mM auf 2,5. Während der gesamten Versuchszeit blieb die Sättigung der Fettsäuren bei allen Ansätzen relativ konstant und es war kein eindeutiger Trend sichtbar.

3.2.5 Toxische Wirkung von Bisphenol A im Säulensystem

3.2.5.1 Bestimmung von Wasser- und Sauerstoffgehalt im Säulensystem

Bevor Bisphenol A als Schadstoff in den Sandsäulen (siehe Abschnitt 2.1.3) zur Untersuchung der Anpassungsmechanismen von *P. putida* P8 eingesetzt wurde, war die Überprüfung des Wassergehalts und der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Sandsäule notwendig. Der letztere Parameter ist besonders wichtig, weil dieser ebenfalls einen bedeutenden Stressfaktor darstellt, der das Wachstumsverhalten von *P. putida* P8 beeinflussen würde. Eine Sauerstofflimitation verursacht eine Stresssituation, die sowohl Wachstumshemmung und als auch Anpassungsreaktionen auf der Membranebene der Zellen hervorrufen kann. Eine Trennung der toxischen Effekte, die durch Bisphenol A und durch Sauerstoffstress ausgelöst werden, wäre dann nicht möglich. In den Sandsäulen ist deshalb eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff eine wichtige Voraussetzung um nur die Adaptionen zu erfassen, die auf das Einwirken von BPA zurückzuführen sind.

Sauerstoff

Die Sauerstoffkonzentration in den bewachsenen Sandsäulen wurde mittels Minisensoren bestimmt, deren Messprinzip auf die Erfassung von Lumineszenz beruht. Die Messung erfolgte in vier Höhen (2 cm, 6 cm, 10 cm und 14 cm) über einen Zeitraum von 48 Stunden. Aus einer Vorratsflasche wurde Medium über einen Schlauch von oben auf die Sandsäule gegeben. Die Flussrate betrug 6,2 ml/h. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 22 °C und einem Luftdruck von 1,012 bar.

Die Abbildung 3-26 zeigt die Werte der Sauerstoffmessung. Zu Beginn, als das Medium den Sand befeuchtete, befanden sich in den vier Höhen 7,92 bis 8,02 mg Sauerstoff pro Kilogramm Sand-Medium-Gemisch. Innerhalb von 24 Stunden sank die Sauerstoffkonzentration in allen Ebenen. Es wurden folgende Konzentrationen erfasst: 2 cm - 5,56 mg/kg; 6 cm – 5,65 mg/kg; 10 cm – 5,73 mg/kg und 14 cm – 5,75 mg/kg. Im oberen Bereich der Sandsäule war der Sauerstoff nur minimal niedriger

als im unteren. In den folgenden Stunden blieb der Sauerstoffgehalt in den vier Schichten des Mikrokosmos konstant. Nach 48 Stunden konnte eine ähnliche Konzentration von 5,68 bis 5,83 mg/kg erfasst werden.

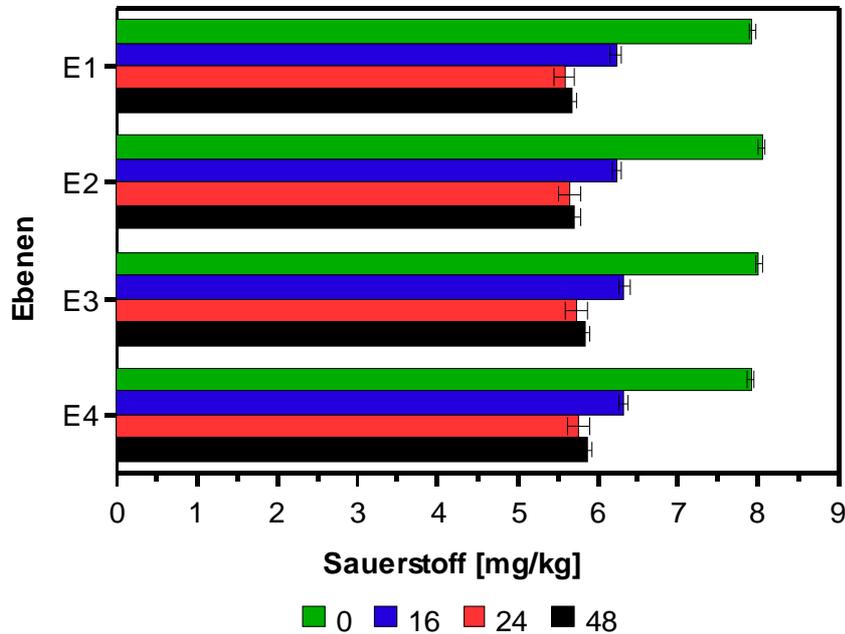


Abb. 3-26: Gemessene Sauerstoffkonzentration in der Sandsäule innerhalb von 48 h. E1-E4 bezeichnen die verschiedenen Ebenen

Wassergehalt

Der Wassergehalt innerhalb des Sandmikrokosmos wurde bestimmt, indem Sand aus vier Ebenen der Säule entnommen und die enthaltene Flüssigkeit ermittelt wurden. Die Säule war unterteilt in: E1 0-4cm, E2 4-8 cm, E3 8-12 cm und E4 12-16 cm. Die Versuchszeit betrug 8, 16, 20 und 24 Stunden. Mittels Differenzbildung aus Trocken- und Nassgewicht konnte der Wassergehalt in Mikroliter pro Gramm Sand berechnet werden.

Die Abbildung 3-27 zeigt den Wassergehalt innerhalb der Säule, welcher nach der oben genannten Methode ermittelt wurde. In den jeweils ersten drei Ebenen war pro Gramm Sand fast die gleiche Menge an Wasser enthalten (im Durchschnitt 40,8 µl/g). Aufgrund des Glasfritteneinsatzes am unteren Ende der Sandsäule und des geringen Durchmessers des Ablaufrohrs kam es zu einem Wasserstau in der

untersten Schicht. Es wurde ein deutlicher Anstieg des Wassergehalts auf mehr als das Doppelte (ca. 110 $\mu\text{l/g}$) erfasst. Dieser Trend war während allen Inkubationszeiten festzustellen. Dennoch gab es im zeitlichen Verlauf geringe Unterschiede bezüglich des Gesamtwassergehalts. Nach 8-stündiger Inkubation enthielten die Sandproben mehr Wasser als nach 16, 20 und 24 Stunden. Zu den anderen Zeitpunkten war der Wassergehalt in der Säule recht ähnlich.

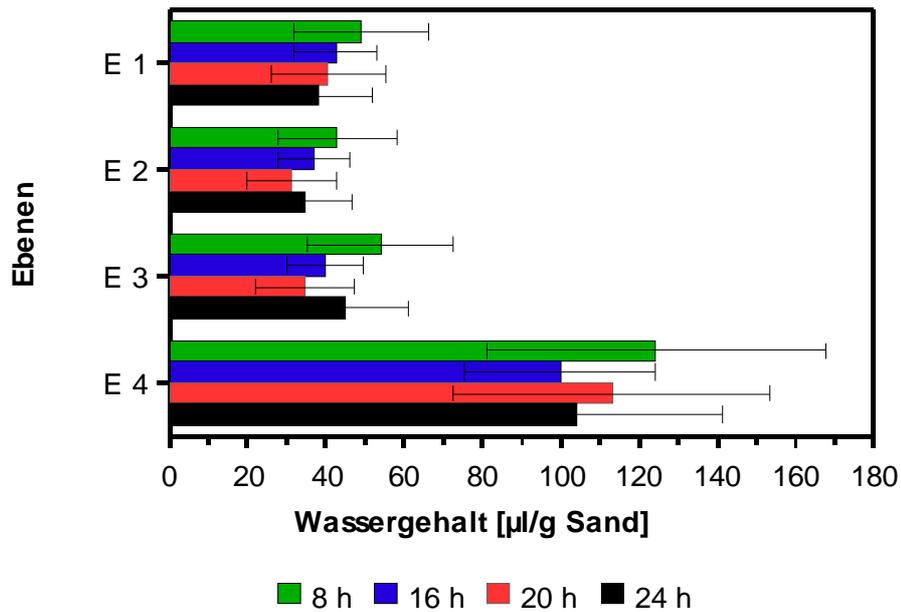


Abb. 3-27: Wassergehalt in den vier verschiedenen Ebenen der Sandsäule über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Werte beruhen auf der Differenzberechnung zwischen Trocken- und Nassgewicht des Sandes in den Ebenen.

3.2.5.2 Zeitabhängige Effekte von Bisphenol A in den Sandsäulen

Der Aufbau des Säulensystems und der Versuchsablauf sind unter 2.2.3 bzw. 2.2.10 beschrieben. Die Zellernte erfolgte jeweils 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden nach Schadstoffzugabe. Dafür wurden die Sandsäulen in vier Ebenen unterteilt und der beimpfte Sand aus der jeweiligen Höhe entnommen. Danach erfolgte die Extraktion des BPAs und der Phospholipidfettsäuren aus dem Sand. Die Durchführung der beiden Arbeitsschritte ist unter 2.2. und von 2.2.11 beschrieben. Zum Schluss wurden die derivatisierten Fettsäuren mittels GC vermessen und die BPA-Konzentration in den einzelnen Ebenen durch HPLC analysiert.

In Abbildung 3-28 sind die Änderungen des *trans/cis*-Verhältnisses der C16-Fettsäuren von *P. putida* P8 dargestellt, welche durch Einwirken von 1 mM Bisphenol A hervorgerufen wurden.

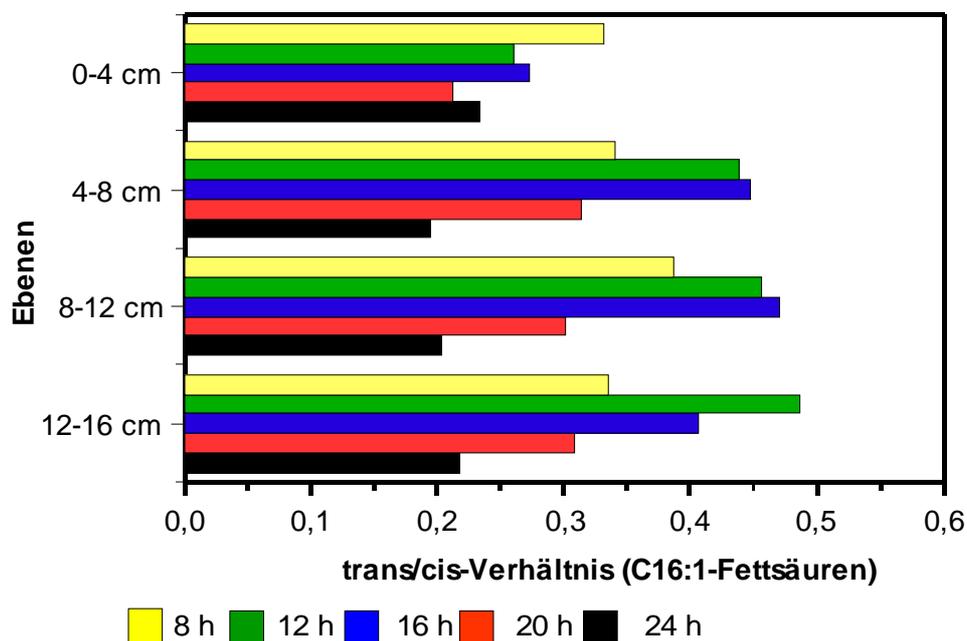


Abb. 3-28: Änderung des *trans/cis*-Verhältnisses der einfach ungesättigten C16-Fettsäuren von *P. putida* P8. Bei ca. 22°C wirkte das BPA (1mM) 8, 12, 16, 20 und 24 h auf die Zellen ein. Die Probenahme erfolgte in 4 Ebenen der Sandsäule.

In allen vier Ebenen wurden verstärkt *trans*-ungesättigte Phospholipidfettsäuren gebildet. Die Ausprägung ist jedoch von der Einwirkzeit des BPAs und der Tiefe der

Sandschicht abhängig. In der obersten Schicht (0-4 cm) erreichte das *trans/cis*-Verhältnis bereits nach 8 Stunden den höchsten Wert mit 0,33. In den späteren Proben sank das Verhältnis wieder, so dass nach 24 Stunden nur noch Werte um 0,23 zu verzeichnen waren. In den Ebenen 2 (4-8 cm) und 3 (8-12cm) nahm das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren innerhalb der ersten 16 Stunden zu und erreichte nach dieser Zeit Werte von 0,45 bis 0,47. Danach erfolgte ebenfalls ein Abfall des Verhältnisses bis auf 0,19 bzw. 0,20. In der untersten Schicht (12-16 cm) war nach 12 Stunden das höchste *trans/cis*-Verhältnis mit 0,49 zu finden. Später sanken die Werte ebenfalls auf 0,22. Vergleicht man die Ebenen untereinander, so wird deutlich, dass in den unteren Schichten die *cis-trans*-Isomerisierung der C16:1-Fettsäuren stärker ist als in der obersten Ebene.

Für den Grad der Adaption der Membranfettsäuren von *P. putida* P8 war eine ähnliche Entwicklung zu beobachten (Abb. 3-29).

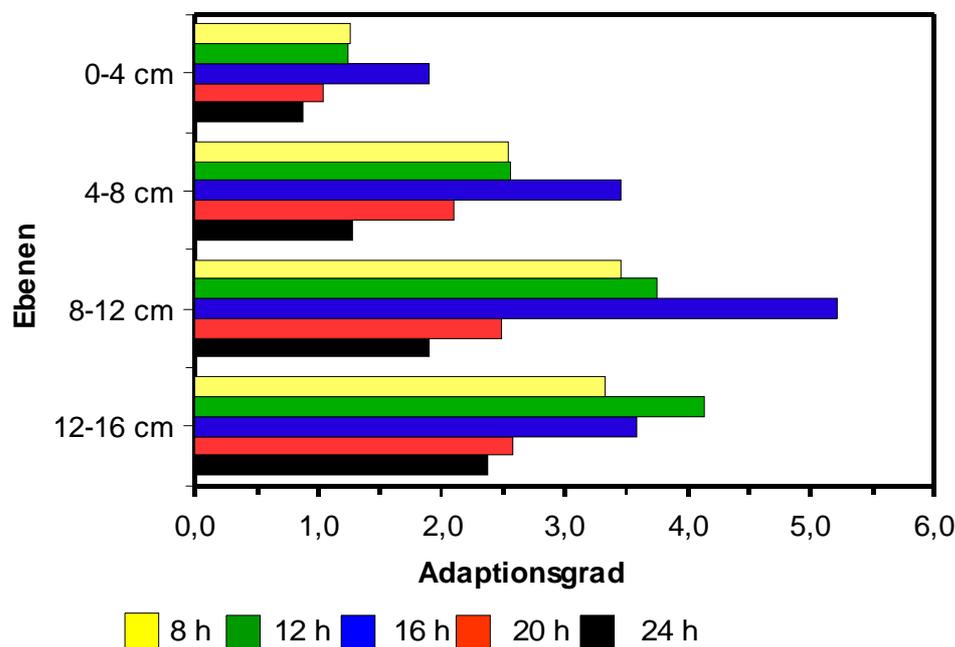


Abb. 3-29: Einfluss von 1 mM Bisphenol A auf den Grad der Adaption der Phospholipidfettsäuren von *P. putida* P8 in den Sandsäulen. Die Einwirkzeit betrug jeweils 8, 12, 16, 20 und 24 h. Die Proben wurden aus 4 Höhen der Sandsäule entnommen.

Auch hier konnte eine Abhängigkeit der Anpassungsreaktion von der Einwirkzeit und Säulentiefe ermittelt werden. Während den 16 Stunden nach Toxinzugabe erhöhte

sich der Adaptionsgrad in den Ebenen 1-3. Es wurden Höchstwerte von 3,59 bis 5,21 erreicht. Danach kam es zu einem Absinken der Werte bis auf 0,87 bis 1,90. In der tiefsten Schicht war bereits nach 12 Stunden die höchste Adaption mit 3,46 zu verzeichnen. Bezüglich der Tiefenabhängigkeit kann man erkennen, dass der Adaptionsgrad ebenfalls in den unteren Regionen der Säule größer ist als in der obersten. Dieser war mit 5,21 besonders stark in der dritten Schicht ausgeprägt.

Während der Versuche wurden auch die Sättigung der Membranfettsäuren sowie das Verhältnis der cyclischen (cy17:0) und der *cis*-ungesättigten Fettsäuren (C16:1) berechnet (Abbildung im Anhang). Letzteres ist ein Indikator für den Grad des Hungerstresses, da cy17:0 beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase aus C16:1 *cis* synthetisiert wird. Die Reaktion wird durch die Cyclopropanfettsäure-Synthase (CFA-Synthase) katalysiert, welche sich im Zytosol befindet. Das Enzym benötigt dafür S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppen-Donor. Die Bildung der Cyclopropan-Fettsäuren (cy17:0) erfolgt aus den einfach ungesättigten *cis*-Fettsäuren (C16:1 Δ 9) durch Transmethylierung an der *cis*-Doppelbindung der Acylkette (Grogan und Cronan 1997, Cronan 2002). Das SAM wird unter Verbrauch von drei ATP aus S-Adenosylhomocystein recycled (Umbarger 1978). Weil über dem gesamten Versuchszeitraum kein deutlicher Anstieg des Verhältnisses zu verzeichnen war, lässt sich schlussfolgern, dass die Zellen von *P. putida* P8 sich nicht in der stationären Phase befanden, sondern das Wachstum kontinuierlich war.

3.2.5.3 Konzentrationshängige Effekte von Bisphenol A im Säulensystem

Die Versuche wurden analog zu 3.2.5 jedoch mit verschiedenen BPA-Konzentrationen und einem festen Zeitpunkt der Probenahme durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse in Abb. 3-26 wurden 16 Stunden als optimale Einwirkzeit angesehen. Nach dieser Zeit waren in allen vier Ebenen der Säule das *trans/cis*-Verhältnis der ungesättigten C16-Fettsäuren und die Adaption der Membranfettsäuren von *P. putida* P8 sehr gut ausgeprägt.

Für den konzentrationsabhängigen Vergleich der Anpassungsmechanismen wurden folgende Bisphenol A-Konzentrationen für das Medium ausgewählt: 0 mM, 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1 mM BPA.

In der Abbildung 3-30 wird deutlich, dass die Ausprägungsstärke des *trans/cis*-Verhältnisses der ungesättigten C16-Fettsäuren von der BPA-Konzentration und von der Ebene abhängig war, aus der die Probe entnommen wurde.

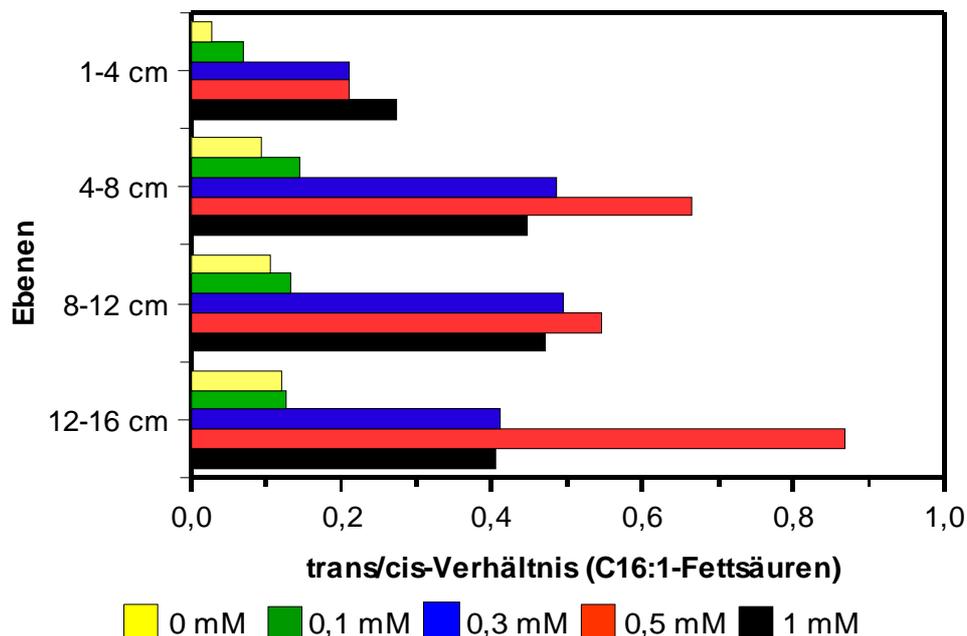


Abb. 3-30: Beeinflussung des *trans/cis*-Verhältnisses der ungesättigten C16-Fettsäuren von *P. putida* P8 durch 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1 mM BPA. Die Probenahme fand 16 h nach BPA-Zugabe in den 4 Ebenen der Sandsäule statt.

Im Kontrollansatz ohne BPA-Zugabe war in allen vier Ebenen das *trans/cis*-Verhältnis für C16:1 mit 0,04 bis 0,08 eher niedrig. Jedoch verstärkte sich die Bildung

von *trans*-ungesättigten Fettsäuren mit steigender Bisphenol A-Konzentration im Medium. In der ersten Ebene konnten die höchsten Werte (bis 0,27) mit 1 mM BPA erreicht werden. In den Ebenen 2-4 war das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren nach Zugabe von 0,5 mM BPA am meisten ausgeprägt, besonders in der untersten Schicht. Es wurden Werte von 0,55 bis 0,87 verzeichnet. Wurde die Konzentration erhöht auf 1mM BPA, erfolgte ein Absinken des *trans/cis*-Verhältnisses auf 0,4 bis 0,47.

Am Grad der Adaption zeigte sich, dass keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit zu verzeichnen waren (Abb. 3-31).

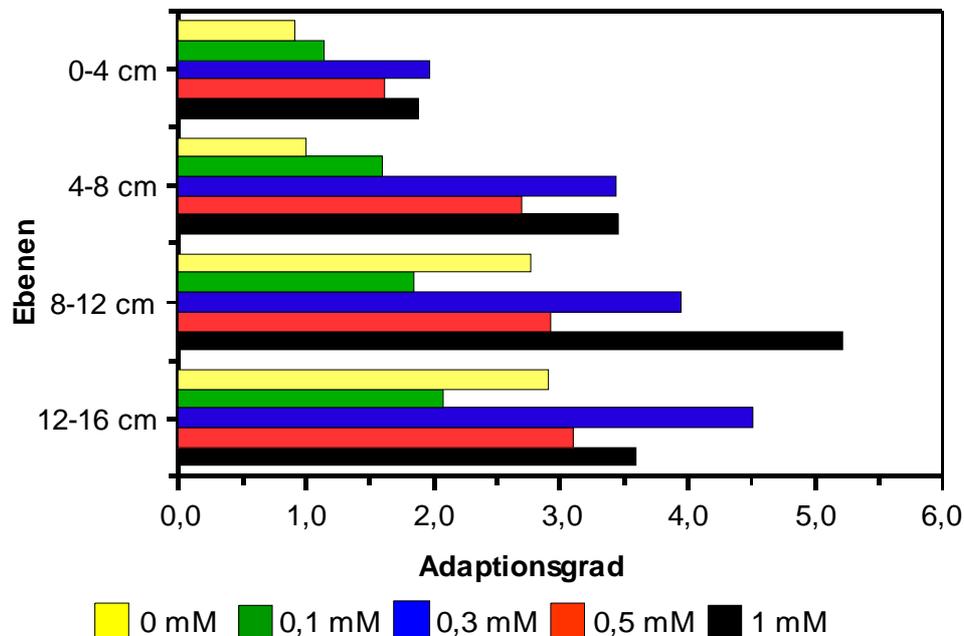


Abb. 3-31: Änderung des Adaptionsgrades der Membranphospholipide von *P. putida* P8 nach der Zugabe von 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1 mM BPA.

Die Höhe der Ebene spielte weiterhin eine wichtige Rolle. In der obersten Schicht wurde bei allen Bisphenol A-Konzentrationen der niedrigste Adaptionsgrad mit 1,13 bis 1,98 beobachtet. In den anderen drei Ebenen war bei der kleinsten BPA-Menge (0,1 mM) auch die Adaption mit 1,59 bis 2,07 am geringsten. Befand sich mehr Bisphenol A im Medium (0,30-1mM), so schwankten die Werte stark. Dennoch waren diese mit 2,67 bis 5,21 deutlich höher. Der erstaunlich hohe Adaptionsgrad der

Kontrolle bis zu 2,91 wurde wahrscheinlich durch andere Einflüsse verursacht, denn die *cis-trans*-Isomerisierung der C16:1-Fettsäuren war sehr gering.

Für den Sättigungsgrad der Membranfettsäuren und das *cyclo/cis*-Verhältnis konnte kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Das letztere weist erneut darauf hin, dass die Zellen kontinuierlich wuchsen und sich nicht in der stationären Phase befanden.

Die Ergebnisse der Säulenversuche lassen sich folgendermaßen zusammen:

- Die *trans/cis*-Werte im gesamten Säulensystem waren viel niedriger als in den Schüttelkulturen.
- Das *trans/cis*-Verhältnis der C16:1-Fettsäuren in *P. putida* P8 erhöht sich mit steigender Bisphenol A-Konzentration. Der höchste Anstieg wurde bei 0,5 mM BPA beobachtet. Bei einer BPA-Konzentration von 1 mM sank das Verhältnis wieder ab.
- Das Optimum der *cis-trans*-Isomerisierung wurde nach einer Einwirkzeit von 12-16 Stunden erreicht. Danach sanken die *trans/cis*-Werte wieder ab.
- Innerhalb der Ebenen der Sandsäule war ein Anstieg des *trans/cis*-Verhältnisses von oben nach unten zu verzeichnen. In der untersten Ebene wurden die höchsten *trans/cis*-Werte beobachtet.

4 DISKUSSION

Bedingt durch den weltweiten großtechnischen Einsatz und die daraus resultierende Verbreitung besitzt Bisphenol A ein erhebliches Gefährdungspotential in Gewässern, Sedimenten und kommunalen Abwässern. Obwohl in einigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass der Stoff einem relativ raschen mikrobiellen Abbau unterliegt, gibt es nur wenige Publikationen über BPA-abbauende Mikroorganismen. Zudem berufen sich diese Studien immer wieder auf die Darstellung des Abbauweges durch den nicht näher bestimmten Bakterienstamm MV1 von Lobos et al. (1992) und Spivack et al. (1994). Deshalb besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf hinsichtlich der detaillierten Beschreibung des Abbaus und der Wirkung dieser Verbindung auf Bakterien und deren Anpassungsreaktionen.

4.1 Identifikation und Charakterisierung von *Cupriavidus basilensis* RW4

In der vorliegenden Arbeit konnte aus dem Wasser eines *Planted Fixed Bed Reactors* des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung (UFZ), welchem Bisphenol A zugefügt wurde, ein Bakterienstamm mit der Fähigkeit zum BPA-Abbau isoliert werden. Mittels 16S rRNA-Analyse und der BIOLOG-Methode wurde dieser als *Cupriavidus basilensis* identifiziert.

Nach Prüfung von verschiedenen Wachstumssubstraten konnte festgestellt werden, dass *C. basilensis* RW4 in der Lage ist, ein großes Spektrum an organischen Verbindungen als Energie- und Kohlenstoffquelle zu verwenden, jedoch keine Zucker wie z. B. Glukose oder Maltose. Der Bakterienstamm kann organische Mono- und Dicarbonsäuren sowie Alkanole unterschiedlicher Kettenlänge wie Ethanol, 1-Oktanol oder 1-Dekanol sehr gut für das Wachstum nutzen. Eine Besonderheit ist die Verwertung von Methanol, da diese Verbindung über den C1-Stoffwechselweg abgebaut wird. Eine solche fakultative Nutzung von Methanol kommt nur bei wenigen Bakterien vor. So kann man diese Art von Methylothropie bei einigen Vertreter der Gattung *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Vibrio* finden (Large et al. 1961, Kung und Wagner 1970, Kosaric und Zajic 1974, Dijkhuizen et al. 1988, Murell und Dalton 1992).

Des Weiteren war eine Nutzung von verschiedenen Mono- und Dihydroxyaromaten wie Phenol, Hydroxybenzoesäure und Brenzkatechin zu verzeichnen.

Benzoesäuren mit einer Hydroxylgruppe stimulierten das Wachstum von *C. basilensis* RW4 mehr als solche mit zwei OH-Gruppen. Meistens sind die 2-fach hydroxylierten Aromaten toxischer als die einfach hydroxylierten und wirken wachstumshemmend.

Die Position der Hydroxylgruppe hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Nutzung der Substanzen. So werden Monohydroxybenzoesäuren mit OH-Gruppe in *meta*- und *para*-Position schneller abgebaut als in *ortho*-Stellung. Während die *m*- und *p*-Hydroxybenzoesäure wahrscheinlich über den gleichen Abbauweg mit Brenzkatechin als zentralem Intermediat verwertet werden, kann die Mineralisierung von *o*-Hydroxybenzoesäure (Salicylat) auch über die 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisat) verlaufen.

Befinden sich die zwei Hydroxylgruppen in *ortho*-Position am aromatischen Ring wie beim 1,2-Dihydroxyphenol (Brenzkatechin) und bei der 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechuat) können zwei unterschiedliche Abbauege mit prägnanten Intermediaten stattfinden. Diese wurden bereits in sehr vielen Arbeiten und Fachbüchern detailliert beschrieben (Kleber und Schlee 1992, Madigan et al. 2001, Reinecke und Schlömann 2007).

Da in *C. basilensis* RW4 keine 2,3-Catechol-Dioxygenase erfasst werden konnte (persönliche Mitteilung Martinez, UFZ) und zudem nicht die charakteristische Gelbfärbung des Mediums durch Hydroxymuconatsemialdehyd auftrat, werden die Ringe vermutlich durch die 1,2-Catechol-Dioxygenase intradiolisch gespalten und über den *ortho*-Abbauweg (Oxadipatweg) mineralisiert. Durch Oxidation entsteht ein Muconat, welches anschließend lactonisiert wird. Danach erfolgt die Isomerisierung des Muconolactons zu β -Keto adipat-Enollacton. Abschließend werden durch Hydrolyse des β -Keto adipats Succinyl- und- Acetyl-CoA gebildet. (Reinecke und Schlömann 2007).

Aromatische Verbindungen mit Halogenen als Substituenten wie z. B. 4-Chlorphenol können durch das Bakterium nicht angegriffen werden.

4.2 Abbau von Bisphenol A durch *C. basilensis* RW4

Wenn Bisphenol A als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt wird, so verläuft der Abbau der Verbindung durch *Cupriavidus basilensis* RW4 relativ langsam und die Zellzahl nimmt nur geringfügig zu (Abb. 3-5).

Ein Vergleich der Abbau- und Wachstumsraten dieser Reinkultur mit Daten aus den verschiedenen Untersuchungen mit anderen Bakterien erweist sich als schwierig. Vielfach wurden Mischkulturen eingesetzt (Dorn et al. 1987, Furun et al. 1990, Kang und Kondo 2002) oder das Wachstum der zu einem Abbau befähigten isolierten Bakterienstämme *Sphingomonas* sp. AO1 (Sasaki et al. 2005), *Pseudomonas monteilii* N-502 (Masuda et al. 2006) und *Sphingomonas* sp. BP-7 (Sakai et al. 2007) wurde mittels Zusatz von stimulierenden Komponenten wie. z. B. Hefeextrakt, Trypton, Pepton oder Glukose gefördert. Somit beruht das Wachstum der Mikroorganismen größtenteils nicht auf der alleinigen Mineralisierung von Bisphenol A. Dadurch werden oft viel zu hohe Abbau- und Wachstumsraten für den Abbau dieser persistenten Verbindung durch Bakterien angegeben. Diese sind mit denen unter realen Bedingungen in kontaminierten Gewässern und Böden nicht oder nur sehr bedingt vergleichbar.

In Bezug auf die Quantifizierung des Abbaus von Bisphenol A und des Wachstums sind diese Untersuchungen somit nur sehr bedingt zum Vergleich mit den in dieser Dissertation erzielten Ergebnissen geeignet und auch besonders im Hinblick auf umweltbiotechnologische Anwendungen unter realen Bedingungen fraglich.

So nehmen neben dem im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Isolat *C. basilensis* RW4 lediglich die Bakterienstämme MV1 (Lobos et al. 1992), WH1 (Ronen und Abeliovich 2000) und *Achromobacter xylosoxidans* B-16 (Zhang et al. 2008) für den biologischen Abbau von Bisphenol A und dessen Untersuchung einen wichtigen Platz ein. Diese Mikroorganismen wurden auch in Mineralsalzmedien mit BPA als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert. Obwohl ebenfalls nur sehr geringe Wachstumsraten beobachtet wurden, war die BPA-Abbauraten relativ hoch. Aufgrund der Isolation aus besonders hoch belasteten Systemen (Abwasserschlämme von einer Plastikfabrik bzw. Gemeindedepotie) scheinen MV1, WH1 und *Achromobacter xylosoxidans* B-16 bereits an eine schnelle Nutzung von BPA gut adaptiert zu sein.

4.3 Abbauweg von Bisphenol A

Während des Abbaus konnten die intermediären Verbindungen: 4-Isopropenylphenol, *p*-Hydrochinon, 4-Hydroxyacetophenon, 4-(2-Propanol)-phenol, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxybenzaldehyd erfasst werden

Vermutlich wird ein Sauerstoffmolekül durch eine Oxygenase in das Ringsystem von Bisphenol A eingeführt, wobei 4-(2-Propanol)-phenol und *p*-Hydrochinon als Spaltprodukte gebildet werden. Aus dem 4-(2-Propanol)-phenol entsteht durch Wasserabspaltung am Propanolrest 4-Isopropenylphenol. Durch Abspaltung eines C1-Körpers wird aus 4-(2-Propanol)-phenol zusätzlich 4-Hydroxyacetophenon gebildet, welches nur teilweise verwertet wird und sich im Medium akkumuliert. So wird hauptsächlich das 4-Isopropenylphenol weiter zu 4-Hydroxybenzaldehyd und 4-Hydroxybenzoesäure oxidiert. Die 4-Hydroxybenzoesäure wird dann vermutlich aufgrund der fehlenden 2,3-Catechol-Dioxygenase im *ortho*-Abbauweg metabolisiert (siehe 4.1). Das *p*-Hydrochinon wird ebenfalls weiter abgebaut, da es das Wachstum stimuliert (Tab 3-3). Nach Ohko et al. (2001), Kaneco et al. (2004) und Kolvenbach et al. (2007) kann 4-Isopropenylphenol in einer Nebenreaktion auch durch OH-Radikale angegriffen werden und somit ebenfalls in einer Bildung von *p*-Hydrochinon resultieren.

Es wird deutlich, dass *C. basilensis* RW4 Bisphenol A nicht über den von Lobos et al. (1992) und Spivack et al. (1994) postulierten Abbauweg sondern über einen alternativen Abbauweg mineralisiert, welcher dem von Kolvenbach et al. (2007) für *Sphingomonas* sp. TTNP3 beschriebenen ähnlich ist. Bei diesem Bakterium wurde zudem ermittelt, dass die Spaltung des Ringsystems durch eine Monooxygenase katalysiert wird, wobei die Gegenwart von NADPH und FAD für die enzymatische Aktivität essentiell war. Möglicherweise ist in *C. basilensis* RW4 auch eine solche Monooxygenase aktiv. Deshalb ist eine weiterführende Charakterisierung dieser enzymatischen Reaktionen in zukünftigen Arbeiten erforderlich.

In Abb. 4-1 ist der Abbauweg für Bisphenol A durch *C. basilensis* RW4 zusammenfassend dargestellt.

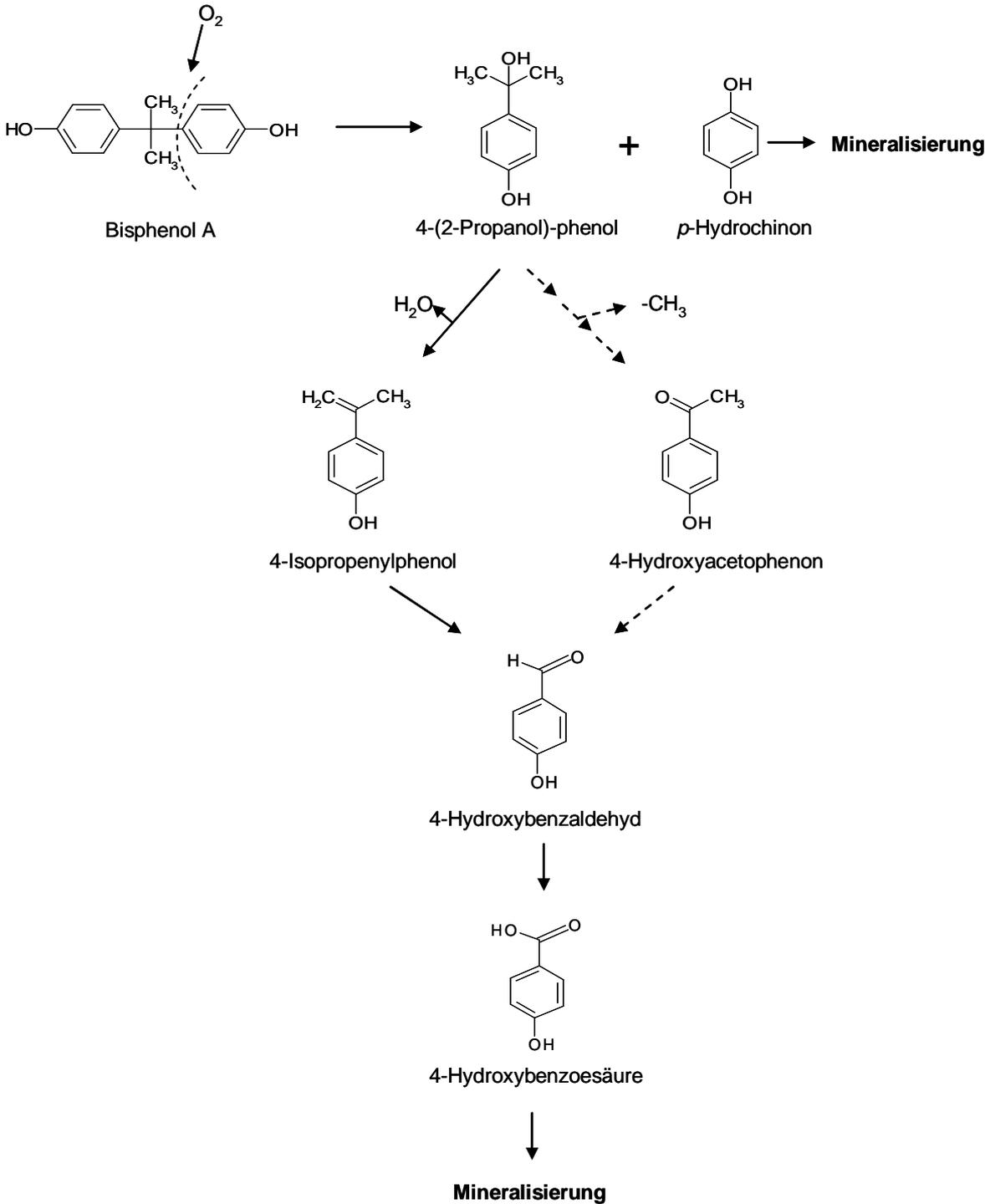


Abb. 4-1: Postulierter Abbauweg von Bisphenol A durch *Cupriavidus basilensis* RW4.

4.4 Abbau von BPA mit Phenol als zusätzliches Wachstumssubstrat

Weil der Abbau von Bisphenol A durch *Cupriavidus basilensis* RW4 relativ langsam und das Zellwachstum nur sehr gering war, wurde nach Möglichkeiten zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Steigerung der Abbaugeschwindigkeit gesucht. Es wurde ermittelt, dass im Gegensatz zu den anderen Bakterienstämmen wie *Sphingomonas* sp. AO1 (Sasaki et al. 2005, Oshiman et. al 2007), *Sphingomonas* sp. BP-7 (Sakai et al. 2007) und *Pseudomonas monteilii* N-502 (Masuda et al. 2006) eine Veränderung der Inkubationstemperatur oder des pH-Wertes bzw. der Zusatz von Glukose, Hefeextrakt oder Pepton nicht zu einer Verbesserung des BPA-Abbaus führten.

Durch Betrachtung des Abbauweges, in dem Bisphenol A mineralisiert wurde, und der Involvierung von Mono- und Dioxygenasen in verschiedenen Reaktionsschritten, entwickelte sich die Hypothese einer verbesserten Umsetzung von Bisphenol A in Gegenwart von Phenol als gut verwertbarem Substrat und zusätzlichem Induktor. Als Überlegungsgrundlage dienten die z. T. relativ geringe Spezifität und das große Substratspektrum der Enzyme des Aromatenabbaus, wodurch teilweise die Mineralisierung mehrerer aromatischer Verbindungen katalysiert werden kann (Kleber und Schlee 1992, Reinecke und Schlömann 2007). Dies wird auch anhand der verschiedenen Substanzen deutlich, die *C. basilensis* RW4 für das Wachstum nutzen kann (Tab. 3-3).

Während des cometabolischen Abbaus sollte Bisphenol A nicht als primäres Wachstumssubstrat dienen, sondern Phenol. Letzteres wird sehr effektiv durch Mono- und Dioxygenasen angegriffen und gut durch *C. basilensis* RW4 abgebaut (Abb. 3-12). Durch die Verwertung von Phenol wird nicht nur das Zellwachstum gefördert, sondern es wird auch die Aktivität der Enzyme, welche auch im BPA-Abbau involviert sind, stimuliert. Zudem werden Coenzyme wie NAD(P)H und Energie (ATP) für die Katalyse bereitgestellt.

Als *C. basilensis* RW4 in Schüttelkulturen mit Bisphenol A und Phenol kultiviert wurde, konnte jedoch nur eine geringe Steigerung des BPA-Abbaus erfasst werden. Anhand der Wachstums- und Abbaukurven in Abb. 3-13 wird ersichtlich, dass das BPA in den *batch*-Kulturen nicht cometabolisch abgebaut wurde, sondern ein diauxisches Wachstum stattfand. Das Phenol stimulierte das Zellwachstum, so dass eine hohe Zelldichte erreicht und die Verbindung sehr schnell abgebaut wurde. Nach

Wegfall des Phenols als Kohlenstoff- und Energiequelle war *C. basilensis* RW4 gezwungen, Bisphenol A zu verwenden, um das Wachstum bzw. den Zellstoffwechsel zu erhalten.

Die Mineralisierung des BPAs verläuft nach dieser Phenol-Wachstumsphase schneller als mit Bisphenol A als alleinigem Substrat. Dieser Effekt beruht auf der relativ hohen Zahl an physiologisch aktiven Zellen. Dadurch wurde mehr BPA umgesetzt.

4.5 Abbau von Bisphenol A in Sandsäulen

Die Isolation von *C. basilensis* RW4 erfolgte aus dem Wasser eines *Planted Fixed Bed Reactors*, der mit BPA behandelt wurde. Während des Isolationsversuchs konnte festgestellt werden, dass sich in diesem Reaktorwasser nur eine sehr geringe Anzahl von Bakterienzellen befand. Mit großer Wahrscheinlichkeit wächst die Hauptmasse der Bakterien auf Oberflächen in Form von Biofilmen innerhalb des Reaktors. In diesen Belägen findet daher - wie auch in anderen Untersuchungen nachgewiesen z. B. Molin und Nilsson 1985, Jass et al. 2002, Gröning et al. 2006, Singh et al. 2006 – der Hauptanteil des Schadstoffabbaus statt. Zudem erhöht sich die Toleranz gegenüber dem Schadstoff BPA und anderen Umwelteinflüssen wie schwankende Temperaturen und pH-Werte (Welin-Neilands und Svensäter 2007). Für diese Theorie spricht auch die Ausbildung von Belägen auf den Oberflächen der Glasgefäße während der Kultivierung von *C. basilensis* RW4. Folglich schien eine Inkubation in Schüttelkulturen nicht optimal für das Zellwachstum und den Abbau von Bisphenol A zu sein.

Durch den Einsatz von Sandsystemen in Säulenform sollte den Bakterienzellen eine große Fläche zur Besiedelung und Bildung von Biofilmen zur Verfügung gestellt werden. Durch diese Änderung der Kultivierung konnten ein verbessertes Wachstum und eine weitere Steigerung des BPA-Abbaus erzielt werden.

Für einen gesteigerten BPA-Abbau war eine relativ hohe Zelldichte innerhalb der Sandsäule notwendig, deshalb wurden Bisphenol A und Phenol gemeinsam als Wachstumssubstrate eingesetzt. Phenol sollte, wie bereits in den Schüttelkulturen gezeigt, das Zellwachstum fördern. In der Säule wurde das Bisphenol A ebenfalls diauxisch abgebaut. Durch die stetige Zufuhr von Phenol wurde das Wachstum von *C. basilensis* RW4 stark gefördert, wodurch der Phenolabbau noch weiter gesteigert

wurde. Innerhalb der Sandsäule bildete sich daher ein Konzentrationsgradient, indem nach unten der Phenolgehalt abnahm. Das heißt, bevor die Verbindung die ganze Säule passieren und den Abfluss erreichen konnte, wurde sie durch die Bakterienzellen mineralisiert. Diese Phenollimitierung besonders im unteren Bereich des Mikrokosmos förderte die Nutzung von Bisphenol A als Wachstumssubstrat und somit dessen Abbau. Hierbei konnte die gesteigerte Mineralisierung erneut auf die sehr hohe Zelldichte im System zurückgeführt werden; auch Enzyminduktionseffekte durch das Phenol können nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den Schüttelkulturen verlief der BPA-Abbau in den Sandsäulen deutlich schneller. Bereits nach 150 Stunden war eine Abnahme des Schadstoffs um fast 50 % zu beobachten. Daher scheint diese Kultivierungsform für den Abbau von Bisphenol A durch *C. basilensis* RW4 wesentlich geeigneter zu sein. Gerade in den Säulenversuchen zum Abbau von BPA mit Phenol als zusätzlichem Substrat wurde deutlich, wie sehr sich der biologische Abbau einer persistenten Verbindung in kontaminierten Böden durch Biostimulation steigern lässt. Somit scheint die Biostimulation, also das Anregen des Abbaus durch bereits im Boden vorkommende Bakterien, noch viel versprechender zu sein als die Bioaugmentation, also die Zugabe von zuvor kultivierten Bakterien.

Ein nicht zu unterschätzendes Problem kann auftreten, wenn innerhalb der Sandsäule Intermediate des BPA-Abbaus angereichert werden, welche vermutlich die weitere Verwertung und das Zellwachstum stören. Es handelt sich dabei hauptsächlich um 4-Hydroxyacetophenon, da *C. basilensis* RW4 diese Verbindung nur schlecht verwertet (Tab.3-3). Bereits Lobos et al. (1992), Ike et al. (2000) und Sasaki et al. (2005) berichteten, dass akkumuliertes 4-Hydroxyacetophenon den BPA-Abbau hemmt. Diese Verbindung besitzt eine ähnliche Hydrophobizität wie Phenol ($\log P$ 1,45) und kann somit membrantoxisch wirken (Heipieper et al. 1994).

Für eine dauerhafte Nutzung der Sandsäulen zum Abbau von Bisphenol A gilt es deshalb, die Substratzufuhr zu regulieren, um eine Metabolitenanreicherung zu vermeiden. Zudem sollten weitere hemmende Einflüsse wie etwa Sauerstofflimitierung, welche aufgrund der schnellen Phenolmineralisierung und dem starken Zellwachstum auftreten kann, eingegrenzt werden, z. B. mit einer zusätzlichen Sauerstoffzufuhr.

4.6 Toxisches Potential von Bisphenol A

In mehreren Untersuchungen wurde das toxische Potential von Bisphenol A gegenüber Mikroorganismen beschrieben (Staples et al. 1998, 2002, Chen et al. 2001). Die effektiven Konzentrationen, bei denen das Wachstum um 50 Prozent gehemmt wird (EC_{50}) bzw. die letale Dosen (MIC), die in diesen Arbeiten genannt werden, erscheinen jedoch sehr hoch.

So können z. B. *P. paucimobilis* FJ-4 bis zu 1,0 mM BPA (Ike et al. 1995) und *P. montellii* N-502 sogar mehr als 10 mM BPA (Masuda et al. 2006) tolerieren. Letztere BPA-Konzentration erscheint fragwürdig, da die Löslichkeitsgrenze von Bisphenol A bei ca. 1,3 mM (300 mg) liegt (Dorn 1987, Howard 1989). Im gesättigten Medium sedimentiert das nicht lösliche BPA in Form von Kristallen. Somit ist dieses nicht direkt bioverfügbar für die Zellen und kann daher auch nicht toxisch wirken.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Methode zur Bestimmung der toxischen Konzentrationen mit Hilfe der Messung der Wachstumsraten ist eine etablierte Technik, die bereits für viele Mikroorganismen und eine Reihe von organischen Verbindungen angewandt wurde (Keweloh et al. 1989, Sikkema et al. 1995, Heipieper et al. 1995, Dijkman et al. 1997, Moreno-Garrido et al. 2000, Halling-Sørensen 2001, Cleuvers 2003, Neumann et al. 2003, 2005, Kabelitz et al. 2003, Guanzon und Nakahara 2008, Pepi et al. 2008).

Anhand der Ergebnisse für *C. basilensis* RW4 und auch für *P. putida* P8 wird deutlich, dass BPA bereits in viel geringeren Konzentrationen das Wachstum hemmt und die Toleranzen bei diesen Bakterien niedriger sind. Entweder sind die eingesetzten Bakterienstämme überdurchschnittlich empfindlich gegenüber BPA oder Bisphenol A besitzt eine höhere Toxizität als vielfach in der Literatur beschrieben. Letzteres ist aufgrund der Hydrophobizität ($\log P$ 3,40) und der guten Wasserlöslichkeit, die BPA als zur Stoffgruppe der extrem membrantoxischen Chemikalien gehörend ausweist, nicht auszuschließen. Wegen dieser hohen toxischen Wirkung kann der Abbauprozess bei höheren Konzentrationen nicht mehr mit dem Kinetikmodell 1. Ordnung beschrieben werden (Zhang et al. 2007). Auch sind die hohe Persistenz der Verbindung in kontaminierten Systemen und der nur sehr langsame Abbau vermutlich vor allem auf die hohe Toxizität zurückzuführen.

4.7 Einfluss von BPA auf die Membranzusammensetzung von *P. putida* P8

Als membranaktive Verbindung induziert Bisphenol A zumindest in subletalen Konzentrationen erwartungsgemäß auch die bakteriellen Stressantworten. (Neumann et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Stressantwort ausschließlich auf Ebene der Zusammensetzung der Membranfettsäuren untersucht. Diese ist jedoch als eine der wichtigsten Zellantworten auf Membranstress bekannt (Heipieper et al. 2007). Da im Rahmen des EU-Projektes BIOTOOL die *cis-trans*-Isomerisierung ungesättigter Fettsäuren bzw. das *trans/cis*-Verhältnis als Biomarker eingesetzt werden sollte, um den toxikologischen Status eines kontaminierten Standortes zu beurteilen, wurden alle weiteren Untersuchungen zur Wirkung von Bisphenol A am Standardorganismus *Pseudomonas putida* P8 durchgeführt. Dieser Bakterienstamm ist im Gegensatz zu *C. basilensis* RW4 sehr gut charakterisiert (Bettman und Rehm 1984, 1985). Zudem wurde mit Hilfe von *P. putida* P8 die *cis-trans*-Isomerase erstmalig beschrieben (Heipieper et al. 1992) und molekularbiologisch charakterisiert (Holtwick et al 1997). Bei der *cis-trans*-Isomerase handelt es sich um ein periplasmatisches Protein des Cytochrom C-Typs mit einem hoch konservierten Häm-Bindungsmotiv, welches auf eine Beteiligung von Häm (Fe^{2+} bzw. Fe^{3+}) an der Isomerisierungsreaktion hinweist (Holtwick et al. 1999, von Wallbrunn et al. 2003). In *C. basilensis* RW4 konnte dieses Protein nicht nachgewiesen werden. Mit *P. putida* P8 wurde ebenfalls eine Verbindung zwischen der Toxizität einiger organischer Substanzen und der *cis-trans*-Isomerisierung ermittelt (Diefenbach et al. 1992, Heipieper et al. 1994, Weber et al. 1994).

In Schüttelkulturen zeigte sich, dass das *trans/cis*-Verhältnis einen guten und schnellen Biomarker für membrantoxische Effekte darstellt. Der Grad der *cis-trans*-Isomerisierung war direkt abhängig von der Toxizität bzw. der Konzentration des zugegebenen BPAs. Anhand der Abbildung 3-19 wird auch deutlich, dass die *cis-trans*-Isomerisierung als eine sehr kurzfristige Antwort von *P. putida* P8 auf das Einwirken von Bisphenol A gelten muss. Bereits eine Stunde nach Zugabe wurden die höchsten Werte ermittelt. Diese schnelle Reaktion kann stattfinden, weil die *cis-trans*-Isomerase (*Cti*) in *P. putida* P8 konstitutiv präsent und auch aktiv ist (Holtwick et al. 1997, von Wallbrunn et al. 2002). Für die Isomerisierung benötigt es weder ATP noch Co-Faktoren wie NAD(P)H und Glutathion (Holtwick et al. 1997, von Wallbrunn et al. 2003, Kiran et al. 2005). Die *trans*-Isomere werden dabei gebildet,

ohne dass sich die Lage der Doppelbindungen verändert (Diefenbach et al. 1992, Chen et al. 1995).

Die *cis-trans*-Isomerisierung ist innerhalb der Mechanismen, mit denen sich die Zelle auf Membranebene adaptieren kann, nur als eine erste Antwort, die kurzfristig nach erfolgter Zugabe membranaktiver Verbindungen das Überleben bzw. das Wachstum der Bakterien ermöglicht, anzusehen (de Bont 1998). Während des Wachstums der Zellen bei subletalen BPA-Konzentrationen wird diese Kurzzeitreaktion (*urgent response*) dann durch andere Anpassungsmechanismen ersetzt.

Somit kann auf Ebene der Zellmembran eine Veränderung des Sättigungsgrades der Fettsäuren zu einer längerfristigen Adaption der Bakterienzellen führen. Durch mehr gesättigte lineare Fettsäuren besitzt die Lipid-Doppelschicht eine dichtere Packung und somit geringere Permeabilitätseigenschaften (Isken und de Bont 1998, Neumann 2006). Eine Modifikation der Phospholipid-Kopfgruppen kann ebenfalls erfolgen. Damit die bakterielle Membran ihre natürlichen Funktionen erfüllen kann, muss die Zusammensetzung der Phospholipide mit neutralen (Phosphatidylethanolamin) und sauren (Phosphatidylglycerol, Cardiolipin) Kopfgruppen ausgeglichen sein (Zhang und Rock 2008). Wirkt Stress auf die bakterielle Zelle ein, können Veränderungen in der Zusammensetzung der Phospholipid-Kopfgruppen erfasst werden. Ramos et al. (2001, 2002) berichteten von einer Anreicherung von Cardiolipin auf bis zu 20 % aller Phospholipide und einer Absenkung von Phosphatidylethanolamin nach Zugabe von Toluol. Durch diese Umverteilung soll die Viskosität der Membran erhöht und dem toxischen Einfluss des Lösungsmittels entgegengewirkt werden. Veränderungen im Cardiolipingehalt stellen eine Antwort auf unterschiedliche pH-Werte, Salzgehalte und organische Lösungsmittel dar und befähigen Bakterien zur Adaption an die vorliegenden Bedingungen (Shibuya et al. 1985, Dowhan 1997, Zhang und Rock 2008). Des Weiteren können Anpassungen auf anderen Ebenen, z. B. morphologische Veränderungen, Änderungen der Oberflächeneigenschaften oder der Zellwand bis hin zum aktiven Stofftransport nach außen, stattfinden (Sikkema et al. 1995, Isken und de Bont 1998, Heipieper et al. 2007).

Dies zeigte sich in Schüttelkulturen, bei denen Bisphenol A in steigender Konzentration zu Zellen von *P. putida* P8 gegeben wurde, die mit Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert wurden. Bei diesen sog. präadaptierten Zellen war eine höhere Konzentration von BPA notwendig, um das Wachstum zu inhibieren; die ermittelte EC₅₀ war etwa doppelt so hoch wie bei nicht adaptierten

Zellen. Aufgrund der ebenfalls oft beschriebenen Übertragbarkeit der Adaptionsmechanismen (Sikkema et al 1995, Pinkart and White 1997, Ramos et al. 1997, Isken und de Bont 1998) sind die Zellen bereits an die membrantoxische Verbindung Phenol angepasst, was zu einer erhöhten Toleranz gegenüber dem Bisphenol A führt. Bei diesen Zellen sind bereits die langfristig wirkenden Mechanismen auf den verschiedenen Ebenen aktiviert, so dass der *cis-trans*-Isomerisierung hier nur eine untergeordnete Rolle bei der Adaption zukommt.

So war das *trans/cis*-Verhältnis in den präadaptierten Zellen anfangs wegen der Kurzfristigkeit der Reaktion weiterhin niedrig. Erst nach BPA-Applikation fand erneut eine Erhöhung des *trans/cis*-Verhältnisses durch Isomerisierung der *cis*-Fettsäuren als schnelle Stressantwort statt (Abb. 3-24).

Können die Zellen wachsen und somit auch eine *de novo*-Synthese von Fettsäuren durchführen, ist die wichtigste langfristige Antwort auf den Stressor auf der Ebene der Membran bei Gram-negativen Bakterien wie *P. putida* eine Erhöhung des Sättigungsgrads der Membranfettsäuren. Mit Hilfe der verstärkten Neusynthese gesättigter Fettsäuren kann die Zelle den Effekten des Schadstoffes (BPA) langfristig entgegenwirken, und so die Membranfunktion auch in Anwesenheit einer die Membranfluidität erhöhenden Verbindung aufrechterhalten (Isken und de Bont 1998, Neuman 2006, Heipieper et al. 2007). Daher stellt auch dieser Adaptionsmechanismus einen Indikator für die Stressantwort dar.

Als zusätzlicher Marker für Zellen mit aktiver *cis-trans*-Isomerase wurde in dieser Arbeit erstmalig der Adaptionsgrad verwendet. Dieser wurde eingeführt, weil er mehr als der normal berechnete Sättigungsgrad auch die physiko-chemischen Eigenschaften der *trans*-ungesättigten Fettsäuren berücksichtigt. Diese entsprechen eher denen von gesättigten Fettsäuren. So haben die *trans*-Isomere eine höhere Phasen-Transitionstemperatur, und die Moleküle verursachen aufgrund ihrer sterischen Form weniger Membranstörungen als die *cis*-Fettsäuren (Heipieper et al. 2003, Roach et al. 2004, Zhang und Rock 2008). Für die Berechnung wurden deshalb die *trans*-Isomere den gesättigten Fettsäuren zugeordnet. Der Grad der Adaption verläuft somit ähnlich dem *trans/cis*-Verhältnis. Für die Differenz zwischen beiden Summenparametern sind allein die gesättigten Fettsäuren verantwortlich.

4.8 Charakterisierung der toxischen Zonen in den Sandsäulen

Der Nutzen der Einführung des dritten Summenparameters (Adaptionsgrad) zeigte sich besonders während der Versuche in den Säulensystemen, in denen die Bakterienzellen kontinuierlich wuchsen und somit eher die langfristigen Adaptionsmechanismen sichtbar wurden. Die *trans/cis*-Werte in den Säulenversuchen waren bei ähnlichen BPA-Konzentrationen deutlich niedriger ausgeprägt als in den Schüttelkulturen. Eine Erklärung hierfür ist das Adsorptionspotential des BPAs. Obwohl die Adsorption von Bisphenol A an den Sand der Säulen gering ist, scheint diese dennoch einen Einfluss auf das *trans/cis*-Verhältnis zu haben. So ist vermutlich die aktuelle BPA-Konzentration an den Bakterienzellen geringer als in der Wasserphase der Flüssigkulturen. Durch die niedrigere Verfügbarkeit wird die Stresswirkung auf Bakterienzellen und deren Antwortreaktion reduziert. Dennoch konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Höhe des *trans/cis*-Verhältnisses von der applizierten BPA-Menge erfasst werden.

Der Anstieg des *trans/cis*-Verhältnisses von oben nach unten innerhalb der Sandsäulen ist vermutlich auf die Erhöhung des Wassergehalts in den unteren Zonen durch Mediumsstau zurückzuführen. Somit ist mehr BPA über die Wasserphase in Bakteriennähe verfügbar und kann auf die Zellen wirken. Ein weiterer Faktor kann die Limitation der C-Quelle Phenol darstellen. Diese Verbindung wird durch die stark wachsenden Zellen in den oberen Zonen sehr schnell abgebaut und erreicht nur noch in sehr geringer Konzentration die unterste Ebene. Durch diese Mangelsituation werden die Bakterien zusätzlich gestresst und die *cis-trans*-Isomerisierung wird aktiviert (Heipieper et al. 2003).

Anhand der zeitlichen Abfolge in diesem Kultivierungssystem wurde erneut deutlich, dass die *cis-trans*-Isomerisierung als bedeutsamer Mechanismus der schnellen Stressantwort (*urgent response*) anzusehen ist, der unabhängig von Energie, Cofaktoren und der *de novo*-Biosynthese von Fettsäuren wirksam wird (Heipieper et al. 1992, Morita et al. 1993, Holtwick et al. 1997, von Wallbrunn et al. 2003, Kiran et al. 2005). So wurde das höchste *trans/cis*-Verhältnis 12-16 Stunden nach Applikation von Bisphenol A ermittelt. Danach wurde diese Antwort aber relativ schnell durch mittelfristig wirkende Mechanismen abgelöst. So wies ein deutlich erhöhter Adaptionsgrad in den Sandsäulen auf mehr gesättigte Fettsäuren hin. Demnach wurde die *cis-trans*-Isomerisierung durch Erhöhung des Sättigungsgrads abgelöst.

Weitere mittel- und langfristige Mechanismen wurden vor kurzem in einem Review zusammengefasst (Heipieper et al. 2007).

4.9 *Cis-trans*-Isomerisierung als Biomarker

Bereits einige Jahre vor Entdeckung und Beschreibung der *cis-trans*-Isomerase wurde die Nutzung des *trans/cis*-Verhältnisses als Biomarker für Stress diskutiert (Guckert et al. 1986), auch heute wird dieser Marker immer noch sehr häufig verwendet (Frostegard et al. 1993, 1996, White et al. 1996, MacNaughton et al. 1999, Kaur et al. 2005). In mehreren Studien wurde erkannt, dass die meisten Zellkulturen und Umweltproben ein *trans/cis*-Verhältnis von $<0,1$ aufweisen (Volkman und Johns 1977, Perry et al. 1979, Gillan und Hogg 1984, Guckert et al. 1985). Ist dieses Verhältnis signifikant größer, kann es als Marker für Hungerbedingungen oder Stress dienen (Guckert et al. 1986 und 1991).

Im Rahmen des EU-Projektes BIOTOOL [<http://www.gbf.de/biotools/>] sollte das *trans/cis*-Verhältnis als Marker eingesetzt werden, um den toxikologischen Status eines kontaminierten Standortes zu beurteilen. Jedoch zeigte sich während der Versuche dieser Arbeit, dass sich dies als äußerst schwierig gestaltete.

Das *cis-trans*-Isomerisierungssystem kann offenbar als Marker für die Charakterisierung der lokalen Unterschiede innerhalb der einzelnen Zonen der Sandsäule genutzt werden. So ist ein erhöhtes *trans/cis*-Verhältnis Ausdruck der hohen BPA-Konzentration in Zellnähe und damit der Bioverfügbarkeit. Jedoch ist dies nur in einem sehr begrenzten Zeitrahmen möglich. Denn bereits nach relativ kurzer Zeit war in den Sandsäulen bei *P. putida* P8 trotz konstanter Stresseinwirkung durch Zufuhr von Phenol und Bisphenol A bereits eine Abnahme der *trans/cis*-Werte zu verzeichnen. Demnach ist zu erwarten, dass bei noch längerer Einwirkzeit beider Schadstoffe das *trans/cis*-Verhältnis wieder das Ausgangsniveau erreicht und somit die Adaption der Zellen sowie die Schadstoffwirkung nicht mehr anhand dieses Mechanismus nachgewiesen werden kann.

Zudem zeigten andere Versuche, dass in Schüttelkulturen von *P. putida* das *trans/cis*-Verhältnis nach Entfernung des Stressors (4-Chlorphenol) bei wachsenden Zellen innerhalb von ca. 5 Stunden wieder das Ausgangsniveau erreichte (Kabelitz, persönliche Mitteilung, 2008). Durch Neusynthese von *cis*-ungesättigten Fettsäuren

wird dieses Absinken des Verhältnisses verursacht. Dieser Prozess ist im Gegensatz zur *cis-trans*-Isomerisierung sehr viel langsamer (Isken und Heipieper et al. 2002).

Eine Beurteilung von Böden, die schon mehrere Jahre mit Kontaminanten belastet sind, nur mittels des *trans/cis*-Verhältnisses ungesättigter Fettsäuren vorzunehmen, erscheint somit als sehr fragwürdig und nicht sinnvoll, da keine Korrelation zwischen Stressor und *trans/cis*-Verhältnis aufgestellt werden kann. Dies wurde auch deutlich während der Untersuchung eines kontaminierten Standortes im Rahmen des BIOTOOL-Projektes. Hier konnten nach Analyse des Fettsäureprofils keine Aussagen über die Stressbelastung nur anhand des *trans/cis*-Verhältnisses gemacht werden (pers. Mitteilung Kabelitz, 2008, UFZ). Die *cis-trans*-Isomerisierung konnte hier nicht als Biomarker genutzt werden.

Schon seit längerem ist bekannt, dass nicht nur Pseudomonaden, sondern auch methanotrophe und nitrifizierende Bakterien *trans*-ungesättigte Membranfettsäuren besitzen. So konnten diese Fettsäuren bei verschiedenen Arten der Gattungen *Methylococcus* (Makula 1978, Nichols et al. 2006, Bowman et al. 2006) und *Nitrosomonas* (Keweloh und Heipieper 1996) nachgewiesen werden. Beide Gruppen können in der Bakteriengemeinschaft von kontaminierten Böden verschiedener Standorte in unterschiedlicher Anzahl vorkommen und das Fettsäureprofil beeinflussen. Deshalb müssen diese Bakterien bei der Boden- bzw. Stressbeurteilung ebenfalls berücksichtigt werden. Somit sind eine Bestimmung der Anzahl dieser Begleitorganismen und deren Anteil an der Bodengemeinschaft von Bedeutung. Mittels der bekannten Kultivierungsmethoden können jedoch nur ca. 1 % der Bakterien erfasst werden, die tatsächlich in einem Habitat vorkommen (Amann et al. 1995). Eine genaue Bestimmung erfordert weitere Nachweismethoden wie z. B. die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Es ist demnach nicht unwahrscheinlich, dass erhöhte *trans/cis*-Werte im Boden auch durch eine große Anzahl an methylo-trophen und nitrifizierenden Bakterien verursacht werden. In marinen Ökosystemen kann das *trans/cis*-Verhältnis weiterhin durch schwefeloxidierende Bakterien der Gattung *Beggiatoa* (Zhang et al. 2005) oder durch das alkanverwertende Bakterium *Alcanivorax borkumensis* (Hara et al. 2003) beeinflusst werden. Diese haben ebenfalls *trans*-ungesättigte Fettsäuren in ihren Membranphospholipiden.

Für die Überwachung von Bioremediationsprozessen, die Beurteilung des toxikologischen Status von kontaminierten Böden und die Erfassung der bakteriellen Diversität ist eine Verknüpfung von physiko-chemischen, mikrobiologischen, genetischen und fettsäureanalytischen Methoden notwendig. So reicht z.B. die Bestimmung von physiko-chemischen Eigenschaften (pH-Wert, organischer Kohlenstoff etc.) allein nicht aus, um Reaktionen auf Stressbedingungen in Böden zu überwachen, da diese nicht sensitiv genug gegen schnelle Veränderungen der Umgebungsbedingungen sind. (Kaur et al. 2005). Ein Monitoring der Stressantwort auf mikrobieller Ebene ist hier von großer Bedeutung, da mikrobielle Populationen schneller auf Störungen reagieren (Atlas 1984). Es müssen ebenfalls Zellzahlen, Respirationsraten und Enzymaktivitäten bestimmt werden, welche Auskunft über die Aktivitäten des gesamten Pools der Populationen geben (Parkinson und Coleman 1991). Mittels genetischer Methoden wie denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), Temperaturgradientgelelektrophorese (TGGE) oder terminaler Restriktionsfragmentanalyse (T-RFLP) kann dann die ganze bakterielle Diversität ermittelt und genauer analysiert werden, wobei sowohl die exprimierten als auch die unexprimierten Gene (Gelsomino et al. 1999, Øvreås 2000) erfasst werden können. Auch durch Bestimmung der Profile aus den Phospholipidfettsäuren (PLFA) kann die gesamte mikrobielle Gemeinschaft auf phänotypischer Ebene analysiert werden (Zelles 1999). Eine Quantifizierung der lebenden und aktiven mikrobiellen Biomasse im Boden ist möglich, da die Phospholipide nach Zelltod sehr schnell abgebaut werden (Kaur 2005). Die Phospholipidfettsäuren variieren in den einzelnen Arten von Mikroorganismen in Vorkommen und Menge und sind deshalb nützliche Signaturen für Bodengemeinschaften (Tunlid 1992, Zelles 1999).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes BIOTOOL (Entwicklung von Verfahren zur Überwachung von Bioremediationsprozessen) angefertigt. Im Zentrum der Aufgabenstellung stand die Charakterisierung des Abbaus von Bisphenol A durch den isolierten Bakterienstamm *Cupriavidus basilensis* RW4. Zusätzlich sollte der Einfluss von Bisphenol A auf das Wachstum und die Membranzusammensetzung (*trans/cis*-Verhältnis und Adaptionegrad) von *Pseudomonas putida* P8 untersucht werden, um zu überprüfen, ob diese Mechanismen als Biomarker für die Beurteilung des toxikologischen Status von BPA-kontaminierten Habitaten dienen können. Dazu wurden Versuche in einfachen Schüttelkulturen und in komplexeren Sandsäulen durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Aus dem Wasser eines *Planted Fixed Bed Reactors* des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung (UFZ) wurde der Bakterienstamm RW4 isoliert, der als *Cupriavidus basilensis* identifiziert wurde und befähigt ist, Bisphenol A als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.
2. Bereits geringe Konzentrationen an Bisphenol A hemmten das Wachstum von *C. basilensis* RW4 und *P. putida* P8. Somit kann BPA ein höheres toxisches Potential besitzen als bisher in der Literatur für andere Bakterien beschrieben.
3. Der BPA-Abbau durch *C. basilensis* RW4 verläuft in Schüttelkulturen sehr langsam. Durch Kultivierung in Sandsäulen konnte die BPA-Abbaurrate durch die wachstumstimulierende Wirkung des zusätzlich applizierten Phenols deutlich gesteigert werden.
4. Als Intermediate des Abbaus wurden 4-(2-Propanol)-phenol, *p*-Hydrochinon, 4-Isopropenylphenol, 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyacetophenon gefunden. 4-Hydroxyacetophenon wird nur mäßig verwertet und kann aufgrund seiner relativ starken Akkumulation und seiner Membrantoxizität hemmend auf den BPA-Abbau wirken.

5. Der Bakterienstamm *C. basilensis* RW4 mineralisiert Bisphenol A entsprechend den in dieser Arbeit identifizierten Intermediaten analog dem von Kolvenbach et al. (2007) für *Sphingomonas* sp. TTNP3 beschriebenen Abbauweg. Demnach wird Bisphenol A durch eine Oxygenase (unter Einbau von O₂) einer primären Oxidation unterzogen und in 4-(2-Propanol)-phenol und *p*-Hydrochinon gespalten. Diese frühen Intermediate werden anschließend über mehrere Stufen in 4-Hydroxybenzoesäure überführt, welche über den *ortho*-Abbauweg von Aromaten metabolisiert wird.
6. In Schüttelkulturen verursacht Bisphenol A eine Erhöhung des *trans/cis*-Verhältnisses der ungesättigten C16-Fettsäuren und des Adaptionsgrads in *P. putida* P8. Der Anstieg ist dabei abhängig von der applizierten BPA-Konzentration.
7. Werden die Bakterien kontinuierlich in Sandsäulen kultiviert, erfolgt nach BPA-Einwirkung ebenfalls eine Erhöhung des *trans/cis*-Verhältnisses und des Adaptionsgrads. Die *trans/cis*-Werte sind jedoch deutlich niedriger als in den Schüttelkulturen. Wegen des kontinuierlichen Wachstums in den Säulen können die Zellen gesättigte Fettsäuren synthetisieren und in die Membran einbauen. Somit wird die *cis-trans*-Isomerisierung als Stressantwort relativ schnell durch andere Anpassungsmechanismen ersetzt.
8. In einem kurzen Zeitraum (12-16 Stunden) kann die *cis-trans*-Isomerisierung als Marker für die an der Zelloberfläche gegebene BPA-Konzentration und damit für die Bioverfügbarkeit innerhalb der Sandsäule genutzt werden. Eine erhöhte BPA-Konzentration zeigte sich im Anstieg des *trans/cis*-Verhältnisses in den Sandsäulen - in der obersten Ebene die niedrigsten, in der untersten Ebene die höchsten *trans/cis*-Werte.
9. Aufgrund der Kurzfristigkeit der *cis-trans*-Isomerisierung kann dieser Mechanismus jedoch nicht als geeigneter Biomarker für die Beurteilung der Stressbelastung von dauerhaft kontaminierten Böden eingestuft werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Alexander H. C., Dill D. C., Smith L. W., Guiney P. D., Dorn P. (1988) Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**: 19-26

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K. H. (1995a) Phylogenetic identification and /in situ /detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.

Anderson M., Kiel P., Larsen H., Maxild J. (1978) Mutagenic action of aromatic epoxy resins. *Nature* **276**: 391-392

Antizar-Ladislao B., Katz S., Galil N. I. (2000) Phenol remediation by biofilm developed in sand soil media. *Water Sci. Technol.* **42**: 99-104

Atlas R. M. (1984) Use of microbial diversity measurements to assess the environmental stress. *Current Perspectives in Microbiol. Ecology* (eds Klug M. J. and Reddy C. A.), American Society for Microbiology, Washington DC

Beek B. (2001) Biodegradation and persistence. The handbook of environmental chemistry. Vol. 2, Part K, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Belfroid A., van Velzen M., van der Horst B., Vethaak D. (2002) Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* **49**: 97-103

Beltrame P., Beltrame P. I., Carniti P. (1984) Inhibiting action of chloro- and nitrophenols on biodegradation of phenol: a structure-toxicity relationship. *Chemosphere* **13**: 3-9

Benachour N., Moslemi S., Sipahutar H., Sealini G. E. (2007) Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disruptors alone and in combination. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222 (2)**: 129-140

Bettmann H. und Rehm H. J. (1984) Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 285-290

Bettmann H. und Rehm H. J. (1985) Continuous degradation of phenol(s) by *Pseudomonas putida* P8 entrapped in polyacrylamide-hydrazine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 389-393

Bligh E. G., Dyer W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917

Bonefeld-Jorgensen E. C., Long M., Hofmeister M. V., Vinggaard A. M. (2007) Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethylate, 4-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ. Health Perspect.* **115**: 169-176

Borjesson G., Sundh I., Tunlid A., Svensson B. H. (1998) Methane oxidation in landfill cover soils as revealed by potential oxidation measurements and PLFA analysis. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1423-1433

Bowman J. P., Skerratt J. H., Nichols P. D., Sly L. I. (2006) Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **85**: 15-22

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Calafat A. M., Kuklennyik z., Reidy J. A., Caudill S. P., Ekong J., Needham L. L. (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a humane reference population. *Environ. Health Perspect.* **113**: 391-395

Cavalca L., Hartmann A., Rouard N., Soulas G. (1999) Diversity of tfd genes: distribution and polymorphism among 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiol. Ecology* **29**: 45-58

CEC Commission of the European Communities (1994) CS/PM/2356 Synoptic Document N. 7: Draft of provisional list of monomers and additives used in the manufacture of plastics and coatings intended to come into contact with foodstuffs, Brüssel

Chang B. V., Yu C. H., Yuan S. Y. (2003) Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediments. *Chemosphere* **55**: 493-500

Chen Q., Nijenhuis A., Preusting H., Dolfing J., Janssen D. B., Witholt B. (1995) Effects of octane on the fatty acid composition and transition temperature of *Pseudomonas oleovorans* membrane lipids during growth in 2-liquid-phase continuous cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 647-652

Chen M.-Y., Ike M., Fujita M. (2002) Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol A and other bisphenols. *Environ. Toxicol.* **17**: 80-86

Cleuvers M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* **142**(3): 185-194

Colborn T., Clement C. (1992) Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. In Mehlman, M (Ed.), *Advances in modern Environmental Toxicology*, vol. 21. Princeton Scientific Publishing Company, Princeton, New Jersey

Cypionka, H. & Pfennig, N. (1986) Growth yields of *Desulfotomaculum orientis* with hydrogen in chemostat culture. *Arch Microbiol* **143**, 366-369.

Davidson P. M., Branen A. L. (1981) Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *J. Food Prot.* **44**: 623-632

de Bont J. A. M. (1998) Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **16**: 493-499

de Souza M. L., Wackett L. P., Sadowsky M. J. (1998): The *atz ABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 21-2326

Diefenbach R., Heipieper H. J., Keweloh H. (1992) The conversion of *cis*- into *trans*- unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 382-287

Diefenbach R. and Keweloh H. (1994) Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. *Arch. Microbiol.* **162**: 120-125

Dijkhuizen L., Arfman N., Attwood M. M, Brooke A. G., Harder W., Watling E. M. (1988) Isolation and initial characterization of thermotolerant methylotrophic Bacillus strains. *FEMS Microbiology Letters* **52(3)**: 209-214

Dijkman N. A., van Vlaadingen P. L. A., Admiraal W. A. (1997) Biological variation in sensitivity to N-heterocyclic PAHs; effects of acridine on seven species of microalgae. *Environ. Poll.* **95(1)**: 121-126

Dodge J. A., Glasebrook A. L., Magee D. E., Phillips D. L., Sato M., Short L. I., Bryant H. U. (1996) Environmental estrogens: effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **59**: 155-161

Dorn P. B., Chou C.-S., Gentempo J. J. (1987) Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* **16**: 1501-1507

Dowhan W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 199-232

EEC (1993) Commission Directive 90/128/EEC, Off. Journ. Europ. Comm. L 349/26

Fang J. and Barcelona M. J. (1998) Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/ electrospray ionisation/ mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* **33**: 23-35

Federal T. W. (1986) Microbial distribution in soil. In *Perspectives in Microbial ecology* (eds Megusar F. and Ganthaer M.), Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, pp 493-498

Feng X., Ou L.-T., Ogram A. (1997) Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. strain CF06. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1332-1337

Fent G., Hein W. J., Moendel M. J., Kubiak R. (2003) Fate of ¹⁴C-bisphenol A in soils. *Chemosphere* **51**: 735-746

Fini J. B., Le Mevel S., Turque N., Palmier K., Zalko D., Travedi J. P., Demeneix B. A. (2007) An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.* 41 (16): 5908-5914

Frostegard A., Baath E., Tunlid A. (1993a) Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil. Biol. Biochem.* **25**: 723-730

Frostegard A., Tunlid A., Baath E. (1993b) Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types exposed to different heavy metals. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 723-730

Fukuda T., Uchida H., Takashima Y., Uwajima T., Kawabata T., Suzuki M. (2001) Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 704-706

Furukawa K., Chakrabarty A. M. (1982) Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 619-626

Furun, Boqing L. L., Zheyong S., Zheng L., Yayan Y., Yurong X. (1990) Treatment of wastewater containing bisphenol A. *Water Treatment* **5**: 105-124

Gelsomino A., Keijzer-Wolters A. C., Cacco G., van Elsas J. D. (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **38**: 1-5

Gillan F. T. and Hogg R. W. (1984) A method for the estimation of bacterial biomass and community structure in mangrove-associated sediments. *J. Microbiol. Methods* **2**: 275-293

Grogan D. W. and Cronan J. E., Jr. (1986) Characterization of *Escherichia coli* mutants completely defective in synthesis of cyclopropane fatty acids. *J. Bacteriol.* **166**: 872-877

Grogan D. W. and Cronan J. E., Jr. (1997) Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* **61**: 429-441

Gröning J., Held C., Garten C., Claußnitzer U., Kaschabek S. R., Schlömann M. (2006) Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere* **69** (4): 509-516

Guanzon jr. N. G. and Nakahara H. (2008) Growth and photosynthesis inhibition by agricultural pesticides in three freshwater microalgae. *Fisheries Sci.* **68**(1): 144-151

Guckert J. B., Antworth C. P., Nichols P. D., White S. C. (1985) Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducibility assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 147-158

Guckert J. B., Hood. M. A., White D. C. (1986) Phospholipids ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *trans/cis* ratio and properties of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 794-801

Guckert J. B., Ringelberg. D. B., White D. C., Hanson R. S., Bratina B. J. (1991) Membrane fatty acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the Proteobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2631-2641

Halling-Sørensen B. (2001) Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* **40**(4): 451-460

Hamada H., Ryotoku T., Asada Y., Furuya T. (2002) Phytoremediation of bisphenol A by cultured suspension cells of *Eucalyptus perriana* – regioselective hydroxylation and glycosylation. *Tetrahodon Letters* **48**: 4087-4089

Hara A., Syutsubo K., Harayama S. (2003) *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ. Microbiol.* **54**: 746-753

- Heipieper H. J., Diefenbach R., Keweloh H.** (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847-1852
- Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H., de Bond J. A. M.** (1994) Mechanism behind resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* **12**: 409-415
- Heipieper H. J., Loffeld B., Keweloh H., de Bond J. A. M.** (1995) The *cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12 an indicator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere* **30**: 1041-1051
- Heipieper H. J., Meulenbeld G., van Oirschot Q., de Bont J. A. M.** (1996) Effect of environmental factors on the *cis/trans* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2773-2777
- Heipieper H. J., Meinhardt F., Segura. A.** (2003) The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**: 1-7
- Heipieper H. J., Neumann G., Cornelissen S., Meinhardt F.** (2007) Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 961-973
- Hilliard C. A., Armstrong M. J., Bradt C. I., Hill R. B., Greenwood S. K., Galloway S.** (1998) Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of non mutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environ. Mol. Mut.* **31**: 316-326
- Hirano T., Honda Y. Watanabe T., Kuwahara M.** (2000) Degradation of bisphenol A by lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1958-1962
- Holtwick R., Meinhardt F., Keweloh H.** (1997) *Cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4292-4297
- Holtwick R., Keweloh H., Meinhardt F.** (1999) *Cis/trans* isomerase of unsaturated fatty acids of *Pseudomonas putida* P8: evidence for a heme protein of the cytochrome c type. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2644-2649
- Howard P. H.** (1989) Handbook of environmental fate and exposure data. Vol. 1 Lewis Publishers, Chelsea, MI
<http://www.gbf.de/biotools/>

Iguchi T., Watanabe H., Katsu Y. (2001) Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. *Hormones and Behaviour* **40**: 248-251

Ike M., Chen M.-Y., Jin C.-S., Fujita M. (1995) Isolation and characterization of a novel bisphenol A-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4. *Jpn. J. Water Treatment Biol.* **31**: 203-212

Ike M., Chen M.-Y., Jin C.-S., Fujita M. (2002) Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A. *Environ. Toxicol.* **17**: 457-461

Ingram L. O. (1976) Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678

Ingram L. O. (1977) Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1233-1236

Ingram L. O., Buttke T. M. (1984) Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **25**: 253-300

Inoue, Kaoru, Yokohama-shi, Kanagawa, JP; Ohkubo, Tuneyuki, Terajima, Takashi, Kanagawa, JP (1999) Verfahren zur Herstellung von Bisphenol A und Polysiloxan-Katalysator dafür. EP-0693470

Isken S. and de Bont J. A. M. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* **2**: 229-238

Isken S. and Heipieper H. J. (2002) Toxicity of organic solvents to microorganisms. In: Bitton G (ed) *Encyclopedia of environmental microbiology*. Wiley, New York pp 3147-3155

Jass J., Roberts S. K., Lapin-Scott H. M. (2002) Microbes and Enzymes in Biofilms. *Enzymes in the environment: activity, ecology, and application*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 307-327

Jin C. S., Ike M., Fujita M. (1996) Metabolic pathway of bisphenol A by *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4. *Jpn. Soc. Water Organism* **32**: 199-210

Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Markham D. A., McNett D. A., Birk K. H., Klecka G. M., Bartels M. J., Staples C. A. (1998) Quantitative determination with confirmation of bisphenol A in river water by gas chromatography/electron impact ionisation/mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **69**: 83-98

Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. (1989) *Dünnschichtchromatographie*, Band 1a/ 1b, VCH Verlagsgesellschaft mbH D 6940 Weinheim

Jung K. K., Kim S. Y., Kim T. G., Kang J. H., Kang S. Y., Cho J. Y., Kim S. H. (2007) Differential regulation of thyroid hormone receptor-mediated function by endocrine disruptors. *Arch. Pharm. Res.* **30 (5)**: 616-623

Junker F., Ramos J. L. (1999) Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* **181**: 5693-5700.

Kabelitz N., Santos P. M., Heipieper H. J. (2003) Effects of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**: 223-227

Kaneco S., Rahman M. A., Suzuki T., Katsumata H., Ohta K. (2004) Optimization of solar photocatalytic degradation conditions of bisphenol A in water using titanium dioxide. *J. Photoch. Photobio. A* **163**: 419-424

Kang J.-H., Kondo F. (2002) Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 265-269

Kang J.-H., Kondo F. (2002) Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere* 493-498

Kang J.-H., Kondo F. (2006) Bisphenol A in the surface water and freshwater snail collected from rivers around secure landfill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **76**: 113-117

Kang J.-H., Kondo F. (2006) Distribution and biodegradation of bisphenol A in water hyacinth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **77**: 500-507

Kappelmeyer U., Wießner A., Kusch P., Kästner M. (2002) Operation of a universal test unit for planted soil filters – planted fixed bed reactor. *Eng. Life Sci.* **2 (10)**: 311-315

Kaur A., Chaudhary A., Kaur. A., Choudhary R., Kauslik R. (2005) Phospholipid fatty acid – a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Curr. Science* **89**: 1103-1112

Keweloh H., Heipieper H. J. Rehm H. J. (1989) Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 383-389

Keweloh H. and Heipieper H. J. (1996) *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**: 129-137.

Kiran M. D., Annapoorni S., Suzuki I., Murata N., Shivaji S. (2005) *Cis-trans* isomerase gene in psychrophilic *Pseudomonas syringae* is constitutively expressed during growth and under conditions of temperature and solvent stress. *Extremophiles* **9**: 117-125

Kleber H.-P., Schlee D. (1992) Biochemie II, Spezielle und angewandte Biochemie. Gustav Fischer Verlag Jena pp. 93-99

Klečka G. M., Gonsior S. J., West R. J., Goodwin P. A., Markham D. A. (2001) Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: River die-away. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2725-2735

Kolvenbach B., Schlaich N., Raoui Z., Prell J., Zühlke S., Schäffer A., Guengerich F. P., and Corvini P. F. X. (2007) Degradation pathway of bisphenol A: does *ipso* substitution apply to phenols containing a quaternary α -carbon structure in the *para* position? *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4776-4784

Korenman Ya. I., Gorokhov A. A. (1973) Distribution of diphenylpropane between certain organic solvents and water. *Zhurnal Prikladnoi Khimii* **46**: 2597-2599

Kosaric N, Zajic J. E. (1974) Microbial oxidation of methane and methanol. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **3**: 89-125

Kroppenstedt R. M. (1992) The genus *Nacardiopsis*. In *The Prokaryotes 2* (eds Balows A. et al.), Springer, Berlin, pp 1139-1156

Kung, H. F., Wagner, C. (1970) Oxidation of C1 compounds by *Pseudomonas* sp. *MS. Biochem. J.* **116**: 357-365

Lal R., Saxena D. M. (1982) Accumulation, metabolism and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiol. Rev.* **46**: 95-127

Large P. J., D. Peel D., and Quayle J. R. (1961) Microbial growth on C₁ compounds. 2. Synthesis of cell constituents by methanol- and formate-grown *Pseudomonas* AM1, and methanol-grown *Hyphomicrobium vulgare*. *Biochem J.* **81(3)**: 470-480

Le H. H., Carlson E. M., Chua J. P., Belcher S. M. (2008) Bisphenol a is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic action of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol. Lett.* **17**: 149-156

Lewis D. F. and Hlavica P. (2000) Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects. *Biochem. Biophys. Acta* **1460**: 353-374

Lindholm C., Soren N., Pedersen S. N., Bjerregaard P. (2001) Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol.* **55**: 75-84

Lindholm C., Wynne P. M., Marriott P., Pedersen S. n., Bjerregaard P. (2003) Metabolism of bisphenol a in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. *Comp. Biochem. Physiol. C* **135**: 169-177

Liu D., Thomson K., Kaiser K. L. E. (1982) Quantitative structure-toxicity relationship of halogenated phenols on bacteria. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **29**:130-136

Lobos J. H., Leib T. K., Su T.- M. (1992) Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a Gram-negative aerobic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1823-1831

Loffeld B. and Keweloh H. (1996) *Cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids as a possible control mechanism of membrane fluidity in *Pseudomonas putida* P8. *Lipids* **31**: 811-815

MacNaughton S. J., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C. (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3566-3574.

Madigan M. T., Martiko J. M., Parker J. (2001) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin pp. 704-705

Makula R. A. (1978) Phospholipid composition of methane-utilizing bacteria. *J Bacteriol.* **134(3)**: 771-777

Martinez B., Tomkins J., Wackett L. P., Wing R., Sadowsky M. J. (2001)

Complete nucleotide sequence and organisation of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. J. Bacteriol. **183**: 5684-5697

Masuda M., Yamasaki Y., Ueno S., Inoue A. (2006) Isolation of bisphenol A-tolerant/degrading *Pseudomonas monteilii* strain N-502. Extremophiles **11 (2)**: 355-362

Matsumoto J., Yokota H. Yuasa A. (2002) Developmental increase in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogen bisphenol A. Environ. Health Perspect. **108**: 193-196

Matsushima A., Kakuta Y., Teramoto T., Koshiba T., Liu x., Okada H., Tokunaga T. Tawabata S., Kimura M., Shimohigashi Y. (2007) Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma. J. Biochem. **142 (4)**: 517-524

Mayer A. M. (1987) Polyphenol oxidases in plants – recent progress. Phytochemistry **26**: 11-20

Mayer A. M., Harel E. (1979) Polyphenol oxidases in plants. Phytochemistry **18**: 193-215

Meyer J. S., Marcus M. D., Bergman H. L. (1984) Inhibitory interactions of aromatic organics during microbial degradation. Environ. Toxicol. Chem. **3**: 583-587

Molin G. und Nilsson I., (1985) Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in continuous culture at different ratios of biofilm surface to culture volume. Appl Environ Microbiol. **50(4)**: 946-950

Morita N. A., Shibahara K., Yamamoto K., Shinkai K., Kajimoto G., Okuyama H. (1993) Evidence for *cis-trans* isomerization of a double bond in the fatty acids of the psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. J. Bacteriol. **175**: 916-918

Moreno-Garrido I., Lubian L. M., Soares A. M. V. M. (2000) Influence of Cellular Density on Determination of EC₅₀ in Microalgal Growth Inhibition Tests. Ecotoxicol. Environ. Safety **47**: 112-116

Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., Usui T. Saijo M., Kanamoto N., Hataya Y., Shimatsu A. Kuzuya H. Nakao K. (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol a as an antagonist. J. Clin. Endocrinol. Metab. **87 (11)**: 5185-5190

Morrison W. R., Smith L. M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid. Res. **5**: 600-608

Munro A. W. and Lindsay J. G. (1996) Bacterial chytochrome P-450. Mol. Microbiol. **20**: 1115-1125

Murell J. C., Dalton H. (1992) Methane an methanol utilizers. Biotechnology Handbooks 3, Plenum Publishing Corporation, New York

- Nadal A., Ropero A. B., Laribi O., Maillet M., Fuentes E., Soria B.** (2000) Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**: 11603-11608
- Nadal A., Ropero A. B., Fuentes E., Soria B., Ripoll C.** (2004) Estrogen and xenoestrogen actions on endocrine pancreas: from ion channel modulation to activation of nuclear function. **69**: 531-536
- Nakajima N., Ohshima Y., Serizawa S., Kouda T., Edmonds J. S., Shiraishi F., Aono M., Kubo A., Tamaoki M., Saji H., Morita M.** (2002) Processing of bisphenol A by plant tissues: Glycosylation by cultured BY-2 cells and glycosylation/translocation by plants of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiol.* **43 (9)**: 1036-1042
- Nakajima N., Teramoto T., Kasi F., Sano T., Tamaoki M., Aono M., Kubo a., Kamada H., Azumi Y., Saji H.** (2007) Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. *Chemosphere* **69 (6)**: 934-941
- Neilson J. W., Josephson K. L., Pepper I. L., Arnold R. B., Giovanni G. D. D., Sinclair N. A.** (1994) Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4053-4058
- Neumann G., Kabelitz N., Heipieper H. J.** (2003) the regulation of the *cis-trans* isomerase (cti) of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*: correlation between cti activity and K⁺-uptake systems. *Europ. J. Lipid Sci. Technol.* **105**: 585-589
- Neumann G., Teras R., Monson L., Kivisaar M., Schauer F., Heipieper H. J.** (2004) Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1907-1912
- Neumann G., Veeranagouda Y. K., Kargoudar T. B., Sahin Ö., Mäusezahl I., Kabelitz N., Kappelmeyer U., Heipieper H. J.** (2005) Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles* **9**: 163-168
- Neumann G., Kabelitz N., Zehnsdorf A., Miltner A., Lippold H., Meyer D., Schmid A., Heipieper H. J.** (2005) Prediction of the adaptability of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a second phase of a solvent for economically sound two-phase biotransformations. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6606-6612.
- Neumann G.** (2006) adaptation of bacteria to toxic solvents: mechanisms and applications. In PhD Dissertation 10/2006
- Nichols P. D., Smith G. A., Antworth C. P., Hansen R. S., White D. C.** (2006) Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxyl fatty acids as potential signatures for the methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 327-355
- Nishiyama T., Ogura K., Nakano H., Kaku T., Takahashi E., Ohkubo Y., Sekine K., Hiratsuka A.** (2002) Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferase. *Drug. Metabol. Pharmacokin.* **17**: 221-228

- Noureddin M. I., Furumoto T., Ishida Y., Fukui H.** (2004) Absorption and metabolism of bisphenol A, a possible endocrine disrupter, in aquatic edible plant, water convolvulus (*Ipomoea aquatica*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 1398-1402
- Ohko Y., Ando I., Niwa C., Tatsuma T., Yamamura T., Nakashima T., Kubota Y., Fujishima A.** (2001) Degradation of bisphenol A in water by TiO₂ photocatalyst. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 2365-2368
- Oikawa S., Tsuda m., Endou K., Abe H., Nakajina Y.** (1985) Structure-activity relationship for antibacterial action of phenolic and aromatic nitro compounds. An attempt at systematic identification of new antibacterial agents. *Chem.. Pharm. Bull.* **33**: 2821-2831
- Okuyama H., Okajima N., Sasaki S., Higashi S., Murata N.** (1991) The cis/trans isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1. *Biochem Biophys Acta* **1084**: 13-20.
- O'Leary W. M. and Wilkinson S. G.** (1988) Gram-positive bacteria. In *Microbial Lipids* (eds Ratledge C. and Wilkinson S. G.) Academic Press, London, vol. 1, pp 117-201
- ÖKO-TEST** (September 2003) Test Babyflaschen
- Oshiman K., Tsutsumi Y., Nishida T., Matsumura Y.** (2006) Isolation and characterization of a novel bacterium, *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1, that degrades bisphenol A. *Biodegradation* **18 (2)**: 247-255
- Ouchi K., Watanabe S.** (2002) Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci* **780**: 365-370
- Øvreås L.** (2000) Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* **3**: 236-251
- Parker J. H., Smith G. A., Fredrickson H. L., Vestal J. R., White D. C.** (1982) Sensitive assay on hydroxyl fatty acids from lipopolysaccharide lipid A, for Gram-negative bacteria in sediments. *Environ. Microbiol.* **44**: 1170-1177
- Parkinson D. and Coleman D. C.** (1991) Microbial communities, activity and biomass. *Agric. Ecosyst. Environ.* **34**: 3-33
- Pawlowski S., Baunbeck T., Turner A. P., Tyler C. R.** (2003) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and estrogenic effluent. *Aquatic Toxicol.* **65**: 205-220

- Pennanen T., Frostegard A., Fritze H., Baath E.** (1996) Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 420-428
- Pepi M., Heipieper H. J., Fischer J., Ruta M., Volterrani M., Focardi S. E.** (2008) Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp ORAs5 strains. *Extremophiles* **12**: 343-349
- Perry G. J., Volkman J. K., Johns R. B.** (1979) Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochem. Cosmochem. Acta* **43**: 1715-1725
- Petersen S. O. and Klug M. J.** (1994) Effect of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2421-2430
- Pinkart H. C. and White D. C.** (1997) Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J. Bacteriol.* **179**: 4219-4226
- Ramos J. L., Duque E., Rodorigues-Herva J. J., Godoy P., Haïdour A., Reyes F., Fernandez-Barrero A.** (1997) Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**: 3887-3890
- Ramos J. L., Gallegos M. T., Marques S., Ramos-Gonzales M. I., Espinosa-Urgel M., Segura A.** (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Cur. Opin. Microbiol.* **4**: 166-171
- Ramos J. L., Duque E., Gallegos M. T., Godoy P., Ramos-Gonzales M. I., Rojas A. T., Teran W. M., Segura A.** (2002) Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 743-768
- Rauscher K., Voigt, Wilke J., Friebe R.** (1993) *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, 9. Auflage, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt/M.
- Reineke W. und Schlömann M.** (2007) *Umweltmikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH München. pp124-131
- Reinhammer B., Malstrom B. G.** (1981) "Blue" copper containing oxidases in Copper Proteins (Metal Ions in Biology) **3**: 109-149
- Roach C., Feller S. E., Ward J. A., Shaikh S. R., Zerouga M., Stillwell W.** (2004) Comparison of *cis* and *trans* fatty acid containing phosphatidylcholines on membrane properties. *Biochemistry* **43**:6344

Ronen Z., Abeliovich A. (2000) Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2372-2377

Saito H., Koyasu J., Yoshida K., Shigeoka T., Koike S. (1993) Cytotoxicity of 109 chemicals to goldfish GFS cells and relationship with 1-octanol/water partition coefficient. *Chemosphere* **26**: 1015-1028

Sandman E. R. I. C., Loos M. A., van Dyk L. P. (1988) the microbial degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **101**: 1-51

Sasaki M., Maki J., Oshiman K., Matsumura S. Tsuchido T. (2005) Biodegradation of bisphenol a by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Biodegradation* **16**: 449-459

Sasaki M., Akahira A., Oshiman K., Tsuchido T., Matsumura S. (2005) Purification of chytochrome P450 and ferredoxin, involved in bisphenol A degradation, from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8024-8030

Schmidt I. K., Ruess L., Baath E., Michelsen A., Ekelund F., Jonasson S. (2000) Long term manipulation of the microbes and micro fauna of two subarctic heaths by addition of fungicide, bactericide c and fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 707-720

Schweikl H., Schmalz G., Rackebrandt K. (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat. Res.* **415**: 119-130

Sherma J., Field B. (2003) Handbook of thin-layer chromatography 3rd Edition, Chromatographic Science Series Vol. 89, Marcel Dekker Inc., New York, Basel

Shibuya I., Miyazaki C., Ohta A. (1985) Alteration of phospholipids composition by combined defects in phosphatidylserine and cardiolipin synthases and physiological consequences in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**: 1086-1092

Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028

Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222

Singh R., Paul D., Jain R. K. (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* **14** (9): 389-397

Smith A. E., Lafond G. P. (1990) Effect of long-term phenoxyacetic acid field applications on the rate of microbial degradation. ACS Symp. Ser. **426**: 14-22

Sohoni P., Tyler C. R., Hurd K., Caunter J., Hetheridge M., Williams T., Woods C., Evans M., Toy R., Gargas M., Sumpter J. P. (2001) Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) Environ. Sci. Tech. **35**: 2917- 2925

Spivack J., Leib T. K., Lobos J. H. (1994) Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. Rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism. J. Biol. Chem. **269**: 7323-7329

Springael D., Top E. M. (2004) Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. Trends Microbiol. **12**: 53-58

Staples C. A., Dorn P. B., Klečka G. M., O'Block S. T., Harris L. R. (1998) A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere **36**: 2149-2173

Staples C. A., Woodburn K., Caspers N. Tilghman Hall A., Klečka (2002) A weight of evidence approach to aquatic hazard assessment of bisphenol A. Hum. Ecol. Risk. Asses. **8**, No. **5**: 1083-1105

Steinle P., Stucki G., Stettler R., Hanselmann K. W. (1998) Aerobic mineralization of 2, 6-dichlorophenol by *Ralstonia* sp. strain RK1. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2566-2571

Steinmetz R., Brown N. G., Allen D. L., Bigsby R. M., Ben-Jonathan N. (1997) The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro*. Endocrinology **138**: 1780-1786

Stoker C., Rey F., Rodriguez H., Ramos J. G. Sirkosky P., Larriera A. Luque Munoz-de-Toro M. (2003) Sex reversal effects on *Caiman latirotris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. Gen. Comp. Endocrinol. **133**: 287-296

Stone R. (1994) Environmental estrogens stir debate. Science **265**: 308-310

Sugita-Konishi Y., Nishikawa T., Sunaga F., Naito H., Suzuki Y. (2003) Effect of bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli*. Toxicol. Lett. **136**: 217-227

Suiko M., Sakakibara Y., Liu M. C. (2000) Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**: 80-84

Sundh I., Borga P., Nilsson M., Svensson B. H. (1995) Estimation of cell numbers of methanotrophic bacteria in boreal peatlands based on analysis of specific phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 103-112

Suzuki T., Nakagawa Y., Takano I., Yaguchi K., Yasuda K. (2004) Environmental fate of bisphenol A and its biological metabolites in river water and their xeno-estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 2389-2396

Top E. M., Springael D. (2003) The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 262-269

Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T. (2000) Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* **42**: 271-276

Tunlid A. and White D. C. (1992) Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status and metabolic activity of microbial community in soil. In *Soil Biochemistry* (eds Stotzky C. and Bollak J. M.), Marcel Dekker, New York, vol. 7, pp 229-262

Uchida H., Fukuda T., Miyamoto H., Kawabata T., Suzuki M., Uwajima T. (2001) Polymerisation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 355-358

Umbarger H. E. (1978) Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 533-606

Umweltbundesamt (17.5.1999) Verwaltungsvorschrift für wassergefährdende Stoffe (vwVwS)

Vanechuoette M., Kämpfer P., De Baere T., Falsen E., Verschraegen G. (2004) *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. Nov. *Int. J. Evol. Microbiol.* **54**: 317-327

Vandamme P. and Coenye T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2285-2289

- Volkel W., Bittner N., Dekant W.** (2005) Quantification of bisphenol A and bisphenol a glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Drug. Metab. Dispos.* **33**: 1748-1757
- Volkman J. K. and Johns R. B.** (1977) The geochemical significance of position isomers of unsaturated acids from intertidal zone sediments. *Nature* **267**: 693-694
- von Wallbrunn A., Heipieper H. J., Meinhardt F.** (2002) *Cis/trans* isomerization of unsaturated fatty acids in cardiolipin synthase knock-out mutant of *Pseudomonas putida* P8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 179-185
- von Wallbrunn A., Richnow H. H., Neumann G., Meinhardt F., Heipieper H. J.** (2003) Mechanism of *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**: 1730-1733
- Voordeckers J. W., Fennell D. E., Jones K. Häggblom M. M.** (2002) Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A and bisphenol A in estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 696-701
- Wackett LP, Sadowsky MJ, Martinez B, Shapir N** (2002) Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:39-45
- Walker J. D.** (1988) Relative sensitivity of algae, bacteria, invertebrates, and fish to phenol: Analysis of 234 tests conducted for more than 149 species. *Toxicity assessment* **3**:415-447
- Wariishi H., Valli K., Gold M. H.,** (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* **267**: 23688-23695
- Weber F. J., Isken S., de Bont J. A. M.** (1994) *Cis/trans* isomerization of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology* **140**: 2013-2017
- Welin-Neilands J. and Svensäter G.** (2007) Acid Tolerance of Biofilm Cells of *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (17): 5633-5638
- West R. J., Goodwin P. A., Klečka G. M.** (2001) Assessment of the ready biodegradability bisphenol A. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **67**: 106-112
- Yamamoto T., Yasuhara A.** (1999) Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere* **38**: 2569-2576

- Wetherill Y. B., Akingbemi B. T. Kanno J., McLachlan J. A., Nadal A., Sonnenschein C. Watson C. S., Zoeller R. T., Belcher S. M.** (2007) *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* **24** (2): 178-198
- White D. C.** (1994) Is there anything else you need to understand about the microbiota that cannot be derived from analysis of nucleic acids. *Microbiol. Ecol.* **28**: 163-166
- White D. C., Stair J. O., Ringelberg D. B.** (1996) Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 185-196
- Widdel F., Pfennig N.** (1981) Studies on dissimilatory sulphate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov. sp. nov. *Arch Microbiol* **129**:395- 400
- Wong L. L.** (1998) Chytochrome P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**: 263-268
- Ying G.-G. and Kookana R. S.** (2005) Sorption and degradation of estrogen-like endocrine disrupting chemicals in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 2640-2645
- Yokota H., Iwano H., Endo M., Kobayashi T., Inoue H. Ikushiro S., Yuasa A.** (1999) Glucuronidation of environmental estrogen bisphenol a by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase UGT2B1, in rat liver. *Biochem. J.* **340**: 405-406
- Yuan S. Y., Yu C. H., Chang B. V.** (2004) Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environ. Pollution* **127**: 425-430
- Zelles L., Bai Q. Y., Ma R. X., Rackwitz R., Winter K., Beese F.** (1994) Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly hydroxybutyrate in agriculturally managed soils. *Soil Boil. Biochem.* **26**: 439-446
- Zelles L.** (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* **29**: 111-129
- Zhang Y. and Rock C. O.** (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* **6**: 222-233
- Zhang C. L., Huang Z., Cantu J., Pancost R. D., Brigmon R. Lyons T. W., Sassen R.** (2005) Lipid Biomarkers and Carbon Isotope Signatures of a Microbial (*Beggiatoa*) Mat Associated with Gas Hydrates in the Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(4): 2106-2112

7 ANHANG

Tab. 7-1: Chemikalienliste

Substanz	Reinheit	Formel	MW	Firma
1-Decanol		$C_{10}H_{22}O$	158,28	MERCK
1-Octanol		$C_8H_{18}O$	130,23	MERCK
4-Hydroxyacetophenon	≥ 98 %	$C_8H_8O_2$	136,15	FLUKA
4-Hydroxybenzaldehyd	≥ 95 %	$C_7H_6O_2$	122,12	FLUKA
4-Hydroxybenzoesäure	~ 99 %	$C_7H_6O_3$	138,12	FLUKA
4-Isopropylphenol	98 %	$(CH_3)_2CHC_6H_4OH$	136,19	ALDRICH
4-Chlorphenol		C_6H_5ClO	128,56	MERCK
Aceton	≥ 99 %	C_3H_6O	58,08	MERCK
Acetonitril		C_2H_3N	41,05	J.T.BAKER
Agar-Agar	reinst.			MERCK
Ammoniumchlorid	99,8 %	NH_4Cl	53,49	MERCK
Bariumchlorid-Dihydrat	99 %	$BaCl_2 \times 2 H_2O$	244,28	MERCK
Biotin	≥ 99 %	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	244,32	FLUKA
Bisphenol A	99 + %	$C_{15}H_{16}O_2$	228,29	ALDRICH
Borsäure	99,8 %	H_3BO_3	61,84	MERCK
Bortrifluorid-Methanol-Komplex		ca. 14 % BF_3		MERCK
Calciumchlorid-Dihydrat	99,5 %	$CaCl_2 \times 2 H_2O$	147,02	MERCK
Chloroform	reinst.	$CHCl_3$	119,38	MERCK
Cobalt-(II)-sulfat-Hydrat	reinst.	$CoSO_4 \times H_2O$	155,00	MERCK
Diethylether	99 %	$C_4H_{10}O$	74,12	MERCK
Dinatriumhydrogenphosphat	99 %	Na_2HPO_4	141,96	MERCK
Dinatriumsuccinat	> 99 %	$C_4H_4Na_2O_4$	162,05	MERCK
Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat	99,5 %	$FeSO_4 \times 7 H_2O$	278,02	MERCK
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA, Titriplex II)	>99,4 %	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292,25	MERCK
Folsäure	98 %	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	441,41	MERCK
Hefeextrakt, granuliert				MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat	99,5 %	KH_2PO_4	136,09	MERCK
Kaliumhydroxid	85 %	KOH	56,11	MERCK
Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat	> 99 %	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	249,68	MERCK

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	99,5	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246,48	ALDRICH
Mangan-(II)-sulfat-Monohydrat	>99 %	MnSO ₄ x H ₂ O	169,02	MERCK
Methanol	≥ 99,5 5	CH ₄ O	32,04	MERCK
Natriumchlorid	> 99,8 %	NaCl	58,44	ROTH
MSTFA	98,5 %	C ₆ H ₁₂ F ₃ NOSi	199,25	FLUKA
n-Hexan	99 %	C ₆ H ₁₄	86,18	MERCK
Nicotinsäure	98 %	C ₆ H ₅ NO ₂	123,12	MERCK
<i>ortho</i> -Phosphorsäure	85 %	H ₃ PO ₄	98,00	MERCK
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	≥ 99 %	C ₇ H ₂ NO ₂	137,14	FLUKA
Pantothensäure	≥ 99 %	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀	476,54	FLUKA
Phenol		C ₆ H ₆ O	94,11	MERCK
Pyridoxamindihydrochlorid	98 %	C ₈ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₂ x H ₂ O	259,13	SIGMA
Riboflavin (Vitamin B ₂)		C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376,37	SIGMA
Salzsäure	32 %	HCl	36,45	MERCK
Schwefelsäure	95-97 %	H ₂ SO ₄	98,08	MERCK
Thiaminchloridhydrochlorid		C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	337,27	MERCK
Toluol		C ₇ H ₈	92,14	MERCK
Trypton, Bacto TM				BD
Vitamin B12 (Cyanocobalmin)	> 98 %	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	355,39	FLUKA
Zinkchlorid	≥ 98,0 %	ZnCl ₂	136,29	FLUKA
α-Liponsäure	98 %	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	206,33	ALDRICH

```
ATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGCGGG  
GGACCGTAAGGCCTCGCGCGATAGGAGCGGCCGATGTCTGATTAGCTAGTTGG  
TGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATC  
AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG  
GGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAG  
AAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCCTTGCCCTAAT  
ACGGCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGTGCGAGCGTTAATCGGAATTAC
```

Abb. 7-1 16S rRNA-Sequenz vom Bakterienstamm *C. basilensis* RW4 welche zur Identifikation bei der BLAST-Suche genutzt wurde.

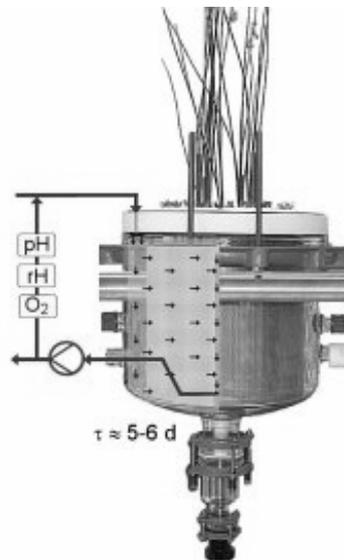


Abb. 7-2 Darstellung eines *Planted Fixed Bed Reactors* (Kappelmeyer et al. 2002). Aus dem Reaktorwasser wurden der Bakterienstamm *C. basilensis* RW4 isoliert.

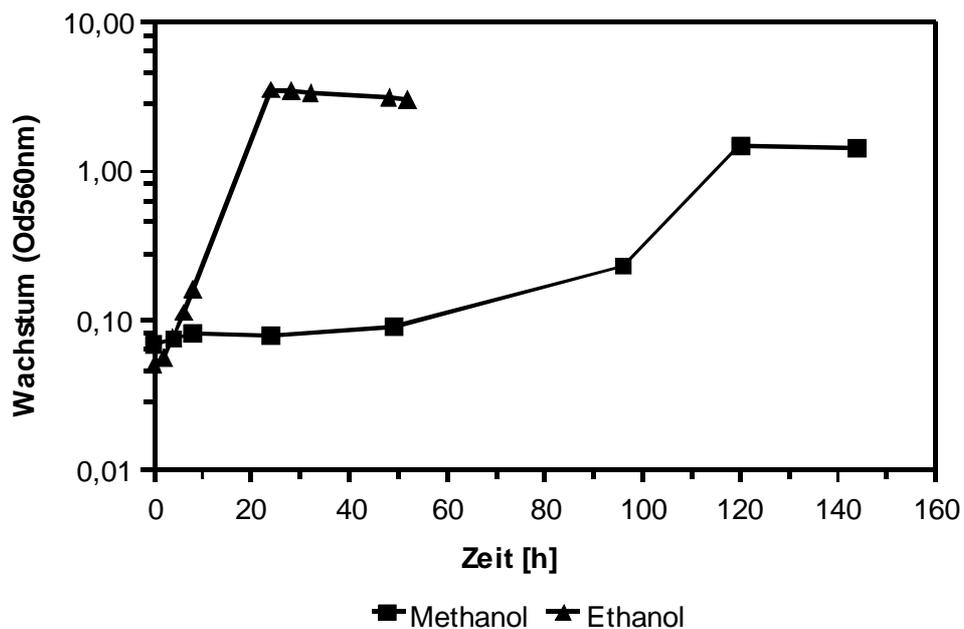


Abb. 7-3: Wachstum von *C. basilensis* RW4 mit 31,2 mM Methanol und 27,1 mM Ethanol als C-Quelle. Die Zellen wurden bei 30°C und 180rpm inkubiert.

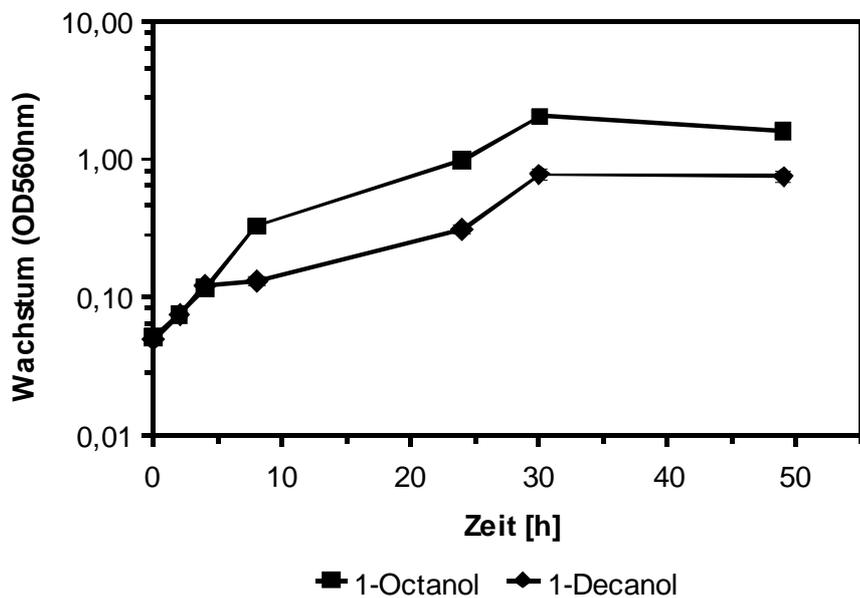
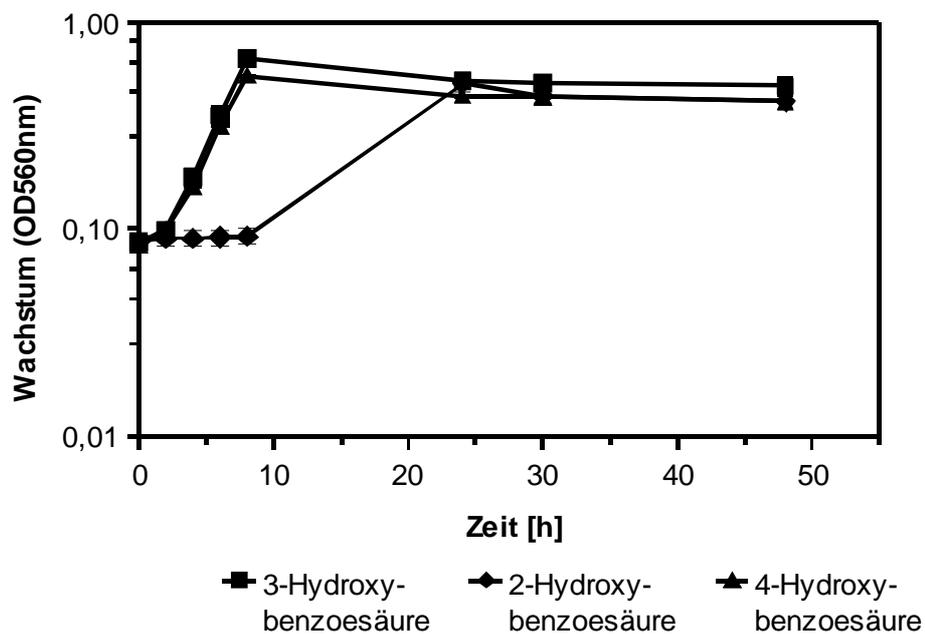


Abb. 7-4: Wachstumskurven von *C. basilensis* RW4 mit 0,13 mM 1-Octanol und 0,13 mM 1-Decanol. Die Kultivierung erfolgte für 50 h bei 30°C und 180 rpm.

A)



B)

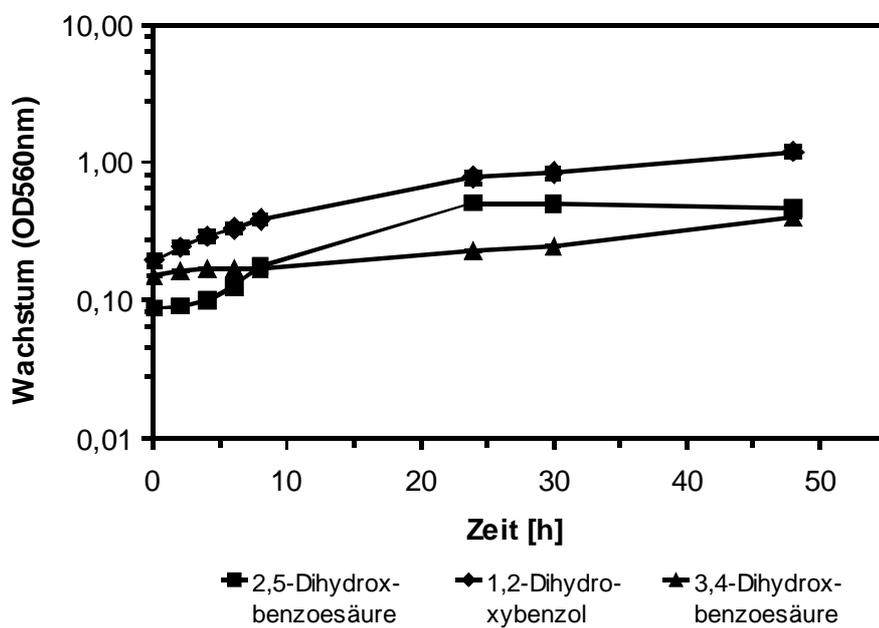


Abb. 7-5: Wachstum von *C. basilensis* RW4 mit A) Mono- und B) Dihydroxybenzoensäuren. Die Zellen wurden für 48 h bei 30°C und 180 rpm kultiviert.

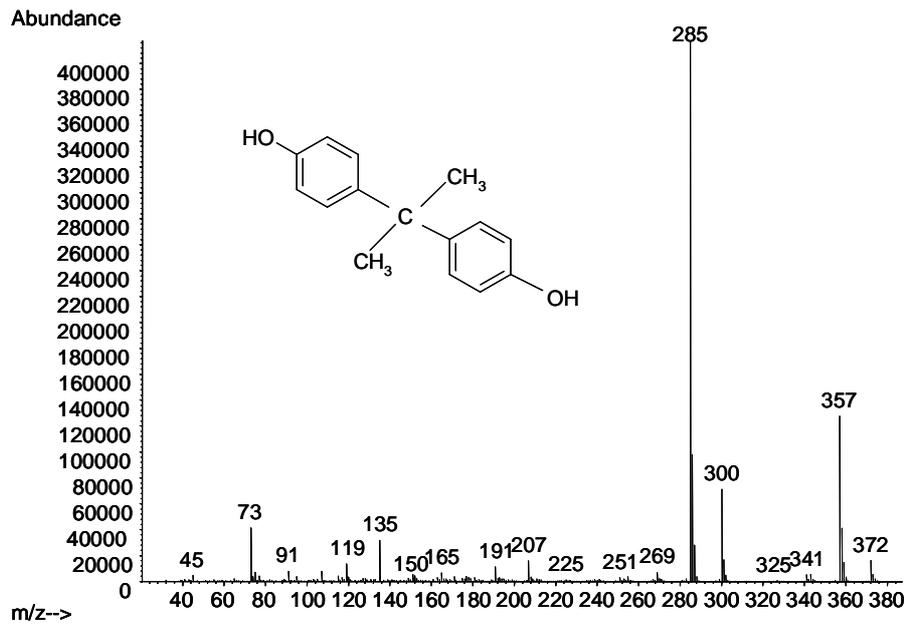


Abb. 7-6: Massenspektrum (2-fach silyliert) und Strukturformel von Bisphenol A

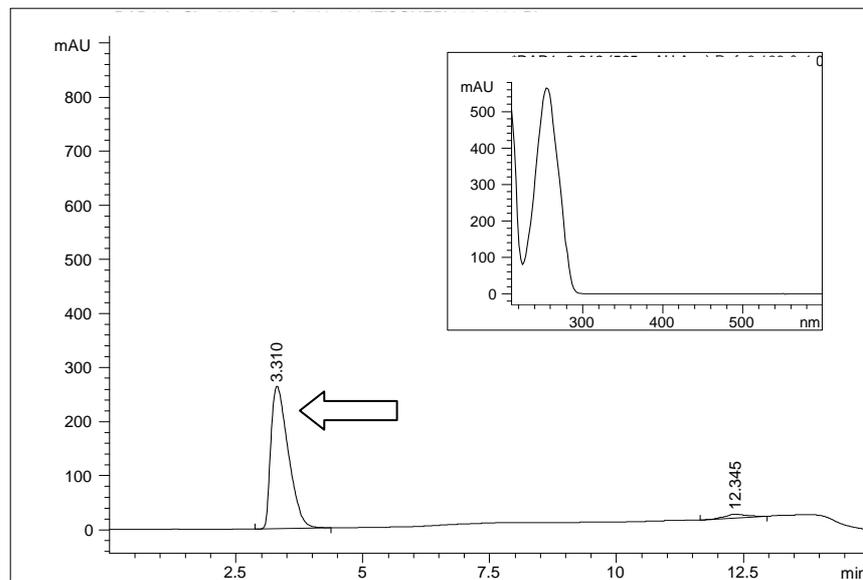


Abb. 7-7: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum vom 4-Hydroxybenzoesäure-Standard, 500 mg/l in Methanol, 10 µl Injektionsvolumen.

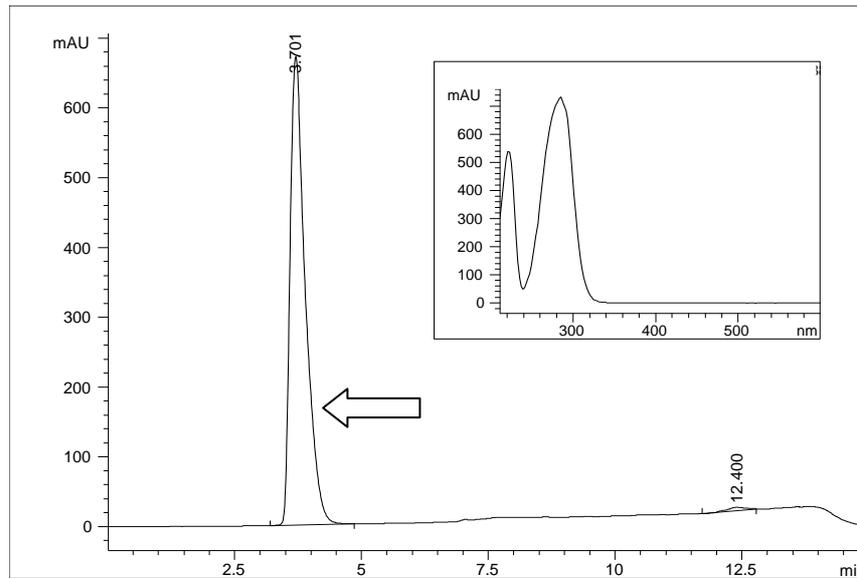


Abb.7-8: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektrum vom 4-Hydroxybenzaldehyd-Standard, 500 mg/l in Methanol, 10 μ l Injektionsvolumen

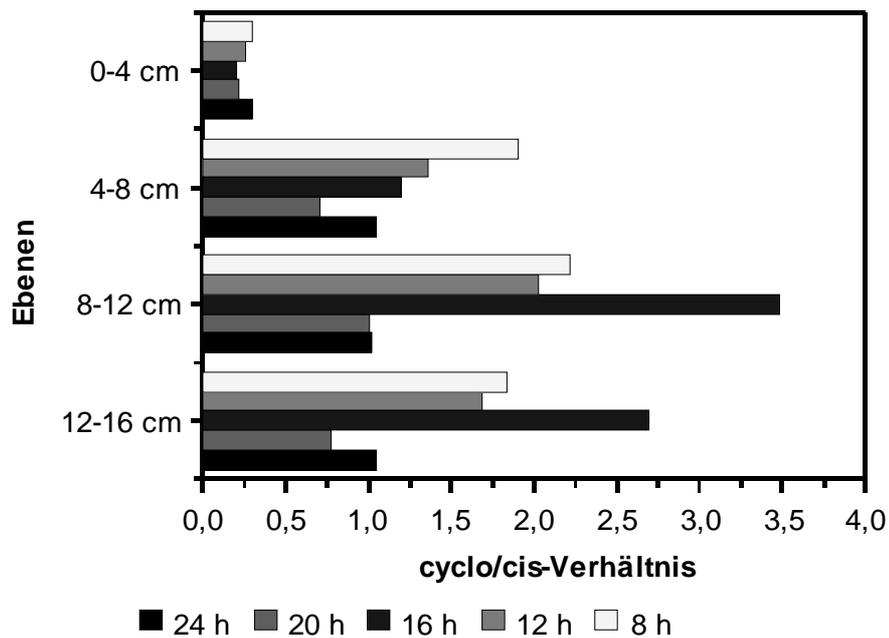


Abb. 7-9: Darstellung des *cyclo/cis*-Verhältnisses der cyclischen C17-Fettsäuren zu den *cis*-ungesättigten C16-Fettsäuren von *P. putida* P8 im Säulenmikrokosmos nach Einwirken von BPA.

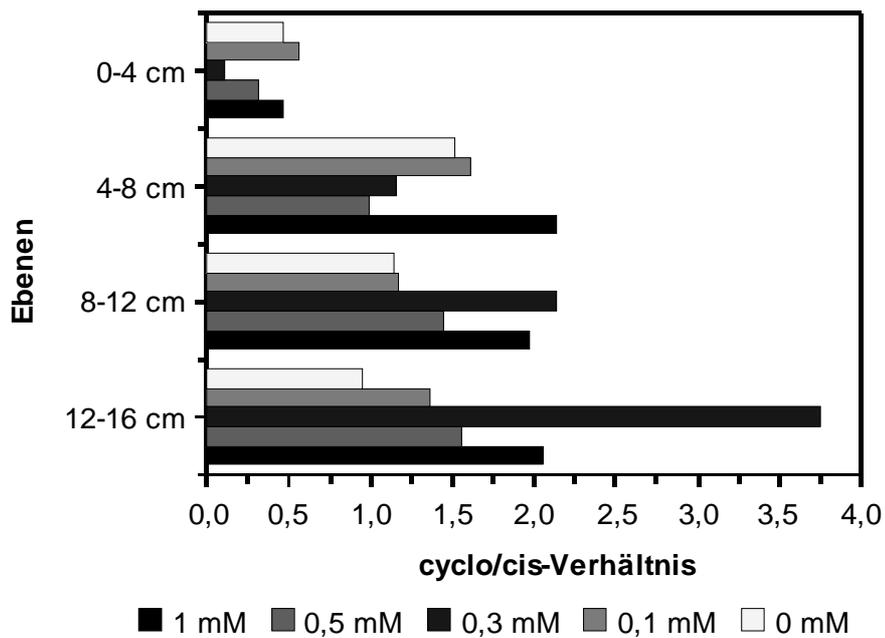


Abb. 7-10: Veränderung des *cyclo/cis*-Verhältnisses von *P. putida* P8 durch 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1 mM BPA. Die Probennahme erfolgte nach 16 h in den 4 Ebenen der Sandsäule.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Frieder Schauer möchte ich für die Annahme als Promotionsstudent für die exzellente Betreuung, die dauerhafte Unterstützung und wertvollen Anregungen ganz herzlich danken. Die Arbeit in den Mikrobiologischen Abteilung war sehr interessant und lehrreich und die Mitarbeiter verdienen meinen Dank.

Ein Dankeschön geht an Dr. Hermann J. Heipieper für die gute Betreuung im UFZ und die hilfreichen Diskussionen während der schriftlichen Phase.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Kästner, dem Leiter des Departements Bioremediation, für die Bereitschaft als Gutachter zu wirken und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Dr. Uwe Kappelmeyer und Paula Martinez möchte ich für die Identifizierung und Charakterisierung des Mikroorganismus mittels molekularbiologischer Methoden sowie Frau R. Bötze für die Charakterisierung über BIOLOG danken.

Vielen Dank verdient Dr. Rabea Sietmann, die mir bei der Auswertung Massenspektren geholfen hat und somit einen sehr wichtigen Aspekt meiner Arbeit beitrug.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern aus dem Department Bioremediation und Isotopenbiogeochemie bedanken, die mich während meiner Arbeit am UFZ hervorragend unterstützt haben und zu einem produktiven Arbeitsklima beitrugen.

Hier möchte ich nennen:

Ilka Duldhardt, Dr. Grit Neumann, Nadja Kabelitz, Kerstin Ethner, Ines Mäusezahl, Claudia Hoffmann-Jänicke, Petra Bombach, Dr. Anja Miltner, Paula Martinez, Steffen Kuppardt, Dr. Alvaro Gonzalias, Inge Haufe, Reimo Kindler, Gwenaël Imfeld, Hans-Günther Militsch, Dr. Ivonne Nijenhuis, Elvira Knaak, Dr. Marcell Nikolausz, Julia Gäbel, Dr. Lukasz Chrzanowski, Dr. Anko Fischer, Anja Offelder, Ilka Herklotz, Stefan Feistauer, Kerstin Puschendorf und Claudia Pietsch

Vielen Dank an „meine“ Praktikanten Tila Krüger, Henning Schindler und Christian Bastisch

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich Grit, Ilka und Nadja sagen (Ohne euch wäre es nur halb so gut). Ihre grenzenlose Unterstützung und Motivation im moralischen sowie im praktischen Sinne war unvergleichlich. Aufgrund Ihrer Anregungen und Hinweise konnte ich immer wieder neue Aspekte bezüglich der Bearbeitung des Themas entdecken und diese verwirklichen.

An dieser Stelle ist es mir auch wichtig meiner Familie zu danken. Sie hat mir immer bedingungslos Beistand geleistet und einen liebevollen Rückhalt gegeben.

Ein riesiges und herzliches Dankeschön an Markus (ja genau du), der immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, mich immer wieder aufrichtete und neuen Mut gab.

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Janett Fischer

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Fischer
Vorname: Janett
Beruf: Diplom Biologe
Geburtsdatum: 06.10.1979
In: Halle
Nationalität: German
Führerschein: Klasse B

Schulbildung

1986-1991 Grundschohle "POS Frederic-Juliot-Curie" / Halle
1991-1992 Sekundarschohle "An der Elsteraue" / Halle
1992-1998 Gymnasium am Reileck / Halle
1998 Abitur

1998-1999 Freiwilliges Ökologisches Jahr bei "Internationale Jugendgemeinschaftsdienste e.V. (IJGD)" in Halberstadt, Deutschland

Studium

10/1999-02/2005 Studium der Diplom-Biologie in der "Ernst-Moritz-Arndt-Universität" (EMAU) in Greifswald, Deutschland
08/2002-09/2002 Praktikum am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Halle in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie unterirdischen Wassers
01/2005-02/2006 Diplomarbeit in der Abteilung Angewandte Mikrobiologie der EMAU Greifswald und in Zusammenarbeit mit dem Departement Bioremediation des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Leipzig
10.02.2005 Biologie-Diplom an der EMAU Greifswald
03/2005-05/2008 Promotionsstudent an der EMAU Greifswald in der Abteilung Angewandte Mikrobiologie und in Zusammenarbeit mit dem Departement Bioremediation des UFZ Leipzig
Mitarbeit im EU-Projekt: *Biological procedures for diagnosing the status and predicting evolution of polluted environments* (Acronym: **BIOTOOL**)
ab 06/2008 Gastwissenschaftler im Department Umweltbiotechnologie (ehemals Bioremediation) des UFZ

REFERENZEN

Fischer J., Kästner M., Schauer F., Heipieper H. J. *Cupriavidus basilensis* JF1 a bacterium capable of degrading bisphenol A. *In Vorbereitung, Manuskript liegt vor*

Schoug Å., Fischer J., Heipieper H. J., Schnürer J., Håkansson S. (2008) Impact of fermentation on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 175-181. March 2008, Issue 3

Pepi M., Heipieper H. J., Fischer J., Ruta M., Volterrani M., Focardi S. E. (2008) Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. *Extremophiles* **12**: 343-349.

Fischer J., Kabelitz N., Heipieper H.J. (2006) Use of membrane lipids as biomarkers for environmental stress during in situ rehabilitation of contaminated soils. Poster, VAAM-Jahrestagung 2006, Jena. *BIOspektrum Sonderausgabe*: p. 138 (PE26).

Fischer J., Heipieper H.J., Schauer F., Kabelitz N. (2006) Biodegradation of bisphenol A by new isolate *Cupriavidus basilensis* RW4. Poster, FEMS 2006, Madrid, Abstract Book: p 315 (P.TOO.4)

Fischer J., Heipieper H.J., Schauer F., Kabelitz N. (2006) Biodegradation-monitoring of endocrine disrupting chemical bisphenol A in sand microcosms. Poster ISEB 2006, Leipzig

Fischer J., Kabelitz N., Schauer F., Heipieper H.J. (2007) Toxic effects of bisphenol A on the phospholipids fatty acid composition of the membrane of *Pseudomonas putida* P8. Poster, VAAM-Jahrestagung 2007, Osnabrück. *BIOspektrum Sonderausgabe*: p. 134 (PF083).

Kabelitz N., Fischer J., Imfeld G., Heipieper H. J. (2007) Monitoring bioremediation processes by using lipids as biomarkers. Poster, VAAM-Jahrestagung 2007, Osnabrück. *BIOspektrum Sonderausgabe*: p. 134 (PF084).

Kabelitz N.; Fischer J., Heipieper H. J. (2006) Application of membrane lipids as biomarkers to monitor successful bioremediation of soils highly contaminated with toxic pollutants. Poster ISEB 2006, Leipzig

Heipieper H. J., Fischer J. (2008) Monitoring of soil bioremediation processes using lipids as biomarkers. 14th Biotechnology Summer School, Gdansk, Poland, 13-18 July 2008. Oral Presentation. Book of Abstracts pp. 20-21.

VORTRÄGE

Fischer J., Schauer F., Heipieper H. J. (2007) So ein Stress im Mikrokosmos: Wenn Bakterien auf Bisphenol A treffen. Doktorandenkonferenz des Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Leipzig

Fischer J., Schauer F., Heipieper H. J. (2007) Endocrine disrupting chemical bisphenol A. Microbial degradation and toxic effects. BIOTOOL, Leipzig

Fischer J., Schauer F., Heipieper H. J. (2007) Adaptation of phenol-grown *Pseudomonas putida* P8 to bisphenol A in sand microcosms on the level of membrane fatty acid content. Klausur Bioremediation, Wittenberg