

## Abbau der 4-Chlorbenzoesäure durch eine *Arthrobacter*-Species

SIBYLLE RUISINGER, UWE KLAGES und FRANZ LINGENS\*

Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim,  
Garbenstr. 30, D-7000 Stuttgart 70 (Hohenheim), Bundesrepublik Deutschland

Degradation of 4-Chlorobenzoic Acid  
by an *Arthrobacter* Species

**Abstract.** An *Arthrobacter* sp. growing on 4-Chlorobenzoic acid as its sole source of carbon excretes 4-hydroxybenzoic acid and protocatechuic acid into the culture medium. Protocatechuic acid is further attacked by "meta"-cleavage. During growth of the *Arthrobacter* sp. on benzoic acid *cis-cis* muconic acid can be isolated from the medium, suggesting the involvement of the "ortho"-cleavage pathway. The enzymes both for the "meta"- and the "ortho"-cleavage pathway are inducible.

**Key words:** Bacterial degradation – 4-Chlorobenzoic acid – *Arthrobacter* sp.

**Zusammenfassung.** Eine *Arthrobacter*-Species, die 4-Chlorbenzoesäure als einzige Kohlenstoffquelle verwenden kann, gibt beim Wachstum auf dieser Verbindung 4-Hydroxybenzoesäure und Protocatechusäure ins Medium ab. Der weitere Abbau des aromatischen Ringes erfolgt durch „meta“-Spaltung. Beim Wachstum der *Arthrobacter*-Species auf Benzoesäure tritt im Medium *cis,cis*-Muconsäure auf. In diesem Falle wird also der „ortho“-Weg eingeschlagen. Die Enzyme für beide Abbauewege sind induzierbar.

2-Chlor-3-(4-chlorphenyl)-propionsäuremethylester, der als Herbizid unter der Bezeichnung „Bidisin“ Verwendung findet, wird durch das Zusammenspiel verschiedener Mikroorganismen des Bodens abgebaut (Köcher et al., 1976). Als Zwischenstufe dieses Abbaus konnte 4-Chlorbenzoesäure nachgewiesen werden. Die 4-Chlorbenzoesäure wird weiterhin durch

eine *Arthrobacter*-Species abgebaut (Köcher et al., 1976). Über den Mechanismus dieses Abbaus wird im folgenden berichtet.

### MATERIAL UND METHODEN

**Geräte.** UV-Messungen wurden mit Zeiss-Spektrographen DMR 21 und PMQ 3 ausgeführt.

IR-Spektren wurden mit einem Leitz-Spektrographen mit Mikroeinrichtung für KBr-Preßlinge aufgenommen.

Substanzgemische wurden säulenchromatographisch durch Gel-filtration getrennt. Säulenmaße: 2,5 cm × 1 m; Füllung: Sephadex LH 20 (Pharmacia); Betthöhe: 85 cm; Elutionsmittel: 96% Äthanol.

Die Fraktionen wurden mittels eines Uvicord I LKB 4700 bei 254 nm gemessen und über einen Schreiber registriert.

Für Zellaufschlüsse fand ein Branson-Sonifier Verwendung. Trübungsmessungen wurden mit einem Eppendorf-Photometer (Filter  $\lambda = 578$  nm) ausgeführt.

**Chemikalien.** Ferak: 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure; Fluka: 4-Chlorbenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, *trans,trans*-Muconsäure; Merck: 2-Chlorbenzoesäure, 3-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure; Riedel-De Haen: 4-Hydroxybenzoesäure, 3-Hydroxybenzoesäure, Na-Benzoat, Brenzkatechin.

Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert.

**Saline und Pufferlösungen.** Saline auf 1 l H<sub>2</sub>O deion. NaCl 5,00 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,12 g, 0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 8 auf 1 l H<sub>2</sub>O deion. Trishydroxymethyl-aminomethan 2,42 g, mit HCl auf pH 8 eingestellt.

**Nährmedien.** Hefeextrakt-Glucose-Komplettmedium (HG-Komplettmedium) pH 7: Auf 1 l H<sub>2</sub>O deion. Yeast Extract 6,00 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,50 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 11,00 g, Glucose 10,00 g.

Minimalmedium pH 7: Auf 1 l H<sub>2</sub>O deion. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,00 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,50 g, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,10 g, NaCl 0,10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,00 g, Spurenlösung 1 ml, C-Quelle 0,20–1,00 g. Spurenlösung: Auf 1 l H<sub>2</sub>O deion. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 500 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O 40 mg, KJ 100 mg, FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 200 mg, MnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 400 mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 1 H<sub>2</sub>O 200 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 400 mg.

Für feste Medien wurden 1,5% Agar-Agar (Merck) zugesetzt. Die Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, Glucose stets extra. Die C-Quellen 4-Chlorbenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure und Na-Benzoat wurden mit autoklaviert. Dünnschichtchromatographische Kontrollen zeigten, daß keine Zersetzung eingetreten war. Alle anderen C-Quellen wurden steril zugegeben.

\* Dem Andenken an Professor Bernhauer gewidmet

**Bakterienstamm.** Der zum Abbau der 4-Chlorbenzoesäure eingesetzte Stamm wurde von H. Köcher isoliert und als *Arthrobacter*-Species bestimmt (DSM 20407). Der Stamm wuchs mit 200 mg 4-Chlorbenzoesäure/l optimal. Konzentrationen über 500 mg/l wirkten hemmend. Der Stamm wurde auf Minimalmedium mit 200 mg 4-Chlorbenzoesäure/l gehalten, um den Verlust des Abbauvermögens zu verhindern. So war auch das für den Abbau verantwortliche Enzymsystem stets induziert.

**Dünnschichtchromatographie.** Die Platten wurden mit Kieselgel HF<sub>254</sub> (Merck) für die analytische und mit PF<sub>254</sub> (Merck) für die präparative Dünnschichtchromatographie hergestellt.

Als Laufmittelsystem dienten: System A: Benzol 3 Teile, Methanol 1 Teil. System B: Benzol 60 Teile, Essigester 48 Teile, Eisessig 8 Teile. System C: Chloroform 150 Teile, Essigester 5 Teile, Ameisensäure 1,25 Teile.

Als Sprühreagenz für Phenole wurde eine 2%ige Eisen(III)-chloridlösung verwendet.

**Die Isolierung von Zwischenprodukten.** Der Zeitpunkt der Akkumulation von Zwischenprodukten konnte dünn-schichtchromatographisch festgestellt werden.

Zur Trennung der 4-Hydroxybenzoesäure von Protocatechusäure und 4-Chlorbenzoesäure eignete sich das Laufmittelsystem A, um Protocatechusäure von 4-Hydroxybenzoesäure zu trennen, das System B. Cis,cis-Muconsäure ließ sich im System A von Benzoesäure trennen. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte im UV-Licht und durch Ansprühen mit FeCl<sub>3</sub>-Reagenz. Zur Isolierung von Metaboliten aus dem Medium erwiesen sich Kulturansätze zwischen 400 ml und 800 ml als ausreichend.

Zur Aufarbeitung wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand am Rotationsverdampfer bis auf ein kleines Volumen eingengt. Das eingengte Medium wurde mit HCl auf pH 2 angesäuert und mit dem 1½fachen Volumen Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterphase wurde eingengt und zur Trennung der Substanzen entweder auf eine Sephadex LH 20-Säule oder auf eine Dünnschichtplatte (PF<sub>254</sub>) aufgetragen.

**Gewinnung des zellfreien Extraktes.** Die Zellen wurden in 1-l-Flüssigkulturen bei 30°C gezüchtet. Das Minimalmedium enthielt als einzige C-Quelle entweder Glucose, 4-Chlorbenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure oder Benzoesäure. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert und gewaschen; die Zellausbeuten betragen 0,5–1 g/l. Zum Aufschluß wurden die Zellen in der doppelten Menge Puffer suspendiert und beschallt (4 × 30 s mit jeweils 30 s Pause). Die aufgeschlossenen Zellen wurden 30 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Enzymansatz verwendet.

**Enzymansatz.** Der Reaktionsansatz enthielt 2 ml 0,02 M Tris/HCl-Puffer pH 8, 0,5 µM Substrat und 50–100 µl Rohextrakt. Gemessen wurde in Quarzcuvetten mit 1 cm Schichtdicke.

Die Brenzkatechin-1,2-oxygenase wurde nachgewiesen durch Messen der Absorptionzunahme bei 260 nm. Der Nachweis der Protocatechusäure-4,5-oxygenase erfolgte durch Messen der Absorptionzunahme bei 410 nm, dem Maximum des α-Hydroxy-γ-carboxymuconsäuresemialdehyds.

## ERGEBNISSE

### Abbau der 4-Chlorbenzoesäure durch den *Arthrobacter*-Wildstamm

In Vorversuchen wurde das Wachstum auf verschiedenen C-Quellen untersucht.

1. Wachstum auf Chlorbenzoesäuren: 2-Chlorbenzoesäure negativ, 3-Chlorbenzoesäure negativ,

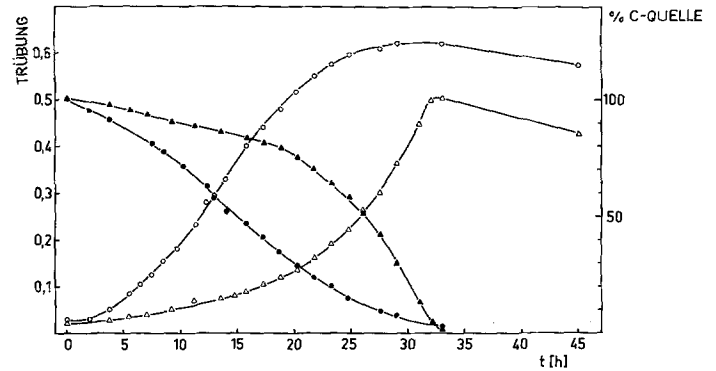


Abb. 1. Wachstum des *Arthrobacter*-Stammes auf 4-Chlorbenzoesäure (Δ) und 4-Hydroxybenzoesäure (○). Abnahme der 4-Chlorbenzoesäure (▲) und 4-Hydroxybenzoesäure (●). Konzentration der C-Quelle jeweils 200 mg/l

3,5-Dichlorbenzoesäure negativ, 4-Chlorbenzoesäure sehr gut. 2. Wachstum auf Hydroxybenzoesäuren: 3-Hydroxybenzoesäure schwach, 4-Hydroxybenzoesäure sehr gut, 3,4-Dihydroxybenzoesäure gut, 3,5-Dihydroxybenzoesäure negativ. 3. Wachstum auf Benzoesäure: sehr gut, trans,trans-Muconsäure negativ, 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure negativ.

Abbildung 1 zeigt das Wachstum des *Arthrobacter*-Stammes auf 4-Chlorbenzoesäure und 4-Hydroxybenzoesäure und dazu die Abnahme dieser Verbindungen.

Das Kulturmedium für die Abbauversuche setzte sich aus dem Mineralsalzmedium und 200 mg 4-Chlorbenzoesäure pro Liter zusammen.

Nach einer Inkubation von etwa 24 h konnte 4-Hydroxybenzoesäure dünn-schichtchromatographisch gut, Protocatechusäure in Spuren nachgewiesen werden. Nach 3 Tagen war die 4-Chlorbenzoesäure vollständig verschwunden. Während der Inkubation sank der pH-Wert des Mediums von pH 6,9 auf pH 6,6.

### Isolierung von 4-Hydroxybenzoesäure

Eine 800-ml-Kultur mit 4-Chlorbenzoesäure als C-Quelle wurde 24 h inkubiert und anschließend aufgearbeitet. Die Auftrennung des Substanzgemisches erfolgte säulenchromatographisch durch Gelfiltration. Von den Fraktionen wurden UV-Spektren aufgenommen.

Die 4-Hydroxybenzoesäure-Fraktion war noch durch 4-Chlorbenzoesäure verunreinigt. Die Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und über die ganze Breite einer präparativen Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Trennung erfolgte im Laufmittelsystem A.

Die Bande der 4-Hydroxybenzoesäure wurde im UV-Licht markiert und der Kieselgelstreifen herausgekratzt. Die Substanz wurde mit Äther extrahiert und nach dessen Verdunsten kristallin erhalten.

### Identifizierung

Authentische 4-Hydroxybenzoesäure: Fp. 211°C. UV-Spektrum (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  255 nm; Phenolatverschiebung (in Wasser): pH 1  $\lambda_{\max}$  255 nm, pH 10  $\lambda_{\max}$  280 nm. Dünnschichtchromatographie: System B:  $R_f$  0,76, System C:  $R_f$  0,15. Isolierte Substanz: Fp. 209°C. Mischschmelzpunkt 210°C. UV-Spektrum (in Äthanol):  $\lambda_{\max}$  255 nm; Phenolatverschiebung (in Wasser): pH 1  $\lambda_{\max}$  255 nm, pH 10  $\lambda_{\max}$  280 nm. Dünnschichtchromatographie: System B:  $R_f$  0,76, System C:  $R_f$  0,15.

Die IR-Spektren von isolierter und authentischer Substanz waren identisch.

### Isolierung von Protocatechusäure

Das Minimalmedium zu diesen Versuchen enthielt 1 g 4-Hydroxybenzoesäure pro Liter als C-Quelle.

Eine 400-ml-Kultur wurde 24 h inkubiert. Die Substanzen wurden durch Gelfiltration getrennt und die Fraktionen durch UV-Spektren identifiziert.

Die noch durch 4-Hydroxybenzoesäure verunreinigten Fraktionen der Protocatechusäure wurden vereinigt, eingengt und nochmals auf die Säule gegeben.

### Identifizierung

Authentische Protocatechusäure: Fp. 198°C. UV-Spektrum in Äthanol:  $\lambda_{\max}$  259 nm, 295 nm; in Wasser pH 7:  $\lambda_{\max}$  250 nm, 290 nm. Dünnschichtchromatographie: System B:  $R_f$  0,64. Isolierte Substanz: Fp. 194°C. Mischschmelzpunkt 196°C. UV-Spektrum in Äthanol:  $\lambda_{\max}$  259 nm, 295 nm; in Wasser pH 7:  $\lambda_{\max}$  250 nm, 290 nm. Dünnschichtchromatographie: System B:  $R_f$  0,64.

Die IR-Spektren von isolierter und authentischer Substanz waren identisch.

Protocatechusäure konnte sowohl aus 4-Hydroxybenzoesäure-Kulturen als auch aus 4-Chlorbenzoesäure-Kulturen isoliert werden.

### Isolierung von cis, cis-Muconsäure

Mehrere 400-ml-Kulturen mit Benzoesäure als C-Quelle (1 g/l) wurden zwischen 1 und 6 Tagen inkubiert.

### Identifizierung

Cis, cis-Muconsäure (Literatur): Fp. 187°C. UV-Spektrum in Äthanol:  $\lambda_{\max}$  262 nm; in Wasser pH 7:  $\lambda_{\max}$  257 nm. Isolierte cis, cis-Muconsäure: Fp. 184°C.

UV-Spektrum in Äthanol:  $\lambda_{\max}$  262 nm; in Wasser pH 7:  $\lambda_{\max}$  257 nm. Dünnschichtchromatographie: System B:  $R_f$  0,7, System C:  $R_f$  0,2.

Die IR-Spektren von isolierter und authentischer Substanz waren identisch.

### Die Aufspaltung des aromatischen Ringes

Die Frage, wie der weitere Abbau des aromatischen Ringes erfolgt, wurde durch den Nachweis der ring-spaltenden Enzyme und ihrer Reaktionsprodukte im zellfreien Extrakt geklärt.

Wurden die Zellen auf 4-Chlorbenzoesäure oder 4-Hydroxybenzoesäure gezüchtet, ließ sich im Rohextrakt mit Protocatechusäure als Substrat die Protocatechusäure-4,5-oxygenase durch die Bildung von  $\alpha$ -Hydroxy- $\gamma$ -carboxymuconsäuresemialdehyd nachweisen. Der Reaktionsansatz färbte sich innerhalb von 3 min grünlich-gelb, das UV-Spektrum der gebildeten Verbindung zeigte ein Maximum bei 411 nm. Protocatechusäure wird also „meta“ gespalten. Brenzkatechin wurde von diesen Extrakten nicht umgesetzt.

Wurden die Zellen auf Benzoesäure gezüchtet, ließ sich nur die Brenzkatechin-1,2-oxygenase nachweisen, Protocatechusäure dagegen wurde nicht umgesetzt. Die Rothera-Reaktion (Ottow u. Zolg, 1974) auf  $\beta$ -Keto adipinsäure verlief positiv. Die Spaltung von Brenzkatechin verläuft also nach dem ortho-Mechanismus, wie auch das Auffinden von cis, cis-Muconsäure im Medium beim Wachstum auf Benzoesäure zeigt.

Extrakte aus Zellen, die auf Glucose gezüchtet worden waren, setzten weder Brenzkatechin noch Protocatechusäure um.

### DISKUSSION

Aus den bisherigen Veröffentlichungen kann man entnehmen, daß die Abspaltung des Halogens bei aromatischen Verbindungen – wenn überhaupt – erst nach der Ringspaltung erfolgt. So baut eine *Pseudomonas* sp. 4-Fluorbenzoesäure über 4-Fluorbrenzkatechin zu 3-Fluormuconsäure ab (Harper u. Blakley, 1971). 2-Fluorbenzoesäure wird entsprechend über 3-Fluorbrenzkatechin in 2-Fluormuconsäure umgewandelt (Goldman et al., 1967). Durch *Pseudomonas fluorescens* entstehen aus 3-Chlorbenzoesäure die in gleicher Menge gebildeten 3-Chlor- und 4-Chlorbrenzkatechine, aus denen 2-Chlor- und 3-Chlormuconsäure gebildet werden (Dorn et al., 1974).

Für 3-Chlorbenzoesäure ist aber auch schon die direkte Substitution am aromatischen Ring durch eine Hydroxylgruppe beschrieben worden. Eine *Pseudomonas* sp. bildet aus 3-Chlorbenzoesäure 3-Hydroxy-

benzoesäure und 3,6-Dihydroxybenzoesäure (Johnston et al., 1972). Auch bei dem hier geschilderten Abbau von 4-Chlorbenzoesäure durch *Arthrobacter* erfolgt ein direkter Austausch von Chlor durch eine Hydroxylgruppe. Die beschriebene *Arthrobacter*-Species kann offensichtlich nur auf 4-Chlorbenzoesäure wachsen und andere Chlorbenzoesäuren nicht verwerten. Da auch 3-Chlor-4-hydroxybenzoesäure nicht metabolisiert wird, scheidet ein NIH-shift beim Abbauvorgang aus (Daly et al., 1972). Es ist bisher nicht bekannt, ob die Fähigkeit zur direkten Eliminierung des Halogens aus Halogenbenzoesäuren in der Natur selten vorkommt oder weit verbreitet ist. Da die direkte Eliminierung zu einer schnellen Entgiftung führt, ist es aber wichtig, diese Frage zu klären. In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung des Mechanismus der Substitution von Halogen durch Hydroxyl von besonderer Bedeutung. Der weitere Abbau der 4-Hydroxybenzoesäure geschieht bei diesem Organismus über Protocatechusäure und eine anschließende Spaltung nach „meta“. Züchtet man den Organismus dagegen auf Benzoesäure, dann erfolgt der Abbau dieser Verbindung auf dem ortho-Spaltungsweg. Vermutlich besitzt die *Arthrobacter*-Species ähnlich wie *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2 (Williams et al., 1974) sowohl den vollständigen ortho- als auch den meta-Abbauweg, wobei je nach Wachstumssubstrat der eine oder der andere Weg beschränkt wird.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie für Unterstützung dieser Arbeit und Herrn Dr. J. Eberspächer für Durchsicht des Manuskripts.

## LITERATUR

- Daly, J. W., Jerina, D. M., Witkop, B.: Arene oxides and the NIH shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds. *Experientia (Basel)* **28**, 1129–1149 (1972)
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W., Knackmuss, H. J.: Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading *Pseudomonad*. *Arch. Microbiol.* **99**, 61–70 (1974)
- Goldman, P., Milne, G. W. A., Pignataro, M. T.: Fluorine containing metabolites formed from 2-fluorobenzoic acid by *Pseudomonas* species. *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 178–184 (1967)
- Harper, D. B., Blakley, E. R.: The metabolism of p-fluorobenzoic acid by a *Pseudomonas* sp. *Canad. J. Microbiol.* **17**, 1015–1023 (1971)
- Johnston, H. W., Briggs, G. G., Alexander, M.: Metabolism of 3-chlorobenzoic acid by a *Pseudomonad*. *Soil Biol. Biochem.* **4**, 187–190 (1972)
- Köcher, H., Lingens, F., Koch, W.: Untersuchungen zum Abbau des Herbizids Chlorphenprop-methyl im Boden und durch Mikroorganismen. *Weed Res.* **16**, 93–100 (1976)
- Ottow, J. C. G., Zolig, W.: Improved procedure and colorimetric test for the detection of ortho- and meta-cleavage of protocatechuate by *Pseudomonas* isolates. *Canad. J. Microbiol.* **20**, 1059–1061 (1974)
- Williams, P. A., Murray, K.: Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bact.* **120**, 416–423 (1974)

Eingegangen am 29. April 1976