



Doctoral Thesis

**Abbau organischer Lösungsmittel mit bakteriellen Misch- und Reinkulturen  
Chemostatexperimente mit den Lösungsmitteln Methanol, Methylenchlorid, Aethanol, n-Propanol, Aceton, n-Butanol und iso-Butanol mit spezieller Berücksichtigung des Acetonstoffwechsels**

**Author(s):**

Bitzi, Urs

**Publication Date:**

1986

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000412774> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8118

ABBAU ORGANISCHER LÖSUNGSMITTEL MIT BAKTERIELLEN  
MISCH - UND - REINKULTUREN

---

Chemostatexperimente mit den Lösungsmitteln Methanol,  
Methylenchlorid, Aethanol, n-Propanol, Aceton, n-Butanol und  
iso-Butanol mit spezieller Berücksichtigung des  
Acetonstoffwechsels

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Technischen Wissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZUERICH

vorgelegt von  
URS BITZI  
Dipl. Lm. Ing. ETH  
geboren am 6.3 1955  
von Luzern und Udligenswil (LU)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. G. Hamer, Referent  
Prof. Dr. J. Bourne, Korreferent

Zürich 1986

**D. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY**

---

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit möglichst einfachen Mischkulturen mehrere organische Lösungsmittel abzubauen. In einfachen Organismensystemen sollte es möglich sein auf die gegenseitige Beeinflussung von Organismen und Substratgemischen eingehen zu können. Die Anreicherungskultur auf den vier Lösungsmitteln Isopropanol, Aceton, Methanol und Methylenchlorid im Chemostaten ergab, dass die zwei Organismen IP und ME für den Abbau aller Substrate verantwortlich waren. Dies entspricht weder den empirischen Erwartungen noch den Vorausagungen mathematischer Modelle aus der Literatur; man erwartet, dass auf  $n$  Substraten  $n$  Organismen im System verbleiben werden.

Der Organismus IP wächst auf Isopropanol oder Aceton in kontinuierlicher und in statischer Kultur, nicht aber auf Methylenchlorid. Methanol wird in Gegenwart von Isopropanol oder Aceton oder Glucose im Chemostaten durch IP ebenfalls metabolisiert. Organismus ME vermag aus dem Lösungsmittelgemisch nur auf Methanol zu wachsen. Werden beide Organismen kombiniert, so verwerten sie in Gegenwart von Isopropanol, Aceton und Methanol ebenfalls das nicht Wachstumssubstrat Methylenchlorid.

Kinetische Experimente mit Misch- und Monokulturen auf Misch- und Einzelsubstraten zeigten annäherndes Uebereinstimmen der Addition von Resultaten aus Fermentationen mit Reinkulturen oder mit Mischpopulationen auf Einzelsubstraten und auf Substratmischungen.

Kleine Differenzen bestehen bei den maximalen Verdünnungsraten, diese sind sowohl beim Wachstum auf Mischsubstraten als auch in Mischkulturen leicht höher. Von praktischem Interesse ist die Beobachtung, dass die Biomassenausbeute  $Y_{X/S}$  in Misch- und in Reinpopulationen mit der Verdünnungsrate gesteuert werden konnte, dies eröffnet die Möglichkeit zur verminderten Klärschlammproduktion in speziellen Abwasserreinigungsanlagen.

Beim Aufnehmen von X-D Diagrammen mit Organismus IP in Reinkultur

auf Aceton oder auf Isopropanol schied IP unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel in Transientzuständen und nahe dem Punkt  $D_c'$ , Methanol und Aethanol in die Kulturfüssigkeit aus. Beide Alkohole verschwanden wieder, wenn ein steady state erreicht werden konnte. In Experimenten kontinuierlicher Kultur, bei konstantem  $D$  und konstanter Einlaufkonzentration an Isopropanol oder Aceton metabolisierte IP das zusätzlich zum Medium beigegebene nicht Wachstumssubstrat Methanol ebenfalls und produzierte dabei, bis zu einem kritischen Mischverhältnis, mehr Biomasse. Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/MeOH}$  für Methanol war bis zu diesem kritischen Mischverhältnis konstant, höhere Methanolanteile führten zu Wandwachstum und Auswaschen der Kultur. Dem energetisch ungünstigeren Wachstumssubstrat Aceton konnte mehr Methanol beigegeben werden, als zu Isopropanol, bis das kritische Mischverhältnis erreicht war. Versuche mit  $^{14}C$  markiertem Methanol ergaben, dass Organismus IP Methanol nicht ins Zellmaterial einbaut, sondern lediglich zu  $CO_2$  oxidiert.

Bei Batch Wachstumsveruchen von IP auf Isopropanol schied der Organismus in der lag Phase Aceton und Methanol in die Kulturfüssigkeit aus, in der folgenden exponentiellen Wachstumsphase verbraucht der Organismus Isopropanol, Aceton und Methanol dann simultan.

Im Chemostaten metabolisierte derselbe Organismus bei den beiden Verdünnungsraten  $D = 0.08 \text{ h}^{-1}$  und  $D = 0.12 \text{ h}^{-1}$  Glucose, Methanol, n-Propanol, n-Butanol, iso-Butanol, Aethanol und Aceton simultan. Diese Experimente wurden folgendermassen ausgeführt: zu dem Gemisch Glucose/Methanol zu Beginn des Versuchs wurde nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes jeweils ein Substrat mehr zum Medium dosiert, dabei sank die Restmethanolkonzentration mit jeder zusätzlichen Mediumskomponente stufenweise ab.

Die Betrachtung der Stoffwechselwege von Organismus IP führte zu folgenden drei Gruppen von Enzymen:

1): Dehydrogenierende Enzyme der Sequenz von Isopropanol zu Pyruvat. Diese Enzyme werden von Isopropanol und Aceton induziert; die Reaktion einer Aceton Monoogxygenase konnte nachgewiesen

werden, sie oxidiert Aceton zu Acetol; die Oxidationssequenz von Isopropanol zu Pyruvat kann von Organismus IP unter Stress umgangen werden, dabei wird Acetol durch eine Ketohydrolase Reaktion in Aethanol und Methanol gespalten, die Regulation dieses Enzyms konnte nicht geklärt werden. Die Induktion der Methylglyoxal Dehydrogenase durch n-Propanol ist ein Hinweis, dass dieser Alkohol ebenfalls durch diesen Stoffwechselweg gehen kann.

2): Enzyme der Methanoldissimilation. Dieser Enzymblock wird beim Wachstum auf Aceton bei hohen und bei tiefen Verdünnungsraten induziert, bei diesen Situationen gehen grössere Acetonanteile über den Bypass der Ketohydrolasereaktion. Methanolgaben zu Wachstumssubstraten wie Glucose oder Aceton induzieren die Enzymsynthese ebenfalls.

3): Enzyme anaplerotischer Reaktionen. Die Phosphoenolpyruvat Synthetase und die Enzyme des Glyoxylsäurezyklus sind konstitutiv vorhanden. n-Butanol und iso-Butanol induzieren die Isocitrat Lyase, das deutet darauf hin, dass iso-C<sub>4</sub> Alkohole und lineare C<sub>4</sub> Alkohole über eine Spaltung in diese anaplerotische Sequenz gelangen können. Das Malat Enzym wird synthetisiert, wenn sich Aceton im Substrat befindet, oder wenn die Konzentration an Restmethanol mehr als 15 mg l<sup>-1</sup> beträgt.

## Summary

The objective of this work was to study mixed cultures using organic solvents and comprising a minimum number of bacterial species. In such systems it is possible to study bacterial interactions with mixed carbon energy substrates. An enrichment culture undertaken in a chemostat using isopropanol, acetone, methanol and methylene chloride as the substrate mixture resulted in a two component (IP and ME) mixed bacterial culture that completely utilised all the four substrates supplied. This result contradicts most experimentally and theoretically derived predictions for multiple carbon energy substrate utilisation, which suggest that the simplest culture that could develop would contain the same number of bacterial species as carbon energy substrates supplied. The bacterium IP grows on isopropanol and/ or acetone in both continuous and batch culture, but does not grow on methylene chloride. When methanol is supplied together with isopropanol, acetone or glucose to cultures of the bacterium IP, it can also be almost completely utilized.

The bacterium ME, when grown on the four carbon energy substrate mixture, utilizes only methanol. However, when the two bacteria, IP and ME are grown with all four carbon energy substrates, all substrates (including methylene chloride) can be completely utilized.

Experiments with mixed and mono-cultures utilizing mixed and single substrates result in essentially the same kinetic constants for the growth processes, thereby suggesting very little interaction. Small differences with respect to the maximum dilution rate, determined in continuous culture exist, such as the when the substrate or culture mixture are used, the maximum specific growth rate is slightly increased. Of particular practical interest, for carbon substrate degradation processes, is the observation that the biomass yield coefficient based on mixed carbon energy substrate utilisation,  $Y_{X/S}$  is growth rate dependent, thereby providing an opportunity for reducing biomass

(sludge) production.

When bacterium IP was grown continuously under stressed conditions, i.e., either very close to wash out or during transient state operation, with either acetone or isopropanol as the carbon energy substrate, both methanol and ethanol were produced as byproducts. These alcohols were utilised when a steady state was re-established. In continuous culture experiments with bacterium IP, either acetone or isopropanol as substrate, constant dilution rate and constant inlet carbon concentration, methanol was utilised and correspondingly more biomass produced. The yield coefficient for methanol was constant when the ratio of methanol to either acetone or isopropanol was below a critical value. This critical value depended on whether acetone or isopropanol was used. Ratios of methanol higher than the critical values, resulted in wall growth and culture wash out. The critical rate was highest in the case of acetone, the bio-energetically poorer substrate. Experiments with  $^{14}\text{C}$  labelled methanol demonstrated that bacterium IP could not assimilate methanol carbon, but co-oxidised it to  $\text{CO}_2$ .

In batch experiments with bacterium IP and isopropanol as sole carbon energy substrate, acetone and methanol were both excreted during the lag phase, but during subsequent exponential growth all three compounds were simultaneously utilized. In the chemostat at dilution rates of  $0.08 \text{ h}^{-1}$  and  $0.12 \text{ h}^{-1}$  the same bacterium utilized glucose, methanol, n-propanol, n-butanol, iso-butanol, ethanol and acetone. When methanol was included in the feed to the chemostat with either one or more of the simultaneously utilised substrates, the residual methanol concentration in the chemostat (and the outflow) was reduced with increasing number of metabolizable substrate.

Investigation of the metabolic pathways of bacterium IP resulted in the identification of three groups of enzymes.

1): Dehydrogenases for the sequence of reactions involved in the

conversion of isopropanol to pyruvate. These enzymes are induced by both isopropanol and acetone. Acetone monooxygenase activity was detected, which results in the oxidation of acetone to acetol. When bacterium IP was subjected to stress, of the the type mentioned above, it could bypass the sequence of reactions from isopropanol to pyruvate in the following way; acetol was cleaved by a ketohydrolase into ethanol and methanol, but the regulation of this enzyme system could not be determined. The induction of the methylglyoxal dehydrogenase by n-propanol suggests that this alcohol is also metabolised by the same pathway.

2): Enzymes for methanol dissimilation. This group of enzymes is induced by growth on acetone at both low and high dilution rates. In this situation, a large fraction of the methanol is diverted into the bypass reactions governed by ketohydrolase. Addition of methanol, when the bacterium IP was growing on either glucose or acetone also resulted in similar enzyme induction.

3): Enzymes of anaplerotic reactions. The phosphoenolpyruvate synthetase and the enzymes of the glyoxylic acid cycle are constitutive. n-Butanol and iso-butanol both induced isocitrate lyase, indicating that iso-C<sub>4</sub> alcohols and linear C<sub>4</sub> alcohols were cleaved and thereby enter the anaplerotic sequence. The malic enzyme is synthesized when either acetone is present in the substrate or when the residual methanol concentration exceeds 15 mg l<sup>-1</sup>.