

Diss. ETH Nr. 11799

Dichlormethan als acetogenes Substrat für eine
anaerobe Mischkultur und für *Dehalobacterium*
formicoaceticum gen. nov. sp. nov.

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE

ZÜRICH

vorgelegt von

ANDREAS MÄGLI

Dipl. Biologie II, Universität Basel

geboren am 5. September 1967

von Oberbipp (BE) und Basel

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. T. Leisinger, Referent

Prof. Dr. P. Dimroth, Korreferent

Zürich 1996

Zusammenfassung

Die Verwendung halogenierter, aliphatischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequellen für aerobe Bakterien ist gut dokumentiert, aber die Verwendung einer Verbindung dieser Klasse als Wachstumssubstrat für ein strikt anaerobes Bakterium wurde bisher nur für Chlormethan beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine schnellwachsende, strikt anaerobe Zweikomponenten-Kultur untersucht, die Dichlormethan als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet. In Medium mit 1 mM Sulfat wuchs diese Mischkultur mit einer Verdoppelungszeit von 20 h und setzte 4.86 mM Dichlormethan innert 7 Tagen zu 9.00 mM Chlorid, 0.61 mM Acetat, 2.06 mM Kohlenstoff in Biomasse und Spuren Mengen von Formiat um. Eine Komponente der Kultur, Stamm DMB, wurde als heterotropher Sulfatreduzent charakterisiert und durch 16S rDNA Sequenzanalyse als *Desulfovibrio* sp. bestimmt. Die andere Komponente, Stamm DMC, wurde zuerst in Cokultur mit *Acetobacterium woodii* bzw. *Methanospirillum hungatei* gebracht. Stamm DMC konnte schliesslich unter Verwendung von Filtrat einer Reinkultur von Stamm DMB in Reinkultur isoliert werden. Nach mehreren Subkultivierungen in Flüssigmedium war Stamm DMC nicht mehr auf den Zusatz von Kulturfiltrat angewiesen und war in der Lage, in definiertem Medium mit Dichlormethan als Substrat zu wachsen. Dabei wurden 4.73 mM Dichlormethan innert 12 Tagen zu 9.74 mM Chlorid, 1.44 mM Formiat, 0.77 mM Acetat, 0.06 mM Pyruvat und 1.29 mM Kohlenstoff in Biomasse umgesetzt. Die Wiederfindungsrate von Kohlenstoff betrug 94%, diejenige der Elektronen 78%. Es wurden eine minimale Verdoppelungszeit von 52 h und eine maximale Dehalogenierungs-Aktivität von $0.0982 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg Protein})^{-1}$ beobachtet, beides bei pH 7.0 und einer Temperatur von 34°C.

Von 50 getesteten potentiellen Substraten und Substratkombinationen ermöglichte lediglich Dichlormethan das Wachstum von Stamm DMC. Der Organismus konnte Sulfat, Sulfit, Thiosulfat, Nitrat oder Fumarat nicht als Elektronenakzeptoren verwerten. Stamm DMC ist ein unbewegliches, gram-positives Stäbchen mit einer durchschnittlichen Länge von 1.8 μm und einem Durchmesser von 1.1 μm . Der Organismus bildet keine Sporen, und er hat einen DNA G+C-Gehalt von 42.7%. Eine

phylogenetische Analyse der 16S rDNA-Sequenz zeigte, dass Stamm DMC zum *Clostridium/Bacillus*-Subphylum der gram-positiven Bakterien gehört und die höchste Sequenzhomologie (89%) mit *Desulfotomaculum orientis* und *Desulfitobacterium dehalogenans* aufweist. Aufgrund dieser phylogenetischen Position und des aussergewöhnlichen Substratspektrums wurde Stamm DMC in eine neue Art und eine neue Gattung eingeteilt, die den Namen *Dehalobacterium formicoaceticum* erhielt. Dies ist der erste bekannte Organismus, der fermentativ mit Dichlormethan als Substrat zu wachsen vermag.

Aktivitäten der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase, Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase, Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase waren in Zellextrakten nachweisbar, während die Methenyl-Tetrahydrofolat-Cyclohydrolase und die Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase nicht nachweisbar waren. Die Dehalogenierungs-Aktivität ging bei der Herstellung von Zellextrakten verloren, konnte aber in Zellsuspensionen erhalten werden. Sauerstoff und Reagenzien, die mit Thiol-Gruppen reagieren, bewirkten eine irreversible, Propyljodid eine reversible Inhibition der Dehalogenierungs-Aktivität. Aus diesen Beobachtungen ergeben sich 2 mögliche Hypothesen für den Stoffwechsel von Dichlormethan in *D. formicoaceticum*: 1) Umsetzung von Dichlormethan zu Methylen-Tetrahydrofolat, das dann über den Acetyl-CoA-Weg einerseits zu Formiat andererseits zur Methylgruppe von Acetat metabolisiert wird oder 2) Umsetzung von 2 Mol Dichlormethan zu Methylen-Tetrahydrofolat – das dann zu Formiat oxidiert wird – und parallel dazu, reduktive Umsetzung von einem Mol Dichlormethan zu einer an das Corrinoid-Protein des Acetyl-CoA-Weges gebundenen Methylgruppe.

Abstract

The utilization of halogenated aliphatics as carbon and energy sources by aerobic bacteria is well documented but the only compound of this class known to be used as a growth substrate by a strictly anaerobic bacterium is chloromethane.

In this work a fast growing, strictly anaerobic two-component culture was analyzed which utilizes dichloromethane as source of carbon and energy. In medium containing 1 mM sulfate, this mixed culture grew with a doubling time of 20 h and transformed 4.86 mM dichloromethane within 7 days to 9.00 mM chloride, 0.61 mM acetate, 2.06 mM carbon in biomass and trace amounts of formate. One component of the culture, strain DMB, was characterized as a heterotrophic sulfate reducer and identified by 16S rDNA analysis as a *Desulfovibrio* sp. The other component, strain DMC, was first associated in coculture with *Acetobacterium woodii* or *Methanospirillum hungatei* respectively. Strain DMC was finally isolated in pure culture using culture filtrate of a pure culture of strain DMB as growth supplement. After several transfers in liquid medium strain DMC was no longer dependent on culture filtrate and was able to grow in defined medium with dichloromethane as the source of carbon and energy. It thereby converted 4.73 mM dichloromethane to 9.74 mM chloride, 1.44 mM formate, 0.77 mM acetate, 0.06 mM pyruvate, 0.06 pyruvate and 1.29 mM carbon in biomass within 12 days. Carbon recovery amounted to 94%, electron recovery to 78%. A minimal generation time of 52 h and a maximal dehalogenation activity of $0.0982 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$ were observed, both at pH 7.0 and a temperature of 33°C.

Of 50 potential substrates and combinations of substrates tested only dichloromethane supported growth of strain DMC. The organism could not utilize sulfate, sulfite, thiosulfate, nitrate and fumarate as electron acceptors. Strain DMC is a non-motile, non-spore-forming, gram-positive rod with an average cell length of 1.8 μm and an average cell diameter of 1.1 μm . The organism has a DNA G+C content of 42.7%. A phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequence revealed that strain DMC groups within the *Clostridium/Bacillus* subphylum of gram-positive bacteria and exhibits the highest levels of sequence similarity (89%) with *Desulfotomaculum orientis*

and *Desulfitobacterium dehalogenans*. Due to this phylogenetic position and the unique substrate range strain DMC was assigned to a new genus and a new species which was named *Dehalobacterium formicoaceticum*. This is the first known organism able to grow fermentatively with dichloromethane as substrate.

Cell extracts were found to contain carbon monoxide dehydrogenase, methylene tetrahydrofolate dehydrogenase, formyl tetrahydrofolate synthetase and hydrogenase activities, whereas activities of methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase and methylene tetrahydrofolate reductase were not detectable. Activity for dehalogenation of dichloromethane was lost on preparation of cell extracts, but was maintained in cell suspensions. Oxygen and reagents that react with thiol groups led to irreversible inhibition and propyl iodide led to reversible inhibition of dehalogenation. These observations lead to two alternative hypotheses for the metabolism of dichloromethane by *D. formicoaceticum*: 1) conversion of dichloromethane to methylene tetrahydrofolate, which gives rise to both formate, and the methyl group of acetate or 2) conversion of two molecules of dichloromethane to methylene tetrahydrofolate, which is oxidized to formate, and in parallel reductive dehalogenation of one dichloromethane to the methyl group of the corrinoid-protein involved in acetate formation.