



Doctoral Thesis

Biochemical and physiological characterisation of a bacterial isolate able to grow with EDTA and other aminopolycarboxylic acids

Author(s):

Witschel, Anna Margarete

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-002025121> →

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 No. 12967

**Biochemical and physiological characterisation of a
bacterial isolate able to grow with EDTA and other
aminopolycarboxylic acids**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
ANNA MARGARETE WITSCHERL
Dipl. Biotech. (Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg)
born March 22, 1969 in Würzburg, Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A.J.B. Zehnder, examiner
Prof. Dr. R. Bachofen, co-examiner
PD Dr. T. Egli, co-examiner

Zürich, 1999

Summary

Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) is a complexing agent widely used in industrial production processes and a variety of industrial and domestic products. In engineered and natural systems EDTA is rather persistent and, in particular, almost not subject to biodegradation. Nevertheless, a Gram-negative bacterium (strain DSM 9103) was isolated in our laboratory which is able to mineralise EDTA. The biochemistry of EDTA breakdown in this bacterium as well as EDTA utilisation in presence of alternative substrates was investigated to get a basic understanding of the bacterial metabolism of this chemical and some information essential for a future application of the strain in the treatment of EDTA-containing wastewaters.

Examination of the uptake of ^{14}C -labeled EDTA in cells of strain DSM 9103 revealed a transport mechanism which relies on an inducible, rather specific and energy-dependent carrier. From cell-extracts a two-enzyme system involved in EDTA breakdown was purified and characterised. It consisted of an EDTA monooxygenase (EDTA-MO) which catalysed the oxidative removal of two acetyl groups from the EDTA molecule resulting in the formation of N,N'-ethylenediaminediacetate (N,N'-EDDA) and two molecules of glyoxylate. EDTA-MO required molecular oxygen and reduced FMN, the latter being provided by the second enzyme of the system, a $\text{NADH}_2\text{:FMN}$ oxidoreductase.

N,N'-EDDA was further degraded in both the membrane and the cytosolic fraction of cells of strain DSM 9103. An acetyl moiety was removed in the form of glyoxylate, probably leaving ethylenediaminemonoacetate. Apparently, this reaction was catalysed by a dehydrogenase. The presence of N,N'-EDDA dehydrogenase activity in the soluble and the particulate protein fraction can be explained either by the existence of two distinct enzymes or by an artefact during cell breakage.

Speciation of EDTA affected both its transport and its transformation by EDTA-MO, although in different ways. While only free EDTA and complexes with low stability (MgEDTA , BaEDTA , CaEDTA and MnEDTA ; all having a $\text{LogK} < 14$) were taken up no such relationship was found for EDTA-MO activity. The preferred substrate of

EDTA-MO was MgEDTA, followed by ZnEDTA, MnEDTA and CoEDTA, whereas free EDTA and CaEDTA were not accepted.

[S,S]-ethylenediaminedisuccinate ([S,S]-EDDS), a structural isomer of EDTA which is proposed to replace EDTA in some applications, also supported growth of strain DSM 9103. Its breakdown, however, proceeded via a pathway clearly distinct from EDTA metabolism. The first enzyme of this pathway, a lyase, was purified. It catalysed the non-oxidative cleavage of [S,S]-EDDS yielding fumarate and N-(2-aminoethyl) aspartic acid.

In addition, strain DSM 9103 was able to grow with further compounds structurally related to EDTA, such as nitrilotriacetate (NTA), iminodiacetate (IDA) and N,N'-EDDA. During batch cultivation EDTA was consumed together with several alternative substrates (fumarate, [S,S]-EDDS, N,N'-EDDA or NTA) and only IDA inhibited its utilisation resulting in a diauxic growth pattern. In a carbon-limited chemostat culture, however, both EDTA and IDA were degraded simultaneously. Pulses of an alternative substrate (fumarate, IDA or [S,S]-EDDS) in an EDTA-limited continuous culture did not result in the repression of EDTA consumption as long as the added substrate was detectable in the culture liquid. However, immediately after its completion EDTA started to accumulate in the chemostat. Possibly, the pulsed substrate was used for the generation of energy and reducing equivalents required for the first steps in EDTA breakdown. Hence, energy and reducing equivalents became scarce when the added substrate was exhausted leading to the observed reduction of EDTA utilisation. Accordingly, EDTA degradation seems not to be greatly hampered by the presence of alternative substrates but the inflexibility of strain DSM 9103 in adaptation to a new substrate spectrum has to be considered when using the isolate for the treatment of EDTA-containing wastewater.

Zusammenfassung

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bildet mit den meisten Metallionen sehr stabile Komplexe und wird aufgrund dieser Eigenschaft in vielen industriellen Prozessen und Produkten eingesetzt. EDTA ist in Kläranlagen und in der Natur recht persistent und insbesondere wird es biologisch kaum abgebaut. Es gelang dennoch, ein Bakterium (Stamm DSM 9103) zu isolieren, welches in der Lage ist, EDTA vollständig zu mineralisieren. Die Biochemie des EDTA-Metabolismus in diesem Bakterium sowie der Abbau des Komplexbildners in Anwesenheit anderer Substanzen wurden nun untersucht, um grundlegende Informationen über Abbauege und Regulation des Abbaus zu erhalten, die unter anderem für einen möglichen Einsatz des Stammes zur Reinigung EDTA-haltiger Abwässer benötigt werden.

Untersuchungen zum Metabolismus von EDTA ergaben, daß ^{14}C -markiertes EDTA mit Hilfe eines induzierbaren, sehr spezifischen und energieabhängigen Transportsystems in die Zellen transportiert wird. Das Enzymsystem, welches für den EDTA-Abbau verantwortlich ist, wurde aus zellfreien Extrakten isoliert und anschließend charakterisiert. Es bestand aus einer EDTA-Monooxygenase (EDTA-MO), die die oxidative Abspaltung zweier Acetylreste vom EDTA-Molekül katalysierte, wobei N,N'-Ethylendiamindiacetat (N,N'-EDDA) und zwei Moleküle Glyoxylat freigesetzt wurden. Diese Reaktion konnte nur in Anwesenheit von reduziertem FMN ablaufen, welches durch das zweite Enzym des Systems, einer NADH₂:FMN Oxidoreduktase, zur Verfügung gestellt wurde.

Der weitere Abbau von N,N'-EDDA konnte sowohl in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion der Zellen beobachtet werden. Es wurde wiederum ein Acetylrest in Form von Glyoxylat abgespalten, und wahrscheinlich Ethylendiaminmonoacetat gebildet. Es ist anzunehmen, daß diese Reaktion von einer Dehydrogenase katalysiert wurde, wobei das Auffinden dieser Aktivität in der löslichen und der partikulären Proteinfraction entweder auf die Existenz zweier unterschiedlicher Enzyme hinweist oder Folge eines Artefakts beim Zellaufschluß sein könnte.

Die Speziierung des EDTAs beeinflusste sowohl den Transport des Komplexbildners als auch dessen enzymatischen Abbau durch die EDTA-MO. Die Aufnahme

verschiedener EDTA-Chelate hing von deren Stabilität ab, und nur instabile Komplexe (MgEDTA, BaEDTA, CaEDTA und MnEDTA, $\text{Log}K < 14$) wurden in die Zellen transportiert. Eine vergleichbare Abhängigkeit von der Stabilität wurde auf Enzymebene nicht festgestellt. Bevorzugtes Substrat der EDTA-MO war MgEDTA gefolgt von ZnEDTA, MnEDTA und CoEDTA, während freies und Ca-komplexiertes EDTA nicht umgesetzt wurden.

[S,S]-Ethyldiamindisuccinat ([S,S]-EDDS), ein Strukturisomer des EDTA Moleküls, welches in Zukunft EDTA in einigen Anwendungen ersetzen soll, war auch ein Wachstumssubstrat des Stammes DSM 9103, doch seine Umsetzung verlief über einen anderen Abbauweg. Eine Lyase wurde gereinigt, die die nicht-oxidative Initialspaltung des [S,S]-EDDS Moleküls katalysierte. Die Produkte dieser Reaktion waren Fumarat und N-(2-Aminoethyl)-Aspartat.

Zusätzlich wuchs das Isolat DSM 9103 noch mit weiteren, chemisch verwandten Komplexbildnern wie Nitrilotriacetat (NTA), Iminodiacetat (IDA) und N,N'-EDDA. Während des Wachstums in Batchkultur baute der Stamm EDTA gleichzeitig mit verschiedenen anderen Substraten (Fumarat, NTA, N,N'-EDDA oder [S,S]-EDDS) ab, und nur IDA unterdrückte unter diesen Bedingungen die Verwendung von EDTA. Wurde der Stamm allerdings in kohlenstofflimitierter kontinuierlicher Kultur gezüchtet, so konnte er IDA und EDTA gleichzeitig umsetzen. Pulse verschiedener Verbindungen (Fumarat, IDA oder [S,S]-EDDS) in eine EDTA-limitierte Chemostatkultur hatten keinen Einfluß auf den EDTA-Abbau, solange das zugegebene Substrat in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Doch sobald dieses aufgebraucht worden war, begann EDTA im Chemostaten zu akkumulieren. Wahrscheinlich verwendeten die Zellen das zugepulste Substrat, um Energie und Reduktionsäquivalente zu erzeugen, die wiederum für die ersten EDTA-Abbauschritte eingesetzt werden konnten. In dem Moment, wo das zugegebene Substrat aufgebraucht war, wurden folglich Energie und Reduktionsäquivalente knapp, was möglicherweise zur beobachteten Reduktion des EDTA Abbaus führte. Der EDTA-Abbau scheint folglich durch die Anwesenheit weiterer Substrate kaum beeinflusst zu werden, aber die beobachtete geringe Flexibilität des Stammes, sich schnell auf ein verändertes Substratangebot einzustellen, muß bei einer möglichen

Entwicklung eines Abwasserreinigungsverfahrens unter Verwendung dieses Isolats berücksichtigt werden.