

Phosphonat-Recycling

Biologischer Abbau von Aminophosphonaten

RAMONA RIEDEL, FABIAN COMMICHAU, DIRK BENNDORF, MARION MARTIENSSEN
INSTITUT FÜR UMWELTWISSENSCHAFTEN UND UMWELTECHNIK, BTU COTTBUS-
SENFTENBERG

Application of commercial aminophosphonates such as glyphosate (GS) or chelating agents in detergent are daily used at large scale worldwide. Only little is known about the potential biodegradation of the latter. Here we describe the characterization of the new strain *Ochrobactrum* sp. BTU1 isolated from a LC/MS standard solution. The strain is capable to degrade all investigated aminophosphonates including GS.

DOI: 10.1007/s12268-024-2179-9
© Die Autorinnen und Autoren 2024

■ Synthetische Aminophosphonate, wie Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) (EDTMP), werden seit Mitte der 1970er-Jahre des vergangenen Jahrhunderts verstärkt zur Unterbindung von Metallausfällungen in verschiedenen Sektoren eingesetzt. So dienen sie bspw. in Bleichen zur deren Stabilisierung, vermindern Kalkablagerungen in Waschmaschinen und sind ein wichtiger Bestandteil von Antiscaling-Produkten für Membranfiltrationsprozesse. Phosphonate zeichnen sich durch ihre hohe Produktstabilität und minimalen Einsatzmengen gegenüber Konkurrenzprodukten aus.

EDTMP wird über Waschmittel in das kommunale Abwasser eingetragen, wo dessen Eliminationsraten unvollständig sind [1, 2]. Somit werden Phosphonate wie EDTMP kontinuierlich in die aquatische Umwelt eingetragen. Prognosen über das Umweltverhalten von EDTMP können aktuell nur vage getroffen werden, da über den biologischen Abbau sehr wenig bekannt ist [3].

Im Gegensatz zum weitestgehend aufgeklärten biologischen Abbau von Glyphosat (siehe auch Beitrag auf S. 273 in diesem Heft, [4]) ist zum biologischen Abbau von EDTMP und weiteren Aminophosphonaten nur sehr wenig bisher bekannt. Wir haben einen neuen Stamm isoliert, der das Potenzial zum biologischen Abbau von synthetischen Aminophosphonaten wie EDTMP aufweist. In unserer Studie haben wir deshalb

den enzymatischen Abbauweg mittels Genom- und Proteom-Analyse genauer untersucht.

Biologischer Abbau ausgewählter Aminophosphonate

Wir haben mit unserem neu entwickelten Abbautest (siehe Beitrag auf S. xy in diesem Heft, [5]) biologische Abbauprozesse mit dem Stamm *Ochrobactrum* sp. BTU1 und den Aminophosphonaten GS, EDTMP, Aminomethylphosphonsäure (AMPA), Iminodi(methylenphosphonsäure) (IDMP) sowie Ethylaminobis(methylenphosphonsäure) (EABMP) durchgeführt. Die drei letztgenannten Substanzen haben wir zusätzlich mit untersucht, da sie typische Abbauprodukte von EDTMP während des photolytischen Abbaus sind [6].

Tabelle 1 Wachstumsraten vom Stamm *Ochrobactrum* sp. BTU1 aus dem biologischen Abbau auf unterschiedlichen Aminophosphonaten.

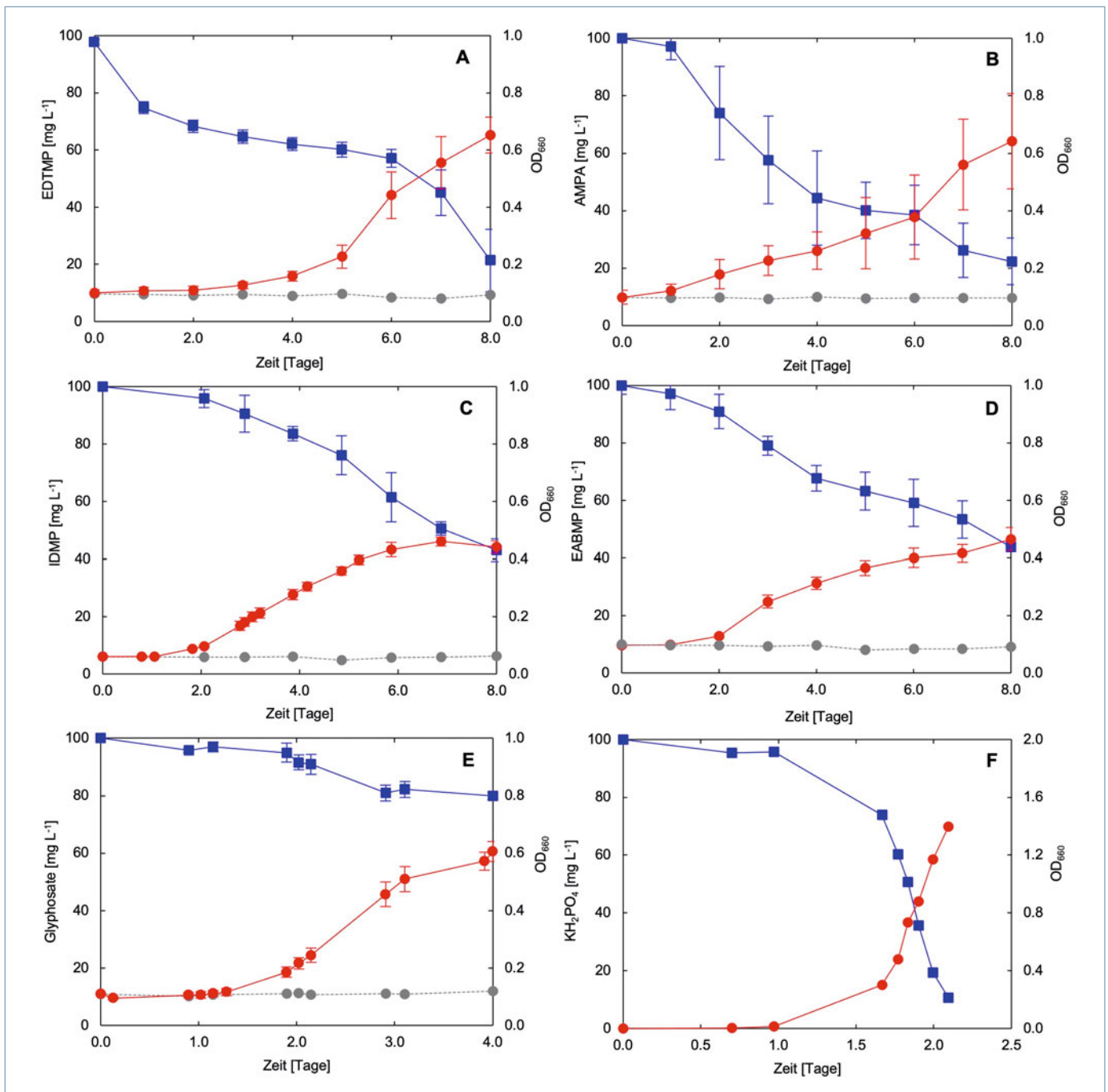
P-Quelle	μ_{\max} [d ⁻¹]	$t_{1/2}$ [h]	P/S* [-]
GS	0.54 ± 0.09	30.7 ± 4.4	0.36 ± 0.1
EDTMP	0.56 ± 0.08	30.3 ± 4.0	0.37 ± 0.1
AMPA	0.80 ± 0.09	20.9 ± 2.1	0.57 ± 0.1
IDMP	0.72 ± 0.07	23.3 ± 2.4	0.58 ± 0.1
EABMP	0.65 ± 0.09	25.9 ± 3.8	0.56 ± 0.1
KH ₂ PO ₄	1.55 ± 0.18	11.0 ± 1.4	-

* Verhältnis der Verdopplungszeit $t_{1/2}$ der Positivkontrolle (P) zum jeweiligen Substrat (S)

Unsere Ergebnisse belegen, dass der Stamm grundsätzlich auf allen untersuchten Aminophosphonaten wachsen kann (Abb. 1). Die Phosphonate dienten dabei als einzige P-Quelle. Der Stamm wies für die unterschiedlichen Phosphonate unterschiedlich lange lag-Phasen auf. Die kürzeste lag-Phase verzeichneten wir für AMPA und Glyphosate, die längste für EDTMP. Um das Wachstum besser beschreiben zu können, haben wir die bakteriellen Wachstumsraten und Verdopplungszeiten auf den unterschiedlichen Strukturen ermittelt (Tab. 1). Für AMPA haben wir die höchste Wachstumsrate μ_{\max} und dementsprechend die niedrigste Verdopplungszeit $t_{1/2}$ ermittelt. Für EDTMP und überraschenderweise auch für Glyphosat haben die niedrigste Wachstumsrate und korrespondierend die höchste Verdopplungszeit bestimmt. Insgesamt konnten wir folgende Abfolgen von kürzester zur längster Verdopplungszeit feststellen: AMPA < IDMP < EABMP < EDTMP < GS.

Genomanalyse

Unsere Genomsequenzierung ergab, dass der Stamm insgesamt vier Chromosomen aufweist, deren GC-Gehalt bei allen vier jeweils über 50 % liegt. Das Genom von *Ochrobactrum* sp. BTU1 enthält insgesamt 5.485 Gene, darunter 5.292 proteincodierende Gene und 100 Pseudogene. Die Analyse ergab ferner, dass der Stamm das *phn-Operon* (C-P-Lyase) sowie akzessorische Gene und das *sox-Operon* besitzt. Letzteres ist für die Oxidation von Sarcosin erforderlich, welches als



▲ **Abb. 1:** Abbaustest von 100 mg L⁻¹ verschiedener Aminophosphonate mit dem Stamm *Ochrobactrum sp. BTU1*. Blaue Kurve repräsentiert das jeweilige Phosphonat. Rote Kurven repräsentieren die Wachstumskurven ermittelt als optische Dichte (OD). Grau gestrichelte Kurven repräsentieren die OD-Kurven der Negativkontrolle ohne P-Zugabe.

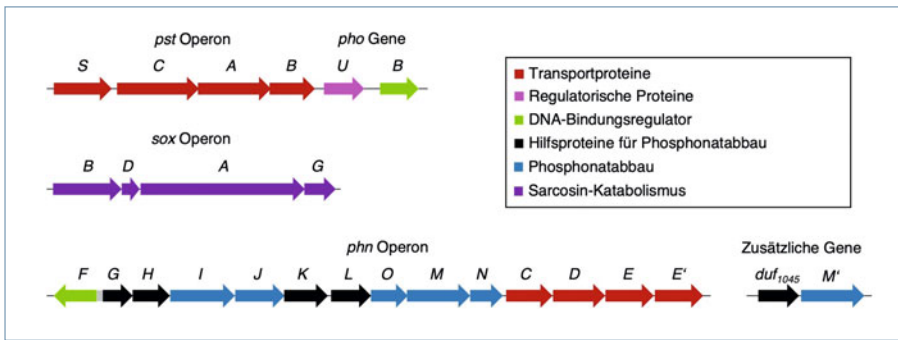
Schlüsselmetabolit während des Glyphosat-Abbaus unter bestimmten enzymatischen Voraussetzungen entsteht.

Die weitere Auswertung der genomischen Daten zeigten, dass die Gene für die C-P-Lyase, Sarcosine-Oxidase und Phosphat-Transporter alle auf Chromosom 1 liegen (**Abb. 2**). Somit bestätigt die Genomanalyse, dass der Stamm grundsätzlich den C-P-Lyase-Multi-Enzymkomplex in seinem genomischen

Arsenal trägt und somit potenziell in der Lage ist, Aminophosphonate wie AMPA und Glyphosat abzubauen. Die Ergebnisse der Genom-Analyse erklären jedoch nicht zwingend, dass der Stamm ebenfalls auf EDTMP, IDMP sowie EABMP wachsen kann. Darüber hinaus erklären diese Ergebnisse auch nicht die unterschiedlichen Wachstumsraten, die wir für die getesteten Aminophosphonate bestimmt haben.

Proteomik-Analyse des Stamms *Ochrobactrum sp. BTU1*

Auf der Grundlage der Genomsequenz konnten wir Proteine identifizieren, die den entsprechenden Genen und genomischen Loci zugeordnet sind. Die Tatsache, dass die Proteine des Phosphataufnahmekomplexes PstSCAB im Proteom angereichert waren, beweist, dass die Bakterien unter Phosphatmangel litten. Zudem wurde das C-P-Lyase-



▲ **Abb. 2:** Organisation der Gene des C-P-Lyase-, Sarcosinoxidase- und Phosphattransporter-Komplexes in *Ochrobactrum* sp. BTU1. Das pstSCAB-Operon, die phoU- und phoB-Gene, das sox-Operon, der phnGHJKLOMNCDEE'-Gencluster und das duf1045-phnM'-Operon befinden sich auf Chromosom 1. Die Nomenklatur für die phn-Gene, die den C-P-Lyase-Pfad codieren, wurde von Hove-Jensen *et al.* übernommen [4].

System nachgewiesen, welches für die Aufnahme und dem Abbau von Aminophosphonaten offensichtlich verantwortlich ist. In den Proteomen von *Ochrobactrum* sp. BTU1 lag das C-P-Lyase-System während der Kultivierung mit GS, EDTMP, AMPA, IDMP und EABMP immer überproduziert vor.

Darüber hinaus lag auch zusätzlich zum C-P-Lyase-Enzymkomplex alle Komponenten des Sarcosin-Oxidase-Komplexes überproduziert vor, wenn der Stamm mit GS als einziger Phosphatquelle kultiviert wurde. Interessanterweise trat eine Überexpression aller vier Sarcosin-Oxidase-Untereinheiten nur dann auf, wenn der Stamm *Ochrobactrum* sp. BTU1 auf GS angesetzt wurde. Daher können wir bestätigen, dass der GS-Abbau durch die C-P-Lyase über den Sarcosin-Weg gefördert wird.

Im Gegensatz dazu trat eine Überproduktion von Duf1045, eine Zwei-Histidin-Phosphodiesterase, bei allen Aminophosphonaten außer GS auf. Somit scheint Duf1045 ausschließlich am Abbau von EDTMP, AMPA, IDMP und EABMP beteiligt zu sein. Eine unterschiedliche Überproduktion von Schlüsselenzymen wie Sarcosin-Oxidase und Duf1045 sowie unterschiedliche Abbau- und Wachstumsraten könnten darauf hinweisen, dass die anfängliche Spaltung von GS und den anderen vier Aminophosphonaten unterschiedlich verläuft.

Für den Abbau von GS muss die Spaltung der C-P-Bindung der erste Schritt sein, der für *Ochrobactrum* sp. BTU1 nachweislich über den Sarkosin-Abbauweg abläuft. Im Gegensatz dazu scheint die initiale Spaltung der anderen vier untersuchten Aminophosphonate an der C-N-Bindung aufzutreten. Die Expression von Proteinen wie Duf1045 und andere mit unbekannter Funktion weisen stark auf einen noch unbekanntem Weg hin, der am Abbau dieser komplexeren Aminophosphonate beteiligt sein könnte.

Somit bestätigen unsere Ergebnisse der kombinierten Genom- und Proteomanalysen, dass die Enzyme des Multienzymkomplex der C-P-Lyase maßgeblich am Abbau von den hier untersuchten Aminophosphonaten beteiligt sind. Sie belegen aber auch, dass höchstwahrscheinlich unterschiedliche initiale Spaltungsmechanismen für den Abbau von GS einerseits und für EDTMP, AMPA, IDMP und EABMP andererseits vorliegen müssen. Dies könnte auch erklären, warum der biologische Abbau von komplexeren Aminophosphonaten wie EDTMP bisher nicht allein über das C-P-Lyase-System beschrieben werden konnte. ■

Literatur

[1] Armbruster D, Rott E, Minke R *et al.* (2020) Trace-level determination of phosphonates in liquid and solid phase of wastewater and environmental samples by IC-ESI-MS/MS. *Ana Bioanal Chem* 412: 4807–4825

- [2] Rott E, Steinmetz H, Metzger JW (2018) Organophosphonates: A review on environmental relevance, biodegradability and removal in wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*: 615: 1176–1191
- [3] Nowack B (2003) Environmental chemistry of phosphonates. *Water Res* 37: 2533–2546
- [4] Hove-Jensen B, Zechel D, Jochimsen B (2014) Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 176–197
- [5] Riedel R, Krahl K, Buder K *et al.* (2023) Novel standard biodegradation test for synthetic phosphonates. *J Microbiol Methods* 212: 106793
- [6] Kuhn R, Tóth E, Geppert H *et al.* (2017) Identification of the complete photodegradation pathway of ethylenediaminetetra(methylenephosphonic acid) in aquatic solution. *Clean Soil Air Water* 45: 1–8

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Ramona Riedel (links), Fabian Commichau



Dirk Benndorf (links), Marion Martienssen

Korrespondenzadresse:

Dr.-Ing. Ramona Kuhn
 Brandenburgische Technische Universität
 Cottbus-Senftenberg
 Institut für Umweltwissenschaften und
 Umwelttechnik
 Lehrstuhl Biotechnologie für Wasseraufbereitung
 Siemens-Halske-Ring 8
 D-03046 Cottbus
 Ramona.riedel@b-tu.de