

# **Mikrobieller Phenanthrenabbau mit Tensidzusatz**

**Von dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
- Dr. rer. nat. -**

**genehmigte DISSERTATION  
von**

**Dipl.-Biol. Christopher Schippers  
geboren am 11. November 1966, in Ahaus, Nordrhein-Westfalen**

**1999**

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
**Korreferent:** Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl  
**Tag der Promotion:** 11. Oktober 1999

---

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit vom Juli 1994 bis Dezember 1997 am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster sowie am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas SCHEPER durchgeführt. Ich möchte mich bei ihm besonders für die gebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die Gewährung eines sehr weiträumigen Forschungsfreiraumes und die großzügige Unterstützung, die sich nicht nur auf die Doktorarbeit beschränkte, bedanken. Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl SCHÜGERL danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und des Instituts für Technische Chemie für die stete Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und den freundlichen Umgang.

Mein besonderer Dank gilt dabei ...

- ... Frau PD Dr. Gerlinde KRETZMER für Ihre stete Hilfsbereitschaft als „guter Geist des Neubaus“.
- ... Nicole BUSCH, Karen GEBNER, Miriam MENGE und Torsten MÜLLER für Ihr Engagement während Ihrer Diplomarbeiten, welches besonders bei den drei letztgenannten außergewöhnlich hoch war.
- ... Astrid HOPPENSACK, Dorothea KORTE, Axel MICHALKE, Thorsten NITZ und besonders Bernhard SCHWARZ für Ihren Einsatz im Rahmen von unterschiedlichen Praktika.
- ... Herrn Dr. Jens-Michael HILMER und Herrn Stefan MAROSE für die Durchführung der Fluoreszenzmessungen, die sich als sehr aufschlußreich erwiesen.
- ... Herrn Dr. Ivo HAVLIK und besonders Herrn Dr. Michael DORS für die Unterstützung in Rechnerfragen, vor allen Dingen für die Installation des RISP-Systems und Ihrem großen Einsatz bei der Lösung damit auftretender Probleme.
- ... Bernhard COCHANSKI, Wilhelm BENSEN, Thorsten STREMPPEL, Michael MUTHESIUS und Burkthardt PROBST für Ihre Hilfe zur Überwindung mechanischer oder elektronischer Schwierigkeiten.
- ... Herrn Hans-Joachim DANIEL vom Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart für die Zusendung der Sophoroselipidmischung.
- ... Herrn Matthias LEHMANN vom Institut für Biochemie der Technischen Universität Braunschweig für die Überlassung des gut charakterisierten Bodens.
- ... Herrn Prof. em. Dr. Hans-Jürgen REHM vom Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die Überlassung eines Bakterienstammes.
- ... Frau Dr. Susann WODARCZAK und Herrn Dr. Norbert BUSCHMANN vom Lehrstuhl für Analytische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die Überlassung des Texapons<sup>®</sup> N25.



---

## Abstrakt

### Mikrobieller Phenanthrenabbau mit Tensidzusatz

Schippers, Christopher

Mikrobiologische Verfahren eignen sich gut zur Sanierung von mit leichtlöslichen Schadstoffen kontaminierten Böden. Problematisch ist dagegen der Bioabbau schwerlöslicher und damit kaum bioverfügbarer Schadstoffverbindungen. Eine Lösung ist der Einsatz von oberflächenaktiven Substanzen, welche in der Praxis mit unterschiedlichem Erfolg zur Anwendung kommt: Die Spanne der Angaben aus der Fachliteratur reicht von toxischen Effekten über Sequestering bis hin zu exzellenten Schadstoffabbauergebnissen. Um den Wirkungsmechanismus aufzuklären und damit einen effizienteren Einsatz der Tenside bei Bodensanierungen zu erreichen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zuerst ein System etabliert, mit dem der Einfluß von Tensiden auf den mikrobiellen Schadstoffabbau untersucht werden konnte.

Zu Beginn mußten geeignete Systemkomponenten gefunden werden. Als schwerlöslicher Schadstoff wurde dabei ein trizyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, das Phenanthren, gewählt. Das ubiquitär verbreitete GRAM-negative Bakterium *Sphingomonas yanoikuyae* B1 erwies sich nach Wachstumsversuchen als am geeignetsten für weitere Untersuchungen. Als oberflächenaktive Substanzen wurden das synthetische Texapon<sup>®</sup> N25 - ein Natriumdodecylethersulfat - und ein Biotensid vom Glycolipidtyp, nämlich Sophoroselipid, intensiver bearbeitet. Aus Braunschweig stammte der in der Arbeit eingesetzte sandige Schluffboden. Ein Teil der Kultivierungen wurde mit einem Biostat B-Reaktor durchgeführt, der zur effektiven Schaumzerstörung mit einem neu entwickelten Begasungssystem ausgestattet wurde. Im Laufe der Arbeit wurden ferner eine Reihe alter Analysemethoden modifiziert und neue etabliert, um phenanthren-, tensid- und/oder bodenhaltige Proben untersuchen zu können. Nach der Ermittlung verschiedener chemisch-physikalischer aber auch biologischer Parameter der eingesetzten Komponenten wurden erste Kultivierungsexperimente in Schüttelkolben durchgeführt.

Ein Schwerpunkt bei diesen Versuchen lag in der Ermittlung der Toxizität der eingesetzten Tenside. In Konzentrationen bis 75 mg/L zeigten weder Texapon<sup>®</sup> N25 noch Sophoroselipide bakteriotoxische Wirkungen; bei höheren Konzentrationen hingen wachstumshemmende Effekte von den konkreten Versuchsbedingungen ab. Im weiteren wurde bestimmt, ob und bei welchen Konzentrationen die Tenside den Phenanthrenabbau von *S. yanoikuyae* B1 fördern können. Beim Texapon<sup>®</sup> N25 wurde in Konzentrationen von 1 - 15 mg/L, bei Sophoroselipiden von 1 - 1.000 mg/L in Schüttelkolben ein besserer Phenanthrenabbau nachgewiesen als in der Referenz ohne Tensidzusatz. Bei dem synthetischen Tensid, das unterhalb seiner CMC den Abbau fördert, war dieses Resultat auf die Erhöhung der Bioverfügbarkeit zurückzuführen. Bei den Sophoroselipiden konnte aufgrund eines starken Proteinzuwachses nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ob der verbesserte Abbau durch die gesteigerte Bioverfügbarkeit des Schadstoffs oder einfach durch die höhere Biomasse verursacht wurde. Darüber sollten Experimente im Bioreaktor, bei denen mehr Analytik eingesetzt werden konnte, Aufschluß geben.

Durch fluoreszenzspektroskopische Analysen konnte bei den Flüssigkultivierungen im 2 L Maßstab gezeigt werden, daß *S. yanoikuyae* B1 apparent - also mizellar und wässrig - gelöstes Phenanthren sehr schnell aufnehmen und verstoffwechseln kann. Da die Sophoroselipide den Schadstoff unter den eingesetzten Kultivierungsbedingungen effektiv lösen konnten, wurde damit bewiesen, das - neben dem untersuchten synthetischen Tensid - auch durch das Biotensid die Bioverfügbarkeit des Schadstoffs erhöht wird. Im Vergleich zur Kultivierung ohne Zugabe einer oberflächenaktiven Substanz konnten mit Tensidzusatz niedrigere Restmengen und auch schnellere Abbauraten gemessen werden. Daran anschließende Kultivierungen zeigten dies - zumindest für das Biotensid - auch in 10%iger Bodensuspension.

Diese Resultate haben für die Praxis eine große Bedeutung: Häufig überwiegen nämlich bei Altlasten mit schwerlöslichen Schadstoffen die Befürchtungen von Auftraggebern, biologische Verfahren könnten zu lange dauern oder die vorgegebenen Grenzwerte könnten nicht erreicht werden, so daß eine alternative Technik angewendet wird. Mit dem im Laufe der Arbeit etablierten System können nun weitere Untersuchungen zum grundlegenden Mechanismus, aber auch solche mit mehr Praxisrelevanz durchgeführt werden, was zur Akzeptanzsteigerung von natürlichen, biologischen Reinigungsverfahren auch in schwierigen Fällen führen kann.

### **Abstract**

#### **Microbial degradation of phenanthrene with addition of surfactants**

Microbiological techniques are well fitting for remediation of soils contaminated with easily soluble pollutants. The biodegradation is nevertheless problematic in the case of poorly soluble and hence, hardly bioavailable compounds. A solution is the use of surface active agents, which is applied with different success in practice. A literature review reveals a span from toxic effects over sequestering up to excellent degradation results. In order to facilitate a more effective use of surfactants, more research is necessary to clarify the mechanism of action.

At first, a system to examine the influence of surfactants on the microbial degradation had to be established within the framework of the thesis presented here.

Suitable system components had to be found in the beginning. Therefore the tricyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene was chosen as poorly soluble pollutant. Due to preliminary tests, the ubiquitous spread GRAM-negative bacterium *Sphingomonas yanoikuyae* B1 proved to be the most suitable one. As surface active agents, the synthetic Texapone<sup>®</sup> N25 - a sodium lauryl ether sulfate - and a biosurfactant of the sophorolipid type, namely sophorolipid, were used for the further examination. The soil was sandy silt coming from Braunschweig. A part of the cultivations were done with a Biostat B-Reactor, which was equiped with a new developed aeration system for effective foam disruption. Earlier analytical methods had to be adapted and new ones established in the course of the study, for being able to examine phenanthrene-, surfactant- and/or soil containing samples. First cultivation experiments in shake flasks were done after different chemico-physical and biological parameters of the components had been determined.

Special emphasis in this experiments was laid in the determination of the toxicity of the surfactants. Up to 75 mg/L, neither Texapone<sup>®</sup> N25 nor sophorolipids revealed any bacteriotoxic effect. At concentrations higher than this, the effects depended on experimental conditions. The following step was to determine, if at all and when, at which concentrations could the surface active agents enhance the degradation of phenanthrene by *S. yanoikuyae* B1. With Texapone<sup>®</sup> N25 in concentrations between 1 to 15 mg/L and with sophorolipids in concentrations between 1 to 1000 mg/L, an improved degradation of the pollutant was measured in shake flask experiments compared to a reference without any addition of surfactant. In the case of the synthetic surfactant, which enhanced degradation below its cmc, this result was put down to an augmentation in the bioavailability. Due to a strong increase of protein values in the shake flasks with addition of sophorolipids, it could not be shown beyond any doubt, if the higher degradation was caused by the increased bioavailability of the pollutant or simply by the higher amount of biomass. This was the reason for carrying out more experiments with a bioreactor, with which it was possible to record more parameters and furthermore to measure them throughout the entire course of cultivation.

It was shown through liquid cultivations in 2 L scale with fluorescence spectroscopy measurements, that *S. yanoikuyae* B1 is able to take up and metabolise apparently - that means micellar and aqueous - dissolved phenanthrene with a very high rate. Since the sophorolipids were able to dissolve effectively the pollutant at the actual culture conditions, it could be proven that - as the synthetic surface active agent mentioned before - the biosurfactant was likewise able to augment the bioavailability of the pollutant. With addition of surfactants, lower residual amounts and higher degradation rates were achieved compared to a reference cultivation without any surface active agent. Subsequent cultivations revealed, that - at least for the biosurfactant - this was also true in 10% soil suspension.

These results have great impact on practical application: Biological techniques for soil remediation are often rejected from possible customers due to time and residual amount reasons. With the system elaborated during this work it is possible to carry out more experiments to clarify basic mechanism on the one hand, and to gain more practical reference with real contaminated soil on the other. This could increase the acceptance of natural, biological soil remediation techniques also in more sophisticated cases.

**Schlagworte:**

Mikrobieller Phenanthrenabbau - Texapon - Sophoroselipide

**Keywords:**

Microbial phenanthrene degradation - Texapone - sophorolipids



---

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil.....</b>	<b>18</b>
2.1	<b>Bodensanierung: ein Überblick.....</b>	<b>18</b>
2.2	<b>Mikrobielle Sanierung PAK-kontaminierter Böden.....</b>	<b>21</b>
2.2.1	Was ist Boden? .....	21
2.2.2	<b>Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) als weitverbreitete Umweltgifte .....</b>	<b>21</b>
2.2.3	<b>Mikrobieller PAK-Abbau.....</b>	<b>22</b>
2.2.3.1	Definition des Begriffs „Abbau“ .....	22
2.2.3.2	Bioabbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen .....	23
2.2.4	<b>Tenside zur Erhöhung der PAK-Wasserlöslichkeit.....</b>	<b>24</b>
2.2.4.1	Grundlagen .....	24
2.2.4.2	Die verschiedenen Tensidtypen.....	25
2.2.4.3	Anforderungen an und Überblick der Tenside für den mikrobiellen Schadstoffabbau .....	27
2.2.5	<b>Tensideinsatz beim mikrobiellen Abbau schwerlöslicher Verbindungen.....</b>	<b>27</b>
2.2.5.1	Mikrobiologisch-ökologische und physiologische Aspekte.....	27
2.2.5.2	Erklärungsansätze für den Schadstoffabbau in Gegenwart von Tensiden.....	29
<b>3</b>	<b>Praktischer Teil I Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
3.1	<b>Phenanthren und andere verwendete PAK.....</b>	<b>31</b>
3.2	<b>Mikroorganismen .....</b>	<b>32</b>
3.3	<b>Getestete Tenside: Texapon® N25 und Sophoroselipide .....</b>	<b>33</b>
3.4	<b>Der verwendete Boden .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Gewinnung.....	35
3.4.2	Siebung, weitere Vorbehandlung und Lagerung des Bodens .....	35
3.4.3	Kurzcharakteristik .....	36

<b>3.5 Offline-Analytik.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5.1 Bestimmung des mikrobiellen Wachstums.....</b>	<b>36</b>
3.5.1.1 Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl .....	36
3.5.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Ausplattierungsmethode .....	37
3.5.1.3 Messung des Proteingehaltes .....	37
3.5.1.3.1 Vorbereitung der Proben für den Bio-Rad DC Protein Assay® .....	38
3.5.1.3.2 Durchführung des Proteintests .....	38
3.5.1.4 Bestimmung der optischen Dichte.....	39
3.5.1.5 Messung biologischer Aktivität in Böden mittels Dehydrogenase-Test .....	40
3.5.1.5.1 Vorbereitung von Bodensuspensionsproben.....	40
3.5.1.5.2 Durchführung des Dehydrogenaseaktivitätstests.....	40
<b>3.5.2 Bestimmung physikalischer und chemischer Meßgrößen .....</b>	<b>41</b>
3.5.2.1 Messung der Oberflächenspannung .....	41
3.5.2.2 Durchführung der 2D-Fluoreszenzmessungen .....	42
3.5.2.3 Messung des pH-Wertes.....	44
3.5.2.4 Bestimmung der Phosphationenkonzentration .....	44
3.5.2.4.1 Vorbereitung der Arbeitsgeräte und Probenahme .....	44
3.5.2.4.2 Durchführung der Phosphatanalytik.....	44
3.5.2.5 Bestimmung des Gehalts anorganischer Stickstoffverbindungen .....	44
3.5.2.5.1 Ermittlung des Nitritgehaltes .....	44
3.5.2.5.2 Bestimmung des Nitratgehaltes.....	45
3.5.2.5.3 Messung des Gehaltes an Ammonium.....	45
3.5.2.6 Bestimmung des Glucosegehaltes .....	46
3.5.2.7 Bestimmung des PAK-Gehaltes .....	46
3.5.2.7.1 Entnahme und Vorbereitung von schadstoffhaltigen Proben.....	46
3.5.2.7.2 Extraktion der PAK .....	47
3.5.2.7.3 Bestimmung des Schadstoffgehaltes mittels GC-MS .....	48
3.5.2.8 Bestimmung des Tensidgehaltes.....	49
3.5.2.8.1 Analytik von Texapon® N25 .....	49
3.5.2.8.2 Qualitativer Nachweis der Sophoroselipide mittels Dünnschichtchromatographie .....	50
3.5.2.8.3 Quantitativer Nachweis der Sophoroselipide mittels Anthronmethode.....	51
3.5.2.9 Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC).....	52

<b>3.6 Online-Analytik .....</b>	<b>52</b>
3.6.1 Messung des pH-Wertes.....	52
3.6.2 Erfassung des Gelöstsauerstoffgehaltes.....	53
3.6.3 Durchführung der 2D-Fluoreszenzmessungen über den Bypass .....	53
3.6.4 CO <sub>2</sub> - und O <sub>2</sub> -Abgasanalytik.....	53
3.6.5 Prozeßsteuerung und Daten- erfassung bei Kultivierungen im Bioreaktor .....	54
<b>3.7 Durchführung der Kultivierungen.....</b>	<b>55</b>
3.7.1 Sterilisation.....	55
3.7.2 Stammhaltung der eingesetzten Mikroorganismen.....	56
3.7.2.1 Kurzzeitlagerung in Agarplattenkultur.....	56
3.7.2.2 Langzeitlagerung als Gefrierkultur .....	56
3.7.3 Bereitstellung des Inokulums für die Kultivierungen .....	57
3.7.3.1 Vorkulturen von <i>S. yanoikuyae</i> B1.....	57
3.7.3.2 Vorkulturen des auf den drei PAK angereicherten Mikroorganismenkonsortiums.....	57
3.7.4 Gewinnung und Test eines auf Phenanthren, Pyren und Benzo[ghi]perylen angereicherten Mikroorganismenkonsortiums.....	58
3.7.4.1 Anreicherung der Mischkultur.....	58
3.7.4.2 Einsatz des Konsortiums beim Abbau des Drei-Komponentengemisches in Schüttelkolben .....	59
3.7.5 Versuche mit <i>S. yanoikuyae</i> B1 und anderen Reinkulturen.....	59
3.7.5.1 Test des Wachstums von <i>S. yanoikuyae</i> B1 in Vorkultur .....	59
3.7.5.2 Untersuchung der Stabilität des Phenanthrenabbauvermögens von <i>S. yanoikuyae</i> B1 .....	60
3.7.5.3 Durchführung der Toxizitätstests .....	60
3.7.5.3.1 Plattendiffusionstest.....	60
3.7.5.3.2 Test in Schüttelkolben („log-Wachstumstest“) .....	61
3.7.5.4 Phenanthrenabbau durch <i>S. yanoikuyae</i> B1 unter Tensidzusatz im Schüttelkolben.....	61
3.7.5.5 Untersuchung des Phenanthrenabbaus durch <i>S. yanoikuyae</i> B1 im Biostat B-Reaktor.....	62
3.7.5.5.1 Optimierung des Biostat B-Belüftungssystems für Experimente mit Tensidzusatz .....	62
3.7.5.5.2 Aufbau und Vorbereitung des Reaktorsystems .....	62
3.7.5.5.3 Durchführung der Probenahmen.....	64

<b>4</b>	<b>Praktischer Teil II</b>	
	<b>Chemisch-physikalische Voruntersuchungen.....</b>	<b>66</b>
4.1	Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC) von Texapon® N25 und Sophoroselipiden.....	66
4.2	Anteil nicht mehr extrahierbaren Phenanthrens in der Bodensuspension in Abhängigkeit von der Zeit .....	68
4.3	Untersuchung der Adsorption von Sophoroselipiden an den Boden .....	69
4.4	Ermittlung der Phenanthren - Solubilisierungskapazität im Medium und in Bodensuspension durch die Sophoroselipide .....	70
4.5	Fluoreszenzspektroskopische Voruntersuchungen.....	72
4.5.1	2D-Fluoreszenzspektren von Phenanthren, Tensiden, Huminsäure und Boden in MM <sub>Brun</sub> .....	73
4.5.2	Schadstofffluoreszenz in Gegenwart von Huminsäure .....	75
4.5.3	Untersuchung der Phenanthrenfluoreszenz in einer 10%igen Bodensuspension .....	75
4.5.4	Auswirkungen steigender Tensidkonzentrationen auf die Phenanthrenfluoreszenz in MM <sub>Brun</sub> .....	76
<b>5</b>	<b>Praktischer Teil III</b>	
	<b>Kultivierungen.....</b>	<b>79</b>
5.1	Kultivierungsversuche in Schüttelkolben .....	79
5.1.1	Wachstum von <i>S. yanoikuyae</i> B1 in Vorkultur .....	79
5.1.2	Wirkung von Dichlormethan auf <i>S. yanoikuyae</i> B1.....	80
5.1.3	Wirkung der eingesetzten Tenside auf <i>S. yanoikuyae</i> B1 sowie auf eine Auswahl anderer Mikroorganismen .....	82
5.1.3.1	Wirkung der Testtenside auf Mikroorganismen im Plattendiffusionstest.....	84
5.1.3.2	Wirkung der beiden primär eingesetzten Tenside auf <i>S. yanoikuyae</i> B1 im logarithmischen Wachstumstest.....	86
5.1.4	Mikrobieller Abbau von Phenanthren, Pyren und Benzo[ghi]perylen durch das isolierte Konsortium.....	88
5.1.5	Phenanthrenabbau von <i>S. yanoikuyae</i> B1 bei mehrmaligem Überimpfen auf nicht-schadstoffhaltiges Medium .....	89

5.1.6	Phenanthrenabbau durch <i>S. yanoikuyae</i> B1 unter Zusatz von Tensiden.....	91
5.1.6.1	Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an Texapon® N25.....	91
5.1.6.2	Wirkung verschiedener Konzentrationen an Sophoroselipiden .....	93
5.2	<b>Ergebnisse der Flüssigkultivierungen von <i>S. yanoikuyae</i> B1 im Bioreaktor.....</b>	<b>96</b>
5.2.1	Phenanthrenabbau in Abhängigkeit variierender Animpfdichte.....	96
5.2.2	Wachstum von <i>S. yanoikuyae</i> B1 auf zwei Kohlenstoffquellen: Phenanthren und Glucose.....	97
5.2.3	Auswirkungen des entwickelten Kopfraum- Begasungssystems auf den Kultivierungsverlauf.....	99
5.2.4	Wirkung eines Bypass auf den Kultivierungsverlauf im Bioreaktor .....	100
5.2.5	Phenanthrenabbau durch <i>S. yanoikuyae</i> B1 in Flüssigkultur im Bioreaktor mit Tensid .....	101
5.2.5.1	Darstellung aller Kultivierungen in Flüssigkultur.....	102
5.2.5.2	Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen: Ein Beispiel .....	111
5.2.5.3	Vergleich des Phenanthrenabbaus bei den Kultivierungen im Flüssigmedium.....	113
5.3	<b>Ergebnisse der Kultivierungen von <i>S. yanoikuyae</i> in 10%iger Bodensuspension im Bioreaktor .....</b>	<b>114</b>
5.3.1	Phenanthrenabbau ohne Zusatz von Sophoroselipiden .....	115
5.3.2	Phenanthrenabbau mit 100 mg/L Sophoroselipid-Zusatz.....	119
5.3.3	Vergleich der Phenanthrenabbau- kurven bei den Bodensuspensionskultivierungen.....	122
6	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>124</b>
7	<b>Anhang.....</b>	<b>130</b>
7.1	Flüssigmedien .....	130
7.2	Festmedien.....	130
7.3	Reagenzien.....	131
7.4	Verwendete Chemikalien .....	133
7.5	Der modifizierte Begasungsring .....	134
8	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>135</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

$\sigma$ .....	Oberflächenspannung
2D .....	zweidimensional
A/D .....	Analog/Digital
abs.....	absolut
BSA.....	Rinderserumalbumin
c .....	Konzentration
CMC .....	kritische Mizellbildungskonzentration
DCM .....	Dichlormethan
DSMZ .....	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
E.....	Extinktion
ed. ....	editor
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
ELSD .....	Lichtstreuendetektor (engl.: evaporative light scattering detector)
EPA.....	Environmental Protection Agency
Fa. ....	Firma
g .....	Erdbeschleunigung
GBF.....	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig - Stöckheim
GC/MSD .....	Gaschromatograph/Massenspektrometerdetektor
HLB .....	hydrophilic-lipophilic-balance
HPLC .....	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hrsg. ....	Herausgeber
KBE .....	Koloniebildende Einheiten
LAS.....	lineares Alkylbenzolsulfonat
MBAS .....	Methylenblau-aktive Substanzen
MM <sub>Brun</sub> .....	Mineralmedium <sub>Brunner</sub>

OD .....	optische Dichte
PAK .....	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
pO <sub>2</sub> .....	Gelöstsauerstoff
R .....	Korrelationskoeffizient
rel .....	relativ
rpm .....	rounds per minute
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SL .....	Spurenelementelösung
SRU .....	Rat der Sachverständigen für Umweltfragen
TCI .....	Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
v/v .....	Volumenanteil
vvm .....	Volumen Gaszufuhr pro Volumen Kulturlösung
w/w .....	Gewichtsanteil

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen hat in seinem Bericht „Altlasten II“ (1995) die Zahl der Altlastenverdachtsflächen, von denen möglicherweise „eine Gefahr für die öffentliche Sicherheit oder Ordnung ausgeht“, auf 143.300 beziffert, wovon 73.600 auf die alten und 69.700 auf die neuen Bundesländer entfallen [MURL 1991, UBA 1994A/B zit. in SRU 1995]. Diese vorläufigen Zahlen zeigen, daß das Thema Altlasten und deren Sanierung nach wie vor eins der akuten Probleme unserer Zeit ist, welches sich ebenfalls in den Schlagzeilen der Medien widerspiegelt. „Aus den Augen, aus dem Sinn - Altlasten“ [MULL 1995], „Das Erbe der Sorglosigkeit“ [STANDORT CHEMIE 1996], „Die ‘Sünden der Vergangenheit’ kosten Millionen“ [HAZ 1997] und „Biologische Bodensanierung kontra Bodendeponierung - (k)eine Kostenfrage (mehr)?!“ [SPRÖER 1997] sind da nur einige charakteristische Beispiele.

Innerhalb der verschiedenen Sanierungsverfahren haben sich biologische Ansätze etabliert: Sie sind kostengünstig, umweltverträglich, bodenschonend und gesellschaftlich akzeptiert. Die Liste der mit diesen Methoden erfolgreich durchgeführten Reinigungsmaßnahmen wird tagtäglich umfangreicher. Eine der größten Herausforderungen ist jedoch die Sanierung von Böden, die mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) kontaminiert sind. Diese Stoffklasse, ubiquitär verbreitet und in zahlreichen Altlastböden in hohen Konzentrationen nachzuweisen, ist umweltpolitisch aufgrund ihrer zahlreichen mutagenen bzw. carcinogenen Vertreter relevant. Die Fähigkeit, PAK abzubauen, ist bei Mikroorganismen weit verbreitet. Jedoch steht deren geringe Wasserlöslichkeit und gute Adsorptionsfähigkeit an Bodenpartikel häufig einem effizienten Abbau entgegen. Viele Sanierungstechnologien haben zum Ziel, die physikochemisch bedingt geringe Bioverfügbarkeit der PAK zu erhöhen, etwa durch Zusatz von Tensiden. Eine Reihe von Untersuchungen zu diesem Themenkomplex sind publiziert worden, wobei sowohl abbaufördernde, abbauhemmende als auch keine Wirkungen beschrieben wurden. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nur ungenügend verstanden; allgemeingültige Aussagen können bisher nur sehr eingeschränkt getroffen werden.

Um Aussagen zum mikrobiellen Schadstoffabbau mit Tensidzusatz zu ermöglichen, soll in der Arbeit ein System entwickelt werden, mit dem sich entsprechende Fragestellungen bearbeiten lassen. Dazu sollen in einem ersten Schritt sowohl geeignete Komponenten, wie Mikroorganismus, Schadstoff, Tensid und Boden ausgewählt und charakterisiert, als auch neue Versuchs- und Analysemethoden am Institut etabliert werden.

Darauf aufbauend sind in einem weiteren Schritt Versuche in Schüttelkolben und mit Agarplatten durchzuführen, um grundlegende biologische Parameter zu bestimmen. Die Ergebnisse sind dann relevant für Bioreaktorexperimente, die zuerst in Flüssigkultur, anschließend mit Bodensuspension den erfolgreichen Einsatz von Tensiden beim mikrobiellen Schadstoffabbau belegen sollen.

Aufgrund der geschilderten Fragen, die in der Literatur bei diesem Thema auftauchen, sollen durch geeignete Analysemethoden darüber hinaus Antworten zur tensidgeförderten Aufnahme von schwerlöslichen Schadstoffen gefunden werden.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Bodensanierung: ein Überblick

Hat sich nach gründlicher Voruntersuchung eines Geländes der Verdacht des Vorliegens einer Altlast erwiesen, so steht im allgemeinen dessen Sanierungsbedürftigkeit außer Frage. In Anbetracht einer gesellschaftlichen Sensibilisierung für die Umwelt haben Industrie und Wissenschaft mit einem Innovationsschub reagiert [CARRERA und ROBERTIELLO 1992, MACDONALD und RAO 1998, OKX et al. 1996]. Heute steht daher eine große Zahl von Sanierungsverfahren zur Verfügung [einen guten Überblick geben beispielsweise BÖHNKE et al. 1990, DECKWER und WEPPE 1987, FRANZIUS 1993, HAMBY 1996, NEUMAIER und WEBER 1996 oder RULKENS et al. 1998]. Abb. 1 zeigt die gebräuchlichsten Techniken, wobei Aspekte sowohl der Art des Schadstoffs und dessen Verbleib als auch der der Bodenwiederverwertbarkeit berücksichtigt werden. Da das Thema der Arbeit die biologische Bodensanierung ist, werden in der folgenden Übersicht die dazu gehörenden Schlüsselbegriffe grau unterlegt.

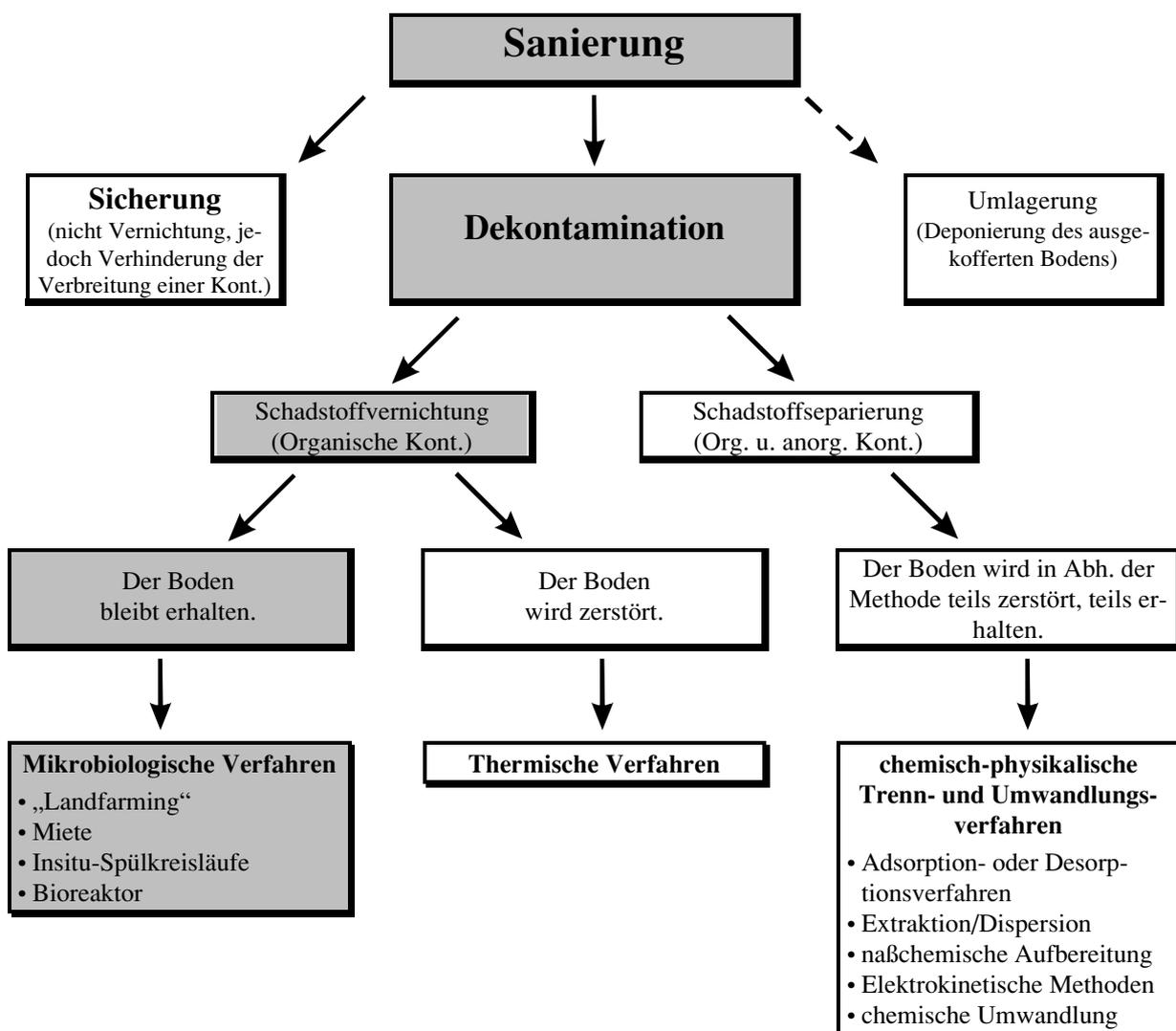


Abb. 1: Übersicht der wichtigsten Bodensanierungsverfahren verändert nach [SRU 1995], weitere Informationen auch in [SRU 1989].

Abkürzungen: Kont. = Kontaminationen / org. = organische / anorg. = anorganische / Abh. = Abhängigkeit

Die Abbildung ist im wesentlichen auf einer vom Rat der Sachverständigen für Umweltfragen (SRU) im Altlasten II Sondergutachten publizierten Darstellung aufgebaut [SRU 1995]. Die Umlagerung stellt dabei im engeren Sinne keine eigentliche Sanierungsmethode dar, denn der Kontaminationsort wird lediglich räumlich verlagert. Des öfteren wird der Begriff Sanierung auch synonym mit dem Wort Dekontamination gebraucht, so daß damit - anders als in Abb. 1 - Sanierungs- und Sicherungsverfahren gegenübergestellt werden [BÖHNKE et al. 1990]. Die Dekontaminationsverfahren werden vom SRU, vereinfachend dargestellt, in mikrobiologische, thermische und chemisch-physikalische Verfahren unterteilt. Ebenso ist die grundsätzliche Unterteilung in Insitu-, Onsite- und Offsite-Verfahren gebräuchlich, womit der Verbleib des schadstoffhaltigen Bodens während der Behandlung im Vergleich zum Ursprungsort charakterisiert wird [BÖHNKE et al. 1990]. Bei Insitu-Techniken bleiben die natürlichen Untergrundverhältnisse erhalten, während bei den beiden anderen Erdaushubarbeiten vorgesehen sind. Bei Onsite-Verfahren wird der Boden danach direkt vor Ort, bei Offsite-Methoden erst nach Abtransport zu einem entfernt liegenden Bodenbehandlungszentrum gereinigt.

Nach dieser allgemeinen Einführung in die Bodensanierung werden nun einige spezielle Aspekte mikrobieller Verfahren behandelt. Mikroorganismen spielen eine eminent wichtige Rolle im Kohlenstoffkreislauf, da sie als sogenannte Destruenten den weitaus überwiegenden Teil organischer Substanz mineralisieren. Dabei sind diese Organismen biochemisch omnipotent, d. h. sie bauen alle Verbindungen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, ab [KNACKMUSS 1996, SCHLEGEL 1992]. Biologische Verfahren, schon seit Jahrzehnten erfolgreich in der Abwasserreinigung angewendet, setzen darauf, diese Selbstreinigungskraft in Störfällen zu aktivieren. Dies ist bei der Sanierung von Böden in erster Linie meist ein technisches Problem: zu hohe Schadstoffkonzentrationen müssen verdünnt, schwerlösliche Schadstoffe mobilisiert, Nährstoffe zugesetzt oder der für den Bioabbau in der Regel notwendige Sauerstoff in den Boden eingebracht werden. Es kann auch der Einsatz von speziell adaptierten Mikroorganismen notwendig werden. Die biologischen Bodensanierungstechniken werden in Insitu-Methoden, Landfarming, Mieten- und Bioreaktorverfahren unterteilt [LFU 1991, LUA NRW 1998].

In Europa lassen sich Länder mit geringer Aktivität bei der Altlastensanierung, wie etwa die Schweiz oder Spanien, deutlich von anderen differenzieren, in denen jährlich über 2.000 Sanierungen durchgeführt werden, beispielsweise die Niederlande oder Deutschland. In der Bundesrepublik werden dabei vorwiegend thermische Verfahren oder Deponierung/Sicherung eingesetzt, zusätzlich die Bodenwäsche. Zu einem gewissen Grad kommen auch biologische Bodensanierungsmethoden zur Anwendung [OVERCASH 1996]. Aktuelle Schätzungen der spezifischen Kosten verschiedener Verfahren im Vergleich zu älteren Daten zeigen im Allgemeinen eine fallende Tendenz, was den Verdrängungswettbewerb auf dem Altlastensanierungsmarkt dokumentiert [SRU 1995, KÖCHLING 1996]. Tabelle 1 gibt einen repräsentativen Überblick der Preise in DM pro Tonne gereinigten Bodens für verschiedene wichtige Dekontaminationsverfahren im Vergleich zur Deponierung wieder.

Tab. 1: Spezifische Kosten verschiedener Dekontaminationsverfahren im Vergleich zur Deponierung [BRINKMANN 1997].

<b>Dekontaminationsverfahren</b>	<b>DM/t</b>
Extraktions- und Waschverfahren	100 - 200
Thermische Verfahren	150 - 250
Biologische Verfahren In situ	30 - 60
" Onsite	80 - 150
<b>Deponierung</b>	<b>10 - 120</b>

Tabelle, verändert nach [SRU 1995]

Die angegebenen Preisspannen der verschiedenen Verfahren sind vergleichsweise groß, da sehr viele Faktoren bei der Kostenermittlung berücksichtigt werden müssen. Darunter fallen beispielsweise die Eigenschaften des zu sanierenden Bodens, die konkrete Anlage, die angestrebten Sanierungsziele, Energie- und Personaleinsatz sowie genehmigungs- und informationstechnische Aspekte. Die angegebenen spezifischen Kosten sollen daher eher einen Eindruck der ungefähren Größenordnungen vermitteln [SRU 1989]. Laut Tab. 1 liegen biologische Dekontaminationsverfahren weitgehend in der Preisspanne der Deponierung, die übrigen angegebenen Techniken meist darüber. Die Deponierung stellt in vielen Fällen aus Zeit- und Kostengründen die gegenwärtig in der Bundesrepublik Deutschland praktikabelste „Lösung“ dar [SELL 1998]. Wird jedoch eine tatsächliche Sanierung bevorzugt, sind unterschiedliche Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren abzuwägen: Nicht jedes Verfahren eignet sich für jeden Anwendungsfall. In der Praxis werden deshalb des öfteren kombinierte Verfahren, etwa Waschverfahren mit anschließender biologischer Behandlung, eingesetzt.

Biologische Bodensanierungsverfahren bieten neben dem günstigen Preis, dem vergleichsweise geringen Energieverbrauch und der Schadstoffelimination weitere Vorteile. So kann etwa der Boden erhalten und anschließend rekultiviert werden. Darüber hinaus kann das zu sanierende Gelände u. U. während der Maßnahme weiter genutzt werden. Ebenso werden die biologischen Verfahren von der Bevölkerung eher akzeptiert. Nachteile biologischer Verfahren sind die begrenzte Einsatzfähigkeit und eine häufig lange Sanierungsdauer, die u. a. durch eine lange Vorversuchsphase bedingt ist [LFU 1991].

Lange Zeit waren jedoch die Voraussetzungen zum Schutz des neben Luft und Wasser dritten Umweltmediums Boden noch nicht bundeseinheitlich geregelt. Dieser Mangel wurde nun durch die Verabschiedung des Bundes-Bodenschutzgesetzes, welches insgesamt am 01. März 1999 in Kraft getreten ist, behoben. Durch das neue Gesetz - in dem u.a. Dekontaminationsmaßnahmen Vorrang vor anderen Sanierungsmaßnahmen eingeräumt wird - werden nun neue Impulse für den Altlastensanierungsmarkt erwartet [DELMHORST 1996, FAZ 1997, FRANZIUS 1998, KÖCHLING 1996, THOENES 1998].

## 2.2 Mikrobielle Sanierung PAK-kontaminierter Böden

### 2.2.1 Was ist Boden?

Der Begriff „Boden“ bezeichnet den obersten Bereich der Erdrinde, der nach unten durch Gestein und nach oben durch eine Vegetationsdecke oder die Atmosphäre begrenzt wird. Er setzt sich aus anorganischen mineralischen und organischen humosen Bestandteilen zusammen, die - in charakteristischer Weise räumlich angeordnet - mit Bodenlösung und -luft durchsetzt sind. Im Boden wurzeln nicht nur höhere Pflanzen. Auch finden eine Vielzahl von Organismen wie Bakterien, Pilze, Algen, Protozoen bis hin zu Gliederfüßlern, Weich- und Wirbeltieren dort ihren Lebensraum. Hauptsächlich durch deren Aktivität und klimatische Einflüsse ist der Lebensraum Boden ständigen Veränderungen unterworfen; er stellt also ein dynamisches System dar.

### 2.2.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) als weitverbreitete Umweltgifte

Unter dem Sammelbegriff PAK werden Verbindungen zusammengefaßt, die aus zwei oder mehr kondensierten Benzolringen aufgebaut sind. Sie können auf natürlichem Wege entstehen, beispielsweise im Boden durch Kondensationsprozesse von Huminsäuren, biogen durch spezielle Stoffwechselfvorgänge in Zellen oder aber auch bei Waldbränden [BLUMER 1976]. Da PAK bei praktisch allen Verbrennungsprozessen gebildet werden, ist ihr Anteil in der Umwelt in den letzten 100 - 150 Jahren, anthropogen bedingt, ständig gestiegen [JONES et al. 1989A und B]. So werden etwa in der Nähe stark frequentierter Straßen bis zu 10 mg PAK/kg Boden gefunden, in ländlichen Gegenden dagegen nur  $\leq 0,6$  mg PAK/kg [SCHACHTSCHABEL et al. 1989, JONES et al. 1989 A/B]. Doch nicht nur in Böden, auch im Wasser und der Luft lassen sich PAK regelmäßig nachweisen und sind daher ubiquitär auf der Erdoberfläche verbreitet [KAMPE et al. 1988, SIMMLEIT und HERRMANN 1987, beide zit. in SCHACHTSCHABEL et al. 1989]. LEGER et al. [1987, zit. in KÄSTNER et al. 1993] vermuten aufgrund astrophysikalischer Beobachtungen sogar, daß PAK die am weitesten verbreitete organische Stoffklasse im Universum darstellt. Im Unterschied zu diesen Hintergrundkontaminationen finden sich erhöhte PAK-Konzentrationen bis hin zu mehreren g/kg in Böden von Geländen, auf denen mit Kohle oder Mineralölen bzw. deren Derivaten umgegangen wurde. Hierzu gehören besonders ehemalige Gaswerke und Kokereien, aber auch Tankstellen, Mineralöllager, Pipelines und Deponien [CUTRIGHT und LEE 1994, LFU 1991, WILSON und JONES 1993].

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe können durch Inhalation im gasförmigen Zustand oder von belasteten Partikeln, durch Nahrungsmittel inklusive Wasser oder durch Hautresorption aufgenommen werden [KÄSTNER et al. 1993]. Durch den Metabolismus werden die PAK verändert. Ein Großteil wird in Form von Sulfaten, Glucoroniden oder Glutathion-Konjugaten über Harn und Faezes ausgeschieden, ein Teil kann jedoch auch über *trans*-Dihydrodiole zu karzinogenen Diol-Epoxiden metabolisiert werden [WEIßENFELS 1990]. Darüber hinaus ist für einige PAK nachgewiesen worden, daß sie Mutagene sind oder die Wirkung anderer karzinogener Substanzen verstärken können [LFU 1991, FALBE und REGITZ 1992]. Zum Schutz sind daher vielfach Grenzwerte festgelegt worden.

### 2.2.3 Mikrobieller PAK-Abbau

Eine Reihe von Faktoren sind in der Natur für die Verminderung von PAK-Konzentrationen in Böden relevant. Durch Verdunstung, Auslaugung und Adsorption können sie - chemisch unverändert - diesem Umweltmedium entzogen werden. Sie können jedoch auch durch chemische oder photolytische Prozesse modifiziert werden. Darüber hinaus spielen auch biotische Abbauprozesse eine eminent wichtige Rolle.

#### 2.2.3.1 Definition des Begriffs „Abbau“

„Abbau“ ist bei oberflächlicher Betrachtung ein klar definierter Begriff, in der Praxis jedoch sehr schwer nachzuweisen. Die komplette Zerlegung, also der eigentliche Abbau eines Schadstoffs in seine anorganischen Bestandteile - vorwiegend  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}$  - wird als „Mineralisation“ bezeichnet. Die Begriffe End- oder Totalabbau werden in der Regel synonym dazu gebraucht. In der Realität ist die Mineralisation meist sehr schwer und nur mittels radioaktiver Methoden nachzuweisen, da ein Teil des organischen Eduktes in die Zellsubstanz oder die Huminstoffmatrix des Bodens eingebaut und damit erst zeitlich stark verzögert Monate oder Jahre später freigesetzt wird. Praxisnaher ist der Begriff „vollständiger (biologischer) Abbau“, der die Umsetzung eines Eduktes in anorganische Verbindungen und höhermolekulare Intermediärprodukte umfaßt, die in den klassischen mikrobiellen Stoffwechsel aufgenommen werden können. In verschiedenen Quellen wird dieser Begriff auch mit Mineralisierung gleichgesetzt [KÄSTNER et al. 1993]. In der Umweltbiotechnologie hat sich zudem die Bezeichnung „umweltverträglicher biologischer Abbau“ (environmentally acceptable biodegradation) eingebürgert, womit der Abbau eines Schadstoffs mit angemessenen Abbauraten zu harmlosen umweltverträglichen Substanzen gemeint ist. Nicht deutlich voneinander zu trennen sind die Begriffe „Primärabbau“ und „funktioneller Abbau“: Bei ersterem ist die Originalsubstanz analytisch nicht mehr nachzuweisen, bei letzterem verliert sie eine charakteristische Eigenschaft. Nach den allgemeinen Begriffsdefinitionen nun Konkretes. KÄSTNER et al. [1993] unterscheiden drei unterschiedliche Typen des mikrobiellen PAK-Abbaus:

#### 1) Unspezifische radikalische Oxidation

Diese Art des Abbaus findet sich bei Weißfäule-Pilzen, die mittels eines extrazellulären Enzymsystems den Ligninanteil des Holzes abbauen. Simultan können dabei vorhandene Schadstoffe radikalisch aktiviert werden, was zu unspezifischen Folgereaktionen führt. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß meist nur ein geringer Teil von  $< 20\%$  des Schadstoffs mineralisiert wird. Demgegenüber werden in der Regel viele Metabolite gebildet, die teilweise sogar toxischer als die Ausgangsprodukte sein können.

#### 2) Kometabolische Transformation

Diese läßt sich sowohl bei Pilzen als auch bei Bakterien nachweisen. Der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff wird dabei mikrobiell erst nach Zugabe eines anderen, leichter verstoffwechselbaren Substrats angegriffen. Auch bei der kometabolischen Transformation reichern sich häufig teiloxidierte Zwischenprodukte an.

#### 3) Vollständige Mineralisierung

Die vollständige Mineralisierung führt idealerweise zu anorganischen Endprodukten, wie es im ersten Abschnitt dieses Kapitels beschrieben wurde. Treffender ist jedoch der Begriff „vollständiger biologischer Abbau“, denn in der Regel gilt der Nachweis des Wachstums eines Mikroorganismus auf einem PAK als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle als wichtigstes Kriterium für die Einordnung in diesen PAK-Abbautyp.

### 2.2.3.2 Bioabbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Bereits MIYOSHI [1895] beschrieb, daß Kohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen abgebaut werden können, während ZOBELL [1946] einen Review über „Action of microorganisms on hydrocarbons“ publizierte. In den 60er Jahren veröffentlichten Gibson, aber auch andere Autoren Grundlegendes über den „Mikrobiellen Abbau aromatischer Verbindungen“ [ROGOFF 1961, GIBSON 1968, weiteres in ATLAS 1981, CERNIGLIA 1984A/B, CERNIGLIA und HEITKAMP 1989, SIMS und OVERCASH 1983, WILSON und JONES 1993]. Die Abbauwege für die lmw PAK (low-molecular-weight) Naphthalin, Anthracen und Phenanthren wurden im besonderen untersucht. Lange Zeit vernachlässigt, wird in letzter Zeit zunehmend der Metabolismus höher anellierter PAK (hmw: high-molecular-weight) bearbeitet.

Obwohl verschiedentlich der Bioabbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen unter anaeroben Bedingungen beschrieben wurde, überwiegt doch der Anteil aerober biologischer Abbaumechanismen in der Natur bei weitem [ATLAS 1981, FERDINANDY-VAN VLERKEN 1998, MIHELICIC und LUTHY 1988]. Für den Abbau von PAK lassen sich einige generelle Grundsätze aufstellen. Der erste Schritt ist der Einbau eines oder zweier Sauerstoffatome in das Substrat. Eukaryonten wie Pilze und Säugetiere verfügen zumeist über Monooxygenasen, die ein Sauerstoffatom auf den Benzolring übertragen, was zu karzinogenen Metaboliten führen kann (s. Kap. 2.2.2). Prokaryonten wie die Eubakterien verfügen überwiegend über Dioxygenasen: Ein Benzolring des Substrats wird zu *cis*-Dihydrodiol hydroxyliert und anschließend durch eine Dehydrogenase zu einem Dihydroxyderivat dehydriert. Nach der Ringspaltung werden das oder die Reststück/e überwiegend als Säuren eliminiert, die in den normalen Intermediärstoffwechsel der Zelle eingeschleust werden können. Dann wird über den gleichen Mechanismus sukzessiv der nächste Benzolring angegriffen. Die Abbauwege der PAK münden in die drei Zwischenprodukte Catechol, Protocatecholsäure und Gentisinsäure (letztere ist 2,5-Dihydroxybenzoesäure, sonstige s. Abb. 2). Anschließend werden diese monoaromatischen Verbindungen nach Ringspaltung zu Succinat, Fumarat, Pyruvat oder Acetat sowie Acetaldehyd abgebaut: Produkte, die in den normalen Stoffwechsel eingeschleust werden können. Alle Metabolite können zum Aufbau der Zellsubstanz oder zur Energiegewinnung herangezogen werden, was zur Produktion von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O führt [SIMS und OVERCASH 1983, WILSON und JONES 1993].

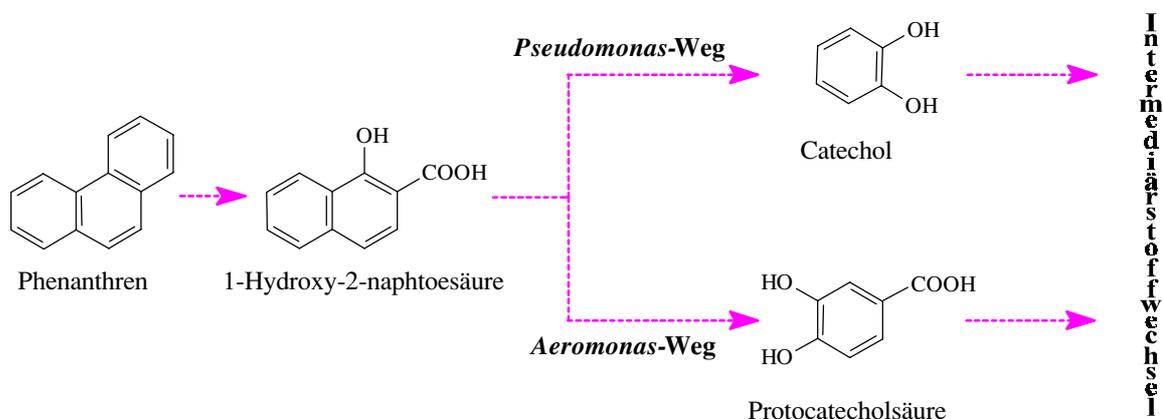


Abb. 2: Phenanthren-Abbauwege [vereinfacht nach CERNIGLIA 1981]

Beim Phenanthren, dem hauptsächlich in dieser Arbeit eingesetzten PAK, lassen sich zwei Abbauewege unterscheiden, die von dem charakteristischen Zwischenprodukt 1-Hydroxy-2-naphthoesäure ausgehen. EVANS ET AL [1965] beschrieben den „*Pseudomonas*-Weg“, KIYOHARA und NAGAO [1978] den „*Aeromonas*-Weg“ (s. Abb. 2) [s. auch CERNIGLIA und HEITKAMP 1989, KÄSTNER et al. 1993].

Die Fähigkeit von Bakterien, auf PAK mit vier Ringen als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, wurde vielfach gezeigt, während die Mineralisation von höherkondensierten PAK noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte [KÄSTNER et al. 1993, LI et al. 1996]. In den letzten Jahren wurden auch vermehrt Untersuchungen des Abbaus von PAK-Mischungen mit Rein- und Mischkulturen untersucht [HUGHES et al. 1997]. YE et al. [1996] konnten beispielsweise zeigen, daß *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 in der Lage ist, auch 5-Ring PAK wie Benzo[a]pyren in Gegenwart anderer Vertreter dieser Stoffklasse kometabolisch abzubauen.

## 2.2.4 Tenside zur Erhöhung der PAK-Wasserlöslichkeit

### 2.2.4.1 Grundlagen

Während der Verdauung wird durch die Gallenblase bei Bedarf eine bittere, alkalisch reagierende Flüssigkeit in den Darm sezerniert, die u. a. Gallensäuren enthält. Diese wirken als biologische Tenside und ermöglichen die Emulgierung der Fette und damit deren Aufnahme in das wässrige System des Körpers [FABRY 1991]. Tenside spielen immer dann eine eminent wichtige Rolle in der Natur, wenn Grenzflächen in biologischen Systemen modifiziert oder Abgrenzungen durch Membranen geschaffen werden sollen. Der von E. Götte 1964 vorgeschlagene Begriff „Tenside“ leitet sich vom lateinischen Wort „tensio“ = Spannung ab. Anschaulich ist auch dessen englische Übersetzung „surfactant“, welches eine Wortkonstruktion aus „surface active agents“ darstellt.

Tenside sind amphiphile Moleküle; sie besitzen mindestens einen hydrophilen und einen lipophilen Anteil. Die Größen dieser Teile müssen in einem bestimmten Gleichgewicht zueinander stehen. Sie sind für viele Eigenschaften wie etwa die Löslichkeiten in Öl oder Wasser entscheidend. (Der sogenannte HLB-Wert (Hydrophilie-Lipophilie-Balance-Wert) gibt die Molmasse der hydrophilen Gruppe im Vergleich zum Gesamtmolekül wieder [GRIFFIN 1949, 1954, zit. in SCHMID, 1996].) Tenside lagern sich bevorzugt an Grenzflächen an, wobei sich die hydrophilen Anteile zur wässrigen, die lipophilen zur Ölphase hin ausrichten. Das wirkt sich insbesondere in einer Herabsetzung der Grenzflächenspannung oder - bei Systemen mit flüssigen und gasförmigen Phasen - der Oberflächenspannung aus. Die meisten Tenside, seien sie synthetischen oder biologischen Ursprungs, reduzieren beispielsweise die Oberflächenspannung des Wassers von 72,8 mN/m auf Werte zwischen 25 - 40 mN/m [BECHER 1973, GEORGIU et al. 1992, GUTNICK und MINAS 1987]. Neben der Anreicherung an Phasengrenzflächen und der Erniedrigung der Grenzflächenspannung ist die Mizellbildung eine weitere charakteristische Eigenschaft dieser Substanzklasse. In flüssig-gasförmigen Systemen wie etwa Wasser/Luft reichern sich die Tenside bei zunehmender Konzentration an der Oberfläche an; zusätzlich liegt ein gewisser Anteil gelöst vor. Irgendwann ist die Wasser-Luft-Grenzfläche vollständig mit Tensidmolekülen bedeckt, so daß sich diese in der wässrigen Phase zu Mizellen zusammenlagern: die hydrophilen Anteile sind zum Wasser, die hydrophoben Anteile zum Zentrum hin ausgerichtet (s. Abb. 3). Im Inneren der Mizellen lassen sich hydrophobe Moleküle solubilisieren, Feststoffe suspendieren oder normalerweise nicht mischbare Flüssigkeiten emulgieren. Dabei wird die Gesamtmenge eines hydrophoben Stoffes in wässriger und mizellarer Phase als apparente Löslichkeit bezeichnet. Der Begriff CMC (critical micelle concentration) bezeichnet die Tensidkonzentration, bei der die Mizellbildung einsetzt.

Tenside können daher beim Waschen, Benetzen, Emulgieren, Reinigen und Dispergieren eingesetzt werden, weshalb diese Substanzgruppe eine breite Anwendung in der Industrie gefunden hat [FALBE und REGITZ 1992, FCI 1992, GEORGIU et al. 1992]. Die Reinigungswirkung der Tenside ist schon seit dem frühen Altertum bekannt: Damals stellten die Sumerer (um 2.500 v. Chr.) seifenähnliche Substanzen durch das Verkochen von Olivenöl mit Holzasche her [FABRY 1991].

#### 2.2.4.2 Die verschiedenen Tensidtypen

Tenside werden je nach Art der Darstellung in synthetische und biogene eingeteilt. Während erstere auf rein chemischem Wege hergestellt werden, umfaßt die zweite Gruppe oberflächenaktive Substanzen biologischer Herkunft. Im engeren Sinne sind mit dem Begriff Biotensid die von manchen Mikroorganismen beim Wachstum auf hydrophoben Substraten gebildeten oberflächenaktiven Substanzen gemeint [LANG und WAGNER 1987]. Diese stellen jedoch nur eine kleine Gruppe aller der in der Natur vorkommenden grenzflächenaktiven Stoffe dar.

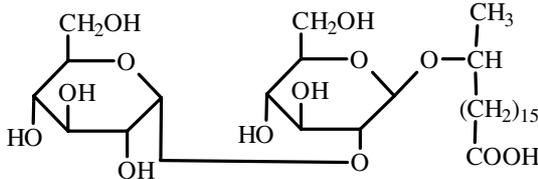
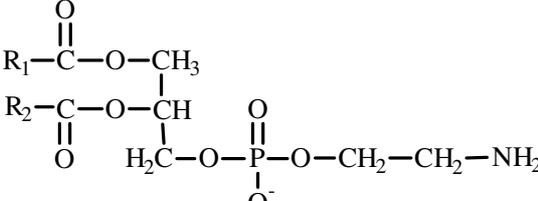
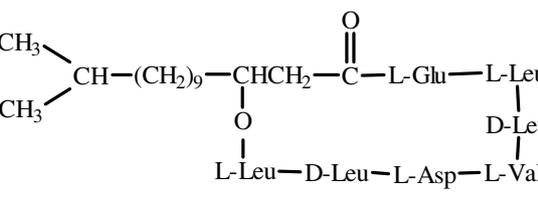
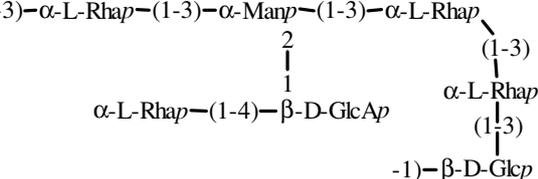
Die synthetischen Tenside sind in der Regel nach dem typischen Kopf-Schwanz-Modell aufgebaut, d. h. sie haben eine hydrophile „Kopf-“ und eine hydrophobe „Schwanzgruppe“. Diese werden in schematischen Darstellungen jeweils mit einem Kreis bzw. einem Strich symbolisiert (s. Abb. 3). Tabelle 2 gibt die verschiedenen synthetischen Tensidgruppen wieder, die im Allgemeinen nach der Ladung des hydrophilen Molekülanteils bei Dissoziation in wässriger Lösung eingeteilt werden.

Tab. 2: Die unterschiedlichen Gruppen synthetischer Tenside mit Beispielen.

Tensidtyp	Beispiel(e)	Quelle(n)
<b>anionische Tenside</b> <b>(Aniontenside)</b>	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{R}-\text{O}-\text{S}-\text{O}^- \quad \text{X}^+ \\    \\ \text{O} \end{array}$ <p><b>primäres Fettalkoholsulfat</b>  (R = C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-Alkylrest,  X = Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, org. Basen)</p>	BRÜSCHWEILER 1975, FABRY 1991
<b>kationische Tenside</b> <b>(Kationtenside)</b>	$\begin{array}{c} \text{R}_1 \quad \text{R}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{N}^+ \\ / \quad \diagdown \\ \text{R}_4 \quad \text{R}_3 \end{array} \quad \text{X}^-$ <p><b>quartäre Ammonium-Verbindung</b>  (z. B. Dimethyldistearylammoniumchlorid mit R<sub>1,2</sub> = C<sub>18</sub>-Alkylrest, R<sub>3,4</sub> = Methylgruppe, X = Cl<sup>-</sup>)</p>	FALBE und REGITZ 1990, FCI 1992
<b>nichtionische T.</b> <b>(Niotenside)</b>	$\text{R}-\text{CH}_2\text{O}-\left[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}\right]_n-\text{H}$ <p><b>primärer Fettalkoholpolyglycoether</b>  R = C<sub>9</sub>-C<sub>19</sub>-Alkylrest, n = 3 - 15</p>	BRÜSCHWEILER 1975, FABRY 1991, MÜLLER 1996
<b>amphotere (zwitterionische) Tenside</b> <b>(Amphotenside)</b>	$\begin{array}{c} \text{R}_2 \\   \\ \text{R}_1-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\   \\ \text{R}_3 \end{array}$ <p><b>lineare Betaine</b>  (R<sub>1</sub> = C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylrest, R<sub>2,3</sub> = Methylgruppe)</p>	FALBE und REGITZ 1989, MÜLLER 1996

Die hydrophoben Gruppen sind in der Regel unpolare Kohlenwasserstoffreste, die linear, verzweigt oder cyclisch sein können. Gelegentlich kommen hier auch Heteroatome vor. Demgegenüber sind die Biotenside nicht so einfach zu klassifizieren, da sie meist wesentlich komplexer und vielfältiger aufgebaut sind. Die bei den synthetischen oberflächenaktiven Substanzen gebräuchliche Einteilung nach Ladung ist nicht anwendbar, weil es Beispiele gibt, bei dem dasselbe Tensid bei gleichem pH sowohl geladen als auch ungeladen vorkommen kann [ROSENBERG 1986]. Biotenside werden daher überwiegend nach ihrer biochemischen Natur eingeteilt. Tabelle 3 gibt eine typische Einteilung wieder, die von DESAI und DESAI [1993] aufgestellt wurde.

Tab. 3: Die verschiedenen Biotensidgruppen mit repräsentativen Beispielen.

Biotensidtyp	Beispiel(e)	Quelle(n)
<b>Glycolipide</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Sophoroselipid</b> s. auch Abb. 5, Kap. 3.3.</p>	verändert nach COOPER et al. 1979, zit. in COOPER und ZAJIC 1980
<b>Phospholipide und Fettsäuren</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Phosphatidylethanolamin</b> (R<sub>1,2</sub> = Alkylsubstituenten)</p>	STRYER 1990, COOPER und ZAJIC 1980
<b>Lipopeptide und -proteine</b>  (darunter auch oberflächenaktive Antibiotika)	 <p style="text-align: center;"><b>Surfactin</b></p>	GEORGIU et al. 1992, GUTNICK und MINAS 1987
<b>Polymere Biotenside</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Polysaccharid-Protein-Komplex von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD4</b></p> <p>Dargestellt ist nur die sich wiederholende Heptasaccharid-Einheit. Es ist nicht klar, ob der amphiphile Charakter durch interagierende Proteine oder Konformationsänderungen des Komplexes erreicht wird. Die Substanz ist ein guter Emulgator.</p>	nähere Informationen und weitere Literatur: GUTNICK und MINAS 1987
<b>besondere „Tenside“</b>	Vesikel, ganze Zellen, Sporen oder Fimbrien	DESAI und DESAI 1993

Der hydrophobe Anteil eines Biotensids wird überwiegend durch eine oder zwei Kohlenwasserstoffkette/n von Fettsäuren repräsentiert [FIECHTER 1992, LANG und WAGNER 1987]. Für weitere Informationen sei ebenfalls auf COOPER und ZAJIC 1980, GEORGIU et al. 1992, GUTNICK und MINAS 1987 verwiesen.

#### 2.2.4.3 Anforderungen an und Überblick der Tenside für den mikrobiellen Schadstoffabbau

Bei der Auswahl von Tensiden, die zur biologischen Bodensanierung eingesetzt werden können, sollten folgende Eigenschaften berücksichtigt werden:

- Löslichkeit
- Toxizität
- Abbaubarkeit
- Produktionskosten
- Solubilisierungs- bzw. Emulgierkapazität

Der überwiegende Teil der Untersuchungen zum tensidvermittelten mikrobiellen Abbau von hydrophoben organischen Verbindungen wurde mit synthetischen nichtionischen Vertretern durchgeführt [ROUSE et al. 1994, VOLKERING et al. 1998]. Weniger Ergebnisse sind dagegen über ionische Tenside zu erhalten. Da kationische Vertreter häufig vergleichsweise toxisch und an die meisten Böden stark sorptiv sind, sind daher vor allem anionische Tenside interessant. Zu deren wichtigsten Vertretern zählen die aus nachwachsenden Rohstoffen preiswert herzustellenden Fettalkohole und Fettalkoholethersulfate. In den letzten Jahren werden vermehrt Biotenside bearbeitet, da sie im Vergleich zu synthetischen Tensiden immer kostengünstiger produziert werden können. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch bessere Lösungs- und Abbaueigenschaften aus. Zusätzlich werden Biotenside von der Gesellschaft aufgrund der umweltfreundlichen Herstellung und dem umweltverträglichen Einsatz favorisiert [FIECHTER 1992, NIEBELSCHÜTZ 1996, OBERBREMER et al. 1990]. Meist werden bei den Untersuchungen zum Schadstoffabbau mit biogenen Tensiden mikrobiell synthetisierte eingesetzt, doch auch solche pflanzlichen Ursprungs werden getestet [SOEDER et al. 1996].

### 2.2.5 Tensideinsatz beim mikrobiellen Abbau schwerlöslicher Verbindungen

#### 2.2.5.1 Mikrobiologisch-ökologische und physiologische Aspekte

Im natürlichen Biotop müssen fast alle Nahrungsstoffe von den Mikroorganismen zunächst modifiziert werden, um aufgenommen und damit verstoffwechselt werden zu können. Die Konfrontation mit einer großen Menge schnell verwertbarer C-Quelle, wie beispielsweise Glucose mit optimaler Nährsalzversorgung, ist meist nur im Labor gegeben. In der Natur unterliegen die Mikroorganismen in der Regel einem starkem Nährstoffmangel. So beträgt in aquatischen Lebensräumen die Konzentration eines Nährstoffs überwiegend weniger als 10 µg/L [Schlegel 1992].

Demgegenüber ist häufig die Investition einer vergleichsweise großen Menge an Stoffwechselenergie nötig, um Nahrungsstoffe verfügbar zu machen. Polymere Substanzen wie Lignin oder Cellulose werden beispielsweise zunächst extrazellulär unter Sekretion und damit möglichem Verlust an Enzymen oder anderen zellulären Substanzen in kleinere Einheiten zerlegt, bevor sie aufgenommen werden können. N<sub>2</sub> kann von einigen Mikroorganismen nur unter hohem ATP-Einsatz fixiert werden. Eine Reihe von Mikroorganismen synthetisieren Biotenside, die die Löslichkeit kaum wasserlöslicher Stoffe wie PAK erhöhen oder - durch Änderung der Zellhydrophobizität - die Adsorption an Grenzflächen ermöglichen. Die physiologische Rolle gerade der Biotensidproduktion ist ein sehr komplexes Themengebiet, denn sie ist nicht unbedingt mit der Erhöhung der Bioverfügbarkeit hydrophober Substanzen gekoppelt. So bildet etwa der Stamm *Pseudomonas aeruginosa* GL1 auch beim Wachstum auf löslichen Substraten - in diesem Falle etwa Glycerol -

Glycolipide [ARINO et al. 1998]. Ein Screening von diversen von Altlasten isolierten Mikroorganismen zeigte, daß sie Biotenside beim Wachstum auf schwerlöslichen Kohlenwasserstoffen eher selten produzieren [HENNE et al. 1995]. WILLUMSEN und KARLSON [1997] beschrieben - aufgrund einer Untersuchung von fünf von PAK-kontaminierten Böden isolierten Bakterienstämmen - dagegen ein signifikantes Potential zur Produktion oberflächenaktiver Substanzen. Diese fiel jedoch nicht mit der Fähigkeit einzelner Stämme zum PAK-Abbau zusammen. Auch ARINO et al. [1998] fanden heraus, daß von einem Stamm sekretierte Biotenside den Phenanthrenabbau durch einen anderen Bakterienstamm fördern kann.

Im Prinzip lassen sich drei Erklärungsmöglichkeiten für die physiologische Rolle der Biotensidproduktion heranziehen.

1. Im Rahmen des Energiestoffwechsels kann der Mikroorganismus durch Aufnahme energiereicher Substrate entweder netto Energie gewinnen, oder - wie im Falle von sekundären Metaboliten aber auch von Biotensiden diskutiert - Energie abgeben, wenn ein andere als die zum Wachstum notwendige C-Quelle ins Minimum geraten ist [ARINO et al. 1996, DAVILA et al. 1992].
2. Daneben kann die Produktion von Biotensiden auch auf die Gewinnung wertvoller Zellbausteine, zum Beispiel N-Verbindungen, zurückgeführt werden. So beschrieb NEU [1996] die Änderung der Zellhydrophobizität durch Rhamnolipidproduktion unter stickstofflimitierten Bedingungen.
3. Darüber hinaus wird aber auch postuliert, daß freigesetzte Produkte toxische Wirkungen für andere Organismen haben können und daher dem synthetisierenden Mikroorganismus einen Wachstumsvorteil verschaffen [ITOH et al. 1971, HAFERBURG et al. 1986].

Für den mikrobiellen biotensidgestützten PAK-Abbau lassen sich darauf aufbauend folgende weitere Aussagen treffen. Durch die Mineralisation der vergleichsweise stark reduzierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe kann der Mikroorganismus Energie gewinnen. Demgegenüber muß zur Synthese von Enzymen und Tensiden Energie verbraucht werden. Bei den oberflächenaktiven Substanzen muß ebenfalls beachtet werden, daß sie ausgeschieden werden können und damit der Zelle unter Umständen verloren gehen. Es ist also fraglich, in welchen Fällen eine positive Energiebilanz für den synthetisierenden Mikroorganismus erreichbar ist.

In der Natur liegen vielfach heterozyklische oder substituierte PAK vor, so daß die Bildung von Biotensiden zum Gewinn neuer Stoffe im Unterschied zum Abbau homozyklischer Verbindungen durchaus denkbar ist. Dabei muß jedoch beachtet werden, inwieweit die Biotenside selbst beispielsweise N-Atome enthalten, wie dies etwa bei Lipopeptiden oder -proteinen der Fall ist.

Demgegenüber sollten in einem PAK-Altlastboden toxische Effekte durch Biotenside keine große Rolle spielen, da diese auch an Boden- und Schadstoffpartikel adsorbieren und daher andere Mikroorganismen erst in höheren Konzentrationen schädigen würden.

Beim Zusatz von Tensiden zur Förderung des Bioabbaus geringlöslicher Kohlenwasserstoffe sollten die in diesem Kapitel gemachten Ausführungen berücksichtigt werden. Der Theorieteil schließt im folgenden mit einer Übersicht dieses Arbeitsgebietes, wobei der Abbau von PAK besonders betont wird.

### 2.2.5.2 Erklärungsansätze für den Schadstoffabbau in Gegenwart von Tensiden

In der Literatur wurde vielfach dokumentiert, daß Tenside die Löslichkeit hydrophober Substanzen und damit die „apparente Löslichkeit“ erhöhen oder eine Änderung der Zellhydrophobizität bewirken können. Zum genauen Wirkmechanismus von Tensiden auf den mikrobiellen Schadstoffabbau schwerlöslicher Verbindungen, die molekular, in fester Form oder als separate flüssige Phase im Boden vorliegen, können dabei jedoch nur vergleichsweise wenige allgemeingültige Aussagen getroffen werden: Es sind sowohl hemmende, fördernde als auch keine Auswirkungen bekannt [CARMICHAEL und PFAENDER 1997, LAHA et al. 1995, ROUSE et al. 1994, VOLKERING et al. 1998]. So zeigten LAHA und LUTHY [1991, 1992], daß verschiedene Niotenside in Konzentrationen über der CMC den Phenanthrenabbau durch ein PAK-abbauendes Mikroorganismenkonsortium in einem Boden-Wasser-System komplett inhibierten, während Konzentrationen unterhalb der CMC keine nennenswerten Auswirkungen zeigten. Demgegenüber wiesen ARONSTEIN et al. [1991] durch Versuche in zwei unterschiedlichen Böden nach, daß sich der Phenanthrenabbau einer Mischkultur durch Zusatz verschiedener Niotenside in Konzentrationen unterhalb der CMC steigern läßt.

Ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen ist jedoch schwierig:

- Zum ersten werden Begriffe nicht einheitlich verwendet, die Problematik wurde am Beispiel des „Abbaus“ in Kap. 2.2.3.1 beispielhaft erläutert.
- Zum zweiten sind Versuchsvorschriften bisher nur wenig standardisiert. So wird z. B. die Bestimmung der CMC meist unter versuchsnahen Bedingungen durchgeführt, wodurch Vergleiche der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erschwert werden.
- Zum dritten wird eine Fülle unterschiedlicher Systeme mit verschiedenen Rahmenbedingungen verwendet, was die Gegenüberstellung kompliziert macht.
- Zum vierten fehlen analytische Verfahren oder sie werden nicht eingesetzt. Zum Beispiel ist es sehr schwer festzustellen, welcher Anteil des Schadstoffs oder des Tensids zu einem gewissen Zeitpunkt an den Boden adsorbiert ist oder in der mizellaren bzw. wässrigen Phase gelöst vorliegt.

Für die tensidgesteigerte Aufnahme von schwerlöslichen Schadstoffen wie PAK lassen sich aus der Literatur drei Erklärungsansätze ableiten (s. Abb. 3):

1. Die Mikroorganismen können den Schadstoff direkt aus der mizellaren Phase aufnehmen, d. h. durch die Mizellen wird der hydrophobe Stoff solubilisiert und zur Zelle transportiert, wo dann eine Wechselwirkung stattfindet. Dies kann beispielsweise die Fusion mit der Zellmembran sein, wie es MILLER und BARTHA [1989] postulierten. Sie konnten zeigen, daß der Alkantransport in gewissen Grenzen durch Liposomen, Vesikeln mit wässrigem Inneren und einer Lipiddoppelschicht, gesteigert wird.
2. Die Zelloberfläche der Mikroorganismen wird hydrophobisiert, so daß ein direkter Kontakt mit der Oberfläche der Kohlenwasserstofftröpfchen oder -kristalle ermöglicht wird. NEUFELD et al. [1980] zeigten beispielsweise, daß *Acinetobacter calcoaceticus* beim Wachstum auf Hexadecan oberflächenaktive Verbindungen produziert, die den Bakterien den Kontakt zum Substrat ermöglichen. In Gegenwart von Boden kann durch Tensidzusatz dementsprechend auch die Adsorption der Mikroorganismen an mit Schadstoff besetzte Bodenpartikel erreicht werden, wodurch ebenfalls eine erleichterte Aufnahme möglich werden könnte [LAOR et al. 1996, POETON et al. 1999, TANG et al. 1998].

3. Die Mikroorganismen verwerten nur die Schadstoffe, die in der wässrigen Phase gelöst sind, wobei durch die Tenside der Massentransfer beschleunigt wird. ALMGREN et al. [1979] konnten zeigen, daß die Verweilzeit verschiedener Arene wie etwa Naphthalin, Anthracen und Pyren in Mizellen verschiedener ionischer Tenside zwischen 1 und 100  $\mu$ s liegt, demzufolge eine schnelle Gleichgewichtseinstellung zwischen mizellarer und wässriger Phase möglich ist.

In Gegenwart von Boden muß ein weiterer Aspekt beachtet werden. Tenside adsorbieren an den Boden und desorbieren dadurch Schadstoffmoleküle, wodurch der Massentransfer erhöht werden kann [TIEHM 1997]. Darüber hinaus könnten durch die Tenside auch in Poren vorhandene Stoffe herausgelöst werden, wie dies etwa von der tertiären Erdölförderung bekannt ist [ZHANG et al. 1998].

Negative Effekte auf den mikrobiellen Schadstoffabbau durch Tensidzusatz werden u.a. auf deren Toxizität zurückgeführt [ARONSTEIN et al. 1991] (s. auch Kap. 2.2.5.1). Darüber hinaus wird immer wieder beschrieben, daß das Tensid bevorzugt abgebaut wird und daher der Schadstoffabbau zum Erliegen kommt [ROUSE et al. 1994]. Daneben wiesen GRIMBERG und AITKEN [1995] im Gegensatz zu den Ergebnissen von ALMGREN et al. [1979] darauf hin, daß mizellar gelöster Schadstoff in bestimmten Fällen für die Mikroorganismen nicht bioverfügbar ist. Dieses Phänomen wird als „Sequestering“ bezeichnet. Entsprechend Punkt 2 der zuvor gegebenen Erläuterungen wird in einigen Fällen auch die Erklärung favorisiert, daß durch Tensidzusatz der direkte Kontakt zwischen Mikroorganismus und hydrophobem Schadstoff verhindert wird [FOGHT et al. 1989].

Fazit der Ausführungen ist, daß noch weitere intensive Forschung auf dem Gebiet des Tensidzusatzes beim mikrobiellen Schadstoffabbau notwendig ist, um einen in allen Fällen effizienten Einsatz in der Praxis zu gewährleisten [JAHAN et al. 1997, VOLKERING et al. 1998].

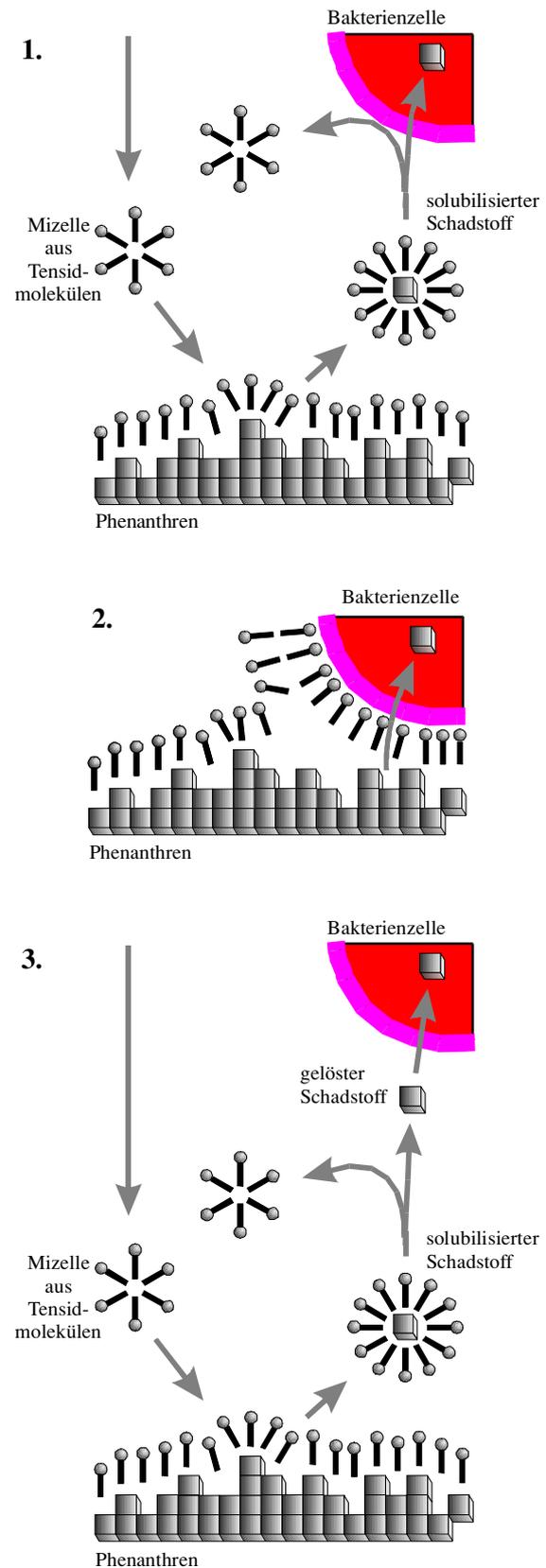


Abb. 3: Erklärungsansätze zur tensidvermittelten Aufnahme von Schadstoffen (weitere Erläuterungen im Text).

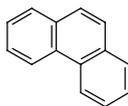
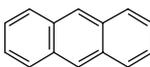
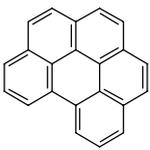
## 3 Praktischer Teil I

### Material und Methoden

#### 3.1 Phenanthren und andere verwendete PAK

Die in der Arbeit eingesetzten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Mehrzahl der Versuche wurde mit Phenanthren durchgeführt, da es sich durch eine vergleichsweise geringe Toxizität und einen für die Stoffgruppe exzellenten Modellcharakter auszeichnet. Darüber hinaus wurde ein Mikroorganismenkonsortium auf einem Drei-PAK-Gemisch angezogen, welches neben Phenanthren auch Pyren und Benzo[ghi]perylen enthielt. Anthracen wurde nicht für Abbauversuche verwendet, kam aber, aufgrund seiner Strukturverwandschaft zum Phenanthren, als interner Standard bei der GC-Analytik zum Einsatz.

Tab. 4: Daten der in der Arbeit eingesetzten PAK.

Bezeichnung	Phenanthren	Anthracen	Pyren	Benzo[ghi]perylen
Strukturformel				
Summenformel	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>
Leitsubstanz	EPA	EPA	EPA	EPA DIN
Molmasse	178,23 g/mol	178,23 g/mol	202,26 g/mol	276,34 g/mol
Schmelzpunkt <sup>(1)</sup>	100,5°C	216,4°C	150,4°C	278,3°C
Siedepunkt <sup>(2,3)</sup>	338°C	340°C	393°C	542°C
Dampfdruck (20°C) <sup>(4)</sup>	9,1*10 <sup>-2</sup> Pa	2,6*10 <sup>-2</sup> Pa	9,1*10 <sup>-5</sup> Pa	1,3*10 <sup>-8</sup> Pa
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O (20°C) <sup>(5)</sup>	7,2 µmol/L	0,37 µmol/L	0,72 µmol/L	0,02 µmol/L

Anmerkungen zu EPA und DIN:

Aufgrund der Vielzahl in der Umwelt vorkommender polyzyklischer aromatischer Verbindungen wurden von der EPA (Environmental Protection Agency) 16 häufig vorkommende Vertreter ausgesucht, die als Leitsubstanzen für analytische Zwecke herangezogen werden [EPA 1979, KARCHER et al. 1985 und 1988]. In der Bundesrepublik Deutschland werden in diesem Zusammenhang gemäß DIN-Vorschriften sechs PAK erwähnt [DIN 38409 TEIL 13 und DIN 38407 TEIL 8].

Literaturhinweise:

(1) KARCHER et al. 1988 / (2) GRIMMER 1983 / (3) WHITE 1986 / (5) PEARLMAN et al. 1984; alle zit. in KARCHER et al. 1988 und BRINKMANN 1996 / (4) SIMS und OVERCASH 1993

### 3.2 Mikroorganismen

Mikrobielle Reinkulturen unterschiedlichster Gruppen wurden für Abbau- und Toxizitätsuntersuchungen eingesetzt. Zudem wurde eine Mischkultur auf einem Medium angezogen, das drei PAK-Komponenten enthielt (s. Kap. 3.7.4).

Zu Beginn der Arbeiten wurde ein Bakterienstamm gesucht, der einerseits über eine gute Phenanthrenabbaukapazität verfügt und andererseits möglichst ubiquitär verbreitet ist. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Versuche getesteten Mikroorganismen und deren Abbauvermögen.

Tab. 5: Test der Phenanthrenabbaukapazität verschiedener Bakterien.

Nr.	Mikroorganismus	Herkunft	GRAM-Verhalten	Phenanthrenabbau
1	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1	DSMZ, Nr. 6900	negativ	100%
2	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	Mikrobiol., Ms	positiv	84%
3	<i>Rhodococcus ruber</i>	DSMZ, Nr. 7512	positiv	72%
4	<i>Rhodococcus ruber</i>	DSMZ, Nr. 7511	positiv	68%
5	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	DSMZ, Nr. 7526	negativ	56%
6	<i>Pseudomonas putida</i>	DSMZ, Nr. 8368	negativ	44%
7	<i>Pseudomonas putida</i> P8	Mikrobiol., Ms	negativ	0%

#### Versuchsdurchführung:

Die Bakterien von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) wurden aus einer Tiefkühlkultur, die Stämme des mikrobiologischen Institutes direkt von einer Agarplatte zuerst auf Standard I-Agar (St I Agar) ausgestrichen und anschließend dreimal sukzessive auf 100 mg/L Phenanthren enthaltende MM<sub>Brün.</sub>-Agarplatten vereinzelt (Doppelansatz, s. Kap. 7.2). Die Inkubation erfolgte jeweils bei 28°C im Brutschrank. Das Wachstum von auftretenden Einzelkolonien, welches direkt mit dem Phenanthrenabbau korreliert, wurde repräsentativ vermessen, protokolliert und in die angegebenen Prozentwerte umgerechnet.

28°C stellt den Durchschnitt der für die einzelnen Stämme angegebenen Temperaturen dar, die von 25 - 30°C variieren. MM<sub>Brün.</sub> ist das im DSMZ-Katalog am häufigsten für Phenanthrenabbauer angegebene Mineral-salzmedium.

#### Anmerkungen:

Die mit „Mikrobiol., Ms“ bezeichneten Stämme wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Rehm, Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Unter den vorgegebenen Bedingungen wächst das Bakterium *S. yanoikuyae* B1 (ehemals *Beijerinckia* spec. strain B1 [KHAN et al. 1996]) am besten und war daher für die weiteren Versuche am geeignetsten.

Die Gattung *Sphingomonas* wurde 1990 von YABUCHI et al. beschrieben, 1993 wurden durch TAKEUCHI et al. Verbesserungen vorgenommen. Einige allgemeine Merkmale dieser Gattung sind nachstehend aufgelistet.

### Morphologische und biochemische Charakteristika der Gattung *Sphingomonas* [BALKWILL et al. 1997]

- GRAM-negative, nicht sporenbildende Stäbchen
- weitgehend unbeweglich, wenn beweglich: monopolar monotrich, d. h. eine polare Geißel liegt vor
- gelb
- obligat aerob, Katalase vorhanden
- Säureproduktion (oxidativ) bei Wachstum auf Pentosen, Hexosen und Disacchariden, aber nicht auf Polyalkoholen und Inulin
- Ubiquinon Q-10 = Hauptquinon der Atmungskette
- Hauptbestandteile der zellulären Lipide: 18:1 und 20H14:0 / Namensgebend ist das Sphingoglycolipid
- G+C Gehalt der genomischen DNA: 61,6 - 67,8 mol%

Sphingomonaden sind in Böden und Gewässern weit verbreitete Bakterien. Sie zeichnen sich durch sehr breite Abbaukapazitäten aus. Der Stamm *S. yanoikuyae* B1 wurde aus einem verschmutzten Fluß in Austin (Texas) isoliert und kann u. a. mit Anthracen, Biphenyl, Naphthalin, Phenanthren, *m*-Xylen als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und eine Reihe weiterer PAK kometabolisieren [DSMZ 1993 und 1995, GIBSON et al. 1973, KHAN et al. 1996 und dort zit., KIM et al. 1997]. Deshalb ist eine ganze Reihe von Untersuchungen zu Abbauwegen und zur Genetik von Sphingomonaden publiziert worden [CERNIGLIA 1993, EATON et al. 1996, JERINA et al. 1984, KIM et al. 1996, 1997, RESNICK und GIBSON 1996, ZYLSTRA und KIM 1997].

Die Mikroorganismen, die im Rahmen von Toxizitätsuntersuchungen eingesetzt wurden, sind an entsprechender Stelle näher beschrieben (s. Kap. 5.1.3).

### 3.3 Getestete Tenside: Texapon® N25 und Sophoroselipide

Zu Beginn der Arbeit wurden *S. yanoikuyae*-Wachstumstests mit Phenanthren unter Zusatz zweier verschiedener anionischer synthetischer Tenside durchgeführt. Dabei wurden, bezogen auf spätere Versuche, relativ hohe Tensidkonzentrationen von 0,33, 0,67 und 1 g/L eingesetzt. Es resultierte eine für Natriumdodecylethersulfat (Texapon® N25) im Vergleich zur Natriumdodecylbenzolsulfonsäure wesentlich geringere wachstumshemmende Wirkung [BUSCH 1995]. Das Natriumdodecylethersulfat wurde daher, stellvertretend für die synthetischen Tenside, näher bearbeitet.

Texapon® N25 findet in der Industrie als preisgünstiger Grundstoff breite Anwendung, etwa in Schaumbädern, Shampoos oder für kosmetische Produkte. Es wird von der Firma Henkel KGaA aus Düsseldorf hergestellt und wurde freundlicherweise von N. Buschmann vom Lehrstuhl für Analytische Chemie der Universität Münster für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Strukturformeln der verschiedenen Komponenten des Tensidgemisches sind in Abb. 4 dargestellt, in Tab. 6 sind einige Daten zum Texapon® N25 zusammengefaßt.

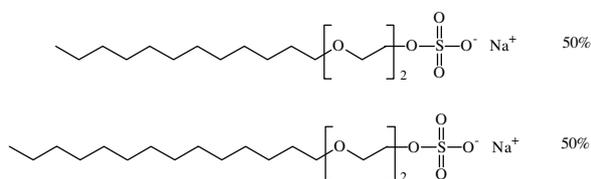


Abb. 4: Texapon® N25  
 - die hydrophobe Alkylkette besteht zu je 50% aus C<sub>12</sub>- und C<sub>14</sub>-Resten  
 - je zwei Ethoxylatgruppen sind im Mittel je Molekül vorhanden

Tab. 6: Daten zu Texapon<sup>®</sup> N25 [Henkel 1985]

CTFA-Bezeichnung	Sodium Laureth Sulfate
Beschaffenheit	gelbliche Flüssigkeit
Waschaktive Substanz	27 - 29%
Molmasse	382,0 g/mol
Anionensid	min. 0,693 mval/g
Natriumchlorid	max. 1,5%
Natriumsulfat	max. 1,0%
pH-Wert (10%ige Lösung)	ca. 6,4 - 7,5
Viskosität (20°C)	2500 - 2900 mPas
Dichte (20°C)	ca. 1,05 g/cm <sup>3</sup>
biologische Abbaubarkeit	gut
Lagerung	bei Temperaturen unter 30°C in verschlossenen Gebinden mindestes 3 Jahre haltbar

Neben dem synthetischen Texapon<sup>®</sup> N25 wurde in der Arbeit ein Biotensid untersucht. Dabei fiel die Wahl auf Sophoroselipid, ein Tensid vom Glycolipidtyp, welches durch *Candida*-Arten synthetisiert wird (s. Abb 5). Das Biotensid-Rohprodukt wurde durch eine zweistufige Kultivierung von *C. bombicola* ATCC 22 214 auf Glucose und Sonnenblumenöl produziert und anschließend durch Zentrifugation des Fermentationsmediums gewonnen. Diese Arbeiten wurden von H.-J. Daniel, der im Arbeitskreis von Herrn Prof. Reuss am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart tätig ist, durchgeführt [DANIEL et al. 1998 a/ b].

Um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen, wurde das gelieferte Gemisch vor der Verwendung in 3 Teilen  $H_2O_{bidest.}$  aufgenommen und zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert [DANIEL 1996]. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer (OB 2001, Fa. Heidolph) bei 50 mbar und einer Wasserbadtemperatur von 50°C eingengt. Im Anschluß daran wurde die hochviskose bräunliche Flüssigkeit noch für 48 - 72 h in einem Drehschieberpumpen-Vakuum getrocknet. Durch Wiederaufnahme des Rückstands - eines gelb-bräunlichen, pulver- bis karamelartigen Feststoffs - in  $H_2O_{bidest.}$  wurde eine Stammlösung hergestellt, die im Kühlschrank bei 4°C gelagert wurde.

Das auf diese Art gewonnene Sophoroselipid ist jedoch kein einheitliches, reines Produkt, da 1. ein Gemisch verschiedener Sophoroselipide vorliegt. TULLOCH et al. [1962] und ASMER et al. [1988] führten die grundlegenden Untersuchungen zur Strukturaufklärung durch: die Biotenside können einerseits als offenkettige („Säureform“), andererseits als geschlossene Form („Lactonform“) vorliegen. Je nach Kultivierungsbedingungen treten zudem noch

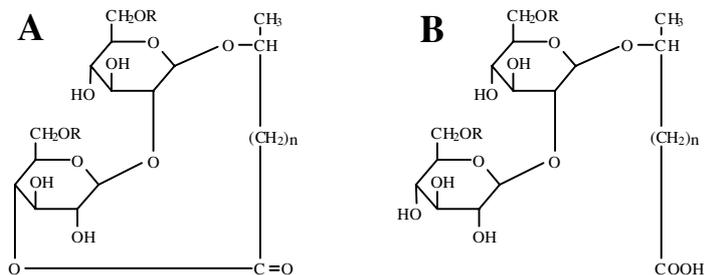


Abb. 5: Strukturformeln von Sophoroselipiden (verändert nach [ASMER 1988])

A. Lacton-, B. Säureform, R = H oder Ac, n = 10 - 20

verschieden lange Fettsäureketten und unterschiedliche Acetylierungsgrade der Sophoroseinheit auf. Abb. 5 gibt verschiedene Strukturformeln der Sophoroselipide wieder. Nähere Angaben zu dem im verwendeten Gemisch vorliegenden Sophoroselipiden können noch nicht gemacht werden [DANIEL 1997].

2. noch Verunreinigungen in Form von Mono- und Diglyceriden und auch freien Fettsäuren vorhanden sind. Sie haben ihren Ursprung im Kultivierungsmedium und können durch die Aufarbeitung nicht zu 100% abgetrennt werden [DANIEL 1996].

In Absprache mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart wurde von einer weiteren Aufarbeitung aus anwendungstechnischer Sicht abgesehen.

Sophoroselipide finden, da sie immer kostengünstiger hergestellt werden können, zunehmend breitere Anwendung. So wurden sie u. a. erfolgreich bei der Insitu-Sanierung eines Hydrauliköl-schadens eines Berliner Geländes eingesetzt [NIEBELSCHÜTZ 1996], werden zur Herstellung von Körperpflegeprodukten verwandt [INOUE et al. 1979] oder dienen in der Medizin als Tumorsuppressoren [ISODA et al. 1997].

### 3.4 Der verwendete Boden

Im Rahmen der Arbeit wurde ein Boden eingesetzt, der freundlicherweise durch Herrn M. Lehmann vom ehemaligen Arbeitskreis Wagner des Instituts für Biochemie der Technischen Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt wurde. CZESCHKA [1995] führte die Gewinnung, Siebung und die in Tabelle 7 angegebene Charakterisierung der verwendeten Bodencharge durch.

#### 3.4.1 Gewinnung

Im Frühjahr 1993 - vor Beginn der Wachstumsperiode - wurde der Boden an einer Stelle, die sich unmittelbar neben der vielbefahrenen Autobahn A 391 in der Nähe der Gebäude der Gesellschaft für biologische Forschung (GBF) in Braunschweig / Stöckheim befand, entnommen. Dazu wurde die oberste Schicht von 5 cm abgetragen und das Erdreich anschließend etwa 30 cm tief ausgehoben.

#### 3.4.2 Siebung, weitere Vorbehandlung und Lagerung des Bodens

Der derart gewonnene Boden wurde durch ein Sieb der Maschenweite 2 mm von groben Bestandteilen, wie größeren Partikeln und Pflanzenteilen, getrennt und bei 4°C in geschlossenen Behältnissen gelagert. Vor der Verwendung wurde der Boden für 24 h bei 105°C bis zur völligen Gewichtskonstanz getrocknet, um das reproduzierbare Einwiegen zu ermöglichen. Des Weiteren konnte dadurch eine deutliche Reduktion der vorhandenen Keime von durchschnittlich  $9,0 \cdot 10^5$  auf  $1,7 \cdot 10^2$  KBE/g trockenem Boden, was 99,98% entspricht, bewirkt werden. (Durchführung nach ALEF 1994 mit minimalen Änderungen, Platten mit Phenanthren als C-Quelle.) Die festgestellte Ausgangszahl an Kohlenwasserstoff-abbauenden Mikroorganismen liegt im Grenzbereich zwischen denen für unkontaminierte und kontaminierte Böden [SCHLEGEL 1992, BOSSERT und BARTHA 1984].

### 3.4.3 Kurzcharakteristik

Tabelle 7 gibt einige der von Czeschka bestimmten Parameter des in der Arbeit eingesetzten Bodens wieder.

Nach MÜCKENHAUSEN [1957] kann der vorhandene Boden aufgrund seiner Korngrößenverteilung und seines  $k_f$ -Wertes als sandiger Schluff charakterisiert werden [CZESCHKA 1995]. Kontaminierte Böden mit  $k_f$ -Werten im Bereich  $\geq 10^{-4} - 10^{-6}$  können ggf. mit In-situ-Sanierungstechniken gereinigt werden [BOUWER 1992, CZESCHKA 1995, THOMAS und WARD 1989, WERNER 1992].

Tab. 7: Zusammenstellung einiger grundlegender Bodenparameter (verändert nach [CZESCHKA 1995]).

Parameter	Bestimmungsmethode	
pH-Wert	nach DIN 19 684 TEIL 1	$7,3 \pm 0,1$
Glühverlust	nach DIN 19 684 TEIL 3	$3,5 \pm 0,1$ Gew.-%
maximale Wasserhaltekapazität	nach [KLEIN 1992]	$33,5 \pm 1,0$ Gew.-%
Porenvolumen (Bodenfestbett)	in [CZESCHKA 1995] k. A.	55,9 Vol.-%
Wasserleitfähigkeit ( $k_f$ -Wert nach Darcy)	in Anlehnung an DIN 19 683 TEIL 9, Meßaufbau nach Hubbert [MATTHESS und UBELL 1983]	$8,4 * 10^{-5} \text{ m} * \text{s}^{-1}$ $\pm 0,5 * 10^{-5}$
elektrische Leitfähigkeit	nach DIN 19 684 TEIL 11	$7,0 \pm 0,2 \text{ mS} * \text{cm}^{-1}$
Korngrößenverteilung	in [CZESCHKA 1995] k. A.	Sand 31 Gew.-% Schluff 59 Gew.-% Ton 10 Gew.-%
BSB <sub>5</sub>	in Anlehnung an DIN 38 414 TEIL 6	$1,8 \pm 0,5 \text{ mg}_{\text{O}_2} * \text{l}^{-1} * \text{g}_{\text{TS}}^{-1}$
CSB	Küvettestests LCK 014 und LCK 114 der Fa. Dr. Lange, Berlin	$43,5 \pm 2,3 \text{ g}_{\text{O}_2} * \text{kg}_{\text{TS}}^{-1}$

Abkürzungen: k. A.: keine Angaben

## 3.5 Offline-Analytik

### 3.5.1 Bestimmung des mikrobiellen Wachstums

Wachstum ist die Zunahme der lebendigen Substanz - bei Mikroorganismen der Zellzahl und/oder -masse. Entsprechend lassen sich Bestimmungen der Zahl (etwa Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl) und der Masse ableiten, wobei letztere noch in direkte (beispielsweise Proteingehalt) und indirekte Methoden (etwa optische Dichte, Dehydrogenaseaktivität) aufgeteilt werden können [SCHLEGEL 1992]. Die beispielhaft genannten Verfahren wurden in der Arbeit eingesetzt und sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

#### 3.5.1.1 Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde durch mikroskopische Auszählung mittels einer Zählkammer ermittelt. Dazu wurde ein Olympus BH-2 Durchlichtmikroskop (Olympus Optical Co., Ltd., Japan) mit 400facher Vergrößerung und eine Helber-Zählkammer benutzt. Um statistisch abgesicherte Werte zu erhalten, wurden nach Möglichkeit je vier diagonal auf dem Zählkreuz liegende Großquadrate ausgezählt. Die Proben wurden so mit Mineralsalzlösung Brunner (MM<sub>Brun.</sub>) verdünnt, daß sich

ein Wert von 30 - 80 Zellen pro Großquadrat ergab. Lag die Zellzahl jedoch bereits bei der Originalsuspension unter 30 Zellen / Großquadrat, wurden entsprechend mehr Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro mL wurde nach Gleichung 1 berechnet.

$$\frac{ZZ}{\text{mL}} = \frac{\sum GQ}{x} * KF * VF \quad (1)$$

wobei

ZZ/mL	=	Zellzahl pro mL	KF	=	Kammerfaktor
GQ	=	Zählergebnis eines Großquadrats	VF	=	Verdünnungsfaktor
x	=	Anzahl gezählter Großquadrate			

Der angegebene Kammerfaktor wird gemäß Gleichung 2 bestimmt und beträgt für die eingesetzte Helber-Zählkammer  $1,25 * 10^6$ .

$$KF = \frac{1000 \mu\text{L}}{(\text{Tiefe} * \text{Fläche} * 16)} \quad (2)$$

mit

KF	=	Kammerfaktor	Tiefe/		
1 mm <sup>3</sup>	=	1 $\mu\text{L}$	Fläche	=	Daten von der Zählkammer

### 3.5.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Ausplattierungsmethode

Zur Bestimmung der lebensfähigen Keimzahl von Bodenproben werden üblicherweise Platten-gußverfahren eingesetzt [ALEF 1994].

Mit den Proben, die von den Kultivierungen mit 10% Bodensuspensionen stammen, wurden daher Verdünnungsreihen mit MM<sub>Brun.</sub> unter sterilen Bedingungen angelegt. Von den Verdünnungsstufen, die eine Zellzahl zwischen  $10^1$  und  $10^3$  je mL erwarten ließen, wurden zweimal jeweils 100  $\mu\text{L}$  mit einem Drigalsky-Spatel auf St I-Agar verteilt (Doppelbestimmung). Die Agarplatten wurden 24 - 36 h bei 28°C im Brutschrank inkubiert und die entstandenen Kolonien anschließend ausgezählt.

Bei der Untersuchung der Phenanthrenabbaustabilität von *S. yanoikuyae* B1 wurde im Prinzip wie bei den Bodenproben verfahren, jedoch wurde nicht auf St I-Agar, sondern auf MM<sub>Brun.</sub>-Agar ausplattiert (s. Kap. 3.7.5.2). Dabei wurden zwei verschiedene Chargen von Platten eingesetzt: als Kohlenstoffquelle wurde entweder 150 mg/L Phenanthren (5 d) oder 1 g/L Glucose (48 h) hinzugefügt. Die Zahlen in Klammern geben die durchschnittliche Inkubationszeit bei 28°C bis zur Auswertung an.

### 3.5.1.3 Messung des Proteingehaltes

In der Mikrobiologie wird die Proteinkonzentration von Kultivierungsproben häufig mit Testverfahren bestimmt, deren Prinzipien in den Veröffentlichungen von BRADFORD [1976] und LOWRY [1951] beschrieben sind. Die darauf basierenden Standardmethoden lieferten jedoch bei den vorliegenden Proben keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Daher wurde der Bio-Rad *Detergent Compatible Protein Assay*<sup>®</sup> getestet, der laut Herstellerangaben durch viele Tenside, etwa SDS, Triton X-100<sup>®</sup>, Tween<sup>®</sup> 20, Brij<sup>®</sup>-35 in Konzentrationsbereichen bis zu 1%, aber auch einer großen Zahl anderer Substanzen nicht beeinflusst wird [BIO-RAD LAB. 1994].

Die in der Arbeit eingesetzten Tenside und der Schadstoff wurden von der Herstellerfirma Bio-Rad nicht auf einen störenden Einfluß auf den Proteintest untersucht. Das wurde in dieser Arbeit durch eine Reihe von Kompatibilitätsexperimenten bewiesen, bei denen die Testsubstanzen in für

die realen Proben typischen Konzentrationsbereichen eingesetzt wurden. Dazu wurden Protein-kalibrationsgeraden unter Zusatz je einer definierten Menge der zu testenden Substanz mit dem Bio-Rad DC Protein Assay<sup>®</sup> vermessen und die Ergebnisse mit den Referenzwerten ohne Test-substanzzugabe verglichen (Sophorolipide [MÜLLER 1996], Texapon<sup>®</sup> N25 [MENGE 1996], Phenanthren (Daten nicht gezeigt)).

Der Bio-Rad *Detergent Compatible* Protein Assay<sup>®</sup> basiert wie der Lowry-Test, von dem er abgeleitet ist, auf zwei Reaktionen: Im ersten Schritt reagieren Proteinbestandteile, vor allem Tyrosin und Tryptophan, daneben aber auch Cystein, Cystin und Histidin, mit dem Kupfer in einem alkalischen Medium. In der Folge wird das Folinreagenz durch das Kupfer-behandelte Protein reduziert, wodurch Verbindungen mit charakteristischer blauer Farbe gebildet werden [BIO-RAD LAB. 1994].

### 3.5.1.3.1 Vorbereitung der Proben für den Bio-Rad DC Protein Assay<sup>®</sup>

#### Vorbereitung von Flüssigkultivierungsproben:

Da die Proteinkonzentrationen von Proben aus Flüssigkultivierungen vergleichsweise niedrig waren, wurden diese vor der Vermessung im Verhältnis 1:10 ankonzentriert. Dazu wurde je 1 mL Probe in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und bei 14.000 rpm 10 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf). Anschließend wurden je 900 µL Überstand verworfen, zum Rückstand 2 µL 3 M HCl zur Lyse der Zellen und Konservierung zugesetzt und die Proben bei +4°C gelagert.

In Zusammenarbeit mit Müller wurde untersucht, ob durch eine Trocknung der Proben und anschließender Zugabe von 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bessere Ergebnisse zu erreichen sind. Die sechs vermessenen Proben wiesen dabei jedoch Streuungen der Proteinkonzentration bis zu 45% vom Mittelwert auf, während die Resultate der durch Zentrifugation ankonzentrierten Proben sich nur bis zu maximal 3% vom Mittelwert unterschieden [MÜLLER 1996].

#### Vorbereitung von Bodensuspensionsproben:

Die Proteinbestimmungen der Proben, die gemäß den für Flüssigkultivierungen gemachten Ausführungen durch Zentrifugation ankonzentriert wurden, führten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Zur Messung der Proteinkonzentration wurde deshalb je ca. 1 mL Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und anschließend mit 20 µL 3 M HCl versetzt, was einen ausreichenden Abfall des pH-Wertes bewirkte. Bis zur Durchführung des Bio-Rad DC Protein Assays<sup>®</sup> wurden die Proben bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert.

### 3.5.1.3.2 Durchführung des Proteintests

Laut Herstellerangaben kann der Test sowohl mit Mikrotiterplatten, als auch in Küvetten durchgeführt werden. Beide Methoden wurden in der Arbeit eingesetzt, jedoch mit Variationen: beispielsweise wurde das Probenvolumen jeweils an die vorliegende Problemstellung optimiert. Für den Test werden drei Lösungen A, B und S benötigt, wobei die Reagenzlösungen S und A kurz vor der Proteinbestimmung im Verhältnis 1:50 zur Lösung A' vermischt werden (Nähere Angaben s. Kap. 7.3).

#### Mikrotiterplattentest für Proben aus Flüssigkultivierungen:

Zunächst wurden sieben verschiedene Kalibrationslösungen, die Protein (Rinderserumalbumin) in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,2 mg/mL enthielten, angesetzt. Dies wurde entsprechend der Vorgehensweise bei den Kultivierungsproben in Eppendorfreaktionsgefäßen mit MM<sub>Brün.</sub> unter Zusatz von je 20 µL 3 M HCl durchgeführt. Als Blindwert wurde reines MM<sub>Brün.</sub> mit der gleichen Konzentration Salzsäure eingesetzt. Jeweils zweifach wurden je 20 µL dieser angesetzten Lö-

sungen und der zu vermessenden Proben in eine neue Kaverne der Mikrotiterplatte pipettiert (Doppelbestimmung). Durch Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  Reagenz A' und 200  $\mu\text{L}$  Reagenz B in jede Vertiefung wurde die Reaktion gestartet und die Lösungen durch Schwenken der Platte gut vermischt. 15 - 60 min später wurden die Extinktionen bei 620 nm mit dem Immunoreader NJ-2000 (Nippon InterMed K. K., Japan) gemessen. Eine typische Kalibrationsgerade ist:

$$\text{Protein [g/L]} = (1,49 \pm 0,054) * E_{620\text{nm}} - (0,02 \pm 0,018)$$

mit  $R^2 = 0,99609$ ,  $S = 0,02283$ ,  $N = 5$  (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 g/L Protein)

#### Küvettestest für Proben der Kultivierungen mit 10% Bodensuspension:

Während die Proben auftauten wurde eine Kalibrationsreihe in Eppendorfreaktionsgefäßen mit 10% Bodensuspension und Proteinkonzentrationen zwischen 0,1 bis 1,4 mg/mL angesetzt. Durch Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  3 M HCl je mL Volumen wurden den Realproben entsprechende Verhältnisse erreicht. Als Blindwert diente ein Ansatz mit Bodensuspension ohne Protein-, jedoch mit Salzsäurezugabe. Je ca. 100  $\mu\text{L}$  dieser Referenzansätze und der Proben wurden jeweils zweifach in neue 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäße überführt, wobei über die Gewichtsdiﬀerenz der Wägung vor und nach der Befüllung das genaue Volumen berechnet werden konnte. 1 g des verwendeten Bodens nimmt ein Volumen von 0,4 mL ein, während 1,03 g dem Gewicht von 1 mL  $\text{MM}_{\text{Brun}}$  entspricht. Durch Zugabe von 125  $\mu\text{L}$  Reagenz A' und 1000  $\mu\text{L}$  Reagenz B wurde die Nachweisreaktion gestartet. In der Reaktionszeit von 15 - 30 min wurden die Ansätze wiederholt mit einem Vortex (Reax 2000, Fa. Heidolph) intensiv gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) und der Überstand in Quarzglasküvetten bei 750 nm im Spektralphotometer (UVIKON 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen. Dies erfolgte spätestens 60 min nach dem Start der Nachweisreaktion. Eine repräsentative Geradengleichung ist:

$$\text{Protein [g/L]} = (0,68 \pm 0,045) * E_{750\text{nm}} - (0,54 \pm 0,046)$$

mit  $R^2 = 0,97841$ ,  $S = 0,06949$ ,  $N = 7$  (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 g/L Protein)

#### 3.5.1.4 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von Kultivierungslösungen zur Bestimmung der Biomasseentwicklung wird in der Regel im Wellenlängenbereich zwischen 540 - 600 nm gemessen. Dieses weit verbreitete Verfahren war in der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt einsetzbar, da vielfach nicht-mikrobielle Feststoffpartikel wie etwa Phenanthrenkristalle und Bodenbestandteile sowie Tensidmizellen die turbidometrischen Messungen extrem störten oder gar unmöglich machten [SCHEPER 1991].

Die OD wurde beispielsweise bei einigen Toxizitätstests durch Messung der Extinktion bei 546 nm bestimmt. Dazu wurde 1 mL Probe in eine Küvette überführt und die Extinktion gegen einen Blindwert mit  $\text{MM}_{\text{Brun}}$  in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) bestimmt. Bei OD-Werten über 1 wurde die Probe verdünnt.

Zur OD-Messung bei Experimenten zum Test des Einflusses von Dichlormethan auf das mikrobielle Wachstum wurde eine probenahmefreie Variante eingesetzt: Die Kultivierungen wurden in 300 mL Zwei-Schikane-Erlenmeyerkolben durchgeführt, an die seitlich an den oberen Teil ein kleines Reagenzglas angeschmolzen ist (sogenannte „Pinocchio-Kolben“) (s. Kap. 5.1.2). Diese Erweiterung paßt, wenn der Kolben um 90° gekippt wird, genau in den Küvetteneinsatz eines tragbaren Kleinphotometers (LKB Biochrom Novaspec, Model 4049, Cambridge).

### 3.5.1.5 Messung biologischer Aktivität in Böden mittels Dehydrogenase-Test

Dehydrogenasen sind in Organismen ubiquitär vorkommende Enzyme, die formal die Wasserstoffatom-Abspaltung von ihren Substraten katalysieren. Zum einen sind sie Komponenten von Elektronentransportketten (Atmungsketten), katalysieren andererseits aber auch viele andere wichtige Stoffwechselreaktionen. Von zentraler Bedeutung ist etwa ihre Beteiligung an der Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA bei allen aeroben Organismen (Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex), wodurch die aus dem Hexoseabbau stammenden C<sub>3</sub>-Körper in den Tricarbonsäurecyclus (TCC) eingeschleust werden [SCHLEGEL 1992, STRYER 1990]. Doch auch am TCC selbst und einer sehr großen Zahl weiterer kataboler Stoffwechselwege inklusive schadstoffabbauender sind Dehydrogenasen involviert. So wurde kürzlich eine *cis*-Biphenyl-Dihydrodiol-Dehydrogenase aus *S. yanoikuyae* B1 näher untersucht [EATON et al. 1996].

Der Dehydrogenaseaktivitätstest wird häufig dann eingesetzt, wenn beispielsweise die Lebensfähigkeit mikrobieller Kulturen getestet oder aber die mikrobielle Aktivität von Belebtschlamm- oder Bodenproben ermittelt werden soll. Es existieren verschiedene Testvorschriften, die im Prinzip auf dem Zusatz eines geeigneten Elektronenakzeptors beruhen (etwa TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid) oder INT (2-*p*-Iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyl-tetrazolium-chlorid)). Dieser wird durch die Dehydrogenasen der Mikroorganismen reduziert, wobei die Reaktion kolorimetrisch erfaßt werden kann. Eine gute Übersicht der verschiedenen Methoden gibt ALEF [1991].

Das eingesetzte Verfahren wurde von Ewald für Belebtschlammproben ausgearbeitet [EWALD et al. 1987, STROTMANN et al. 1992] und von Oberbremer zur Messung der biologischen Aktivität von Bodensuspensionsproben adaptiert [CZESCHKA 1995, OBERBREMER 1990].

#### 3.5.1.5.1 Vorbereitung von Bodensuspensionsproben

Die Kultivierungsproben wurden zuerst 10 min bei 5000 g (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Braun, Melsungen) zentrifugiert und der Rückstand in 1 mL Sepawet CE 5432-Lösung (3 mg/L in Pyrophosphatpuffer 2,8 g/L, pH 7) wiederaufgenommen und gründlich gemischt (1 min, Reax 200, Heidolph, höchste Stufe). Die Mikroorganismen hydrophobisieren in Gegenwart von Kohlenwasserstoffen ihre Zellwände, deshalb mußte dieser Spülvorgang zur Erleichterung des Transportes des hydrophilen Farbstoffs in die Zellen durchgeführt werden [OBERBREMER 1990]. Nach erneuter Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen wurde der Rückstand in 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> wiederaufgenommen und direkt weiterverwendet.

#### 3.5.1.5.2 Durchführung des Dehydrogenaseaktivitätstests

Die gewaschenen Bodenproben wurden in Reagenzgläser überführt und 1 mL Resazurinlösung, 0,5 mL Pufferlösung A und 5 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 37°C und 225 rpm im Brutschrank (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert. Ebenso wurde eine Blindprobe, die statt der Bodensuspension 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und zusätzlich bereits 1 mL Pufferlösung B enthielt, angesetzt und inkubiert. Je Probe wurde zudem parallel ein zusätzliches Reagenzglas angesetzt, bei dem durch Zugabe von zwei Tropfen *m*-Kresol die biologische Reduktion des Resazurins unterbunden wurde. So konnte die chemische Aktivität nach LIU und STRACHAN [1977] festgestellt werden (zu den Lösungen s. Kap. 7.3).

Nach erfolgter Verfärbung der Reaktionslösungen von blau nach rosa wurde die Reaktion durch Zugabe von je 1 mL Pufferlösung B gestoppt. Die Proben wurden dann 20 min bei 5300 rpm zentrifugiert (Heräeus, Labofuge) und der Überstand aller Ansätze in Quarzglasküvetten bei 615 nm im Spektrophotometer (Uvikon 922, Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen.

Die Dehydrogenaseaktivität wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Dehydrogenaseaktivität} = \left( \left( \frac{(E_{\text{Blind}} - E_{\text{ges.}})}{\text{Vol.} * t} * R \right) - \left( \frac{(E_{\text{Blind}} - E_{\text{chem.}})}{\text{Vol.} * t} * R \right) \right) * 1000 \quad (3)$$

$E_{\text{Blind}}$	=	Extinktion der Blindprobe bei 615 nm
$E_{\text{ges.}}$	=	Extinktion der Probe ohne <i>m</i> -Kresol bei 615 nm
$E_{\text{chem.}}$	=	Extinktion derselben Probe mit <i>m</i> -Kresol bei 615 nm
Vol.	=	Volumen in mL der Bodensuspensionsprobe
t	=	Inkubationszeit in h
R	=	mg Resazurin in der Probe (= 0,075)

Die Dehydrogenaseaktivität wird in der Einheit  
[mg reduziertes Resazurin/L Bodensuspension \* h] angegeben.

Um festzustellen, wie gut der Test für die im Laufe der Arbeit erwarteten Bodensuspensionsproben geeignet ist, wurde eine Kalibrationsgerade mit unterschiedlichen Zellzahlen/mL erstellt:

$$\begin{aligned} & \text{Dehydrogenaseaktivität [mg red. Resaz./L Bodensusp. * h]} = \\ & (2,92 * 10^{-10} \pm 0,084 * 10^{-10}) * \text{zugesezte Zellzahl/mL} + (0,28 \pm 0,005) \\ & \text{mit } R^2 = 0,995, S = 0,00754, N = 8 (0,5; 1; 2; 4; 5; 6; 8; 10 \text{ (jeweils } * 10^8 \text{ Zellen/mL)}) \end{aligned}$$

### 3.5.2 Bestimmung physikalischer und chemischer Meßgrößen

#### 3.5.2.1 Messung der Oberflächenspannung

Die Bestimmung der Oberflächenspannung ist in Arbeiten zum Schadstoffabbau mit Tensidzusatz die gebräuchlichste Methode, um Aussagen über den Abbau des Tensids selbst zu gewinnen [CZESCHKA 1995]. Eine Möglichkeit zu deren Online-Messung in Kultivierungslösungen ist jedoch nicht bekannt [BUSCHMANN 1997]. Offline-Messungen haben jedoch den Nachteil, daß die tatsächlichen Verhältnisse im Bioreaktor nicht einwandfrei repräsentiert werden können.

Die Messungen der Oberflächenspannung wurden mittels der Ringmethode (nach Du Noüy) mit dem LAUDA Tensiometer TE (Meßgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen) durchgeführt. Ein Meßring (Platin-Iridium-Legierung, 6 cm Umfang) wird aus der zu messenden Lösung herausgezogen. Die dabei auf ihn wirkende Kraft wird mittels eines induktiven Kraftaufnehmers registriert und das Signal in eine analoge Gleichspannung umgewandelt, die über einen y/t-Schreiber als Meßkurve ausgegeben wird. Die Bestimmungen erfolgten zweifach automatisch bis zum Lamellenabriß, wobei jeweils die Differenz zwischen dem Maximalwert und dem Nullwert (unbenetzter, frei in Luft hängender Ring) für die Berechnung der Oberflächenspannung  $\sigma$  zugrundegelegt wurde (gemäß Lauda Tensiometer Bedienungsanleitung). Die Kalibration mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  wurde wie die übrigen Messungen bei 28°C durchgeführt und der Schreiberausschlag auf den entsprechenden kalibrierten Skalenwert angeglichen. Nach LIDE und KEHIAIAN 1994 ist  $\sigma_{\text{H}_2\text{O}, 28^\circ\text{C}} = 71,5 \text{ mN/m}$ . Die berechneten Oberflächenspannungen wurden nach der Gleichung

$$\sigma_{\text{korr.}} = \sigma_{\text{meß.}} - \Delta\sigma \quad (4)$$

mit dem Harkins-Jordan-Faktor  $\Delta\sigma$ , der aus der Anleitung zu entnehmen war, korrigiert.

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung wurden je 9 mL Probe direkt nach der Entnahme in ein Glasschälchen pipettiert, auf die Kultivierungstemperatur von 28°C gebracht und vermessen.

Nach der Bestimmung wurden sämtliche mit der Probe in Kontakt gekommenen Bestandteile dreifach mit  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  und Aceton gereinigt. Weitere Informationen siehe GEBNER 1997, MENGE 1996 und MÜLLER 1996.

### 3.5.2.2 Durchführung der 2D-Fluoreszenzmessungen

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Hilmer und Marose durchgeführt, weshalb für eine ausführlichere Darstellung auf folgende Literaturstellen verwiesen wird [HILMER 1996, MAROSE 1995 und 1999].

Für die Untersuchungen wurde das kommerziell erhältliche Fluoreszenz-Spektralfluorometer F-4500 (Hitachi, Ltd., Tokyo) eingesetzt. Ursprünglich nur für Messungen mit Küvetten ausgelegt, wurde es durch Ankopplung eines 1 m langen Flüssiglichtwellenleiters (Typ 300, Lumatec, Denzlingen) auch möglich, außerhalb der Meßkammer Fluoreszenzspektren aufzunehmen.

Zur Messung wird prinzipiell eine Exzitationswellenlänge auf die Probe gestrahlt und das Emissionsspektrum aufgenommen, dann wird die Exzitationswellenlänge einen Schritt erhöht und erneut die Emission registriert usw. Das Resultat läßt sich graphisch als ein 3D-Diagramm darstellen, bei dem die beiden Wellenlängen  $\lambda_{Ex.}$  und  $\lambda_{Em.}$  auf der X- bzw. Y-Achse liegen, während die Fluoreszenzintensität in der Z-Achse aufgetragen wird (s. Abb. 6).

Offline-Messungen wurden sowohl mit einer Fluoreszenzküvette (Hellma) als auch in einem neuen 10 mL Meßreaktor durchgeführt [MAROSE 1999], während für die Online-Aufnahme von Fluoreszenzspektren am Bioprozeß eine Durchflußmeßzelle eingesetzt wurde [SCHEPER 1991]. Durch einen PC 486 DX/2-Computer kann das Fluoreszenz-Spektralfluorometer konfiguriert und die anfallenden Daten gespeichert und für eine erste vorläufige Betrachtung visualisiert werden. Bei den Offline-Messungen wird dabei das BioView-Programm benutzt, welches Daten im ASCII-Format liefert, die mittels Microsoft Excel weiterverarbeitet werden können. Damit lassen sich farbige 2D-Fluoreszenzspektren graphisch darstellen, deren Perspektive verändern oder Fluoreszenzintensitätsveränderungen eines Wellenlängenpaares ( $\lambda_{Em}/\lambda_{Ex}$ ) über verschiedene Messungen extrahieren. Tabelle 8 gibt die verwendeten Geräteeinstellungen bei den Offline-Messungen wieder, während Abb. 6 Fluoreszenzdaten in unterschiedlichen Darstellungsformen zeigt.

Tab. 8: Einstellung der Geräteparameter des Fluoreszenzspektrophotometers während der Offline-Messungen.

	Küvette / 10 mL Meßreaktor	
Photomultiplierspannung	700 V	
Scangeschwindigkeit	30000 nm/min	
	Exzitation	Emission
erfaßte Wellenlängen	230 - 500 nm	250 - 650 nm
Schrittweite	10 nm	10 nm
Slit	10 nm	20 nm

Auf Abweichungen wird an entsprechender Stelle hingewiesen.

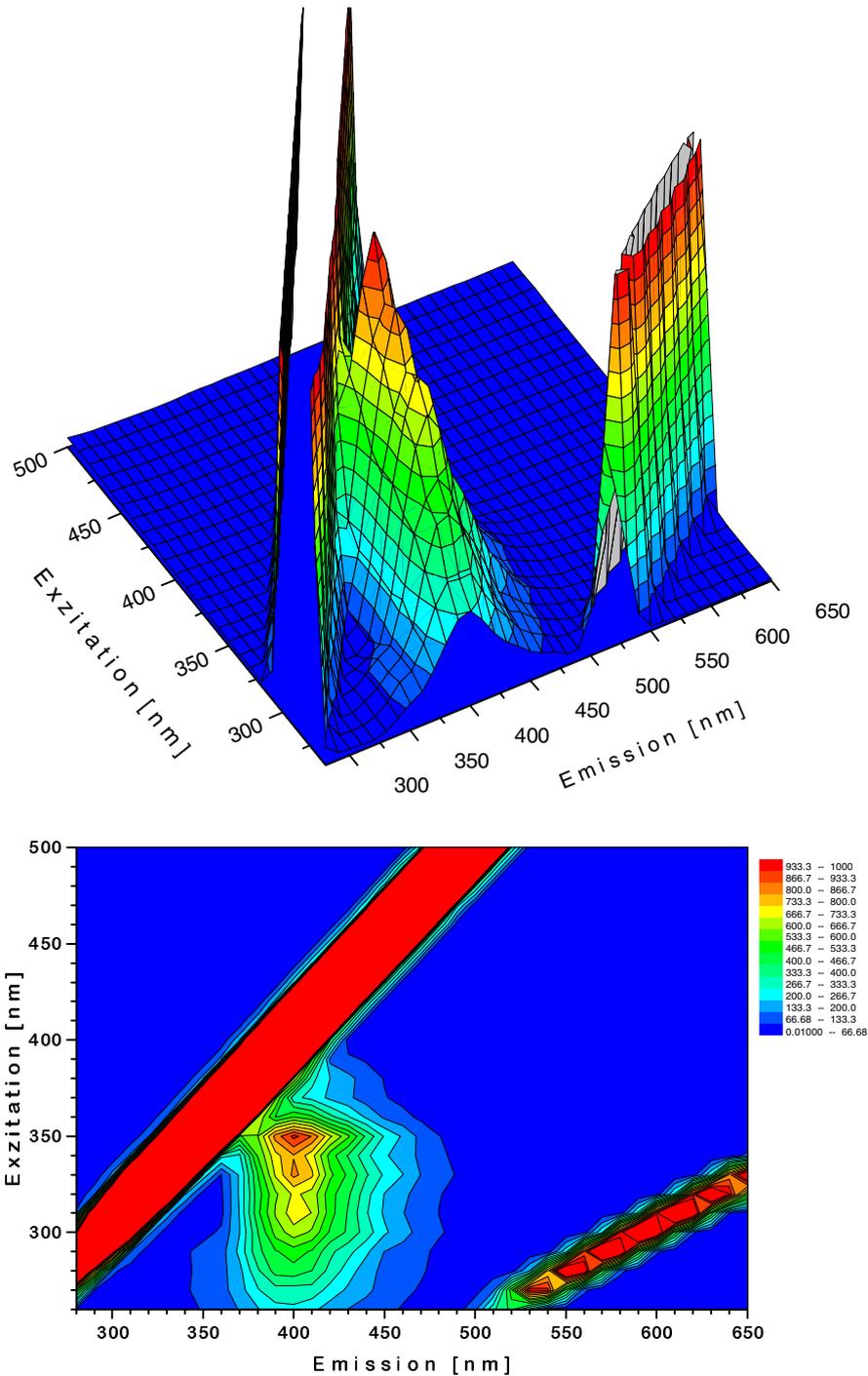


Abb. 6: Isometrische Projektion (oben) und die in der Arbeit verwendete Form des Konturliniendiagramms (unten) am Beispiel einer Probe von  $MM_{\text{Brun.}}$  mit 100 mg/L Phenanthren.

Bereiche gleicher Fluoreszenzintensität sind mit der gleichen Farbe versehen. Bei den quer durch die Graphiken laufenden Maxima ( $Ex. = Em.$  und  $Ex. = 2 * Em.$ ) handelt es sich um Streulicht. Die drei Fluoreszenzmaxima von Phenanthren sind bei  $\lambda_{Ex.} = 350, 330, 310$  nm und  $\lambda_{Em.} = 400$  nm zu erkennen.

### 3.5.2.3 Messung des pH-Wertes

pH-Bestimmungen wurden offline mit einer Gelelektrode (Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz) durchgeführt, die an die Steuereinheit des Biostat B-Bioreaktors (Braun, Melsungen) angeschlossen war. Die Kalibration wurde mittels entsprechender Pufferlösungen im neutralen bis sauren Bereich (pH 7,0 / pH 4,01 oder pH 5,0) vorgenommen.

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde eine Probe von mindestens 1 mL genommen und zügig gemessen. Zwischenzeitlich wurde die Elektrode in 3 M Kaliumchloridlösung aufbewahrt.

### 3.5.2.4 Bestimmung der Phosphationenkonzentration

Zur Messung der Phosphatkonzentration wurde der Merck (PMB) Phosphortest eingesetzt, mit dem sich selektiv Phosphat nachweisen läßt. Das Prinzip beruht auf zwei Reaktionsschritten. Zuerst bildet sich in schwefelsaurer Lösung aus Phosphat- und Molybdat-Ionen Molybdato-phosphorsäure, die anschließend mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau (PMB) reduziert wird. PMB wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 712 nm erfaßt; mittels einer Kalibrationsgeraden kann dann der Phosphatgehalt der Probe bestimmt werden.

#### 3.5.2.4.1 Vorbereitung der Arbeitsgeräte und Probenahme

Glasgeräte wurden mit einem phosphatfreien Reinigungsmittel gespült. Ca. 1,3 mL der Bodensuspensionsproben wurden sofort 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) und der Überstand bei -20°C tiefgefroren (s. Kap. 3.7.5.5.3).

#### 3.5.2.4.2 Durchführung der Phosphatanalytik

Nach dem Auftauen wurden die Proben im Verhältnis 1:400 mit  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  verdünnt und je 1 mL der resultierenden Lösung in einer Plastikeinmalküvette mit 1 Tropfen Reagenzlösung P-1A vermischt. Im Anschluß daran wurde in alle Proben die gleiche Menge Reagenz P-2A zugesetzt, von dem vorher eine wässrige Lösung hergestellt worden war (Reagenzien s. Kap. 7.3). Laut Arbeitsanweisung sollte in jeden Testansatz eine kleine Spatelspitze des Reagenzes zugesetzt werden. Es wurde jedoch festgestellt, das sich durch Herstellung einer Stammlösung und definierterer Zugabe bessere Ergebnisse erzielen lassen. Parallel dazu wurde auch ein Blindwert, bei dem statt der Probe 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  vorgelegt worden war, angesetzt. Alle Ansätze wurden gründlich gemischt und innerhalb von 10 bis 30 min bei 712 nm im Spektrophotometer (Uvikon 922, Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen.

Zum Ansatz des Phosphat-Standards wurde 0,2866 g bei 105°C getrocknetes  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  unter Zusatz von 2,5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\rho = 1,84 \text{ g/mL}$ ) auf 1000 mL aufgefüllt (entspricht 200 mg  $\text{PO}_4^{3-}$ ) und daraus durch geeignete Verdünnung die Kalibrationswerte von 0,5 bis 12,5 mg/L angesetzt. Eine typische resultierende Geradengleichung war:

$$\text{Phosphat [mg/L]} = (6,37 \pm 0,025) * E_{712 \text{ nm}} - (0,009 \pm 0,0259)$$

mit  $R^2 = 0,99991$ ,  $S = 0,04961$ ,  $N = 8$  (0; 0,5; 1; 2; 5; 7,5; 10; 12,5 mg/L Phosphat)

### 3.5.2.5 Bestimmung des Gehalts anorganischer Stickstoffverbindungen

#### 3.5.2.5.1 Ermittlung des Nitritgehaltes

Nitritgehalte über 0,6 mg/L stören den Nitratnachweis (s. Kap. 3.5.2.5.2). Daher wurde stichprobenartig gemäß der DIN-Vorschrift 38 405, Teil 10 (übergegangen in DIN EN 26 777) der Nitritgehalt verschiedener Kultivierungsproben bestimmt. Der Test basiert auf der Diazotierung von Nitrit und Sulfanilamid bei einem pH-Wert von 1,9 und anschließender Kupplung mit Naphthylamin unter Bildung eines rosa gefärbten Azofarbstoffs, der photometrisch erfaßt werden kann.

Probenahme und -aufbereitung erfolgte gemäß den Angaben in Kap. 3.5.2.4 zur Phosphatanalytik. 1000 µL Probelösung oder für den Blindwert  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  wurde in Plastikeinmalküvetten mit 25 µL Reagenzlösung vermischt und 225 µL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  bzw. ggf.  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  zugesetzt, so daß der pH-Wert 1,9 betrug (s. Kap. 7.3). Nach 20 - 120 min wurden die Extinktionen der gut gemischten Lösungen bei 540 nm gemessen (in Doppelbestimmung). Für die Bezugsgerade wurden geeignete Verdünnungsstufen einer  $\text{NaNO}_2$ -Lösung hergestellt und wie oben angegeben vermessen:

$$\text{NO}_2^- [\text{mg/L}] = (1,23 \pm 0,007) * E_{540 \text{ nm}} + (0,006 \pm 0,0017)$$

mit  $R^2 = 0,99981$ ,  $S = 0,00327$ ,  $N = 8$  (0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,7 mg/L  $\text{NaNO}_2$ )

In den untersuchten Proben konnte kein Nitrit nachgewiesen werden (s. Kap. 5.3.1 und 5.3.2).

### 3.5.2.5.2 Bestimmung des Nitratgehaltes

Der Nitratgehalt von Kultivierungsproben wurde nach der DIN 38 405, TEIL 9 bestimmt: In schwefel- und phosphorsaurer Lösung reagieren die Nitrat-Ionen mit zugesetztem 2,6-Dimethylphenol zu 4-Nitro-2,6-dimethylphenol, welches photometrisch bei 324 nm vermessen werden kann.

Probenahme und -aufbereitung erfolgte ebenfalls wie bei der Phosphatanalytik beschrieben. 150 µL Probe wurde in Plastikeinmalküvetten pipettiert und durch Zugabe von 1200 µL Säuremischung und 150 µL Dimethylphenol-Lösung die Nachweisreaktion gestartet (in Doppelbestimmung) (s. Kap. 7.3). Auf die Vorbehandlung der Proben mit Amidosulfonsäure zur Reduktion des den Nachweis störenden Nitrits konnte, wie im Kapitel 3.5.2.5.1 beschrieben, verzichtet werden. Die Reaktionslösung wurde gut vermischt und nach 10 - 60 min die Extinktion der Lösungen bei 324 nm vermessen. Eine Kalibrationsreihe wurde durch geeignete Verdünnungen einer  $\text{KNO}_3$ -Lösung aufgestellt, die typischerweise wie folgt zu beschreiben war:

$$\text{NO}_3^- [\text{mg/L}] = (80,10 \pm 2,596) * E_{324 \text{ nm}} + (10,76 \pm 3,740)$$

mit  $R^2 = 0,99686$ ,  $S = 4,6482$ ,  $N = 5$  ((0); 13,3; 66,7; 106,7; 146,7; 200 mg/L  $\text{KNO}_3$ )

Bei der Auswertung wurde der Fehler durch Verwendung von Plastikeinmalküvetten ebenfalls berücksichtigt, in dem die Extinktion vor Zugabe der Nachweislösung bestimmt und vom gemessenen Endwert abgezogen wurde.

### 3.5.2.5.3 Messung des Gehaltes an Ammonium

Die Bestimmung von  $\text{NH}_4^+$  wurde gemäß der DIN 38 406, TEIL 5 durchgeführt. Bei einem pH von 12,6 reagieren die vorliegenden Ammoniumionen mit Hypochlorit- und Salicylationen zu einem photometrisch bei 655 nm zu detektierenden blauen Farbstoff. Natriumpentacyanonitrosylferrat dient dabei als Katalysator. Die Hypochloridionen werden im Alkalischen durch die Hydrolyse der Ionen der Dichlorisocyanursäure gebildet.

Die Probenahme und -aufbereitung erfolgte wie in Kap. 3.5.2.4 beschrieben. Die Proben wurden vor der Analyse 1:100fach verdünnt und je 1 mL in eine Plastikeinmalküvette pipettiert. Nach Zusatz von 100 µL der Salicylat-Citratlösung und der gleichen Menge frisch angesetzter Reagenzlösung wurden die Ansätze gemischt und nach 1 bis max. 3 h photometrisch vermessen (s. Kap. 7.3). Als Blindprobe wurde wieder 1000 µL  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  eingesetzt. Der Küvettenfehler wurde auch hier gemäß den Angaben im Kap. 3.5.2.5.2 berücksichtigt. Zur Kalibration wurden Diammoniumsulfatlösungen in Konzentrationen von 0 - 1,4 mg/L unter mit den Proben identischen Bedingungen vermessen:

$$\text{NH}_4^+ [\text{mg/L}] = (1,27 \pm 0,005) * E_{655 \text{ nm}} - (0,01 \pm 0,003)$$

mit  $R^2 = 0,99991$ ,  $S = 0,00528$ ,  $N = 8$  (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; (0,8); 1; 1,2; 1,4 mg/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

### 3.5.2.6 Bestimmung des Glucosegehaltes

Die Glucosekonzentrationen von Kultivierungsproben der Vorkulturuntersuchung wurden mit einem enzymatischen UV-Test der Firma Boehringer, Mannheim gemessen. Dabei wird zuerst der Analyt Glucose durch Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, welches dann durch eine spezifische Dehydrogenase unter NADP<sup>+</sup>-Reduktion zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert wird. Die entstehenden, photometrisch meßbaren Reduktionsäquivalente sind zur D-Glucosekonzentration der Probe äquivalent, welche dann mittels einer Berechnungsformel bestimmt werden kann (s. D-Glucose/D-Fructose UV-Testkit, Best. Nr. 139 106, Boehringer Mannheim).

Die Anwendbarkeit des Tests bei den phenanthrenhaltigen Proben wurde durch verschiedene, in der Anleitung aufgeführte Erkennungsmethoden für Störungen verifiziert (gemäß Kap. 7.1 - 7.3 Testkit-Anleitung).

Je 1 mL Probelösung wurde direkt nach der Probenahme bei -20°C tiefgefroren und gelagert. Vor der Bestimmung wurden alle Eppendorfreaktionsgefäße gemäß der Testvorschrift für 15 min auf 80°C erhitzt, um alle enzymatischen Reaktionen zu stoppen. Die Messung erfolgte in Plastikküvetten gemäß der Durchführungstabelle aus der Anleitung, jedoch mit halbiertem Volumen. Mittels eines Zweistrahl-Spektralphotometers (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) wurden die Extinktion  $E_{340\text{ nm}}$  bestimmt und dann der Glucosegehalt berechnet.

### 3.5.2.7 Bestimmung des PAK-Gehaltes

Im Rahmen der Arbeit wurden die Abbauprobversuche hauptsächlich mit Phenanthren durchgeführt. Zur Charakterisierung des angereicherten Konsortiums wurden jedoch auch Abbauprobversuche mit einem Drei-Komponenten-Gemisch, welches zusätzlich noch Pyren und Benzo[ghi]perylen enthielt, vorgenommen. Da in verschiedenen Gefäßen zu unterschiedlichen Zwecken mit differierenden Schadstoffen diverse Kultivierungen durchgeführt wurden, werden im folgenden mehrere Vorgehensweisen beschrieben.

#### 3.5.2.7.1 Entnahme und Vorbereitung von schadstoffhaltigen Proben

Eine repräsentative und reproduzierbare Analytik von PAK-haltigen Medien gelingt nur, wenn diese zum Zeitpunkt der Probenahme optimal durchmischt werden. Das kann bei Schüttelkolbenversuchen im Gegensatz zu Bioreaktorexperimenten nicht gewährleistet werden. Daher wurde, mit Ausnahme der Wachstumsuntersuchung von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur (s. Kap. 5.1.1), auf die Methode der Aufarbeitung eines ganzen Kolbeninhalts je Probenahme zurückgegriffen [KEUTH 1990]. Dazu wurden 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben eingesetzt, die zur Verhinderung des Austrags von PAK mit Schraubdeckeln und Teflondichtungen verschließbar waren. Bei der Probenahme wurden durch Zugabe von 20 µL 3 M HCl je mL Kultivierungsmedium die biologischen Prozesse abgestoppt und eine definierte Menge Anthracen-Stammlösung (3 mg/mL in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) zugesetzt. Bis zur Aufarbeitung wurden die Kolben im Kühlschrank bei +4°C gelagert. Im Gegensatz dazu wurden zur Untersuchung des Wachstums von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur jeweils 6 mL Kultivierungsmedium aus 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben entnommen und zur Bestimmung des Schadstoffgehalts eingesetzt. Nach Zusatz von HCl und Anthracen-Standard wurden die Probeflaschen bis zur Aufarbeitung bei +4°C gelagert.

Bei den Flüssigkultivierungen im Bioreaktor wurden von der Probe je 10 mL in mit 200 µL 3 M HCl versehene Braunglasflaschen pipettiert. Zur Erfassung des noch an den Glaswandungen der Pipette adsorbierten Phenanthrens wurde der Schadstoffrest mit etwas H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> in die Braunglasflasche gespült. Den Proben wurde dann wieder eine definierte Menge Anthracen-Stammlösung als interner Standard zugesetzt und bei +4°C kurzzeitig gelagert.

Die Menge der mit der abgestumpften Glaspipette gezogenen 10%igen Bodensuspensionen wurde durch Differenzwägung der Braunglasflasche vor und nach der Probenahme bestimmt. Nach Zusatz einer entsprechenden Menge 3 M HCl sowie des Anthracen-Standards wurden die Fläschchen bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank eingefroren.

Die Proben, die im Rahmen von Voruntersuchungen anfielen, wurden nach Zusatz des internen Standards direkt extrahiert.

#### 3.5.2.7.2 Extraktion der PAK

##### Proben mit flüssigem Medium:

Die Proben wurden im 50 mL Scheidetrichter dreimal für 1 min per Hand mit dem insgesamt gleichen Volumen Dichlormethan ausgeschüttelt, wobei die organischen Phasen in einem 100 mL Spitzkolben vereinigt wurden. Vor allem bei höheren Tensid- und / oder Biomassekonzentrationen traten dabei Emulsionen auf, die sich entweder bei längerem Stehenlassen auflösten oder durch fünfminütiges Gefrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gebrochen werden konnten. Das Dichlormethan wurde anschließend mittels eines Rotationsverdampfers (OB 2001, Fa. Heidolph) bei 600 mbar und  $40^{\circ}\text{C}$  bis fast zur Trockene abgezogen und der verbleibende Rückstand einer Festphasenextraktion zugeführt.

##### Proben mit 10%iger Bodensuspension:

Die Proben der Kultivierungen mit Bodensuspension wurden zur Extraktion der PAK aus den Braunglasflaschen in 100 mL Messuren quantitativ überführt. Diese wurden dann auf einem Reziproschüttler (Lab-Shaker, Fa. Adolph Kühn AG) befestigt und für 30 min bei 170 rpm extrahiert. Anschließend wurde die untere organische Phase über einen mit einem Wattestopfen versehenen Glastrichter in einen Spitzkolben überführt. Dieser Schritt diente zur Sicherheit, um eventuell aus der Messur abgelassenen Boden aufzufangen. Die Extraktion wurde noch zweimal mit je 10 mL Dichlormethan wiederholt. Zum Abschluß wurde der Wattefilter noch dreimal mit je 2 mL Dichlormethan gespült. Dann wurde das im Spitzkolben vereinigte Lösemittel, wie im vorhergehenden Absatz beschrieben, abgezogen und der Rückstand durch Festphasenextraktion aufgereinigt.

Zur Bestimmung der zeitlichen Adsorption des Phenanthrens an den Boden wurde der gesamte Inhalt eines 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolbens (47 mL Suspension) direkt nach dem Versuch in die Messur überführt und der Kolben mehrfach mit insgesamt 20 mL Wasser und 15 mL Dichlormethan gereinigt. Nach Zugabe dieser Spülflüssigkeiten wurde der Anthracen-Standard mit einer Hamilton-Spritze zugesetzt ( $51\ \mu\text{L}$  pro Messur, 10 mg/mL in Dichlormethan) und, wie bereits bei den Kultivierungsproben mit 10% Bodensuspension beschrieben, mit der Aufarbeitung fortgefahren. Statt 10 wurden dabei aber jeweils 15 mL Dichlormethan eingesetzt und für 2 h extrahiert.

In Zusammenarbeit mit GEBNER [1997] wurde nach der beschriebenen Methode die kürzeste Schüttelzeit für Bodensuspensionsproben bestimmt. Danach wird nach 3mal 1 min Schütteln per Hand nur  $68,8 \pm 2,5$  Prozent des eingesetzten Phenanthrens, bei 3 mal 30 min per Schüttler aber  $77,5 \pm 3,1$  Prozent wiedergefunden. Durch eine Steigerung der Schüttelzeit auf 3 mal 2 h konnte keine weitere Erhöhung der Ausbeute erreicht werden.

Durchführung der Festphasenextraktion:

Der nach dem Abrotieren im Spitzkolben verbliebene Rückstand wurde in 1 mL Dichlormethan wiederaufgenommen und auf die mit 1 mL Methanol und anschließend 4 mL Dichlormethan konditionierte Silikagelsäule (200 mg/ 3 ml, Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL und später ICT, Internationale Chemie-Technik GmbH, Bad Homburg) gegeben. Die Probe wurde in einem 50 mL Spitzkolben aufgefangen und durch Zusatz von ca. 4 - 5 mL Dichlormethan unter leichtem Druck (max. 100 mbar) geflasht. Im Anschluß daran wurde das Dichlormethan am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 5 mL Dichlormethan wieder aufgenommen, wovon ca. 4 mL als Reserve in ein Braunglasfläschchen und 1 mL in ein Autosamplervial überführt wurden. Bis zur Messung wurden die Proben bei +4°C, bei längerer Lagerung bei -20°C aufbewahrt.

Die Festphasenextraktion diente dazu, polare Substanzen, die die GC-Säule oder das MS schädigen könnten, zu eliminieren [SCHNABEL 1995]. Durch den Einsatz der Silikagelsäulen werden die polaren Bestandteile zurückgehalten, während apolare Substanzen wie die PAK nahezu quantitativ eluiert werden können.

3.5.2.7.3 *Bestimmung des Schadstoffgehaltes mittels GC-MS*

Die PAK-Analytik wurde mit einer von BRINKMANN [1996] und SCHNABEL [1995] etablierten, leicht modifizierten Meßmethode an einem GC-MS durchgeführt. Die beiden Komponenten stammen von der Firma Hewlett-Packard (Waldbronn):

Gaschromatograph: Modell 5890 2

Quadrupol-Massenspektrometer: Modell 5972 A

Die Probenaufgabe erfolgte durch einen von der gleichen Firma gelieferten Autosampler.

Autosampler: Modell 5960

Das dazu von HP gelieferte Progammpaket, das einerseits zur Gerätesteuerung und andererseits zur Datenerfassung bzw. -verarbeitung dient, wurde auf einem 486 PC installiert.

Software: HP G1034C MS ChemStation C.02.03

In Tabelle 9 sind die Geräteeinstellungen für die Bestimmung der Proben mit Phenanthren und mit den Drei-PAK-Komponenten aufgelistet.

Durch Vermessung von Kalibrationsstandards mit Phenanthren und Anthracen wurde die Methode getestet. Eine typische Geradengleichung ist:

$$\text{Phenanthren [mg/L]} = (7,46e^{-7} \pm 1,430e^{-8}) * \text{Area} - (0,854 \pm 0,942)$$

mit  $R^2 = 0,9978$ ,  $S = 1,9171$ ,  $N = 8$  (0,0 (0); 0,002 (1); 0,01 (5); 0,02 (10); 0,05 (25); 0,1 (50); 0,15 (75); 0,2 (100) g/L (mg/L) Phenanthren mit je 0,08 g/L (10 mg/L) Anthracen

(Die Zahlen in Klammern geben die Ursprungsgehalte im Kultivierungsmedium wieder.)

Die Wiederfindungsraten von Phenanthren in Flüssigproben war  $86,4\% \pm 0,8\%$ , die der Bodensuspensionsproben  $35,8\% \pm 0,3\%$ .

Tab. 9: Geräteeinstellungen des GC-MSD (modifiziert nach [SCHNABEL 1995] und [MENGE 1996])

	<b>Phenanthren</b>	<b>Phenanthren, Pyren, Benzo[ghi]perylen</b>
Injektionsvolumen	1 µL	1 µL
Liner	Single Taper Liner	Single Taper Liner
Injektortemperatur	300°C	300°C
Split	splitless	30 mL/min
Chromatographiesäule	HP-5MS, 30 m * 0,25 mm	HP-5MS, 30 m * 0,25 mm
Carriergas	Helium 4.6	Helium 4.6
Trägergasdruck/-flußrate	104 kPA/ 1,68 mL/min	104 kPA/ 1,68 mL/min
Temperaturprogramm	60°C: 1 min 20°C/min bis 150°C 5°C/min bis 210°C 20°C/min bis 310°C 310°C: 10 min	60°C: 1 min 20°C/min bis 150°C 5°C/min bis 210°C 20°C/min bis 310°C 310°C: 15 min
Solvens Delay	5 min	5 min
Elektronen-Multiplier-Spannung	gemäß Standard Sensitive Autotune	gemäß Standard Sensitive Autotune
Modus	SIM	SIM
Gruppe 1 Dwell: 65 ms	ab 5 min: 136/128/64	ab 5 min: 136/128/64
Gruppe 2 Dwell: 45 ms	ab 7,5 min: 154/153/152/76	ab 7,5 min: 154/153/152/76
Gruppe 3 Dwell: 65 ms	ab 9 min: 166/165/83	ab 9 min: 166/165/83
Gruppe 4 Dwell: 33 ms	ab 10,5 min: 178/176/152/89/76	ab 10,5 min: 178/176/152/89/76
Gruppe 5 Dwell: 65 ms	ab 13,5 min: 202/200/101	ab 13,5 min: 202/200/101
Gruppe 6 Dwell: 45 ms	ab 18 min: 228/226/114/101	ab 18 min: 228/226/114/101
Gruppe 7 Dwell: 65 ms		ab 22 min: 252/250/126
Gruppe 8 Dwell: 26 ms		ab 28 min: 278/276/274/139/138/137

### 3.5.2.8 Bestimmung des Tensidgehaltes

#### 3.5.2.8.1 Analytik von Texapon<sup>®</sup> N25

Das synthetische Tensid Texapon<sup>®</sup> N25 wurde nach der Europäischen Norm EN 903 „Bestimmung von anionischen oberflächenaktiven Stoffen durch Messung des Methylenblau-Index MBAS“, die den Status einer Deutschen Industrie Norm hat, bestimmt. Das Verfahren eignet sich besonders für Sulfate und Sulfonate und wird sowohl bei der Trink-, Oberflächen- als auch bei der Abwasseranalyse eingesetzt.

Das Prinzip des Verfahrens beruht auf der Bildung eines Tensid-Methylenblau-Komplexes. In alkalischer Lösung bilden sich Salze aus dem Farbstoff und Texapon<sup>®</sup> N25. Zur Beseitigung von Störungen wird die Probe mit Chloroform extrahiert und diese dann mit einer sauren Methylenblau-Lösung geschüttelt. Die Extinktion des blauen Komplexes in der organischen Phase wird bei 650 nm photometrisch ermittelt. Über eine mit Natriumdodecylsulfat aufgestellte Kalibrationsgerade kann dann der Methylenblau-Index MBAS in mg/L ermittelt werden.

Ausführung und Vorbereitung der Arbeitsgeräte:

Um Tensidverluste durch Adsorption zu minimieren, bestanden die zur Analytik von Texapon<sup>®</sup> N25 eingesetzten Gefäße und Geräte aus Glas. Alle wurden vor dem Einsatz mit einer Methanol / Salzsäurelösung (1/1 (v/v)) von anderen oberflächenaktiven Stoffen gereinigt und - nach intensiver Spülung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> - getrocknet.

Vorbereitung von Kultivierungsproben:

Die aus den Kultivierungen stammenden, mit HCl konservierten Proben wurden zur Entfernung von störenden Zellbestandteilen und anderen Schwebstoffen mittels einer Glasmembranfiltrationsanlage (250 mL, Fa. Sartorius AG, Göttingen) im Wasserstrahlpumpenvakuum durch eine Teflon-Membran (0,22 µm Porendurchmesser, Typ GVWP, Millipore) filtriert. Die Membran wurde dann mit 70 - 80 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült, Original- und Spüllösung wurden anschließend in einem Meßkolben auf 100 mL aufgefüllt. Da die Konzentration der oberflächenaktiven Substanzen in diesem Volumen 20 - 200 µg betragen sollte, wurden - je nach zu erwartender Tensidkonzentration - Probelösungen zwischen 1 und 15 mL eingesetzt.

In Zusammenarbeit mit MENGE [1996] wurde festgestellt, daß die Membranfiltration zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse führt: Proben gleicher Tensidkonzentration, aber unterschiedlicher Zellzahlen wurden unfiltriert und filtriert vermessen. Die Standardabweichung bei fünf Ansätzen konnte dadurch von 9,12% auf 2,42% gesenkt werden (Doppelbestimmung). Außerdem konnte gezeigt werden, daß durch Zellyse keine die Analytik störenden Substanzen freigesetzt werden bzw. der Teflonfilter keine Tenside adsorbiert.

Durchführung der Tensidanalytik:

Die jeweiligen Probelösungen oder 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> als Blindwert wurden in einen 250 mL-Scheidetrichter überführt, der nach Zusatz von 5 mL neutraler Methylenblau-Lösung, 10 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub>-Pufferlösung und 15 mL Chloroform gleichmäßig eine Minute lang in waagerechter Position geschüttelt wurde (s. auch Kap. 7.3). Anschließend wurde die organische Phase in einen zweiten Scheidetrichter, in dem 110 mL H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 5 mL saure Methylenblau-Lösung vorlagen, abgelassen und wie zuvor geschüttelt. Nach dem Ablassen der organischen Phase in einen 50 mL Meßkolben wurde sowohl die neutrale als auch die saure Methylenblau-Lösung noch je zweimal mit 10 mL Chloroform ausgeschüttelt und alle organischen Phasen im Meßkolben vereinigt. Zur Adsorption von Wasserresten wurde das organische Lösemittel dabei immer über einen mit Chloroform getränkten Wattefilter in den Meßkolben filtriert. Nach Auffüllung bis zur Eichmarke wurde die Lösung bei 650 nm im Zweistrahl-Spektrophotometer (Uvikon 922, Kontron Instruments, Neufahrn) gegen Chloroform vermessen.

Zur Kalibration wurde Natriumdodecylsulfat in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Die folgende Gleichung gibt eine Kalibrationsgerade wieder:

$$Tensid [g/L] = (1,35 \pm 0,015) * E_{650nm} + (0,011 \pm 0,010)$$

mit R<sup>2</sup> = 0,99961, S = 0,01259, N = 5 (0; (0,1738); 0,3476; 0,6952; 1,0428; 1,3904 g/L SDS)

MENGE [1996] stellte durch den Vergleich von Kalibrationsgeraden von H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> mit denen von MM<sub>Brn.</sub> fest, daß das Medium keinen Einfluß auf die Tensidanalytik ausübt.

3.5.2.8.2 *Qualitativer Nachweis der Sophoroselipide mittels Dünnschichtchromatographie*

Zur Erfassung qualitativer Veränderungen der Sophoroselipidmischung wurde die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Dazu wurden zwei Methoden verwendet, die auf unterschiedlichen Chromatographieplatten und verschiedenen Laufmitteln basieren. Diese sind in Tabelle 10a wiedergegeben.

Tab. 10a: Zur Dünnschichtchromatographie eingesetzte Methoden

Chromatographieplatte	DC-Fertigplatten RP-18 F <sub>254</sub> S (E. Merck, Darmstadt)	DC-Alufolien Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (E. Merck, Darmstadt)
Laufmittel	Methanol / Wasser (9/1 (v/v))	Chloroform / Methanol / Wasser (65/15/20 (v/v/v))

Die wässrigen Kultivierungsproben und die Sophoroselipidstammlösungen wurden dabei in unterschiedlichen Mengen auf die Chromatographieplatte aufgetragen (zwischen 5 - 100 µL, je nach Konzentration), die dann entwickelt wurden.

Tab. 10b: Anfärbung der Chromatographieplatten

Anfärbung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- entwickelte und getrocknete Platten werden kurz in eine Lösung aus Anisaldehyd / Schwefelsäure / Essigsäure (1/2/100 (v/v/v)) getaucht und anschließend</li> <li>- mit einem Heißluftgebläse solange im Luftstrom auf ca. 150°C erhitzt, bis die Spots sichtbar werden</li> </ul>
Literatur	KREBS et al. [1967]

### 3.5.2.8.3 Quantitativer Nachweis der Sophoroselipide mittels Anthronmethode

Der Einsatz von Anthron zur Messung von Kohlenhydraten ist schon seit geraumer Zeit bekannt [MOMOSE et al. 1957, JERMYN 1975]. Wodarczak und Buschmann etablierten darauf aufbauend ein Meßverfahren zur quantitativen Bestimmung von Alkylpolyglucosiden [BUSCHMANN und WODARCZAK 1995, WODARCZAK und BUSCHMANN 1995]. Die Methode basiert auf der Hydrolyse des Tensides in stark saurer Lösung und anschließender Reaktion mit Anthron zu einem grün gefärbten Komplex, der photometrisch bei 620 nm erfaßt werden kann.

#### Probenahme und Vorbereitung:

Bei den Flüssigkultivierungen mit Sophoroselipidkonzentrationen über der CMC wurden 2 mL, bei denen unterhalb der CMC 10 mL Probe in Braunglasflaschen gefüllt, zur Konservierung je 20 µL 3 M HCl/mL Volumen zugesetzt und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Bei den Bodensuspensionskultivierungen wurden etwa 2 mL in eine 4 mL Braunglasflasche abgefüllt und bei -20°C gelagert. Die Vorbereitung der Glasgefäße wurde entsprechend den Angaben zur Texapon<sup>®</sup> N25-Analytik durchgeführt (s. Kap. 3.5.2.8.1). Am Vortag wurde jeweils die Anthronreagenzlösung angesetzt (s. Kap. 7.3).

#### Durchführung der Anthronmethode:

Je 1 mL Probe wurde in einen 100 mL Erlenmeyerkolben gegeben. Bei den Proben der Kultivierung unterhalb der CMC wurden die gesamten 10 mL in den Kolben überführt, durch Erhitzung auf 60°C das Wasser moderat abgedampft und der Rückstand in 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wieder aufgenommen. Bei den Bodensuspensionsproben wurden jeweils 1,2 g eingewogen.

Im Anschluß daran erfolgte die Zugabe von 1 mL konz. Salzsäure, 100 µL konz. Ameisensäure und 8 mL Anthronreagenzlösung. Die Kolben, die zur Verminderung von Verdampfungsverlusten mit Glasplatten abgedeckt worden waren, wurden für genau 12 min in ein siedendes Wasserbad

gestellt und anschließend in einem Eisbad abgeschreckt. Bei den flüssigen Proben wurde ein Teil der grünblau gefärbten Lösung in Glasfläschchen überführt, die dann 5 - 15 min im Ultraschallbad zur Entfernung störender Gasblasen behandelt wurden. Demgegenüber wurde ein Aliquot der Lösung der Bodensuspensionsproben in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (10 min bei 14.000 rpm (Labofuge, Fa. Eppendorf)) und anschließend 10 min im Ultraschallbad entgast.

Die Extinktion der Lösungen wurde bei 620 nm mit einem Zweistrahl-Spektrophotometer (UVI-KON 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen.

Als Blindwert wurde 1 mL  $MM_{\text{Bun.}}$  anstelle der Probe eingesetzt. Die Kalibration erfolgte mit Glucose in  $MM_{\text{Bun.}}$  (bei den zehnfach ankonzentrierten Proben wurden jeweils zehnfach konzentrierte Saline eingesetzt):

$$\text{Glucose [mg/L]} = (246,66 \pm 1,70) * E_{620 \text{ nm}} + (0,09 \pm 0,968)$$

$$\text{mit } R^2 = 0,99976, S = 1,57754, N = 7 (0; 25; 50; 100; 150; 200; 250 \text{ mg/L Glucose})$$

Die Methode wurde nach den Angaben von WODARCZAK und BUSCHMANN [1995] durchgeführt und ist ein spezifischer Nachweis für Hexosen [KAKAC und VEJDELEK 1977]. Dieser Test diente in erster Linie zur Bestimmung der Sophoroselipidkonzentration der Stammlösung und der Vorversuche. Bei den Kultivierungen wurde der Gesamtgehalt an Hexosen bestimmt, da nicht abtrennbare Bakterienbestandteile ebenfalls Glucosereste oder andere meßbare Zucker aufweisen können.

#### 3.5.2.9 Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC)

Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs von Überstandsproben aus den Bodensuspensionskultivierungen wurden mit dem TOCOR 3 (H. Maihak AG, Hamburg) durchgeführt. Dabei wird die Probe in einen Reaktor, der mit Schwefelsäure vom pH 2,0 - 2,5 gefüllt ist, eingespritzt. Durch die anliegende Sauerstoffbegasung wird zuerst der gelöste anorganische Kohlenstoff (DIC, dissolved inorganic carbon) ausgetrieben. Durch Aktivierung einer UV-Licht emittierenden Hg-Niederdruckdampfampe werden die organischen Bestandteile der Probe photochemisch zu  $CO_2$  oxidiert und über den Sauerstoffstrom ebenfalls ausgetrieben. Durch einen Infrarot-Gasanalysator UNOR wird der  $CO_2$ -Gehalt gemessen und in ein proportionales elektrisches Signal umgewandelt. Die Meßdaten werden über einen mit einer A/D-Karte versehenen PC 486 aufgenommen und gespeichert. Durch die Ermittlung der Integrale einer Kalibrationsgeraden mit einer Glucoselösung, die im Bereich 0 - 150 oder 200 mg/L DOC angelegt wurde, konnte dann der DOC einer Probe bestimmt werden. Eine repräsentative ermittelte Geradengleichung ist:

$$\text{DOC [mg/L]} = (2,34 \pm 0,037) * \text{Integral} - (2,75 \pm 1,442)$$

$$\text{mit } R^2 = 0,99878, S = 2,06287, N = 7 (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 \text{ mg/L DOC})$$

Dabei wurden jeweils 900  $\mu\text{L}$  Standard oder Probe eingespritzt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie in Kap. 3.7.5.5.3 beschrieben.

## 3.6 Online-Analytik

### 3.6.1 Messung des pH-Wertes

Zur Online-Analytik wurde die bereits erwähnte Gelelektrode eingesetzt. Die sterilisierbare pH-Elektrode wurde jeweils vor dem Autoklavieren, wie im Kap. 3.5.2.3 beschrieben, kalibriert.

### 3.6.2 Erfassung des Gelöstsauerstoffgehaltes

Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff von Kultivierungsmedien wurde mit einer autoklavierbaren pO<sub>2</sub>-Elektrode (Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz) erfaßt. Die Messung basiert auf dem amperometrischen Prinzip (Clark-Prinzip).

Die Kalibration der Sauerstoffelektrode erfolgte nach der Sterilisation und anschließender, mindestens sechsständiger Polarisierung direkt im Bioreaktor und zwar

- a) bei den Reaktorläufen mit dem Standardbegasungsring in Form einer Zwei-Punkt-Kalibration mit Stickstoff (0%-Wert) und Druckluft (100%-Wert) unter Einhaltung der Kultivierungsbedingungen (bzgl. Temperatur, Rührerdrehzahl, Begasungsrate),
- b) bei Versuchen mit einem modifizierten Schaumzerstörungsbegasungsring mittels einer Ein-Punkt-Kalibration mit Druckluft, da die Gleichgewichtseinstellung verlangsamt war. Diese Möglichkeit wird ebenfalls durch die Bedienungsanleitung des Bioreaktors vorgegeben (s. Betriebshandbuch Biostat, B. S. 5 - 9, Kap. 5.4.2, Braun, Melsungen).

Die Ergebnisse werden als relative Werte zwischen den beiden Kalibrationswerten angegeben (rel. O<sub>2</sub>-Sättigung [%]).

### 3.6.3 Durchführung der 2D-Fluoreszenzmessungen über den Bypass

Bei einigen Flüssigkultivierungen im 2 L Bioreaktor wurden online 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen, in dem ein Bypass mit Durchflußmeßzelle an den Reaktor angeschlossen wurde (s. auch Kap. 3.7.5.5.2). Das Spektralfluorometer Hitachi F-4500 wurde über den Lichtleiter an den Prozeß angekoppelt und die Daten mittels des BioView-Programms kontinuierlich aufgenommen [HILMER 1996]. Die Weiterverarbeitung der Daten erfolgte wieder mit dem Programm Excel (Microsoft) gemäß den zu den Offline-Messungen gemachten Ausführungen (Kap. 3.5.2.2). Tabelle 11 gibt die Einstellung des Spektralfluorometers bei den Online-Messungen wieder.

Tab. 11: Einstellung der Geräteparameter des Fluoreszenz-Spektrophotometers während der Online-Messungen.

Photomultiplierspannung	700 V	
Scangeschwindigkeit	30000 nm/min	
	Exzitation	Emission
erfaßte Wellenlängen	230 - 500 nm	250 - 650 nm
Schrittweite	10 nm	10 nm
Slit	10 nm	20 nm

### 3.6.4 CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgasanalytik

Bei den Kultivierungen im 2 L Bioreaktor wurden ebenfalls online der Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt der Abluft bestimmt. Aufgrund des zwischenzeitlichen Wechsels des Arbeitsplatzes wurden dabei zwei Systeme eingesetzt:

- a) bei den Reaktorläufen mit dem Standardbegasungsring wurde die Abluft einem mobilen Abgasanalysator (EGAS1, Braun, Melsungen) zugeführt. Dazu wurde ein Teilstrom mit einer internen Pumpe aus der Abgasleitung abgetrennt und vor der Vermessung über einen Meßgaskühler mit Kondensatauffanggefäß getrocknet. Die Sauerstoffkonzentration wurde anschließend elektrochemisch über eine Elektrolysezelle, die Kohlendioxidkonzentration mit einem IR-Photometer vermessen. Die Kalibration des O<sub>2</sub>-Analysators erfolgte mit Druckluft

- und einem Prüfgas (1,98% CO<sub>2</sub>, 19,0% O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>), die des CO<sub>2</sub>-Analysators mit Druckluft und Stickstoff jeweils bei Bedingungen, die mit denen der Kultivierung identisch waren.
- b) bei den Versuchen mit dem modifizierten Schaumzerstörungsbegasungsring wurde eine fest installierte Anlage eingesetzt. Diese besteht aus einem Rückflußkühler mit Kondensatauffanggefäß, einem IR-spektroskopisch messenden CO<sub>2</sub>-Analysator (Polytron IR-CO<sub>2</sub>, Drägerwerk) sowie einem nach dem paramagnetischen Prinzip funktionierenden O<sub>2</sub>-Analysator (Oxygor, H. Maihak AG, Hamburg). Das Meßgas wird über eine Pumpe, die sich im Oxygor und damit in der letzten der in Reihe geschalteten Komponenten befindet, gefördert. Die Kalibration erfolgte wie in a) beschrieben.

### 3.6.5 Prozeßsteuerung und Datenerfassung bei Kultivierungen im Bioreaktor

Der Biostat B verfügt über einen eigenen Frontend-Prozessor als Steuereinheit. Während der Abbauprobungen wurden damit Temperatur und Rührerdrehzahl geregelt und verschiedene Meßwerte über eine serielle Schnittstelle zur Verfügung gestellt. Durch ein Mass-Flow-Meter (Mass-Flow-Controller 5851, 0 - 30 L/min, Fa. Brooks) mit Controller (Modell 5876, Fa. Borse) wurde die Begasungsrate auf einem konstanten Niveau gehalten.

Die Aufnahme der 2D-Fluoreszenzdaten erfolgte getrennt von der Erfassung der übrigen Kultivierungsdaten und wurde bereits in den entsprechenden Kapiteln beschrieben (s. Kap. 3.5.2.2 und Kap. 3.6.3).

Im Laufe der Arbeit wurde das Datenerfassungssystem gewechselt.

a) Die Bioreaktorkultivierungen ohne Tensidzusatz wurden mit einem auf der Software MicroMFCs (Braun, Melsungen) basierenden System aufgezeichnet. Das Programm ist auf einem Computer (PC 486, 50 MHz) installiert, der über die serielle Datenschnittstelle mit der Bioreaktorsteuereinheit verbunden ist. Der Abgasanalysator (EGAS1, Braun, Melsungen) ist über ein FIS (fermenter interchanging system) an den Rechner angeschlossen. Die Online-Prozeßmeßgrößen wurden alle 5 s erfaßt, jedoch anschließend programmbedingt über 10 min gemittelt und abgespeichert.

b) Zur Datenerfassung der Kultivierungen mit Tensidzusatz oder/und Boden wurde ein Hauptrechner (MIMAS) benutzt, auf dem das Prozeßleitsystem RISP installiert ist. Über eine am Reaktor aufgestellte Workstation (Vax-Station 3000, Digital), die über das institutseigene local area network (LAN) mit dem Rechner verbunden ist, wurden sowohl der Datenerfassungsprozeß gestartet und kontrolliert als auch die anfallenden Daten visualisiert.

Die durch die Steuereinheit des Bioreaktors direkt aufgenommenen Prozeßdaten, wie Temperatur, Rührerdrehzahl, Gelöstsauerstoffkonzentration und pH-Wert, konnten über den Hostanschluß digital ausgegeben und somit direkt an die MIMAS weitergeleitet werden. Demgegenüber verfügen die Abgasanalysengeräte (CO<sub>2</sub>-IR, Oxygor) nur über Analogausgänge. Diese Daten wurden per Computer (PC 486, 50 MHz), der mit einer 12-Bit Mehrkanal-A/D-Karte (PCL 818, Advantech) ausgestattet war, und dem Programm Labtech Notebook aufgenommen und dann digitalisiert an den Zentralrechner weitergegeben.

Die verschiedenen Prozeßdaten wurden alle 2 s erfaßt und die über eine Minute anfallenden 30 Werte gemittelt und gesichert.

## 3.7 Durchführung der Kultivierungen

### 3.7.1 Sterilisation

#### Kultivierungsmedien:

Nährböden und Flüssigmedien wurden je nach Größe der Gefäße für 20 - 30 min bei 121°C im Autoklaven (Fedegrari Autoklav FV5 - 3, Integra Biosciences Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald) sterilisiert. Der 2 L Bioreaktor wurde inklusive der Peripherie und des Mediums für 30 min bei 121°C autoklaviert. Glucoselösungen wurden stets separat autoklaviert und erst anschließend dem Medium zugesetzt.

#### Sonstige Lösungen:

Die Stammlösungen der verschiedenen PAK in Dichlormethan waren autosteril. Dies galt ebenso für die des Texapons; die Sophoroselipid-Stammlösung hingegen war geringer konzentriert und weniger toxisch für Kontaminanten (s. Kap. 5.1.3). Da die Komponenten des Sophoroselipidgemisches hitzeempfindlich sind, wurden sie im Wasserbad dreimal von Raumtemperatur auf 80°C erhitzt und bei dieser Temperatur je 10 min inkubiert. Das Glycerin zum Ansatz von Tiefkühlkulturen wurde 20 min bei 121°C autoklaviert.

#### Mikroorganismensuspension:

Zum Ansatz der Kultivierungen ohne mikrobielle Aktivität wurde das gemäß Kap. 3.7.3.1 ankonzentrierte Inokulum durch intermittierendes Erhitzen (dreifache Erhitzung von Raumtemperatur auf 80°C und 20 min Inkubation bei dieser Temperatur) inaktiviert. Der Erfolg wurde durch Ausplattierung auf geeignetem Agar dokumentiert. So wurden die Zellen schnell abgetötet, ohne daß dabei Inhaltsstoffe denaturiert wurden.

#### Boden:

GEBNER [1997] führte Untersuchungen zur Sterilisation des Bodens durch. Sie stellte fest, daß es durch

- (a) Sterilisation im Autoklaven (25 min, 121°C),
- (b) intermittierende Erhitzung (dreifach in direkter Folge von Raumtemperatur auf 80°C erhitzen und diese Temperatur für 30 min halten),
- (c) fraktionierte Sterilisation kombiniert mit intermittierender Erhitzung (wie bei (b), jedoch zwischenzeitliche 2tägige Inkubation bei 28°C)

entweder zu einer drastischen Veränderung der Bodenstruktur (a) oder nicht zu einer vollständigen Entkeimung des Bodens (b, c) kommt, was Kontrollen auf St I-Platten zeigten.

Eine Alternativmethode der reversiblen Entkeimung von Böden ist der Einsatz von  $\gamma$ -Strahlung ( $^{60}\text{Co}$ ) [ARONSTEIN et al. 1991, ARONSTEIN und ALEXANDER 1992]. Diese Methode wurde jedoch nicht angewendet, da keine Bestrahlungsanlage zur Verfügung stand.

Für Voruntersuchungen und Referenzkultivierungen mit Boden, die ohne mikrobielle Aktivität durchgeführt werden sollten, konnte daher nur eine Methode, die auf irreversibler Vergiftung beruhte, eingesetzt werden. Ein Literaturüberblick ergab, daß dazu am häufigsten  $\text{NaN}_3$  angewendet wird [CZESCHKA 1995, TIEHM 1994]. Im Rahmen der am Anfang dieses Absatzes beschriebenen Versuche testete GEBNER [1997] ebenfalls, ob der

- (d) Zusatz von 0,1; 0,5; 1 oder 2%  $\text{NaN}_3$  (w/w) zur Bodensuspension die Abtötung der Mikroorganismen bewirkte.

Es stellte sich heraus, daß Natriumazid-Konzentrationen  $\geq 1\%$  nötig waren.

### Zuluft:

Die bei den Kultivierungen eingesetzten Gase wurden über keimfreie Wattefilter sterilfiltriert.

### Abfälle:

Alle Abfälle wurden, je nach Größe der Gefäße oder Beutel, für 30 - 60 min bei 121°C im Autoklaven sterilisiert.

## **3.7.2 Stammhaltung der eingesetzten Mikroorganismen**

### 3.7.2.1 Kurzzeitlagerung in Agarplattenkultur

Das vorrangig eingesetzte GRAM-negative Bakterium *S. yanoikuyae* B1 wurde alle 4 - 6 Wochen auf phenanthrenhaltige MM<sub>Brun.</sub>-Agarplatten mittels Vereinzelausstrich übertragen (s. Kap. 7.2). Damit war gewährleistet, ständig über frisch an den Schadstoff adaptierte Reinkulturen verfügen zu können. Dabei erfolgte die Überimpfung, auch die der nachfolgend beschriebenen Organismen, stets im Doppelansatz. Eine Agarplatte diente immer zur Entnahme von Mikroorganismen für Kultivierungen, die andere wurde zum Ansatz von zwei neuen Stammhaltungsplatten eingesetzt. Nach der Inkubation von etwa 2 - 3 d bei 28°C im Brutschrank (BE 200, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach) wurden die gut mit *S. yanoikuyae* bewachsenen Platten bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

Die auf den drei PAK angereicherte Mikroorganismensuspension wurde zur Stammhaltung nicht auf Agarplatten ausgebracht, da sich das Konsortium in seiner Zusammensetzung geändert hätte und ein reproduzierbares Übertragen auf neue Platten nicht möglich gewesen wäre. Der Inhalt des Anzucht-Erlenmeyerkolbens wurde vielmehr gemäß Kapitel 3.7.2.2 tiefgefroren.

Die Stammhaltung der Bakterien, deren Phenanthrenabbaukapazität getestet wurde, erfolgte auf entsprechenden schadstoffhaltigen MM<sub>Brun.</sub>-Agarplatten (s. Kap. 7.2 und [DSMZ 1993/1995]). Im Gegensatz dazu wurden die Stämme, die für die Toxizitätstests eingesetzt wurden, auf reichen adäquaten Komplexmedien (St I-Agar, Casein-Sojapeptonagar oder Malzextrakt (Zusammensetzung s. [DSMZ 1993])) gehalten (s. Kap. 5.1.3). Dabei wurden die Bakterienstämme alle 4 - 6 Wochen überimpft, während die sporenbildenden Pilze nur etwa alle drei Monate auf neues Medium übertragen wurden. Ausreichend bewachsene Platten wurden, nach Inkubation bei 28°C, bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

### 3.7.2.2 Langzeitlagerung als Gefrierkultur

Eine Voraussetzung für eine Tiefkühlkultur ist ein ausreichend konzentriertes, frisches, nicht zu häufig überimpftes Inokulum. Um eine Reinkultur einzufrieren, wurde direkt von einer bewachsenen Agarplatte Biomasse entnommen und in MM<sub>Brun.</sub> resuspendiert. Demgegenüber wurde die Flüssigkultur des auf dem Drei-PAK-Gemisch angereicherten Konsortiums in sterile Zentrifugenbecher überführt, 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Braun, Melsungen), der Überstand anschließend verworfen und die Suspensionen nach Resuspendierung vereinigt.

Die Suspensionen wurden dann in keimfreie Kryoröhrchen überführt, in die so viel steriles Glycerin vorgelegt war, daß sich nach der Mikroorganismenzugabe eine Endkonzentration von 15% (v/v) ergab.

Einfrrier- und Auftauvorgänge wurden langsam und schonend vorgenommen, indem sukzessive die Temperatur von Raumtemperatur auf +4°C über -20°C bis zu -80°C erniedrigt bzw. erhöht wurde. Die Suspensionen wurden für ca. 1 - 2 h bei den jeweiligen Zwischentemperaturen gelagert.

Etwa 2 Tage nach dem Einfrieren wurde jeweils ein Kryoröhrchen eines Drei- oder Mehrfachansatzes wieder auf Raumtemperatur erwärmt, ein Aliquot in Doppelbestimmung auf geeignete Agarplatten ausgebracht und nach Inkubation die Lebensfähigkeit und die Reinheit der Kultur begutachtet.

### 3.7.3 Bereitstellung des Inokulums für die Kultivierungen

#### 3.7.3.1 Vorkulturen von *S. yanoikuyae* B1

Vorkulturen wurden in 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben, die mit 200 mL  $MM_{\text{Brun.}}$  und 1 g/L Glucose und 150 mg/L Phenanthren befüllt waren, angesetzt. Nach der Inokulation wurde der Kolben für 3 - 5 Tage im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) bei 120 rpm und 28°C inkubiert.

Danach wurde der Inhalt des Erlenmeyerkolbens auf sterile 30 mL Zentrifugenröhrchen (aus Polyallomer mit Polypropylen-Schraubverschluß) verteilt und für 10 min bei 8.000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Braun, Melsungen). Der Großteil des Überstands wurde verworfen und die Zellen im verbleibenden Rest resuspendiert und zu einer stark ankonzentrierten Bakterien-suspension vereinigt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl gemäß Kapitel 3.5.1.1 und zur optischen Kontrolle wurde eine Probe mikroskopisch untersucht. Im Anschluß daran wurde mit der berechneten Menge ankonzentrierter Bakterien-suspension die Kultivierung gestartet.

Die aufgeführten Arbeitsschritte wurden kurz vor dem Beginn eines Experimentes durchgeführt, um eine zu lange Lagerung des Inokulums zu vermeiden.

#### 3.7.3.2 Vorkulturen des auf den drei PAK angereicherten Mikroorganismenkonsortiums

Diese Untersuchungen sowie die Anreicherung selbst wurden in Zusammenarbeit mit MENGE [1996] durchgeführt.

Die Vorkulturen wurden parallel den Ausführungen in Kap. 3.7.3.1 immer gleichartig in 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben mit 200 mL  $MM_{\text{Brun.}}$  angesetzt. Dazu wurden die Glasgefäße mit etwas  $H_2O_{\text{dest.}}$  befüllt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde 400 µL Benzo[ghi]perylen-Stammlösung (5 mg/mL in  $CH_2Cl_2$ ) zugesetzt. Dieser Kohlenwasserstoff bildete so relativ feine Kristalle. Im Anschluß daran wurde durch leichte Erwärmung und Begasung mit steriler Druckluft die Flüssigkeit ausgetrieben, da die Wirkung der vergleichsweise hohen zugesetzten Menge Dichlormethans auf die Mikroorganismen nicht einzuschätzen war. In die trockenen Kolben wurden anschließend steril 190 mL  $MM_{\text{Brun.}}$  und 10 mL Glucoselösung (10 g/L) eingefüllt und durch Zusatz von 40 µL einer Phenanthren/Pyren-Stammlösung (je 250 mg/mL in  $CH_2Cl_2$ ) die restlichen PAK zugegeben. Die Kolben wurden dann für 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend gelagert. Die Endmengen der vorgelegten Kohlenstoffquellen im Medium waren:

Phenanthren	50 mg/L	Benzo[ghi]perylen	10 mg/L
Pyren	50 mg/L	Glucose	500 mg/L

Nachdem 1 mL Mikroorganismensuspension aus einem aufgetauten Kryoröhrchen (1 mL) unter sterilen Bedingungen zugesetzt worden war, wurde der Erlenmeyerkolben bei 120 rpm und 28°C im verdunkelten Schüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) so lange inkubiert, bis keine Glu-

cose mehr nachweisbar war. Dazu wurde ein Schnelltest (Accutrend Glucose, Boehringer Mannheim) eingesetzt. Nach sechs Tagen konnte das Kultivierungsmedium aufgearbeitet werden. Dabei wurde wie bei der *S. yanoikuyae*-Vorkultur verfahren, mit der einzigen Abweichung, daß das Vorkulturmedium für 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Mit der ankonzentrierten Mikroorganismensuspension wurden dann zügig die Versuchsansätze beimpft.

### 3.7.4 Gewinnung und Test eines auf Phenanthren, Pyren und Benzo[ghi]perylen angereicherten Mikroorganismenkonsortiums

#### 3.7.4.1 Anreicherung der Mischkultur

Zur Anreicherung von Mikroorganismen wird in der Regel Probematerial, in dem die gewünschten Keime vorliegen, unter selektiven Bedingungen inkubiert [ALEF 1991 und 1994, SCHLEGEL 1992]. So werden beispielsweise PAK-Abbauer aus schadstoffbelasteten Proben in Mineralsalzmedien unter Zusatz der entsprechenden Verbindungen angezogen und durch mehrfaches Überimpfen in frisches Medium angereichert.

Tabelle 12 gibt eine Liste des Probematerials wieder, das für die vorgenommene Anreicherung eingesetzt wurde.

Tab. 12: Ausgangsmaterial für die Anreicherung eines Mikroorganismenkonsortiums auf einem Drei-PAK-Komponentengemisch.

Nr.	Probe	Quelle	zur Verfügung gestellt durch / Literatur	eingesetzte Menge
1	Altlastboden	Gaswerkgelände, Solingen-Ohligs	[BRINKMANN 1996]	1 g
2	Altlastboden	Tankstellen-Grundstück Limmerstr., Hannover	GEO-DATA, Garbsen	2 g + 2g <sup>1)</sup>
3	Belebtschlamm	Kläranlage, Belebtschlammstufe	Klärwerk Herrenhausen	4 mL

<sup>1)</sup> Es handelte sich dabei um unterschiedliche Proben vom gleichen Grundstück.

Die Proben wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben, die mit 200 mL PAK-haltigem MM<sub>Brun</sub> befüllt waren, überführt. Die Kolben für die ersten vier Überimpfungen waren nach dem in Kapitel 3.7.3.2 angegebenen Verfahren angesetzt worden, allerdings unsteril und ohne Glucose. Sie wurden bei Raumtemperatur und 100 rpm in einem Reziproschüttler (HT, Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Suspension in einen 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben überführt, der nun jedoch steril angesetzt war und bei 28°C und 120 rpm (Certomat R/H, Braun, Melsungen) geschüttelt wurde. Tabelle 13 gibt einen Überblick der verschiedenen Anreicherungs-schritte.

Tab. 13: Vorgehensweise bei der Anreicherung des PAK-abbauenden Konsortiums.

Nr. der Überimpfung	Inkubationszeit	auf den nächsten Kolben übertragenes Volumen	Bedingungen
0	0 d	5 mL	500 mL Emk, unsteril, 100 rpm, RT
1	14 d	10 mL	500 mL Emk, unsteril 100 rpm, RT
2	28 d	5 mL	500 mL Emk, unsteril 100 rpm, RT
3	48 d	5 mL	500 mL Emk, unsteril 100 rpm, RT
4	59 d	Gefrierkultur (s. Kap. 3.7.2.2) und Abbauersuch (s. Kap. 3.7.4.2 und Kap. 5.1.4)	500 mL Vier-Schikane-Emk, steril 120 rpm, 28°C

Anmerkung: Das Experiment wurde im Doppelansatz durchgeführt. Es wird nur die besser wachsende, weiter verwertete Reihe gezeigt. (Abkürzungen: Emk = Erlenmeyerkolben, RT = Raumtemperatur)

### 3.7.4.2 Einsatz des Konsortiums beim Abbau des Drei-Komponentengemisches in Schüttelkolben

In 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben wurden steril 30 mL MM<sub>Brn.</sub> mit 50 mg/L Phenanthren und Pyren und 10 mg/L Benzo[ghi]perylen vorgelegt und eine Mikroorganismenzahl von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL eingestellt (s. Kap. 3.7.3.2). Die Kolben wurden anschließend bei 28°C und 120 rpm im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert und nach 1 h die erste Probenahme durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1 mL zur pH-Wert- und Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen, die verbleibenden 28 mL zur Unterbindung mikrobieller Aktivität mit 600 µL 3 M HCl versetzt und bis zur PAK-Bestimmung bei +4°C im Kühlschrank gelagert (s. Kap. 3.5.2.7).

## 3.7.5 Versuche mit *S. yanoikuyae* B1 und anderen Reinkulturen

### 3.7.5.1 Test des Wachstums von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur

Für diese Untersuchungen wurde die Biomasse per Impföse von der Stammhaltungs-Agarplatte direkt in ein mit 1 mL MM<sub>Brn.</sub> befülltes steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl gemäß Kap. 3.5.1.1 konnte so in zwei Vorkulturkolben der für den Standardanimpfvorgang repräsentative mittlere Ausgangstiter von  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/mL eingestellt werden. Die beiden Kolben wurden anschließend wie reguläre *S. yanoikuyae*-Vorkulturen inkubiert (s. Kap. 3.7.3.1). Zur Beprobung wurden 10 mL Kultivierungsmedium entnommen: Offline bestimmt wurden der Glucose- und Phenanthrengelalt (1 bzw. 6 mL) sowie der pH-Wert (2 mL) und die OD (1 mL).

### 3.7.5.2 Untersuchung der Stabilität des Phenanthrenabbauvermögens von *S. yanoikuyae* B1

Diese Experimente wurden durchgeführt, um zu testen, ob *S. yanoikuyae* B1 auch nach mehrmaligem Überimpfen in nicht schadstoffhaltiges Medium seine Phenanthren-Abbaufähigkeit behält. Dazu wurde in Doppelbestimmung je 200  $\mu\text{L}$  einer 3 Tage alten Vorkultur in einen sterilen 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben übertragen, der 30 mL  $\text{MM}_{\text{Brun.}}$  und Glucose (Arbeitskonzentration 1 g/L) enthielt. Die beiden Kolben wurden dann bei 28°C und 120 rpm im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert und nach 10 min 1 mL Probe genommen. Diese diente zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Zahl der KBE (koloniebildenden Einheiten) auf glucose- bzw. phenanthrenhaltigem  $\text{MM}_{\text{Brun.}}$ -Agar.

Mittels OD-Messungen konnte gezeigt werden, daß sich die Kulturen nach 24 h Inkubationszeit in der stationären Wachstumsphase befanden. Nach diesem Zeitintervall wurde pro Ansatz je 200  $\mu\text{L}$  Kultivierungsmedium in einen frischen Glucose- $\text{MM}_{\text{Brun.}}$ -Kolben überführt. Diese wurden dann gemäß den Ausführungen im ersten Abschnitt erneut inkubiert und beprobt, um vergleichbare Bestimmungen zu erreichen. Diese Prozedur wurde in den darauf folgenden acht Tagen wiederholt, so daß *S. yanoikuyae* B1 zehnmal mit frischem glucosehaltigem Medium konfrontiert wurde.

### 3.7.5.3 Durchführung der Toxizitätstests

#### 3.7.5.3.1 Plattendiffusionstest

Experimente mit gelochten Filterplättchen (Filterpapierplattentest) und ausgestanzten Löchern (Lochplattentest), wie sie etwa bei SCHLEGEL [1992] beschrieben sind, ergaben mit den Tensidlösungen keine zufriedenstellenden Resultate. Der zuletzt genannte Test führt nur dann zu reproduzierbaren Ergebnissen, wenn durch teilweise Wiederbefüllung der ausgestanzten Löcher mit Agar ein anschließendes Auslaufen der Tensidlösungen zwischen dem Agar und dem Petrischalboden verhindert wurde.

Von den Agarplatten zur Stammhaltung der in Kap. 5.1.3 aufgelisteten Mikroorganismen wurden Bakterien- oder Sporensuspensionen hergestellt. Je 100  $\mu\text{L}$  wurden dann auf speziell angesetzte Agarplatten mit Vollmedien, die per EM-Dispenser (10 - 60 mL, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) mit 20 mL Medium befüllt wurden, ausplattiert. Anschließend wurden diese Platten auf eine Schablone gelegt. Mittels einer Pasteurpipette, deren ausgezogener Teil abgesägt und an die ein Wasserstrahlpumpenvakuum angeschlossen war, konnten dann Löcher an den markierten Stellen in das Agarmedium gestanzt werden. Im Anschluß daran wurden je 25  $\mu\text{L}$  gerade noch flüssigen Agars in die Löcher pipettiert und nach Erhärtung je 50  $\mu\text{L}$  der Tensidlösungen eingefüllt.

Anschließend wurden die Platten bei 28°C im Brutschrank inkubiert und konnten nach 1 - 2 d (bei Bakterien) und 2 - 4 d (bei Pilzen) nach der in Abb. 7 dargestellten Methode ausgewertet werden.

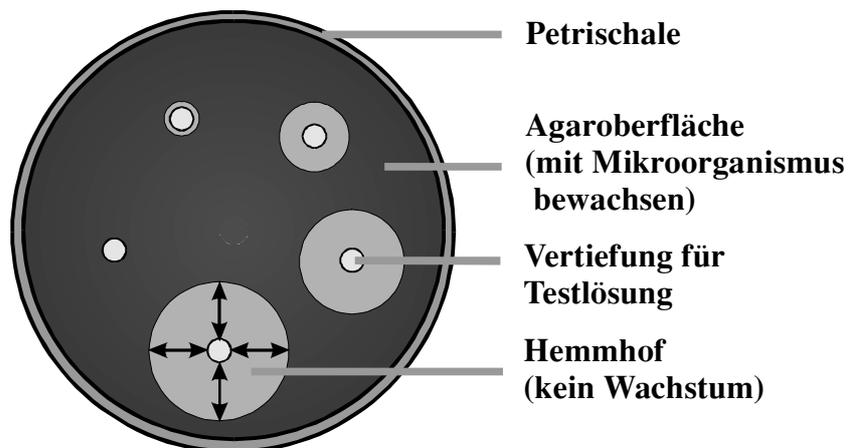


Abb. 7: Schematische Darstellung der Hemmhofausmessung mittels Schublehre beim Plattendiffusionstest (je ein Doppelpfeil repräsentiert eine Messung).

### 3.7.5.3.2 Test in Schüttelkolben („log-Wachstumstest“)

Dieser Test basiert auf der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Schadstoffen, wie er am Institut für Mikrobiologie der Universität Münster durchgeführt wurde. Dabei wird der zu untersuchende Mikroorganismus, auf einer nichttoxischen Kohlenstoffquelle wachsend, erst in der logarithmischen Wachstumsphase mit der zu testenden Substanz konfrontiert, wobei ständig das Wachstum verfolgt wird.

Eine sterile 1 L Schott DURAN<sup>®</sup>-Laborflasche, die mit 320 mL MM<sub>Brun.</sub> und Glucose (Arbeitskonz. 1 g/L) befüllt war, wurde im ersten Schritt mit 10 µL einer *S. yanoikuyae*-Vorkultur beimpft (s. Kap. 3.7.3.1). Die Flasche wurde dann bei 28°C und 120 rpm im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert und nach 16 h stündlich die OD bestimmt, bzw. im Falle des Sophoroselipid-Toxizitätstests ebenfalls eine Probe zur Proteinbestimmung genommen. Beim Erreichen einer OD zwischen 0,18 - 0,2 wurden je 20 mL Kultivierungsmedium zügig per EM-Dispenser (10 - 60 mL, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) in 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben überführt. In diese, auf 28°C vortemperierten Kolben wurden 10 mL MM<sub>Brun.</sub> mit einer Glucosekonzentration von 0,5 g/L und - in Doppelbestimmung - unterschiedliche Tensidkonzentrationen vorgelegt. In den jeweiligen Kolben lagen damit  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL vor: Dies entsprach der Ausgangskonzentration der später durchgeführten Kultivierungen. Daraufhin wurde die nächste Probenahme durchgeführt und die Kolben weiter bei 28°C und 120 rpm im Schüttler inkubiert. Bei den Experimenten mit Texapon<sup>®</sup> N25 konnte die OD weiter gemessen werden. Der Sophoroselipidzusatz hatte einen starken Einfluß auf diese Meßgröße, weshalb das Wachstum mittels Proteinbestimmung verfolgt wurde.

### 3.7.5.4 Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 unter Tensidzusatz im Schüttelkolben

Diese Versuche wurden in 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben durchgeführt, in die steril je 30 mL Medium mit 100 mg/L Phenanthren und unterschiedlichen Tensidkonzentrationen vorgelegt wurden. Dazu wurden 3 mL zehnfach konzentriertes MM<sub>Brun.</sub> sowie 300 µL Spurenelementelösung SL-4 in die Kolben pipettiert und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei Experimenten mit Sophoroselipid auf 20 bzw. mit Texapon<sup>®</sup> N25 auf 29 mL Volumen aufgefüllt. Durch Zugabe der Tensidlösungen nach dem Autoklavieren wurde auf 30 mL aufgefüllt.

Bei den Experimenten mit dem Sophoroselipid wurde im Anschluß an die Sterilisation zuerst das Tensid zugesetzt und dann 10 µL der Phenanthren-Stammlösung (300 mg/mL in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Nach der Verflüchtigung des Lösemittels aus den 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben bei leicht aufgedrehten Schraubdeckeln wurden diese für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Durch Zugabe einer definierten Menge der aufbereiteten Vorkultur wurde in den Kolben eine Zellzahl von je  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL eingestellt. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, um statistisch abgesicherte Werte zu erhalten.

Bei Versuchen mit Texapon<sup>®</sup> N25 wurde der Schadstoff in sterile Kolben mit 30 mL MM<sub>Brun.</sub> gegeben und diese im Anschluß an den Abdampfvorgang ü.N. bei 90°C gut verschlossen im Ultraschallbad temperiert. Dadurch wurde eine homogenere und kleinere Kristallgröße erreicht. Erst im Anschluß wurden die entsprechend konzentrierten Tensidlösungen zugesetzt und die Versuche durch Zusatz von *S. yanoikuyae* B1 gemäß den im vorhergehenden Abschnitt gemachten Angaben gestartet.

Alle Kolben wurden bei 120 rpm und 28°C im verdunkelten Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert.

Da die Probenahme aus den Kolben nicht reproduzierbar durchgeführt werden konnte, wurden nur die Anfangs- ( $t = 0$  h, 20 min nach Animpfung) und Endbedingungen ( $t = 21 - 24$  h) analytisch erfaßt. Dabei wurde je ein Kolben zur Phenanthrenanalytik und der andere zur Bestimmung der verbleibenden Meßgrößen eingesetzt (s. Kap. 5.1.6).

### 3.7.5.5 Untersuchung des Phenanthrenabbaus durch *S. yanoikuyae* B1 im Biostat B-Reaktor

Das eingesetzte Biostat B-Reaktorsystem (Braun, Melsungen) besteht aus einer Steuereinheit und einem Glasreaktor mit 2 L Arbeitsvolumen.

#### 3.7.5.5.1 Optimierung des Biostat B-Belüftungssystems für Experimente mit Tensidzusatz

Die Belüftung des Kultivierungsmediums erfolgt standardmäßig mittels eines direkt unterhalb des Rührwerks angebrachten Begasungsringes, wie er in Abb. 8 dargestellt ist. Beim Einsatz von Tensiden führt dies erwartungsgemäß zu sehr starker Schaumbildung, wobei das Medium über den Abluftweg hinausgedrückt wird. Für das Biostat B-Reaktorsystem (Braun, Melsungen) ist in solchen Fällen nur eine chemische Schaumzerstörung vorgesehen. Auf den Zusatz von Antischaummitteln wurde jedoch bewußt verzichtet, da sie die Wirkung der Tenside beeinträchtigt hätten. Da für den Kleinlaborreaktor keine mechanische Schaumzerstörung erhältlich war, mußte ein entsprechendes System entwickelt werden.

Versuche mit einer an der Rührachse befestigten rotierenden Scheibe, die mit sechs in  $30^\circ$  Winkeln abgestellten Blättern versehen waren, führten nicht zum gewünschten Erfolg.

Da sich durch Vorversuche gezeigt hatte, daß die Aufrechterhaltung einer ausreichend hohen Sauerstoffkonzentration im Medium kein Problem darstellte, wurde daraufhin versucht, das Begasungssystem zu verändern. Durch Experimente konnte gezeigt werden, daß nach Demontage des Schikanekorbes und durch Positionierung eines großen Begasungsringes mit nach unten gerichteten Düsen eine effektive Schaumzerstörung möglich ist. Abbildung 8 gibt die Lage des modifizierten Begasungsringes wieder (Konstruktionszeichnung des modifizierten Begasungsringes s. Kap. 7.5).

#### 3.7.5.5.2 Aufbau und Vorbereitung des Reaktorsystems

Der für die Kultivierungen mit Tensiden optimierte Gesamtaufbau des Bioreaktorsystems ist, ohne Steuereinheit und die zur Datenerfassung notwendigen Computer, in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

Das Bioreaktorgefäß ist mit einem Rührwerk aus zwei übereinanderliegenden Scheibenrührern versehen. Zur Unterdrückung zu starker Schaumbildung wurde der Schikanekorb ausgebaut und der modifizierte Begasungsring eingesetzt. An weiteren Einbauten ist ein Probenahmerohr und das Zu- und Ablaufrohr des Bypass, über den bei Flüssigkultivierungen online die Fluoreszenzmessungen durchgeführt wurden, vorhanden. Dazu wurde das Medium, nachdem es eine Blasen-falle passiert hat, ständig durch die Fluoreszenzmeßzelle gepumpt. Um Adsorptionseffekte des Phenanthrens zu minimieren, war dieses System mit Glasrohren ausgestattet, die mit Norprene<sup>®</sup>-

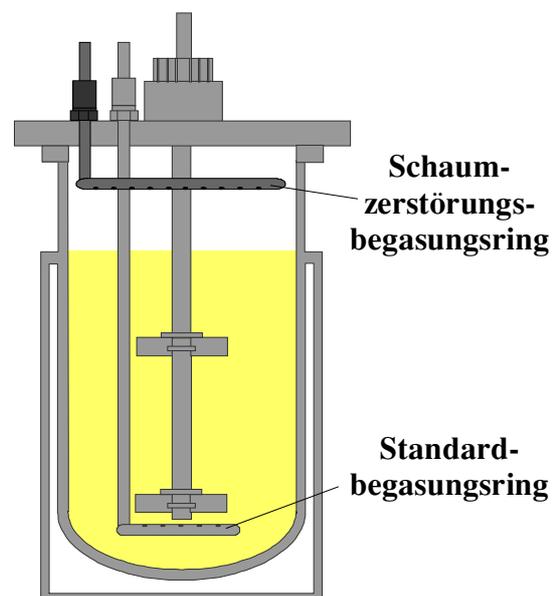
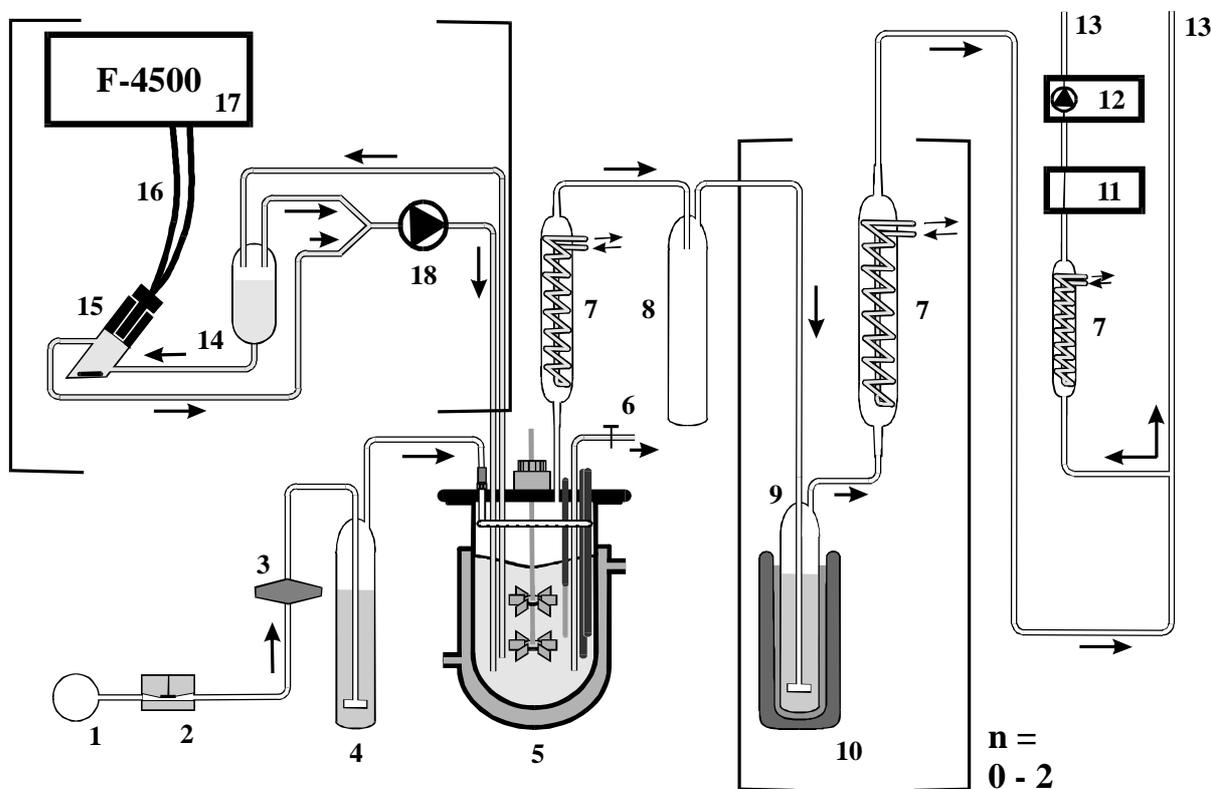


Abb. 8: Lage des modifizierten Begasungsringes, verändert nach MÜLLER [1996].

Schläuchen verbunden waren. Während der Kultivierungen wurde das Medium mit einer Rate von  $528,5 (\pm 8,5)$  mL/min über den Bypass, der  $102,4 (\pm 1,4)$  mL Fassungsvermögen hatte, gepumpt. Zur Messung unterschiedlicher Meßgrößen ist darüber hinaus eine pH-, eine  $pO_2$ -Elektrode sowie ein pT100-Temperaturfühler im Reaktor angebracht.



- |   |                                                                                                                  |    |                                                                 |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------|
| 1 | Druckluftanschluß (1 bar)                                                                                        | 10 | Dewargefäß mit Salz / Eis-Mischung                              |
| 2 | Mass-Flow-Meter                                                                                                  | 11 | CO <sub>2</sub> -Infralyt                                       |
| 3 | Sterilfilter                                                                                                     | 12 | O <sub>2</sub> -Oxigor                                          |
| 4 | Zuluftbefeuchtungsflasche                                                                                        | 13 | Abluft (in Abzug geleitet)                                      |
| 5 | Biostat B inklusive Rührwerk, pH- und $pO_2$ -Elektroden, pT100-Temperaturfühler und modifizierten Begasungsring | 14 | Blasenfalle                                                     |
| 6 | Probenahmerohr                                                                                                   | 15 | Durchflußmeßzelle                                               |
| 7 | Rückflußkühler                                                                                                   | 16 | Flüssiglichtleiter                                              |
| 8 | Sicherheitswaschflasche                                                                                          | 17 | Hitachi F-4500 Prozeßspektralfluorometer                        |
| 9 | Waschflasche mit Fritte der Porosität 2 und 250 mL Toluol                                                        | 18 | Schlauchquetschpumpe 501U (Watson-Marlow Ltd., Falmouth, Engl.) |

Abb. 9: Schematische Darstellung des eingesetzten Reaktorsystems.

Der Zuluftstrom wird über ein Mass-Flow-Meter geregelt und nach Sterilfiltration und Befeuchtung in den Reaktor geleitet. Der Abluftstrom wird über den systemintegrierten Rückflußkühler geleitet und gelangt von dort in einen Abzug. Ein Teilstrom wird vorher über einen weiteren Rückflußkühler, den CO<sub>2</sub>-Analysator und anschließend das O<sub>2</sub>-Meßgerät, welches über eine interne Förderpumpe verfügt, abgeführt (s. Kap. 3.6.4). Die zur CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Analytik führenden Gasleitungen waren aus gasdichten Teflonschläuchen. Bei einigen Kultivierungen wurden zur Erfassung der Menge an gestripptem Phenanthren ein oder zwei Toluolwaschflaschen, die mit einer Salz / Eis-Mischung gekühlt wurden und mit je einem Rückflußkühler versehen waren, in den Abluftstrom eingebaut. Um zu verhindern, daß Toluol durch Rückschlageffekte in den Bioreaktor

gelangt, wurde eine Sicherheitswaschflasche vor die Abgaswäsche eingesetzt. Die Zuleitungen aller dieser zusätzlichen Einbauten wurden, wie beim Bypass, ebenfalls mit Glasrohren ausgeführt. Während eines Laufes wurden Bioreaktor, Bypass und gegebenenfalls Toluolwäsche abgedunkelt, um die photolytische Zersetzung des Phenanthrens zu unterbinden.

Zur Vorbereitung einer Kultivierung wurde der Bioreaktor mit 200 mL zehnfach  $\text{MM}_{\text{Brun.}}$ -Saline und 20 mL Spurenelementelösung SL-4 befüllt. Unter Berücksichtigung der Volumina eventuell nach dem Autoklavieren noch zuzusetzender Tensidstammlösung oder Boden wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  soweit aufgefüllt, das sich letztendlich ein Arbeitsvolumen von 2 L ergab.

Der gesamte Reaktor inklusive Zuluftsystem und eventuell vorhandenem Bypass wurde 30 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung wurde das System mit der Steuereinheit verbunden, auf 28°C temperiert, der Rührer in der Regel auf 500 rpm eingestellt und gegebenenfalls die entsprechende Bodenmenge zugesetzt. Bei den Kultivierungen mit dem modifizierten Begasungsring mußte das Medium in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 6 h bis zur Gleichgewichtseinstellung begast werden. Das Medium wurde dabei üblicherweise mit 1 vvm belüftet, auf veränderte Begasungsraten wird an entsprechender Stelle hingewiesen. Im Anschluß daran wurde 200 mg Phenanthren (Stammlösung: 300 mg/mL in Dichlormethan) und gegebenenfalls die entsprechende Menge Tensid-Stammlösung zugesetzt. Vor dem Start der Kultivierung durch Zusatz einer entsprechend ankonzentrierten Vorkulturlösung von *S. yanoikuyae*-Bakterien wurde eine gewisse Wartezeit eingehalten, um die Verteilung der verschiedenen Substanzen zu gewährleisten (s. Kap. 3.7.3.1). Diese Zeit mußte trotz komplexerer Gleichgewichtseinstellung bei den Kultivierungen mit der Bodensuspension drastisch auf 30 min gekürzt werden, da sonst autochthone Bodenorganismen vermehrt angewachsen wären [s. auch CZESCHKA 1995].

#### 3.7.5.5.3 Durchführung der Probenahmen

Vor allem bei den Kultivierungen mit Bodensuspension war die Durchführung einer reproduzierbaren Probenahme schwierig, da gröbere Bodenpartikel im nicht optimal gerührten Medium sofort absinken.

Abbildung 10 gibt eine schematische Darstellung der Probenahme bei den Kultivierungen im Bioreaktor wieder. Während der Kultivierungen in flüssigen Medien wurden die Proben über das Probenahmerohr entnommen. Dazu wurde der erste Teil des Mediums verworfen und eine definierte Menge Probe anschließend in einem Meßkolben aufgefangen. Die Probe wurde unter ständigem Rühren zügig aufgearbeitet. Im Gegensatz dazu wurden die Proben bei Bodensuspensionskultivierungen nicht über das Probenahmerohr, sondern mit einer umgedrehten sterilen 50 mL Vollpipette entnommen. Ein Teil wurde direkt in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert, mit dem die Lebendzellzahl durch Ausplattieren bestimmt wurde. Der Rest wurde in einen 100 mL Erlenmeyerkolben überführt. Das Medium wurde dann während der weiteren Pipettierarbeit mit einem Magnetrührer gut gemischt. Mittels einer 10 mL Meßpipette mit vergrößerter Öffnung wurden die vorbereiteten Probengefäße befüllt, wobei das Volumen in der Regel über die Bestimmung der Gewichts-differenz der Gefäße vor und nach der Zugabe berechnet werden konnte. Abschließend wurden die Proben für die Bestimmungen von Meßgrößen im reinen Flüssigmedium pipettiert, bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge (5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfreaktionsgefäße übertragen.

Alle Proben wurden entweder sofort weiterverarbeitet (Oberflächenspannung, Lebendzellzahlbestimmung) oder bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C tiefgefroren. Die zur Phenanthren-, Protein- und Tensidanalytik bestimmten Proben wurden vorher noch mit 20 µL 3 M HCl je 1 mL Kultivierungsmedium zur Konservierung versetzt.

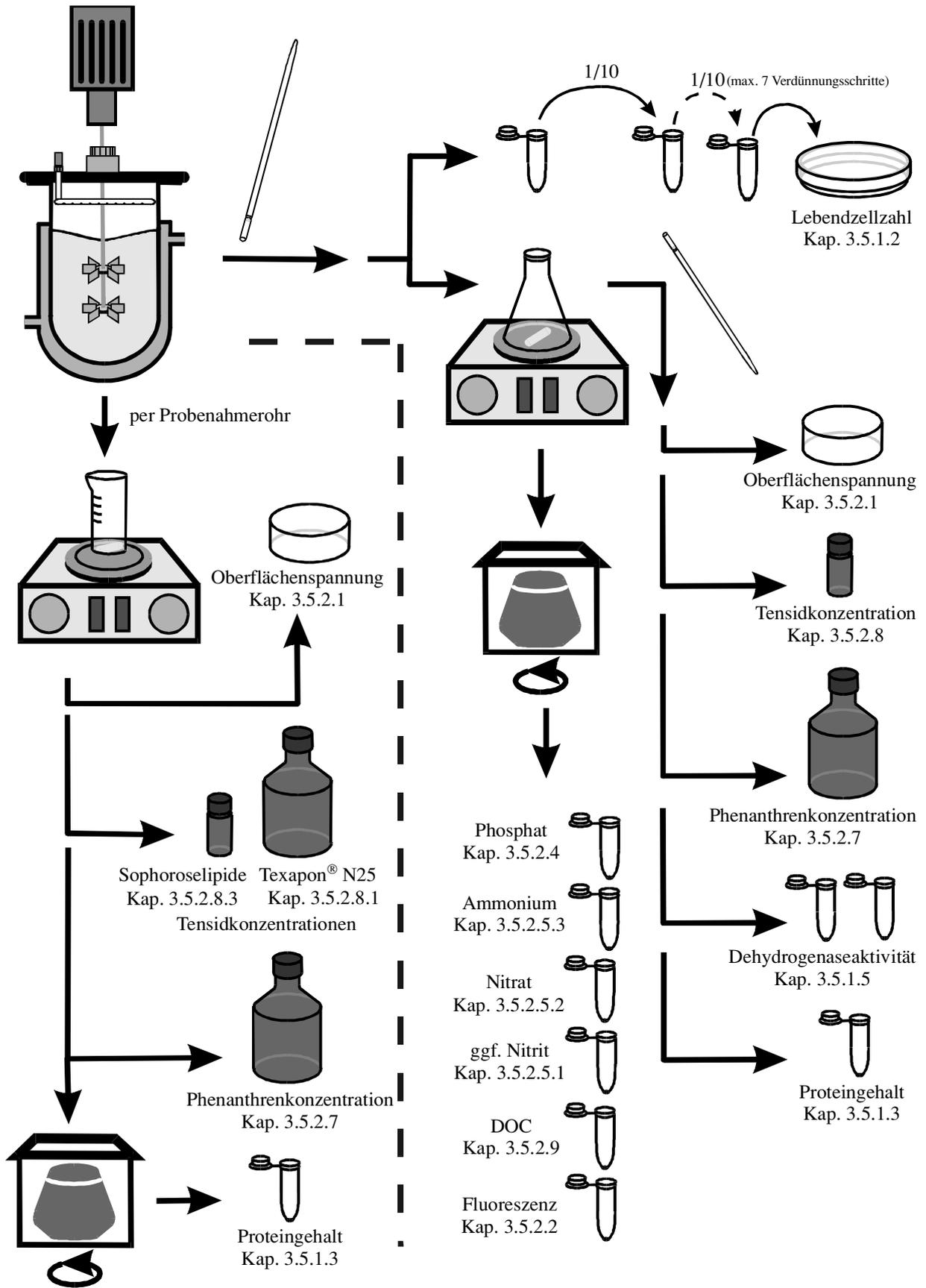


Abb. 10: Schematische Darstellung der Probenahmen bei Kultivierungen im 2 L Bioreaktor.  
 links der gestrichelten Linie: Kultivierung in flüssigem Medium  
 rechts der gestrichelten Linie: Kultivierung in 10% Bodensuspension

## 4 Praktischer Teil II

# Chemisch-physikalische Voruntersuchungen

In diesem Kapitel werden Durchführung und Ergebnisse aus chemisch-physikalisch ausgerichteten Voruntersuchungen mit Tensiden und Phenanthren präsentiert, die relevant für die Auslegung der biologischen Experimente und für die Diskussion der daraus resultierenden Ergebnisse sind.

### 4.1 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC) von Texapon® N25 und Sophoroselipiden

Die kritische Mizellbildungskonzentration ist ein Schlüsselparameter zur Charakterisierung von Tensiden oder Tensidgemischen und gibt an, ab welcher Konzentration eine Mizellbildung in wässriger Lösung erfolgt. Schadstoffabbausteigernde Wirkungen sind laut Literatur häufig erst oberhalb der CMC zu beobachten (s. Kap. 2.2.5.2).

Beim Überschreiten der CMC verändern sich einige physikalisch-chemische Eigenschaften von Tensidlösungen, wie etwa die Oberflächenspannung, die Leitfähigkeit oder der osmotische Druck. Diese können auf verschiedene Arten, etwa photo- oder tensiometrisch erfaßt werden. Darauf aufbauend gibt es verschiedene Methoden der CMC-Bestimmung, jedoch keine in einer DIN-Vorschrift niedergelegte [HALBIG 1997].

Die in dieser Arbeit dokumentierten Oberflächenspannungen wurden per Ringmethode nach Du Noüy bestimmt (s. Kap. 3.5.2.1). Dabei wurden auch die verschiedenen Kalibrationslösungen unter kultivierungsnahen Bedingungen (Temperatur: 28°C, Medium: MM<sub>Brun.</sub>) vermessen, um die Übertragbarkeit auf die späteren Versuchsergebnisse zu gewährleisten. Dazu wurden entsprechende Lösungen im 10 mL Meßkolben angesetzt: flüssige Proben wurden nach einer kurzen Lagerungszeit, Bodensuspensionsproben (versetzt mit 1% NaN<sub>3</sub>) erst nach 48 h Inkubation in 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben im Schüttelschrank (Certomat R/H, Braun, Melsungen bei 28°C und 200 rpm) vermessen. Nach intensivem Schütteln wurden 9 mL Probe entnommen und die Oberflächenspannung gemäß Kapitel 3.5.2.1 bestimmt. Durch die graphische Darstellung der gemessenen Werte gegen die logarithmisch aufgetragenen Tensidkonzentrationen kann durch Ermittlung des Schnittpunktes der Regressionsgeraden die CMC bestimmt werden. Abbildungen 11 und 12 auf der nächsten Seite geben die verschiedenen CMC-Bestimmungen wieder. In Tabelle 14 sind die der Berechnung zugrundeliegenden Daten aufgelistet.

An alle dargestellten Kurven lassen sich zwei Regressionsgeraden - je eine mit geringer bzw. großer Steigung - anlegen. Oberhalb der CMC hat eine Veränderung der Tensidkonzentration keine nennenswerte Auswirkung auf die Oberflächenspannung. Unterhalb der CMC wirken sich kleine Variationen des Tensidgehaltes drastisch auf diese Meßgröße aus.

Die unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ermittelte kritische Mizellbildungskonzentration der eingesetzten Sophoroselipide von 4,0 mg/L liegt wesentlich unter der von Texapon® N25 mit 60,6 mg/L. Unter der Voraussetzung, daß beide Tenside eine abbaufördernde Wirkung erst oberhalb der CMC zeigen, ist das getestete Biotensid effektiver, weil es in geringeren Mengen bei Schadstoffabbaubersuchen eingesetzt werden kann.

Die CMC der Sophoroselipide im eingesetzten Boden ist mit 45,5 mg/L mehr als zehnfach höher als die in Flüssigkultur bestimmte. Dies kann durch die zusätzlichen Wechselwirkungen der Tensidmoleküle mit Bodenpartikeln begründet werden.

Die im Rahmen dieses Kapitels durchgeführten Arbeiten wurden in Kooperation mit MENGE [1996] (Texapon® N25) und GEBNER [1997] (Sophoroselipide) durchgeführt. In Zusammenarbeit mit GEBNER [1997] wurden auch die im Kapitel 4.2 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt.

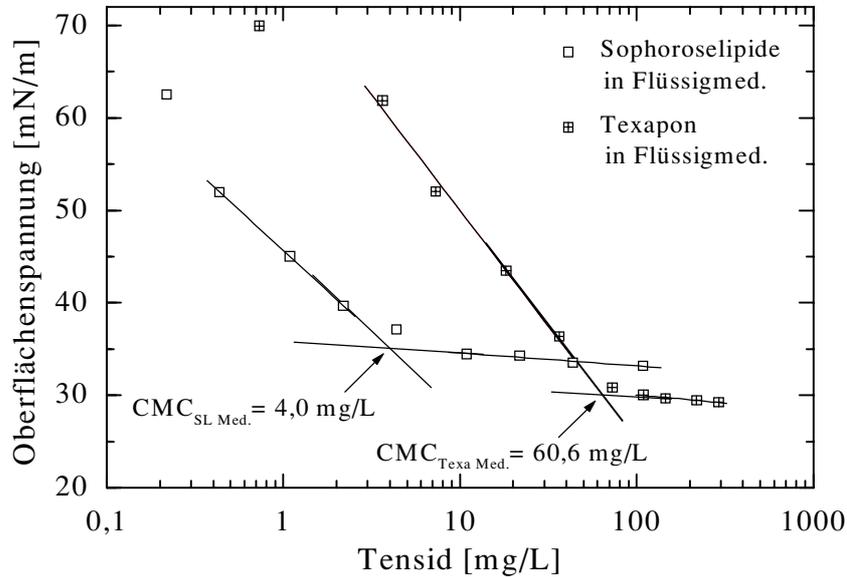


Abb. 11: Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen der beiden hauptsächlich untersuchten Tenside im flüssigen Medium. (Abkürzungen: s. Tab. 14)

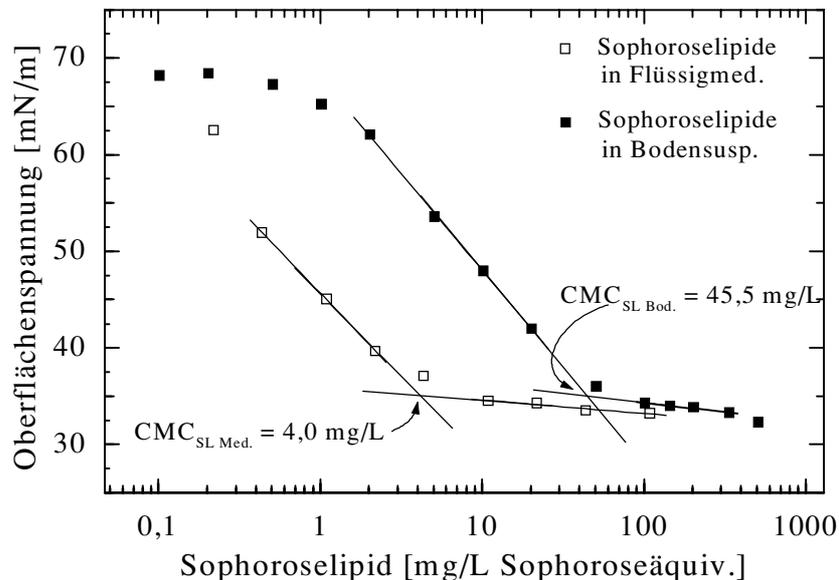


Abb. 12: Vergleich der CMC des Sophoroselipidgemisches in flüssigem Medium und in 10%iger Bodensuspension. (Abkürzungen: s. Tab. 14)

Tab. 14: Die der Berechnung der CMC zugrundegelegten Regressionsgeraden.

	<b>Regressionsgeradengleichung</b>	<b>R<sup>2</sup>, s, N</b>
Texa Med. < CMC	$\sigma$ [mN/m] = (-24,9 ± 1,58) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (74,9 ± 1,79)	R <sup>2</sup> = -0,99202 s = 1,20527 N = 4
Texa Med. > CMC	$\sigma$ [mN/m] = (-1,8 ± 0,29) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (33,6 ± 0,64)	R <sup>2</sup> = -0,95059 s = 0,09299 N = 4
SL Med. < CMC	$\sigma$ [mN/m] = (-17,5 ± 0,13) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (45,6 ± 0,04)	R <sup>2</sup> = -0,99994 s = 0,06449 N = 3
SL Med. > CMC	$\sigma$ [mN/m] = (-1,4 ± 0,25) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (36,0 ± 0,39)	R <sup>2</sup> = -0,93981 s = 0,18433 N = 4
SL Bod. < CMC	$\sigma$ [mN/m] = (-20,0 ± 0,41) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (68,1 ± 0,37)	R <sup>2</sup> = -0,99916 s = 0,30145 N = 4
SL Bod. > CMC	$\sigma$ [mN/m] = (-1,8 ± 0,04) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (38,0 ± 0,09)	R <sup>2</sup> = -0,99956 s = 0,01472 N = 3

Abkürzungen:

SL = Sophoroselipide

Med. = flüssiges MM<sub>Brun.</sub>Texa = Texapon<sup>®</sup> N25

Bod. = 10% Bodensuspension

## 4.2 Anteil nicht mehr extrahierbaren Phenanthrens in der Bodensuspension in Abhängigkeit von der Zeit

In Abhängigkeit von der Zeit können PAK auch ohne biotischen Einfluß so an Böden festgelegt werden, daß sie mit organischen Lösemitteln nicht mehr quantitativ extrahierbar sind [ESCHENBACH et al. 1994, HATZINGER und ALEXANDER 1995, POETON et al. 1999, YEOM und GHOSH 1998]. Mit diesem Versuch wurde daher für den vorliegenden Boden die Menge an Phenanthren ermittelt, die auf diese Weise analytisch nicht mehr nachweisbar ist.

Dazu wurden in 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben je 50 g 10%ige Bodensuspension (w/w), 1,0% Natriumazid (w/w) und 100 mg/L Phenanthren gefüllt. Die Kolben wurden anschließend bei 28°C und 200 rpm im Rotationschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert. Zur Probenahme wurden jeweils zwei Kolben entnommen und der gesamte Inhalt analysiert. Abbildung 13 zeigt die Versuchsergebnisse.

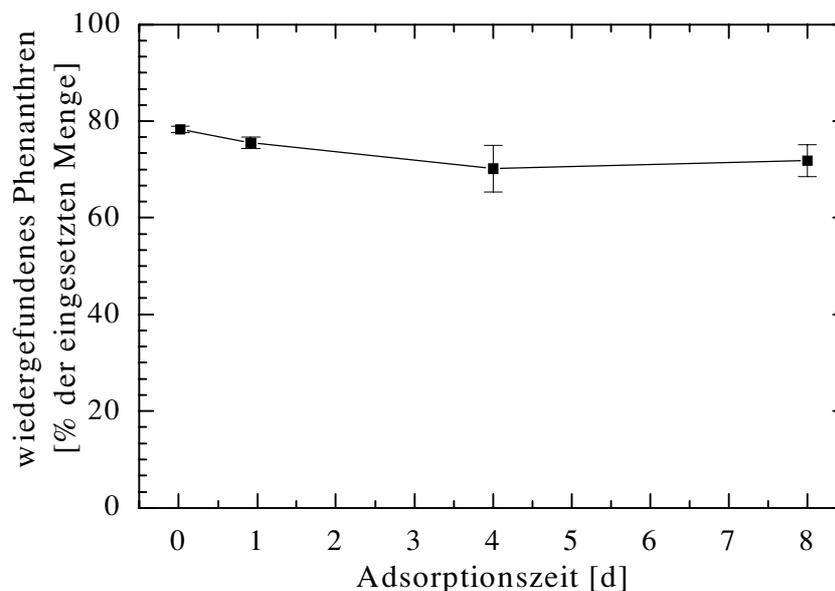


Abb. 13: Prozentualer Anteil des nach verschiedenen Inkubationszeiten aus 10%igen Bodensuspensionsproben noch zu extrahierenden Phenanthrens.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde nur  $78,3 \pm 0,6\%$  Phenanthren wiedergefunden, während nach 22 h nur noch  $75,5 \pm 1,2\%$  Schadstoff erfaßt werden konnte. Ab einer Inkubationsdauer von 4 Tagen bleibt die extrahierbare Menge des Phenanthrens vergleichsweise konstant (4 d:  $70,2 \pm 4,8\%$ , 8 d:  $71,8 \pm 3,3\%$ ).

Ein vergleichbarer zeitabhängiger Verlauf der PAK-Festlegung wurde auch von anderen Autoren beschrieben [OU et al. 1995, WEIßENFELS et al. 1992].

### 4.3 Untersuchung der Adsorption von Sophoroselipiden an den Boden

Neben Phenanthren adsorbieren auch Tenside an Bodenpartikel [SWISHER 1987]. Die Stärke der Adsorption muß speziell für jeden Anwendungsfall ermittelt werden, da sie unter anderem vom Tensid oder vom verwendeten Boden abhängig ist.

Die eingesetzte Versuchsmethode basiert darauf, daß Änderungen der Tensidkonzentration im Bodensuspensionsüberstand durch die Bestimmung der Oberflächenspannung erfaßt werden können. Voraussetzung ist dabei der Einsatz des Tensids in Konzentrationen unterhalb der CMC (s. Kap. 4.1).

Die Kolben wurden - wie in Kapitel 4.2 beschrieben - angesetzt, jedoch statt Phenanthren Sophoroselipidstammllösung zupipettiert (Versuchsansatz 1: 2,0 mg/L Sophoroselipidäquivalente, Versuchsansatz 2: 3,3 mg/L Sophoroselipidäquivalente (Arbeitskonzentrationen)). Die Kolben wurden anschließend ebenfalls bei 200 rpm und 28°C im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert. Zur Probenahme wurden jeweils zwei Kolben entnommen und gemäß Kap. 3.5.2.1 die Oberflächenspannung des Mediums bestimmt. Abbildung 14 gibt die Ergebnisse der durchgeführten Versuche wieder.

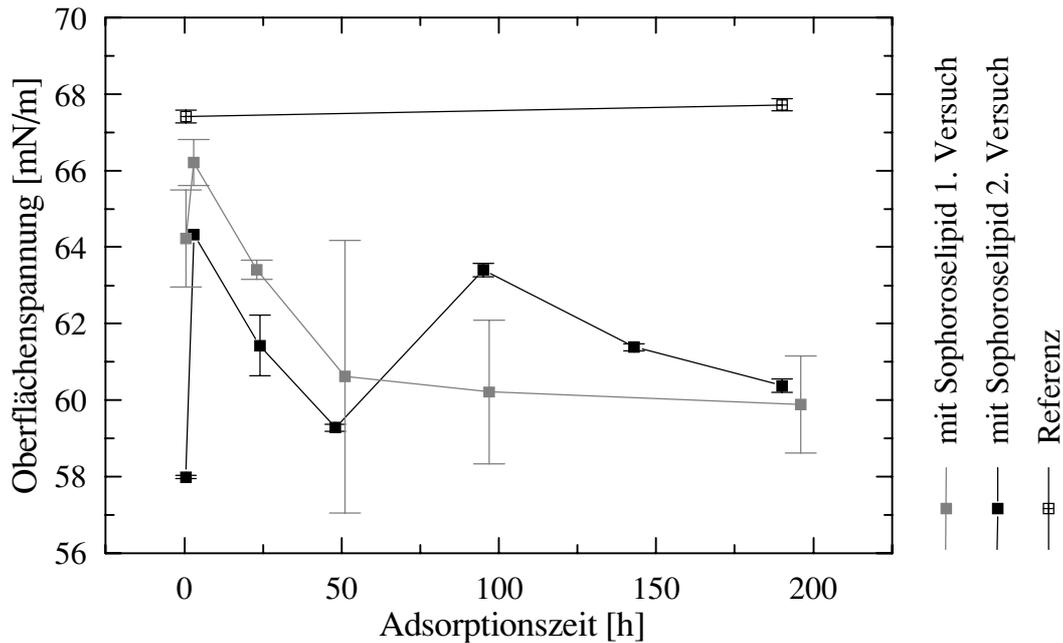


Abb. 14: Zeitabhängige Adsorption der Sophorolipide an den Boden.  
Die Fehlerbalken geben die Abweichungen der Doppelbestimmungen wieder.

In den ersten drei Inkubationsstunden ist, wie erwartet, bei beiden Parallelversuchen eine Steigerung der Oberflächenspannung festzustellen. Ein Teil der Biotenside adsorbiert an den Boden. Bis zur ca. 50. Stunde wird jedoch reproduzierbar ein deutlicher Abfall der Oberflächenspannung gemessen. Beim 1. Versuch nimmt der Wert anschließend bis zum Versuchsende nur minimal ab, während er beim zweiten bis zur 100. Stunde wieder ansteigt und erst im folgenden abnimmt. Die Referenzmessungen von Bodensuspensionsproben ohne Tensidzusatz bleiben im gleichen Zeitraum konstant.

Der Verlauf der Kurven ab der dritten Inkubationsstunde ist ungewöhnlich. Vergleichbare Daten aus der Literatur liegen nicht vor. GEBNER [1997] stellte die Theorie auf, daß der ungewöhnliche Verlauf durch die Freisetzung oberflächenaktiver mikrobieller oder anderer Substanzen aufgrund des Schüttelns verursacht sein könnte. Dies läßt sich jedoch eindeutig durch die Untersuchung des Referenzansatzes widerlegen. Eine Erklärung für das beobachtete Phänomen kann im Rahmen dieser Arbeit nicht gegeben werden; dazu wären weitere Untersuchungen nötig.

#### 4.4 Ermittlung der Phenanthren - Solubilisierungskapazität im Medium und in Bodensuspension durch die Sophorolipide

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu klären, wieviel Phenanthren durch welche Menge Sophorolipide gelöst werden kann. Die Versuchsdurchführung basiert auf den Angaben von TIEHM [1994]. Dabei werden Ansätze von Schadstoff und Tensid bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands inkubiert, kristalliner Schadstoff über eine Membranfiltration abgetrennt und im Filtrat die Schadstoffkonzentration bestimmt.

In 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben wurden zum Test der Solubilisierung in flüssigem Medium je 45 mL  $MM_{\text{Brun.}}$  mit 200 mg/L Phenanthren und unterschiedlichen Sophoroselipidkonzentrationen versetzt. Für die Bodensuspensionsproben wurden entsprechend noch 5 g Boden und 0,5 g Natriumazid zugesetzt. Im Anschluß daran wurden die Kolben 20 h bei 28°C und 200 rpm im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) geschüttelt.

Anschließend wurde die Membranfiltration mit Polycarbonat-Filtern ( $\varnothing$  4,5 cm, Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) und einer Filtrationseinheit aus Glas (Fa. Sartorius, Göttingen) durchgeführt. TIEHM [1994] stellte fest, daß PAK an diese Filter in sehr viel geringerer Menge adsorbieren als an Membranfiltern aus Celluloseacetat, Nitrocellulose oder Nylon. Auch die eingesetzte Porengröße ist derselben Literaturstelle entnommen. Zur Sättigung des Filters mit Phenanthren und Sophoroselipiden wurde 10 mL Lösung filtriert und verworfen. Daraufhin wurden 20 mL des Filtrates aufgefangen und gemäß den Angaben im Kapitel 3.5.2.7 der Phenanthrengehalt bestimmt.

In Abbildung 15 werden die Resultate dargestellt.

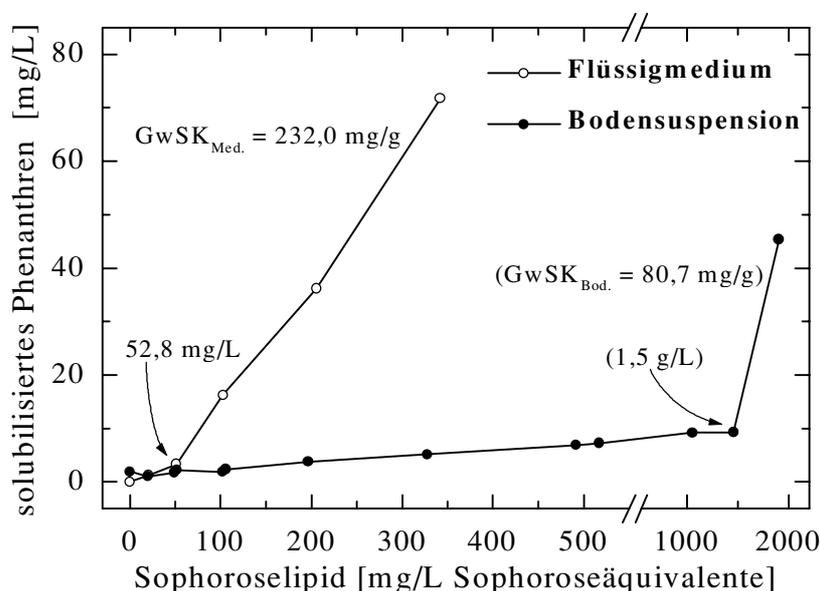


Abb. 15: Solubilisierung von Phenanthren in Abhängigkeit von der Sophoroselipidkonzentration in  $MM_{\text{Brun.}}$  und 10%iger Bodensuspension.

Die Werte in g/L sind die Sophoroselipidkonzentrationen im Übergang zwischen flacher und starker Steigung. Die Angaben in mg/g stellen die Steigung der steileren Geraden dar und repräsentieren den gewichtsbezogenen Solubilisierungskoeffizienten (GwSK) [EDWARDS et al. 1991, TIEHM 1994]. Die beiden dargestellten Graphen für reines Medium und Bodensuspension lassen sich je in zwei Bereiche trennen, an die sich Regressionsgeraden unterschiedlicher Steigung anlegen lassen. Nähere Daten zu diesen Geraden sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tab. 15: Daten der in Abb. 15 dargestellten Regressionsgeraden.

	<b>Regressionsgeradengleichung</b>	<b>R<sup>2</sup>, s, N</b>
MM <sub>Brun.</sub> Ger. kleiner Steigung	solub. Phen. [mg/L] = (0,064 ± 0,001) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (-0,019 ± 0,035)	R <sup>2</sup> = 0,99972 s = 0,03951 N = 3
MM <sub>Brun.</sub> Ger. großer Steigung	solub. Phen. [mg/L] = (0,232 ± 0,010) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (-8,820 ± 2,120)	R <sup>2</sup> = 0,99614 s = 2,26968 N = 4
Bodensus. Ger. kleiner Steigung	solub. Phen. [mg/L] = (0,006 ± 0,001) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (2,141 ± 0,452)	R <sup>2</sup> = 0,85798 s = 1,20624 N = 12
Bodensus. Ger. großer Steigung	solub. Phen. [mg/L] = (0,081 ± 0,0) * Sophoroseäquiv. [mg/L] + (-108,394 ± 0,0)	R <sup>2</sup> = 1 s = 0 N = 2

(Mangels weiterer Meßpunkte können zur steilen Bodensuspensions-Regressionsgeraden keine statistisch abgesicherteren Werte präsentiert werden. Daher wurde der entsprechende gewichtsbezogene Solubilisierungskoeffizient in Abbildung 15 auch in Klammern gesetzt.)  
Abkürzung: Ger. = Gerade

Die Sophoroselipidkonzentrationen, ab denen in MM<sub>Brun.</sub> und Bodensuspension drastische Löslichkeitserhöhungen des Phenanthrens erfolgen, liegen deutlich über denen der CMC-Bestimmung in Kap. 4.1 (für MM<sub>Brun.</sub> 13,2fach und Bodensusp. 33,1fach). Dies ist durch die zusätzlich vorhandenen Phenanthrenkristalle, mit denen die Tensidmoleküle ebenfalls wechselwirken, zu begründen. Der gewichtsbezogene Solubilisierungskoeffizient im flüssigen Medium von 232,0 mg/g sagt aus, daß etwa 232,0 mg Phenanthren von 1 g Sophoroselipiden gelöst werden können. Dies ist ein im Vergleich zu synthetischen Tensiden etwa 10fach höherer Wert; so beträgt dieser beim SDS unter vergleichbaren Bedingungen beispielsweise 21,0 mg/g [TIEHM 1994].

In Gegenwart von Boden erhöht sich die für die Solubilisierung des Phenanthrens benötigte Tensidmenge beträchtlich. Zuerst adsorbieren die Tenside hauptsächlich an Bodenpartikel, bis diese überwiegend abgesättigt sind. Erst ab dem kritischen Wert von 1,5 g/L wird die apparente Löslichkeit des Phenanthrens merklich erhöht. Da in der Folge weiterhin auch eine geringe Menge Tensidmoleküle an den Boden adsorbiert, bleibt der gewichtsbezogene Solubilisierungskoeffizient mit etwa 81 mg/g 2,9fach kleiner als der des Ansatzes ohne Boden [s. auch LIU et al. 1992].

Neben der CMC liegt auch der gewichtsbezogene Solubilisierungskoeffizient des Sophoroselipidgemischs im Vergleich zu üblichen synthetischen Tensiden in einem optimaleren Bereich.

#### 4.5 Fluoreszenzspektroskopische Voruntersuchungen

Zum Test der Einsatzfähigkeit des F-4500 Fluoreszenz-Spektralfluorometers (Fa. Hitachi, Ltd., Tokyo) bei Abbaubersuchen mußten einige Voruntersuchungen durchgeführt werden. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Marose [1999]. Er führte ebenfalls die Auswertungen der Fluoreszenzmessungen durch; alle im folgenden gezeigten Diagramme wurden freundlicherweise von ihm zur Verfügung gestellt.

#### 4.5.1 2D-Fluoreszenzspektren von Phenanthren, Tensiden, Huminsäure und Boden in $MM_{Brun.}$

In Abbildung 20a ist ein Fluoreszenzspektrum von 100 mg/L Phenanthren in  $MM_{Brun.}$  dargestellt, welches bei zu den Kultivierungen vergleichbaren Bedingungen mit dem Flüssiglichtleiter aufgenommen wurde. Phenanthren ist aufgrund seines aromatischen Charakters sehr gut fluoreszenzspektroskopisch zu erfassen. Bei den Messungen wurden drei Fluoreszenzpeaks hoher Intensität detektiert, die bei  $\lambda_{Ex.} = 310, 330, 350$  nm und  $\lambda_{Em.} = 400$  nm liegen. Festes Phenanthren fluoresziert im Bereich von  $\lambda_{Ex.} = 280 - 380$  nm/ $\lambda_{Em.} = 405$  nm mit einem Maximum bei  $\lambda_{Ex.} = 350$  nm/ $\lambda_{Em.} = 405$  nm. Diese Messungen wurden von Marose mit einem speziellen Feststoffadapter durchgeführt. Er untersuchte mittels der Lichtleiteranordnung ebenso die Fluoreszenz einer Phenanthrenlösung (Konz. ca. 1 mg/L), deren Fluoreszenzmaximum bei  $\lambda_{Ex.} = 260 - 280$  nm/ $\lambda_{Em.} = 360$  nm liegt (Näheres zur Versuchsdurchführung und Spektren s. [MAROSE 1999]).

Das reine Mineralsalzmedium  $MM_{Brun.}$  weist dagegen keine Fluoreszenz auf (Spektrum nicht gezeigt). Ebenso wurden die Sophoroselipide bzw. Texapon<sup>®</sup> N25 in für die bei Kultivierungen typischen Konzentrationen zu  $MM_{Brun.}$  gegeben und mit dem Spektralfluorometer vermessen, wobei ebenfalls keine Peaks detektiert wurden (s. Strukturformeln in Kap. 3.3, Spektren nicht gezeigt).

Der überwiegende Teil der Messungen wurde mit dem Flüssiglichtleiter durchgeführt. Durch dessen Eigenfluoreszenz können Signale, die unterhalb von  $\lambda_{Em.} = 240$  nm liegen, nicht mehr erfaßt werden. Der Meßbereich ist also im Vergleich zu Messungen in der Küvette eingeschränkt. Zusätzlich muß beim Einsatz des Flüssiglichtleiters mit einer starken Intensitätseinbuße gerechnet werden, die die Empfindlichkeit verringert.

Da Phenanthren auch photolytisch zersetzt werden kann, wurde ein Dauerbelichtungsversuch durchgeführt. Dazu wurde eine Meßzelle, die auch bei Online-Fluoreszenzmessungen von Kultivierungen verwendet wurde, mit  $MM_{Brun.}$  inklusive 100 mg/L Phenanthren befüllt, abgedichtet und über einem Magnetrührer installiert. Über den Flüssiglichtleiter wurde diese Probe 40 min im Peakmaximum des Schadstoffs bestrahlt. Dabei wurde eine vernachlässigbare Abnahme der Fluoreszenzintensität um 1,2% in 450 h gemessen. Die Testbedingungen waren extrem. Einerseits wurde unter normalen Kultivierungsbedingungen das Medium schnell durch die Meßzelle gepumpt, andererseits wurde das F-4500 Fluoreszenzspektrometer mit einer Scangeschwindigkeit von 30.000 nm/min eingesetzt und nur alle 5 min ein Spektrum aufgenommen. Unter realen Bedingungen wird die Probe für nur sehr wenige Sekunden durch eine Wellenlänge belichtet, bei 24 h Laufzeit und 5minütiger Messung beispielsweise insgesamt nur etwa 15 s.

In nahezu allen Böden sind Huminstoffe enthalten, die je nach ihrer Löslichkeit in Säuren und Laugen in die Fulvosäuren, die Humine und die Huminsäuren unterteilt werden. Dabei handelt es sich um sehr heterogene organische Stoffe, die u. a. auch Aromaten enthalten [SCHEFFER und SCHACHTSCHABEL 1989] und damit die Hauptgruppe fluoreszierender Bodenbestandteile bilden sollte. Eine Huminsäure (Natriumsalz, Aldrich) wurde stellvertretend fluoreszenzspektroskopisch untersucht, indem eine Lösung in  $MM_{Brun.}$  im 10 mL Meßreaktor sukzessive verdünnt und vermessen wurde. Erst bei einer Konzentration von 0,01% (w/w) konnten Fluoreszenzpeaks detektiert werden, da bei größeren Mengen die Lösung so trübe war, daß das Fluoreszenzlicht zu stark absorbiert wurde (s. Abb. 16).

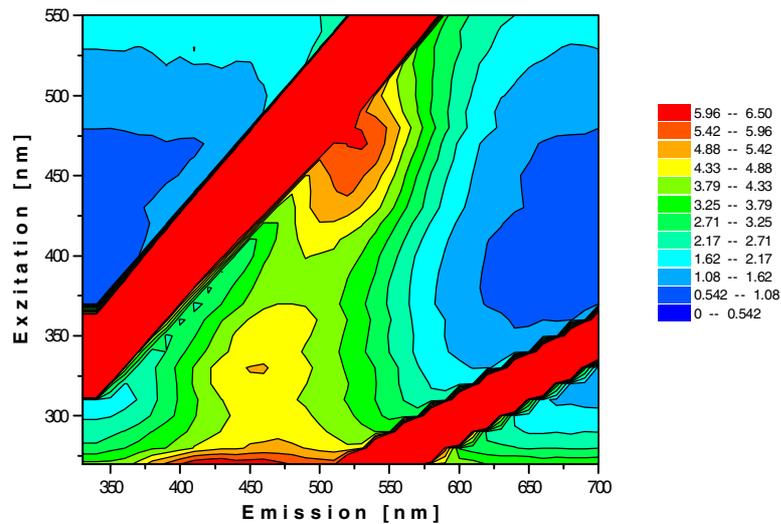


Abb. 16: Fluoreszenzspektrum von 0,01% Huminsäure in  $MM_{Brun.}$ .  
 (EX 270 - 550, 10, 10; EM 330 - 700, 10, 20; 700, auto, 240)  
 Zur Durchführung:  
 5 g Huminsäure wurden mit  $MM_{Brun.}$  unter Zusatz von 500  $\mu\text{L}$  10% NaOH auf 25 g aufgefüllt. Diese 20% Lösung wurde mit  $MM_{Brun.}$  entsprechend weiter verdünnt.

Die eingesetzte Huminsäure zeigt im Medium unter den gegebenen Meßbedingungen nur eine vernachlässigbare Fluoreszenz, die erreichte relative maximale Intensität lag bei 6,5 Einheiten. Bei den Messungen von Phenanthren in  $MM_{Brun.}$  wurden demgegenüber beispielsweise Werte um 900 gemessen (s. Abb 20a).

Im 10 mL Meßreaktor wurde daraufhin die verwendete 10%ige Bodensuspension fluoreszenzspektroskopisch untersucht (s. Abb 17).

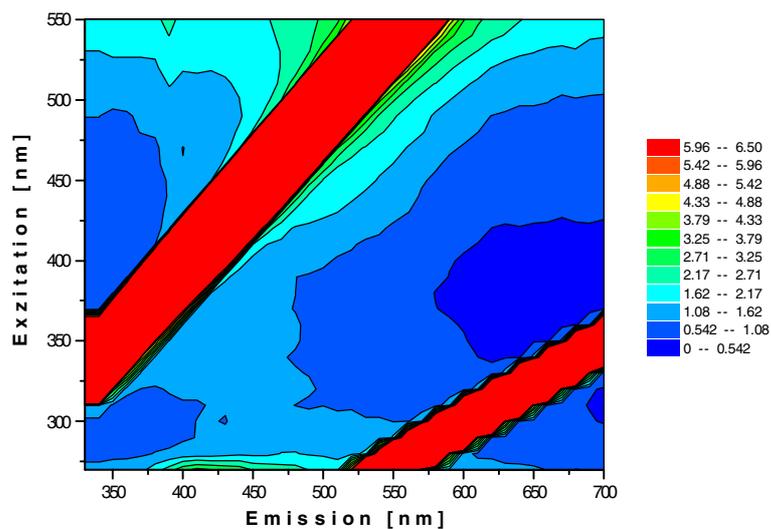


Abb. 17: Fluoreszenzspektrum einer 10%igen Bodensuspension.  
 (EX 270 - 550, 10, 10; EM 330 - 700, 10, 20; 700, auto, 240)

Die Eigenschaften des verwendeten Bodens, die in Kapitel 3.4.3 aufgelistet sind, lassen darauf schließen, daß dort auch Humine vorhanden sind. Mit dem eingesetzten F-4500 Meßsystem inklusive Flüssiglichtleiter können jedoch nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten, die kaum über dem Signalrauschen liegen, detektiert werden. Dies wird ebenfalls auf die starke Trübung zurückgeführt, die die Reichweite des eingestrahlten Exzitationslichts so stark erniedrigt, daß nicht genug Moleküle zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt werden können (s. Kap. 4.5.3).

#### 4.5.2 Schadstofffluoreszenz in Gegenwart von Huminsäure

Im nächsten Experiment sollte geklärt werden, ob neben der Huminsäure auch das Phenanthren in  $MM_{\text{Brun.}}$  noch fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden kann. Dazu wurde einer 0,01%igen Huminsäurelösung (w/w) im 10 mL Meßreaktor 100 mg/L Phenanthren (Endkonzentration) zugesetzt. Das Spektrum unterscheidet sich nur sehr geringfügig von dem, welches ohne den Schadstoff aufgenommen wurde. Durch die Berechnung des Differenzspektrums werden die Unterschiede jedoch deutlicher (s. Abb. 18).

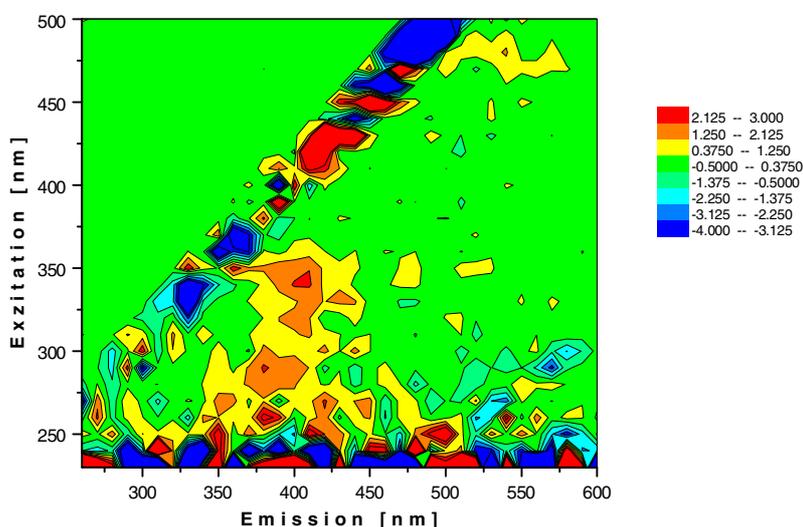


Abb. 18: Differenzspektrum der Zugabe von 100 mg/L Phenanthren zu 0,01% Huminsäure in  $MM_{\text{Brun.}}$ .  
(EX 230 - 500, 10, 10; EM 260 - 600, 10, 20; 700, auto, 30000)

Im Fluoreszenzbereich des Phenanthrens wird eine Intensitätszunahme sichtbar, die jedoch wieder nur sehr gering ausfällt. Die Erfassung des Phenanthrens in  $MM_{\text{Brun.}}$  in Gegenwart von Huminsäure mit dem derzeit etablierten Meßsystem ist daher nur eingeschränkt praktikabel.

#### 4.5.3 Untersuchung der Phenanthrenfluoreszenz in einer 10%igen Bodensuspension

Der 10 mL Meßreaktor wurde mit einer 10%igen Bodensuspension befüllt und im stündlichen Abstand je 25 mg/L Phenanthren zugesetzt. Vor einer erneuten Schadstoffzugabe wurde jeweils ein 2D-Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Diese unterscheiden sich jedoch nur unwesentlich von dem Spektrum mit reiner 10%iger Bodensuspension (s. Abb. 17). Abbildung 19 gibt ein Differenzspektrum wieder, in dem das Ausgangsspektrum ohne Schadstoffzugabe vom Spektrum der maximalen Menge zugesetzten Phenanthrens (100 mg/L) abgezogen wurde.

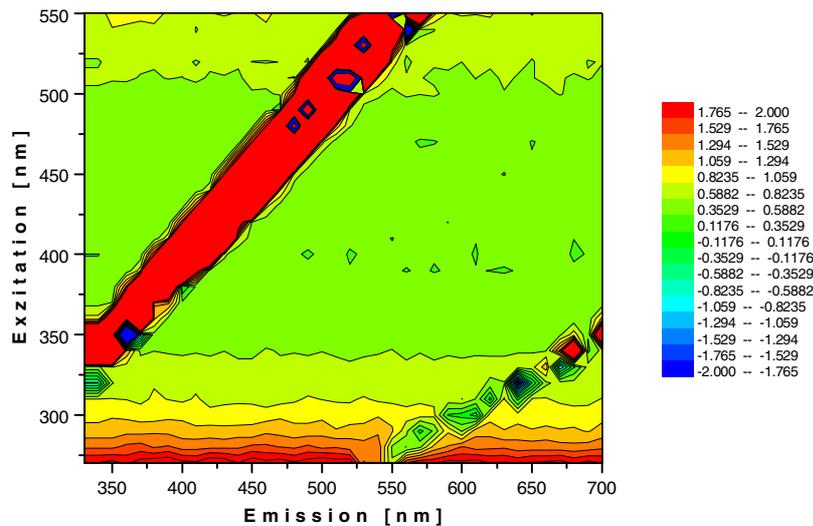


Abb. 19: Differenzspektrum der Zugabe von 100 mg/L Phenanthren zu 10%iger Bodensuspension.  
(EX 270 - 550, 10, 10; EM 330 - 700, 10, 20; 700, auto, 240)

Phenanthren läßt sich mit dem verwendeten Meßsystem nicht im Boden detektieren. Auch der Zusatz von 0,01% Huminsäure zur 10%igen Bodensuspension mit 100 mg/L Phenanthren verändert das Fluoreszenzspektrum nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Mit dem eingesetzten F-4500 Fluoreszenzspektrometer, das über eine Xenon-Lampe verfügt, können in dem eingesetzten Boden keine Fluoreszenzpeaks erkannt werden. Vermutlich ist die Kapazität der Lichtquelle zu niedrig, die Empfindlichkeit des Detektors zu gering oder der Intensitätsverlust durch den Flüssiglichtleiter zu hoch. Verschiedene Arbeitsgruppen, die sich auf diesem Gebiet mit der PAK-Analytik in Gewässern und Böden beschäftigen, setzen daher die Laserfluoreszenzspektroskopie ein [KUMKE et al. 1995, KOTZICK und NIESSNER 1996 und dort zit.].

#### 4.5.4 Auswirkungen steigender Tensidkonzentrationen auf die Phenanthrenfluoreszenz in $MM_{\text{Brun.}}$

Nachdem bei Messungen von Phenanthren in  $MM_{\text{Brun.}}$  deutliche Fluoreszenzpeaks detektiert werden konnten, wurde im weiteren getestet, wie sich steigende Sophoroselipidkonzentrationen auf diese Fluoreszenz auswirken. Die Ergebnisse repräsentativer Messungen sind in Abbildung 20 dargestellt. In Abbildung 20a ist ein Spektrum ohne Tensidzusatz wiedergegeben, das die bereits erwähnten Fluoreszenzpeaks bei  $\lambda_{\text{EX.}} = 310, 330, 350 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Em.}} = 400 \text{ nm}$  aufweist. Mit zunehmendem Tensidgehalt ist eine Verlagerung der Fluoreszenz in den Bereich niedriger Exzitations- und Emissionswellenlängen zu erkennen. Bei Zugabe von 100 mg/L Sophoroselipid verringert sich einerseits die Fluoreszenzintensität der ursprünglichen Signale, andererseits wird ein neuer Peak bei  $\lambda_{\text{EX.}} = 290 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Em.}} = 360 \text{ nm}$  detektiert (s. Abb 20b). Bei 500 mg/L hat sich diese Tendenz noch weiter verstärkt (s. Abb 20c). Die Ausgangspeaks sind nicht mehr nachzuweisen; die Intensität des neuen Peaks hat sich weiter vergrößert.

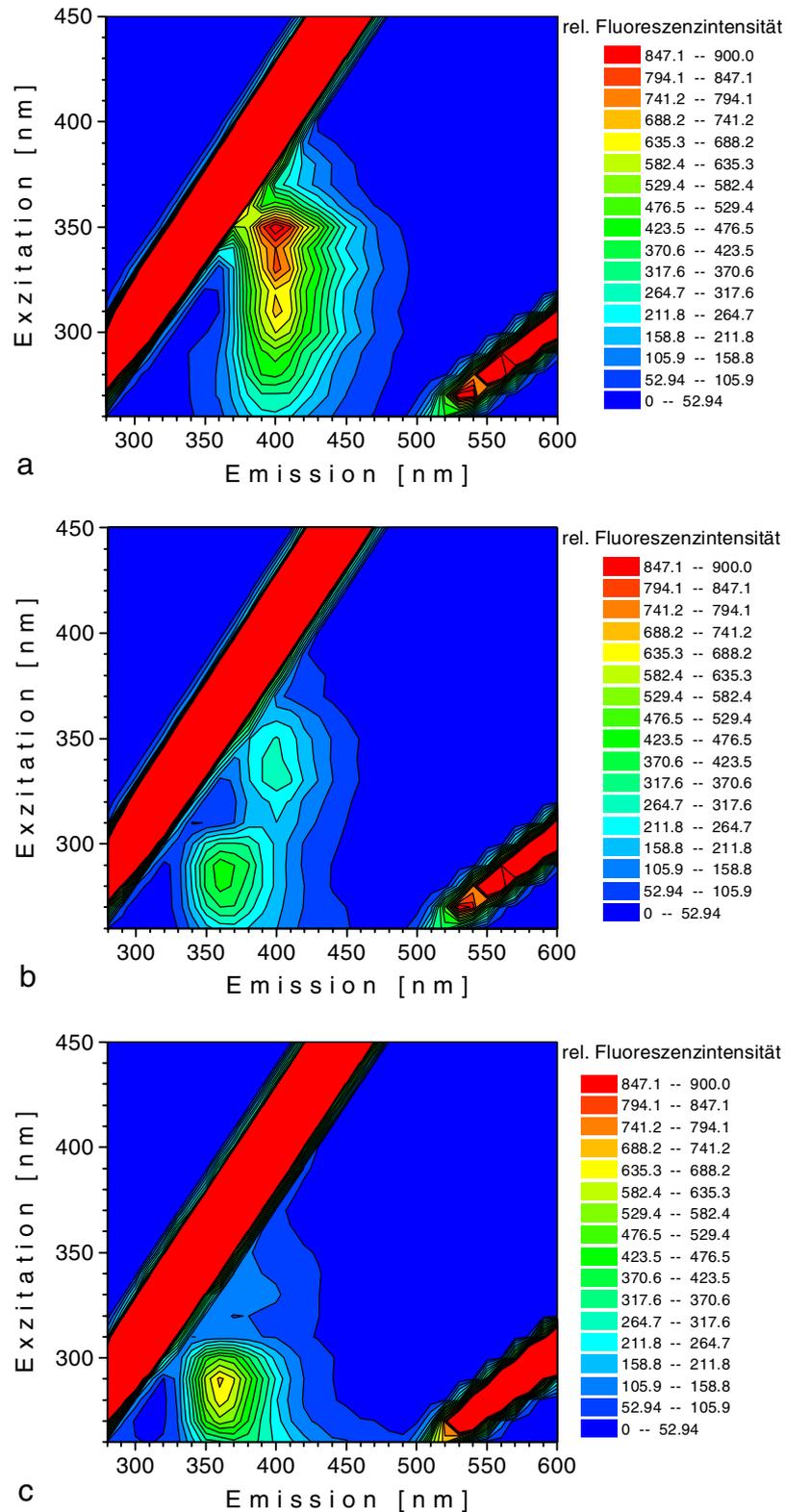


Abb. 20: 2D-Fluoreszenzspektren von 100 mg/L Phenanthren in  $MM_{Brun}$ , mit steigenden Konzentrationen an Sophoroselipid.

a) 0 mg/L SI (EX 260 - 500, 10, 10; EM 280 - 650, 10, 20; 700, auto, 30000)

b) 100 mg/L SI (EX 230 - 500, 10, 10; EM 250 - 650, 10, 20; 700, auto, 30000)

c) 500 mg/L SI (EX 260 - 450, 10, 10; EM 280 - 600, 10, 20; 700, auto, 30000)

Die Spektren wurden bei den entsprechenden Kultivierungen kurz vor der Beimpfung aufgenommen (s. Kap. 5.2.5.1).

Diese Ergebnisse lassen sich makroskopisch mit dem Verschwinden der Phenanthrenkristalle korrelieren. Während sie zu Beginn ohne Tensidzusatz noch deutlich sichtbar sind, können nach Zugabe von 500 mg/L Sophoroselipide keine mehr entdeckt werden.

Aufgrund der Vorversuche mit festem und gelöstem Phenanthren lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen (s. Kap. 4.5.1). In Abb. 20a fluoresziert weitaus überwiegend kristallines Phenanthren, während der geringe Anteil an wässrig gelöstem Phenanthren nicht detektiert werden kann. Durch Zusatz des Tensidgemisches wird mehr Phenanthren apparent gelöst, was zu der beschriebenen Fluoreszenzverschiebung führt.

Durch die 2D-Fluoreszenzspektroskopie läßt sich also kristallines Phenanthren von apparent gelöstem - also wässrigem und mizellarem - Phenanthren unterscheiden.

# 5 Praktischer Teil III

## Kultivierungen

### 5.1 Kultivierungsversuche in Schüttelkolben

Bevor mit den Kultivierungen im Bioreaktor begonnen werden konnte, wurden einige Voruntersuchungen in Schüttelkolben zur Klärung grundlegender Fragen durchgeführt, die im ersten Abschnitt dieses Kapitels dargestellt werden.

#### 5.1.1 Wachstum von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur

Zunächst wurde das Wachstum von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur getestet, um die kürzest mögliche Vorinkubationszeit bei maximalem Zellertrag und vollständigem Verbrauch aller Kohlenstoffquellen zu ermitteln.

Da Vorversuche mit Phenanthren allein nicht zu einer ausreichenden Zellausbeute in einer angemessenen Zeit geführt hatten, wurde den Vorkulturkolben als weitere Kohlenstoffquelle Glucose zugegeben. Phenanthren wurde weiterhin eingesetzt, um die Adaptation der Zellen an den Schadstoff zu erhalten.

Zum Test des Wachstums von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur wurden entsprechende Kolben unter Standardbedingungen inokuliert, inkubiert und die Konzentrationen der Kohlenstoffquellen sowie die optische Dichte und der pH-Wert durch regelmäßige Beprobung verfolgt (s. Abb. 21).

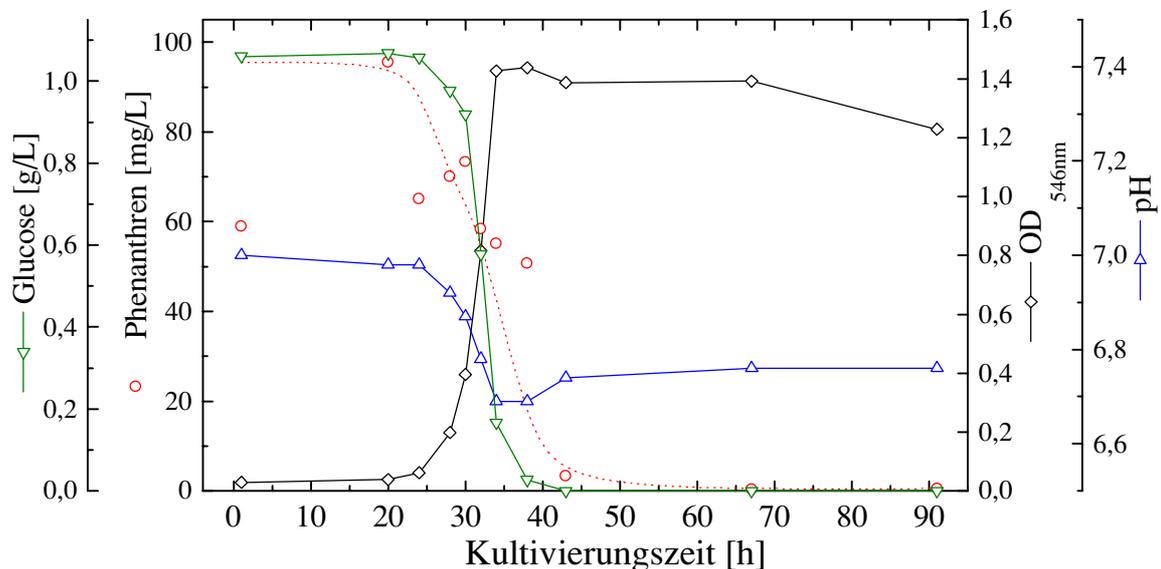


Abb. 21: Wachstum von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur.

Die Phenanthrenabbaukurve ist idealisiert dargestellt. Die Meßwerte weisen eine starke Streuung auf, weil aufgrund der vorliegenden Schadstoffkristalle keine reproduzierbare Probenahme direkt aus den Kolben möglich war (s. Kap. 3.5.2.7).

Ansatz in einem 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben mit 200 mL  $MM_{\text{Brun}}$ . (1 g/L Glucose, 100 mg/L Phenanthren), Ausgangszelltitel je mL:  $2,5 \cdot 10^5$ , Inkubation bei 120 rpm und 28°C (s. Kap. 3.7.5.1)

Nach einer Anlaufphase von 20 h werden sowohl Phenanthren als auch die zehnfach höher konzentrierte Glucose abgebaut, was mit einem Abfall des pH-Wertes einhergeht. Nach einer 14stündigen exponentiellen Wachstumsphase erreicht die Kultur den stationären Zustand, wobei Glucose nach 43 h, Phenanthren nach 60 h verbraucht wurde. Eine Diauxie liegt nicht vor, da beide Kohlenstoffquellen parallel abgebaut werden und der Verlauf der optischen Dichte die typische sigmoide Form aufweist. Der Abfall des pH-Wertes ist wahrscheinlich auf die Ausschleusung organischer Säuren durch das Bakterium beim Abbau von Glucose zurückzuführen, wie es beispielsweise auch von *E. coli*-Kultivierungen bekannt ist. Beim Wachstum von *S. yanoikuyae* allein auf Phenanthren sind dementsprechend keine pH-Änderungen festzustellen (s. Kap. 5.2.5). Nachdem in der Vorkultur die eingesetzten C-Quellen fast verbraucht sind, steigt der pH-Wert wieder, was auf die Verstoffwechslung der vorher ausgeschleusten Säuren durch das Bakterium hinweist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Vorkulturdauer auf 60 bis 84 h festgelegt, bevor die Zellen zentrifugiert und als ankonzentrierte Suspension den Hauptkultivierungen zugesetzt wurden.

### 5.1.2 Wirkung von Dichlormethan auf *S. yanoikuyae* B1

Die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wurden bei den Kultivierungen in Mengen von  $\leq 100$  mg/L eingesetzt. Da während der Schüttelkolbenversuche 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben, die mit 30 mL Medium befüllt waren, verwendet wurden, war ein zügiges, keimfreies und reproduzierbares Einwiegen der erforderlichen minimalen Mengen an festem, kristallinem Schadstoff nicht möglich.

Deshalb wurde ein bereits von KEUTH [1990] eingesetztes Verfahren genutzt, indem die PAK in Dichlormethan gelöst den Medien zugesetzt wurden. Der leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoff (LCKW) ist jedoch in höheren Konzentrationen toxisch für Mikroorganismen, so daß im Einzelfall Hemmphänomene individuell bestimmt werden müssen [LFU 1991].

Bei den Kultivierungen wurden die PAK-Dichlormethan-Stammlösungen (Konzentration meist 300 mg/mL) dem Medium spätestens 1 h vor der Beimpfung zugesetzt. Ein Großteil des Dichlormethans konnte sich in der Zwischenzeit verflüchtigen. Um jedoch auszuschließen, daß die verbleibenden Restmengen keine wachstumshemmenden Wirkungen ausüben, wurde eine Versuchsreihe angesetzt.

300 mL Zwei-Schikane-Erlenmeyerkolben mit angeschmolzenem Reagenzglas („Pinocchiokolben“) wurden mit 90 mL Medium und verschiedenen, in Tabelle 16 aufgelisteten C-Quellen versehen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden diese Kolben, die bei 28°C und 140 rpm geschüttelt wurden, inokuliert und das Wachstum über stündliche Messung der OD verfolgt. Tabelle 16 gibt einen Überblick der verschiedenen Ansätze und des jeweiligen Wachstumsverlaufs.

Tab. 16: Wachstum von *S. yanoikuyae* unter Dichlormethanzugabe.

Nr.	Glucose	Phenanthren	Zeitpunkt DCM-Zug.	$\Delta$ OD (OD <sub>stat.</sub> - OD <sub>lag.</sub> )	Beginn / Ende der exp. Phase [h : min]	Dauer der exp. Pha. [h : min]	Wachstumsrate <sub>max.</sub> (Zunahme OD/h)
1	0,5 g/L	-	-	0,33	11:10 / 20:10	9:00	0,037
2	0,5 g/L	-	log-Phase	0,34	11:00 / 19:50	8:50	0,038
3	0,5 g/L	100 mg/L	-	(0,43)	14:40 / 23:20	8:40	(0,050)
4	0,5 g/L	100 mg/L	log-Phase	0,36	13:30 / 23:50	(10:20)	0,032
5	0,5 g/L	100 mg/L	15 min v. B.	0,37	15:20 / 23:20	8:00	0,042
6	0,5 g/L	100 mg/L	1 h v. B.	0,35	15:20 / 24:10	8:50	0,038

Zu den Berechnungen: Die mittleren optischen Dichten der Anlaufphase und der stationären Phase (OD<sub>stat.</sub> und OD<sub>lag.</sub>) wurden durch Anlegung von Ausgleichsgeraden an die Graphen bestimmt. An die OD-Meßwerte der exponentiellen Wachstumsphase wurde zur Berechnung der Wachstumsrate ebenfalls eine Gerade angelegt. Der Beginn und das Ende der log-Phase wurde idealisiert als Schnittpunkt der jeweiligen Geraden bestimmt.

Weitere Anmerkungen: Bei allen angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte einer Doppelbestimmung. Das Phenanthren in den Kolben 3 - 6 wurde separat von der Lösemittelzugabe ebenfalls in Dichlormethanolung zugesetzt.

Werte, die als „Ausreißer“ angesehen werden, sind eingeklammert. Zur Problematik der OD-Messung phenanthrenhaltiger Medien sei auf Kapitel 3.5.1.4 verwiesen.

Abkürzungen: DCM-Zug. = Dichlormethan-Zugabe, v. B. = vor Beimpfung

Die  $\Delta$  OD aller Kolben liegen im Bereich von 0,33 - 0,37, wobei kein nennenswerter Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen mit und ohne Phenanthren besteht. Die eingesetzte Menge an Schadstoff ist zu gering, um zu einem gesteigerten Wachstum zu führen. Auch eine Verstoffwechslung des Dichlormethans, die etwa bei Zugabe in der log-Phase der *S. yanoikuyae*-Bakterien auftreten könnte, ist nicht nachweisbar. Die Streuung der Ergebnisse liegt in dem für diese biologischen Anwendungen üblichen Bereich. Die Dauer der log-Phasen mit 8 - 9 h und die maximalen Wachstumsraten (0,032 - 0,042 Zunahme der OD/h) lassen ebenfalls keinen charakteristischen Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen erkennen. Einzig der Beginn und das Ende der log-Phasen zeigen, daß durch Phenanthrenzusatz das Wachstum um 2:30 - 4:20 h verzögert wird. Dies kann auf einen hemmenden Einfluß des Phenanthrens hindeuten, andererseits liegen hier im Gegensatz zu den Ansätzen mit ausschließlich Glucose nicht nur gelöste Verbindungen, sondern ebenfalls kristalliner Schadstoff vor, was die Vergleichbarkeit erschwert. Die Außenmembranen von Sphingomonaden sind nämlich vergleichsweise hydrophob, so daß die Bakterien zum Teil auch in Assoziation mit den Kristallen vorliegen können: Ein Wachstum auf der Oberfläche muß daher nicht direkt per OD sichtbar werden [CESCHKA 1995, MAHRO 1996].

Es gibt keinen Hinweis auf einen hemmenden Einfluß des Dichlormethans, weil das Wachstum innerhalb aller Ansätze vergleichbar verläuft. Sogar bei der Zugabe des Lösemittels in der exponentiellen Wachstumsphase ließ sich im Rahmen dieses Tests keine Beeinflussung der Bakterien feststellen.

Folglich können die PAK den Kultivierungsmedien für *S. yanoikuyae* B1 in Form einer Dichlormethanstanmlösung in den angegebenen Mengen zugesetzt werden.

### 5.1.3 Wirkung der eingesetzten Tenside auf *S. yanoikuyae* B1 sowie auf eine Auswahl anderer Mikroorganismen

Tenside können das Wachstum von Mikroorganismen sowohl hemmen als auch fördern. Toxische Effekte werden hauptsächlich auf zwei Mechanismen zurückgeführt. Zum einen kann die Funktion der Zellmembranen durch Einlagerung von Tensidmolekülen gestört sein, was bei steigenden Anteilen sogar bis zu Zellyse führen kann. Zum anderen können Proteine wie etwa Enzyme durch die Wechselwirkung mit intrazellulär vorliegenden Tensiden in ihrer Wirkungsweise beeinträchtigt werden [HUGO 1965, zit. in SWISHER 1987]. Wachstumsfördernde Wirkungen können demgegenüber einerseits auf der Verwertung des Tensids selbst beruhen, andererseits können kleine Mengen Tenside durch Wechselwirkung mit der Membran oder Zellproteinen auch eine Steigerung der Stoffwechselaktivität bewirken [LICHTENBERG et al. 1983].

Welchen Einfluß ein Tensid auf einen Mikroorganismus haben kann, ist daher konzentrationsabhängig. Daneben ist ebenfalls die chemische Struktur wichtig. So steigt beispielsweise die Bakterientoxizität mit Verlängerung der hydrophoben Kettenlänge [SCHÖBERL e al. 1988]. Neben diesen tensidbezogenen Parametern muß bei der Bewertung ebenfalls auch der Testorganismus, seine Konzentration und Vorgeschichte wie auch das Testverfahren berücksichtigt werden.

Im Hinblick auf eine spätere praktische Anwendung der Sophoroselipide und des Texapons® N25 bei der Bodensanierung wurde deren Toxizität für eine größere Anzahl von Mikroorganismen getestet, die überwiegend zur Bodenmikroflora zu zählen sind. Der in der Arbeit primär eingesetzte Mikroorganismus *S. yanoikuyae* B1 wurde dabei zwei Testverfahren unterworfen, dem Agarplattendiffusionstest und dem logarithmischen Wachstumstest. Dabei sollte ermittelt werden, in welchen Konzentrationen die Tenside bei Abbauversuchen mit diesem Bakterium einsetzbar sind, ohne daß toxische und damit den Phenanthrenabbau hemmende Wirkungen auftreten.

Tabelle 17a/b gibt einen Überblick der im Rahmen von Toxizitätstests eingesetzten Mikroorganismen.

Tab. 17a: Übersicht der in den Plattendiffusionstests eingesetzten Mikroorganismen.

Stamm / Einordnung	Anmerkungen [DSMZ 1993 u. 1995, SCHLEGEL 1992, BROCK ET AL. 1994]
<i>Enterobacter aerogenes</i> GRAM-neg. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- „Zwillingsbruder“ von <i>E. coli</i> (nur sehr wenige biochemische Unterschiede)</li> <li>- im Boden häufig vorkommend</li> <li>- fakultativ anaerob</li> <li>- produziert vergleichsweise viel Gas (daher: aerogenes)</li> <li>- zur Verfügung gestellt durch J. Mukherjee, Jadavpur, Universität Kalkutta</li> <li>- Quelle: National Collection of Industrial Microorganisms (NCIM), Pune, Indien</li> </ul>
<i>Escherichia coli</i> TG1 GRAM-neg. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- berühmtestes Bakterium, breite Anwendung in Biotechnologie/Gentechnik</li> <li>- Darmbewohner</li> <li>- fakultativ anaerob</li> <li>- TG1 ist ein Wildtypstamm</li> <li>- zur Verfügung gestellt durch das Institut für Biochemie der Universität Münster</li> </ul>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> DSMZ 7526 GRAM-neg. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isolat aus einem mit Steinkohleteer kontaminierten Boden</li> <li>- obligat aerob</li> <li>- schwach beweglich (daher „paucimobilis“)</li> <li>- Abbau verschiedener PAK</li> <li>- Quelle: DSMZ, Braunschweig</li> </ul>

Tab. 17b: Übersicht der in den Plattendiffusionstests eingesetzten Mikroorganismen: Fortsetzung.

<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> DSMZ 6900 GRAM-neg. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- im Boden weit verbreitet</li> <li>- obligat aerob</li> <li>- s. auch Kapitel 3.2</li> <li>- Quelle: DSMZ, Braunschweig</li> </ul>
<i>Micrococcus luteus</i> GRAM-pos. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pigmentiertes Bakterium („luteus“ lat. gelb)</li> <li>- im Boden vorkommend</li> <li>- obligat aerob</li> <li>- „Luftkeim“ (vergleichsweise resistent gegen Trockenheit)</li> <li>- Quelle: Institut für Mikrobiologie, Münster</li> </ul>
<i>Rhodococcus ruber</i> DSMZ 7511 GRAM-pos. Bakterium und <i>Rhodococcus ruber</i> DSMZ 7512 GRAM-pos. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- beide Isolate aus einem kontaminierten Sediment</li> <li>- im Boden vorkommend</li> <li>- Kolonien rot gefärbt</li> <li>- hohes Abbaupotential für eine Reihe von Stoffen</li> <li>- Quelle: DSMZ, Braunschweig</li> </ul>
<i>Arthrobacter polychromogenes</i> GRAM-pos. Bakterium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isoliert aus einer Altlast [KEUTH 1990]</li> <li>- im Boden verbreitet</li> <li>- aerob</li> <li>- Kokkus-Stäbchen-Morphogenese: sowohl kokkoide Formen als auch unregelmäßige Stäbchen mit Zellverzweigungen</li> <li>- resistent gegen Trockenheit</li> <li>- großes Abbaupotential</li> <li>- Quelle: Institut für Mikrobiologie der Universität Münster</li> </ul>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H620 Bier- und Bäckerhefe	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ursprünglicher Lebensraum: Früchte, Fruchtsäfte</li> <li>- fakultativ anaerobe, knospende Hefe</li> <li>- viele physiologische Rassen</li> <li>- häufige Anwendung in der Biotechnologie/Gentechnik, kommerzielle Hefen unterscheiden sich oft stark vom Wildtyp</li> <li>- Eukaryontischer „Modellorganismus“</li> <li>- Institutsstamm</li> </ul>
<i>Aspergillus niger</i> DSMZ 1988 Schimmelpilz (sog. „Gießkannenschimmel“)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- im Boden verbreitet, aber auch beispielsweise auf verrottendem Pflanzenmaterial und feuchten Wänden</li> <li>- aerob</li> <li>- biotechnologisch interessant: Bildung von Citronensäure und anderen Produkten</li> <li>- bildet typisch schwarze Sporen („niger“ lat. schwarz)</li> <li>- Quelle: DSMZ, Braunschweig</li> </ul>
<i>Penicillium chrysogenum</i> DSMZ 1075 Schimmelpilz (sog. „Pinselschimmel“)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ebenfalls im Boden verbreitet, aber auch auf Pflanzenmaterial u. ä.</li> <li>- aerob</li> <li>- Bildung von Penicillin, aber auch anderer Produkte</li> <li>- Stamm bildet grüne Sporen</li> <li>- Quelle: DSMZ, Braunschweig</li> </ul>

Bei den vorgestellten Testorganismen handelt es sich - mit Ausnahme der Standardorganismen *E. coli* und *S. cerevisiae* - um Vertreter, die sich vergleichsweise häufig aus dem Boden isolieren lassen.

### 5.1.3.1 Wirkung der Tenside auf Mikroorganismen im Plattendiffusionstest

Der Agarplattendiffusionstest stellt eine einfache und schnelle Methode dar, um die Wirkung verschiedener Konzentrationen einer Testsubstanz auf ein großes Spektrum von Mikroorganismen zu ermitteln.

Bei der eingesetzten Variante, dem Lochplattentest, wurden die Mikroorganismen auf Agarplatten mit Vollmedien ausplattiert und anschließend in den Nährboden Löcher gestanzt, die dann mit neuem Agar abgedichtet wurden. Anschließend wurden die unterschiedlich konzentrierten Tensidlösungen einpipettiert und die Platten bis zum Auftreten eines geschlossenen Mikroorganismenrasens im Brutschrank inkubiert (s. Kap. 3.7.5.3.1).

Abbildung 22 zeigt die bei diesem Versuch erhaltenen Resultate.

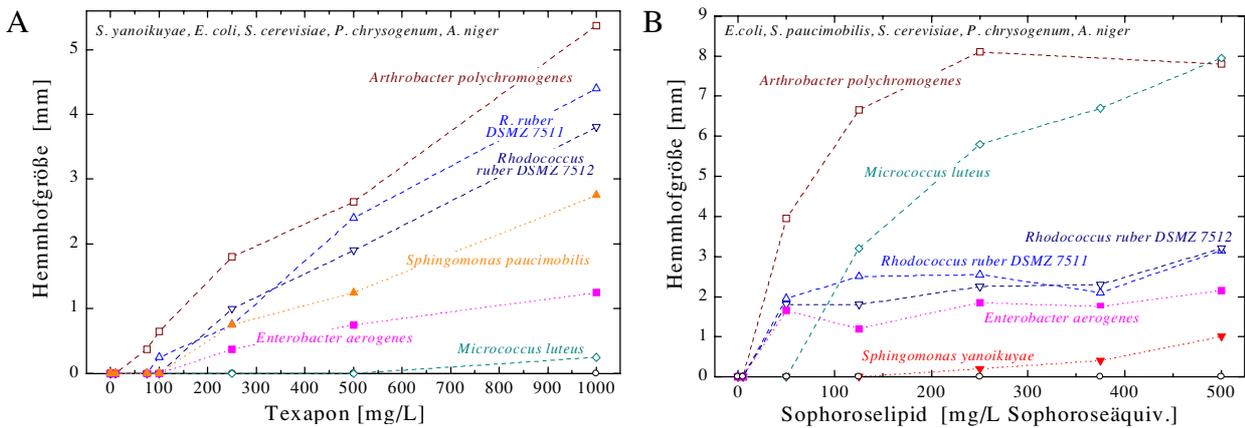


Abb. 22: Toxizität des Texapons<sup>®</sup> N25 (A) und der Sophoroselipide (B) für verschiedene Mikroorganismen im Plattendiffusionstest.

Jeder Hemmhof wurde mit der Schublehre vierfach vermessen und diese Ergebnisse mit denen des Parallelansatzes zu einem Mittelwert zusammengefasst. Mikroorganismen, bei denen keine Hemmhöfe festgestellt werden konnten, sind jeweils im oberen Teil der Graphik in schwarzer Schrift aufgelistet.

Der Toxizitätstest mit Sophoroselipiden wurde in Zusammenarbeit mit GEBNER [1997] durchgeführt.

Beim Texapon<sup>®</sup> N25 (Abb. 22A) lassen sich nur lineare Verläufe erkennen, die nahezu gleichmäßig verteilt sind. Durch Verdopplung der Konzentration eines toxischen Teststoffes läßt sich üblicherweise nur eine kleinere als die zweifache Vergrößerung des Hemmhofes erreichen, was in der Testmethode begründet liegt. Zur Erläuterung sollte zuerst ein imaginäres System aus konzentrischen Kreisen mit variierendem Durchmesser um das eingestanzte Loch gelegt werden. Um auf einem weiter entfernt gelegenen Kreis die gleiche Testsubstanzkonzentration wie in einem nah am Zentrum liegenden Kreis zu erreichen, ist dann aufgrund des größeren Umfangs eine wesentlich höhere Ausgangskonzentration vorzulegen. Bei den durchgeführten Messungen mit dem Texapon<sup>®</sup> N25 läßt sich jedoch kein Abfall der Graphensteigungen feststellen. Folglich würde eine weitere Erhöhung der Konzentration über 1 g/L also noch zu wesentlichen Vergrößerungen des Hemmhofes führen.

Die Graphik der Sophoroselipide (Abb. 22B) zeigt zum Teil die erwarteten Kurvenverläufe mit zunehmend geringer werdender Steigung. Die eingesetzten Mikroorganismen lassen sich in drei unterschiedliche Hemmgruppen einordnen, so ist etwa bei *A. polychromogenes* eine starke, demgegenüber bei *E. coli* gar keine Hemmung beobachtet worden. Um die Zuordnung der Resultate zu den entsprechenden Mikroorganismengruppen zu erleichtern, wurden die Ergebnisse zusammengefasst und mit der Einordnung der Mikroorganismen in Tabelle 18 aufgelistet.

Tab. 18: Zusammenfassende Darstellung der Toxizität von Sophoroselipiden und Texapon® N25 für die eingesetzten Mikroorganismen.

Mikroorganismus	Einordnung	Toxizität Sophoroselipide	Toxizität Texapon® N25
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	GRAM-pos. Bakterium	100	100
<i>Micrococcus luteus</i>	GRAM-pos. Bakterium	69	2
<i>Rhodococcus ruber</i> DSMZ 7511	GRAM-pos. Bakterium	36	72
<i>Rhodococcus ruber</i> DSMZ 7512	GRAM-pos. Bakterium	33	62
<i>Enterobacter aerogenes</i>	GRAM-neg. Bakterium	25	22
<i>Escherichia coli</i> TG1	GRAM-neg. Bakterium	0	0
<i>S. paucimobilis</i> DSMZ 7526	GRAM-neg. Bakterium	0	44
<i>S. yanoikuyae</i> DSMZ 6900	GRAM-neg. Bakterium	5	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> H620	Bier- und Bäckerhefe	0	0
<i>Aspergillus niger</i> DSMZ 1988	Schimmelpilz (sog. „Gießkannenschimmel“)	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i> DSMZ 1075	Schimmelpilz (sog. „Pinselschimmel“)	0	0

Zur Ermittlung der prozentualen Verteilung wurden die Hemmhofgrößen jedes Testmikroorganismus bei allen eingesetzten Tensidkonzentrationen addiert. Die höchste Summe wurde gleich hundert Prozent gesetzt, die anderen entsprechend umgerechnet.

In der Literatur wurde beschrieben, daß GRAM-negative Bakterien aufgrund ihrer zweiten, äußeren Membran nicht so empfindlich gegenüber Tensiden sind wie GRAM-positive Bakterien [HOMMEL et al. 1987, JAMES 1965, SWISHER 1987]. Dies läßt sich mit den vorliegenden Resultaten bestätigen, nach denen die GRAM-positiven Bakterien überwiegend höhere Prozentzahlen aufweisen. Das Bakterium *A. polychromogenes* etwa erwies sich bei beiden Tensiden als der empfindlichste Testorganismus.

Während der Lochplattentest bei den beiden, aus der gleichen Bodenprobe isolierten Rhodococccen vergleichbare Ergebnisse lieferte, lagen sie bei den „Zwillingsbrüdern“ *E. coli* und *Enterobacter aerogenes* weit auseinander. Bei der Gattung *Sphingomonas* ist beim Texapon® N25 ein stark differierendes Resultat gemessen worden. Ergebnisse von Toxizitätsuntersuchungen mit oberflächenaktiven Substanzen sind häufig stark stammabhängig. So ermittelte NAKAMURA [1968] Mortalitätsraten von 10 - 100% bei verschiedenen *E. coli* - Stämmen in Gegenwart gleicher SDS-Konzentrationen.

Bei den Pilzen, die sich als Eukaryonten morphologisch und physiologisch stark von den prokaryontischen Bakterien unterscheiden, etwa durch einen anderen Zellwandaufbau, konnte weder bei Texapon® N25 noch bei Sophoroselipiden eine Hemmung festgestellt werden.

Wegen der bei den beiden Versuchsreihen eingesetzten unterschiedlichen Tensidkonzentrationen und der differierenden Testansätze - beispielsweise lagen unterschiedlich konzentrierte Zellsuspensionen vor - sind Vergleiche innerhalb, nicht jedoch zwischen den beiden Tensiden möglich. Für reale Bodensanierungen muß beachtet werden, daß - auch im Falle der vorliegenden Biosenside - toxische Effekte in keinem Fall vernachlässigbar sind. Dabei dürften jedoch die toxisch wirksamen Konzentrationen aufgrund von Adsorptionseffekten wesentlich höher sein.

#### 5.1.3.2 Wirkung der beiden primär eingesetzten Tenside auf *S. yanoikuyae* B1 im logarithmischen Wachstumstest

Im Vergleich zum Agarplattendiffusionstest ist der logarithmische Wachstumstest empfindlicher und näher an die Verhältnisse, wie sie in den Kultivierungen vorlagen, angepaßt. Die Zellen befinden sich zum Zeitpunkt der Testsubstanzzugabe in der exponentiellen Wachstumsphase; sie sind also sehr stoffwechselaktiv und Wirkungen können schneller auftreten und damit schneller erfaßt werden.

Beim logarithmischen Wachstumstest werden die Bakterien in einem Flüssigmedium mit einer leicht verstoffwechselbaren Kohlenstoffquelle - wie etwa Glucose - angezogen. Erreicht die OD einen definierten Wert, wird die Kultur mit der Testsubstanz konfrontiert und die Biomasseentwicklung weiter verfolgt. Über den Vergleich mit der Kontrolle kann die Wirkung des zugesetzten Stoffes bestimmt werden. Des weiteren ist auch die Ermittlung der MHK („minimale Hemmkonzentration“, auch als „minimale bakterio- bzw. fungistatische Konzentration“ bezeichnet) möglich: Damit wird die Konzentration der Testsubstanz bezeichnet, bei der über einen definierten Zeitraum „gerade kein Wachstum erfolgt ist“ [KEWELOH et al. 1989, SCHLEGEL 1992]. Die Resultate der log-Wachstumstests mit dem Stamm *S. yanoikuyae* B1 in Gegenwart der beiden Tenside sind in Abbildung 23 auf der nächsten Seite dargestellt.

Die Wachstumskurven von *S. yanoikuyae* B1 sind beim Versuch mit Texapon<sup>®</sup> N25 bis zu einer Konzentration von einschließlich 75 mg/L innerhalb der Meßungenauigkeit idenisch mit der des Referenzansatzes. Eine negative Beeinträchtigung des Wachstums ist bei 100 mg/L Tensid festzustellen, die sich bei steigenden Konzentrationen noch weiter verstärkt. Während beim Ansatz mit 250 mg/L nach einer Adaptationsphase von 4,5 h erneut das Wachstum einsetzt, bleibt dieses bei 500 und 1000 mg/L Texapon<sup>®</sup> N25 aus. Ein Abfall der OD unter den Ausgangswert, der besonders bei der höchsten Tensidkonzentration auftritt, deutet auf Zelllyse hin. Daß die Bakterien in den Ansätzen mit den höheren Konzentrationen effektiv abgetötet werden, zeigten auch weitergehende OD-Bestimmungen: Auch später ist kein Wachstum in diesen Kolben meßbar (Daten nicht gezeigt). Diese Wirkung von Tensiden wurde mehrfach in der Literatur beschrieben und wird in der Medizin auch zu Sterilisationszwecken genutzt [LAHA und LUTHY 1992, REHM 1996]. Die MHK von Texapon<sup>®</sup> N25 bei *S. yanoikuyae* B1 liegt zwischen 250 und 500 mg/L, weil in diesem Konzentrationsbereich der Übergang vom verzögerten zum unterbundenen Wachstum erfolgt.

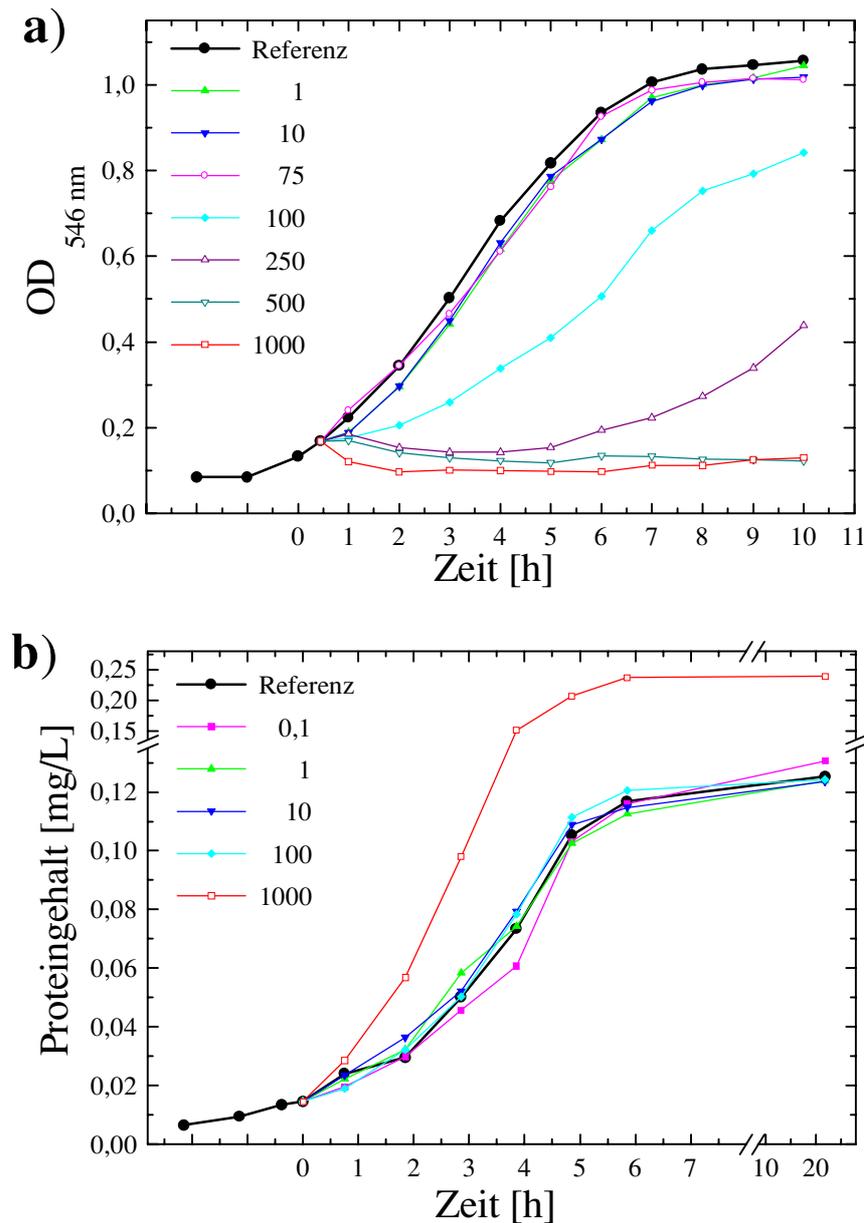


Abb. 23: Texapon® N25 (a) und Sophoroselipid (b) - Toxizitätstest.

In den Legenden sind die eingesetzten Tensidkonzentrationen in mg/L angegeben. Die Konfrontation der Zellen mit den Tensiden erfolgte im Zeitpunkt  $t=0$ .

Der Texapon® N25-Toxizitätstest wurde in Zusammenarbeit mit Menge [1996], der mit Sophoroselipiden mit Müller [1996] durchgeführt.

Demgegenüber konnte beim Versuch mit Sophoroselipiden keine hemmende Wirkung festgestellt werden [s. a. POREMBA et al. 1991]. Bis zu einer Konzentration von 100 mg/L Sophoroseäquivalenten lassen sich keine signifikanten Unterschiede zur Referenz feststellen. Beim Ansatz mit 1 g/L Tensid ist sogar eine wachstumsfördernde Wirkung meßbar: Im Vergleich zu den Kolben mit niedrigeren Tensidkonzentrationen steigt der Proteingehalt auf das etwa 1,9fache an. Die Bakterien können folglich das Tensidgemisch, das aus den Sophoroselipiden und einem gewissen Grad an Verunreinigungen besteht, als zusätzliche C-Quelle nutzen (s. Kap. 3.3). Im Ansatz mit der höchsten Konzentration ist eine lag-Phase dabei nicht zu erkennen, da bereits die erste

Bestimmung nach Zugabe des Tensids einen erhöhten Proteingehalt aufweist: Die zusätzliche Kohlenstoffquelle kann offensichtlich gleich verwertet werden. Da die Zellen auf Glucose wachsen, sind die katabolen Stoffwechselwege für Hexosen, in die auch C3-Körper etc. eingeschleust werden können, aktiviert, so daß eine physiologische Umstellung nicht nötig erscheint.

Beim Vergleich der Ergebnisse dieses Versuchs mit denen des Plattendiffusionstests sind Unterschiede feststellbar. So konnte auf den Agarplatten keine hemmende Wirkung von Texapon® N25 auf *S. yanoikuyae* B1 festgestellt werden, während bei den Sophoroselipiden von einer, wenn auch kleinen hemmenden Wirkung im Diffusionstest ausgegangen werden muß. Die unterschiedlichen Ergebnisse beim synthetischen Tensid lassen sich durch die bereits in der Einleitung dieses Kapitels beschriebene höhere Empfindlichkeit des logarithmischen Wachstumstests erklären. Demgegenüber könnte der Schlüssel für die Begründung der differierenden Ergebnisse mit dem Biotensid in der unterschiedlichen Zellphysiologie liegen, da die Zellen bei den beiden angewendeten Tests in unterschiedlichen Wachstumsphasen mit dem Tensid konfrontiert werden. Während bei exponentiell wachsenden Zellen das Biotensid offenbar schnell verstoffwechselt werden kann und somit die Konzentration bei fortlaufend steigender Biomasse schnell abnimmt, verzögert das Sophoroselipid bei *S. yanoikuyae* B1 in der lag-Phase offenbar den Beginn des Wachstums.

Für die Kultivierungsversuche mit Phenanthren in Flüssig- und Bodensuspensionskultur sind aufgrund der Toxizitätsuntersuchungen folgende Schlußfolgerungen zu ziehen: Bei Konzentrationen beider Tenside bis 75 mg/L sind bei den Experimenten keine inhibitorische Effekte zu erwarten. Bei höheren Konzentrationen ist das Auftreten wachstumshemmender Effekte von den jeweiligen konkreten Versuchsbedingungen abhängig.

#### **5.1.4 Mikrobieller Abbau von Phenanthren, Pyren und Benzo[ghi]perylen durch das isolierte Konsortium**

Bei der Untersuchung des mikrobiellen Abbaus von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Labor werden neben Einzelverbindungen neuerdings auch vermehrt komplexe Schadstoffgemische eingesetzt. Dabei wurden je nach Einzelfall verschiedene Wirkungen des Zusatzes weiterer PAK ermittelt, die Inhibition, Cometabolismus, Abbauförderung oder keine Effekte umfassen [HUGHES et al. 1997 und dort zit., TIEHM und FRITSCHKE 1995].

Im Laufe der Arbeit wurde ein Mikroorganismenkonsortium aus einer Altlasten- und Belebtschlammprobe durch wiederholtes Überimpfen auf frisches Flüssigmedium mit Phenanthren, Pyren und Benzo[ghi]perylen als Kohlenstoffquellen isoliert (s. Kap. 3.7.4). Langfristig sollen damit Versuche zum Abbau von weiteren PAK unter Tensidzusatz durchgeführt werden.

Zum Test der Abbaufähigkeit dieses Konsortiums wurde es auf den drei PAK und 0,5 g/L Glucose angezogen (s. Kap. 3.7.3.2). 100 mL Erlenmeyerkolben, die mit 30 mL MM<sub>Brun.</sub> und je 50 mg/L Phenanthren und Pyren sowie 10 mg/L Benzo[ghi]perylen versehen waren, wurden dann mit je  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL beimpft. Die Ansätze wurden wie üblich inkubiert und der gesamte Inhalt eines Kolbens je Probenahme analysiert (s. Kap. 3.5.2.7). Abbildung 24 auf der folgenden Seite gibt die Ergebnisse dieses Versuchs wieder.

Phenanthren wird innerhalb von 7 d zu 97,5%, Pyren zu 71,5% abgebaut, während der Benzo[ghi]perylen-Gehalt unverändert bleibt. In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, daß Zwei- und Drei-Ringaromaten in Gemischen schneller abgebaut werden als solche mit vier Ringen, was meist auf die unterschiedlichen Wasserlöslichkeiten zurückgeführt wurde [HUGHES et al. 1997, WALTER et al. 1990]. Die Graphen in Abbildung 24 zeigen, daß die Pyrenmenge erst dann abnimmt, wenn Phenanthren schon zum Großteil abgebaut ist. Dies wurde auch von WALTER et

al. [1990] beschrieben, die den Abbau eines Anthracenöls, welches u. a. Pyren und Phenanthren enthielt, untersuchten. Benzo[ghi]perylen gilt als sehr persistent und wird deshalb sogar in Versuchen zum mikrobiologischen Abbau von komplexen PAK-Gemischen in realen Böden als interner Standard für die GC-Analytik eingesetzt [BRINKMANN 1996A].

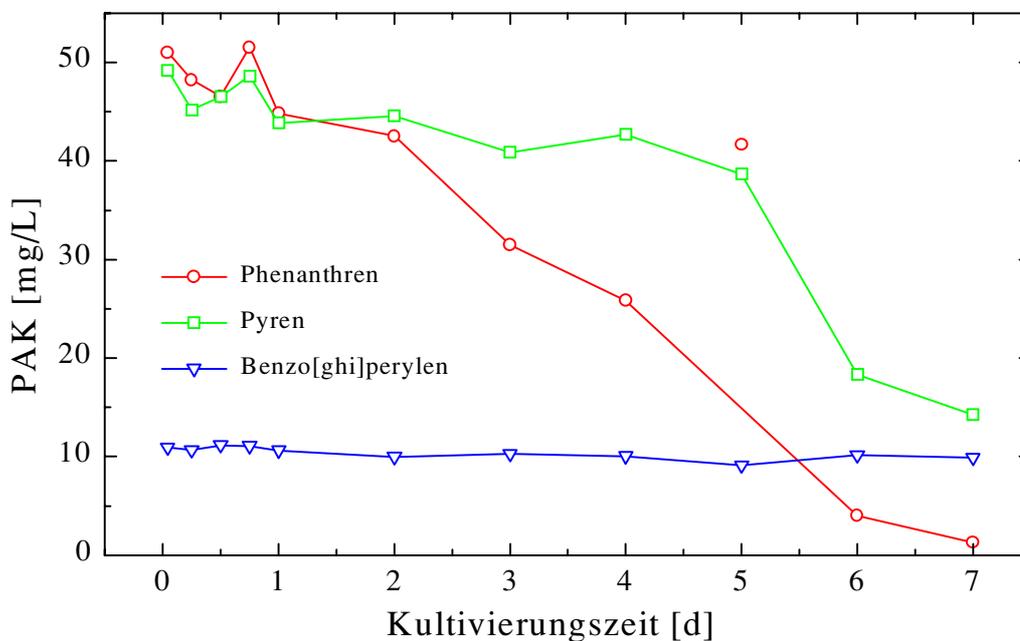


Abb. 24: Abbau des Drei-PAK-Komponentengemisches durch das angereicherte Mikroorganismenkonsortium [s. auch Menge 1996].

Der pH-Wert blieb während der Kultivierung im Bereich um  $6,91 \pm 0,02$  konstant, wie dies auch beim Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 beobachtet wurde (s. Kap. 5.2.5). Der Proteingehalt stieg demgegenüber von durchschnittlich 3,4 mg/L innerhalb der ersten 5 d auf 6,0 mg/L zum Versuchsende (Daten nicht gezeigt). Dieser Anstieg der Biomasse ist nur durch den Bioabbau der PAK zu begründen.

Das isolierte Mikroorganismenkonsortium ist folglich in der Lage, Phenanthren und Pyren abzubauen; innerhalb der Versuchszeit wird Benzo[ghi]perylen jedoch nicht angegriffen.

### 5.1.5 Phenanthrenabbau von *S. yanoikuyae* B1 bei mehrmaligem Überimpfen auf nicht-schadstoffhaltiges Medium

*S. yanoikuyae* B1 enthält die zwei Plasmide pKG1 ( $\approx 230$  kb) und pKG2 ( $\approx 30$  kb). KIYOHARA et al. [1983] zeigten, daß das kleinere Plasmid beim Wachstum auf Benzoat verloren gehen kann. Dies korrelierte damit, daß der Stamm nicht mehr mit Phenanthren oder Biphenyl als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen konnte. KIM und ZYLSTRA [1995] zeigten jedoch, daß die Strukturgene für den Biphenylabbau nicht auf pKG2 liegen. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Gene auf dem Bakterienchromosom vorhanden sind, während analoge Gene bei aus der Tiefsee isolierten *Sphingomonas* spec. auf dem großen Plasmid liegen [KIM et al. 1996]. Der Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 wurde - abgesehen von den ersten beiden Schritten, die zu einer *cis*-Dihydrodiolbildung führen - noch nicht im Detail untersucht. Bisher sind über 30 Gene, die für mono- oder polyzyklische aromatische Verbindungen abbauende Enzyme kodieren, charakterisiert worden. Es müssen aber noch einige gefunden werden [ZYLSTRA und KIM 1997].

Aufgrund der Unklarheiten sollte mit einem Versuch geklärt werden, wie viele Bakterien auch nach mehrmaligem Wachstum in schadstofffreiem Medium noch in der Lage sind, Phenanthren abzubauen. Liegen alle Gene der für den Phenanthrenabbau codierenden Enzyme bei *S. yanoikuyae* B1 auf dem Bakterienchromosom, so sollte die Zahl der auf schadstoffhaltigen Agarplatten wachstumsfähigen Bakterien über den Versuchszeitraum konstant bleiben. Sind die Abbauenzyme jedoch teilweise oder vollständig plasmidkodiert, so sollten sich während des Versuches Bakterien durchsetzen, die aufgrund des Plasmidverlustes schneller wachsen können, so daß es zu einer deutlichen Reduktion der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf Phenanthrenplatten kommt.

Für den Versuch wurde der Stamm *S. yanoikuyae* B1 jeweils täglich in frisches MM<sub>Brum.</sub>-Nährmedium mit 1 g/L Glucose überimpft und zu Beginn die Gesamtzellzahl und die Anzahl der KBE auf glucose- und phenanthrenhaltigen Agarplatten bestimmt (s. Abb. 25).

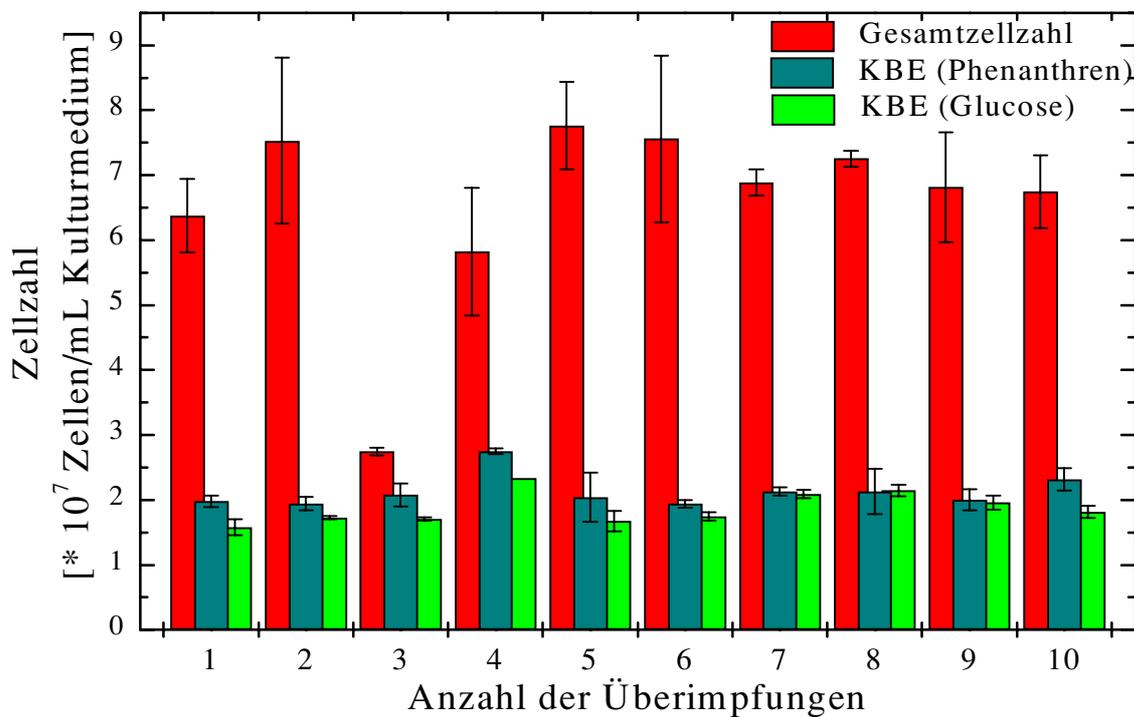


Abb. 25: Wachstum von *S. yanoikuyae* B1 nach mehrfacher Anzucht in phenanthrenfreiem Medium. Die Gesamtzellzahlen wurden mikroskopisch gemäß Kap. 3.5.1.1 bestimmt, die KBE durch Ausplattierung entsprechender Verdünnungen auf Agarplatten mit Phenanthren oder Glucose ermittelt (s. Kap. 3.5.1.2). Die Fehlerbalken ergeben sich aus den Ergebnissen der Doppelbestimmungen. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit MENGE [1996] durchgeführt.

Mit Ausnahme des dritten Ansatzes liegen alle Gesamtzellzahlen in einem Bereich zwischen  $5,8 - 7,8 \times 10^7$  Zellen/mL. Die Anzahl der KBE auf beiden Kohlenstoffquellen bleibt während der Versuchsdauer konstant zwischen  $1,5 - 2,8 \times 10^7$  Zellen/mL, was 22 - 47% der Gesamtzellzahl entspricht. Alle wachstumsfähigen Bakterien sind während der gesamten Versuchsdauer in der Lage, Phenanthren zu verstoffwechseln.

Aufgrund der erhaltenen Resultate liegt die Vermutung nahe, daß die für den Phenanthrenabbau codierenden Enzyme wahrscheinlich auf dem Bakterienchromosom liegen.

SALEH [1995] führte einen Plasmidstabilitätstest nach gleichem Prinzip mit einem *E. coli*-Stamm durch, der zwei gegen verschiedene Antibiotika Resistenz vermittelnde Plasmide trug. Er fand heraus, daß nach spätestens sechs Übernachtkulturen keine plasmidtragenden Bakterien mehr vorlagen. Dies zeigt, wie schnell sich plasmidfreie Bakterien in diesem System durchsetzen können. MAHRO et al. [1995] überimpften bis zu dreißigmal drei verschiedene Stämme, darunter auch *Sphingomonas spec. BA 2*, auf schadstoffreies Flüssigmedium und erzielten dabei ähnliche Ergebnisse wie die für *S. yanoikuyae B1*.

Aus den Resultaten läßt sich folgern, daß der Einsatz von Glucose als zusätzlicher Kohlenstoffquelle in den Vorkulturen ohne Auswirkung auf die Anzahl der zum Phenanthrenabbau befähigten Bakterien bleibt. Wenn für reale Bodensanierungsvorhaben *S. yanoikuyae B1* in großen Mengen angezogen werden soll, kann auf den Zusatz von Schadstoffen verzichtet werden.

### 5.1.6 Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae B1* unter Zusatz von Tensiden

Nachdem durch die verschiedenen Voruntersuchungen grundlegende Daten zu den Tensiden ermittelt worden waren (s. Kap. 4), sollten darauf aufbauend Versuche in Schüttelkolben Aufschluß über deren Wirkung auf den Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae B1* geben. Durch die Analytik einer Vielzahl von Meßgrößen - neben dem Phenanthrengelalt wurde die Proteinkonzentration, der MBAS-Index oder der Gesamtzuckergehalt, der pH-Wert und die Oberflächenspannung bestimmt - sollten die Abbauergebnisse bestätigt bzw. weitergehende Aussagen ermöglicht werden. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Versuchsreihen sollten anschließend Kultivierungen im 2 L Bioreaktor durchgeführt werden.

Für die Experimente wurden 100 mL Erlenmeyerkolben mit 30 mL MM<sub>Brun.</sub> und 100 mg/L Phenanthren mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen versetzt, mit  $1 * 10^8$  Zellen/mL inokuliert und unter Standardbedingungen inkubiert (s. Kap. 3.7.5.4). Zu Beginn und nach einer definierten Inkubationszeit wurden je zwei Kolben pro Ansatz entnommen. Der eine diente zur Analytik des Phenanthrens, der andere zur Bestimmung der restlichen Meßgrößen.

#### 5.1.6.1 Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an Texapon® N25

Die Resultate der mit verschiedenen Texaponkonzentrationen durchgeführten Versuche sind in Abbildung 26 auf der nächsten Seite dargestellt.

Zum Versuchsbeginn sind die in den Kolben gemessenen pH-Werte annähernd gleich. Im Verlauf von 21 h ist der pH-Wert ohne erkennbare Regelmäßigkeit in allen Ansätzen um 0,05 - 0,13 Einheiten gesunken.

Der Proteingehalt ist in nahezu allen Ansätzen über den Versuchszeitraum gestiegen. Die Zunahmen sind, bis auf zwei Ausnahmen, größer oder gleich dem des Kontrollansatzes. Im Ansatz mit 70 mg/L Tensid wurde eine, wenn auch geringe Abnahme des Proteingehaltes gemessen. Diese beruht wahrscheinlich entweder auf einem Meßfehler oder auf der durch die Versuchsdurchführung bedingten Proteinkonzentrationsbestimmung ( $t_0$  und  $t_{21}$ ) in zwei unterschiedlichen Kolben. Beim Ansatz mit 100 mg/L Tensid wurde eine im Vergleich zu den anderen Ansätzen geringere Zunahme des Proteingehaltes registriert. Generell wurde beim Versuchsansatz mit den höheren eingesetzten Tensidkonzentrationen auch durchschnittlich höhere Zuwächse verzeichnet.

Die im Vorversuch ermittelte CMC von 60,6 mg/L läßt sich bestätigen, wenn die zu Beginn des Versuchs bestimmten Werte der Oberflächenspannung einer Regressionsanalyse unterzogen werden (s. Kap. 3.5.2.1). Bis zu einer Konzentration von 50 mg/L fällt diese Meßgröße nämlich stark ab, während ab dem Ansatz mit 70 mg/L nur noch schwache Abnahmen zu verzeichnen sind. Die mathematische Bestimmung der CMC von Texapon® N25 bei diesem Versuch ergab

61,5 mg/L. Das ist eine Abweichung von nur 1,5% gegenüber dem zuvor bestimmten Wert (s. Kap. 4.1). Die Abweichung ist auf die variierten Versuchsbedingungen zurückzuführen: Bei der CMC-Bestimmung im Vorversuch wurde - anders als bei diesem Experiment - nur reines Medium ohne Phenanthren und Bakterien verwendet. Die Oberflächenspannungen aller Ansätze mit Tensidzusatz steigen über den Versuchszeitraum an: Bei Texapon<sup>®</sup> N25-Ausgangskonzentrationen bis 5 mg/L um 2 - 2,5 mN/m, bei höheren Anfangsmengen um 7,5 - 9 mN/m. Beim Ansatz mit 100 mg/L Texapon<sup>®</sup> wurde sogar eine Zunahme von 12,5 mN/m gemessen.

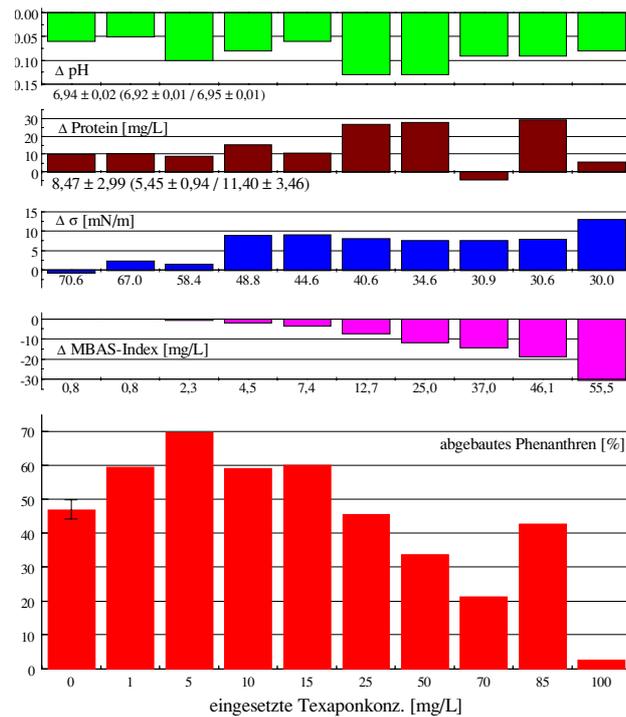


Abb. 26: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 unter Zusatz von Texapon<sup>®</sup> N25 in Schüttelkolben.

Der Abbildung liegen zwei unterschiedliche Versuchsreihen zugrunde (1 - 15 mg/L und 25 - 100 mg/L mit jeweils einem eigenen Referenzwert, der in der Abbildung für alle Meßgrößen gemittelt aufgetragen wurde.) Die Anfangsprobe wurde jeweils nach 1 h, die Endprobe nach 21 h Inkubationszeit genommen.

Die Säulen der oberen vier Teildiagramme geben die Zu- oder Abnahmen der jeweiligen Meßgrößen wieder. Unter den jeweiligen Säulen sind bei Oberflächenspannung und MBAS-Index jeweils die Anfangswerte wiedergegeben. Beim pH-Wert und Protein sind die Mittelwerte aller Ansätze, und in Klammern die der jeweiligen Versuchsreihe (links niedrigere, rechts höhere Konzentrationen), angegeben. Diese Art der Darstellung wurde gewählt, um einen übersichtlichen Vergleich aller gemessenen Meßgrößen zu ermöglichen.

Die Experimente wurden in Kooperation mit MENGE [1996] durchgeführt.

Die Anfangswerte der MBAS-Indizes zeigen die Zuverlässigkeit dieser Bestimmungsmethode, da bei der Berechnung der Regressionsgeraden ein Koeffizient  $R^2$  von 0,99772 erreicht wurde. Die Abnahme dieser Meßgröße über den Versuchszeitraum steht zudem in einem linearen Zusammenhang zur jeweils eingesetzten Tensidkonzentration: Je höher diese ist, desto größer ist auch der Abfall über den Versuchszeitraum. Die Ergebnisse beider Tensidbestimmungsmethoden weisen,

wie erwartet, die gleiche Tendenz auf, d.h. ein abnehmender  $\Delta$  MBAS-Index korreliert mit einer Zunahme der Oberflächenspannung. Durch beide Verfahren wird jedoch - wie auch bei der Phenanthrenanalytik - nur der Primärabbau bestimmt (s. Kap. 2.2.3.1).

In den Ansätzen ohne Tensidzusatz wird im Mittel 46,5% des eingesetzten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs abgebaut. Mit Texapon<sup>®</sup> N25-Zusatz lassen sich drei Kategorien unterscheiden. Im Konzentrationsbereich zwischen 1 - 15 mg/L wird mehr, bei Mengen um 25 mg/L etwa genausoviel und zwischen 50 und 100 mg/L weniger Phenanthren abgebaut. Die Regressionsanalyse der Ergebnisse von 5 - 100 mg/L zeigt, daß die zugesetzte Tensidmenge umgekehrt proportional zum abgebauten Phenanthren steht ( $R^2 = 0,97925$ , wenn die Tensidkonzentrationen 10 und 85 mg/L nicht in die Berechnung miteinbezogen werden).

Vor allem der Vergleich der Phenanthrenmengen mit den  $\Delta$  MBAS-Indizes zeigt, daß bei niedrigen Tensidkonzentrationen (< 25 mg/L) eher Phenanthren, bei höheren (> 25 mg/L) eher Tensid abgebaut wird. Interessant dabei ist, daß die Meßwerte beider Meßgrößen ab Tensidkonzentrationen von über 5 mg/L linear verlaufen. Texapon<sup>®</sup> N25 fördert den mikrobiellen Phenanthrenabbau in Konzentrationen weit unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration, wie es bereits für andere Tenside beschrieben wurde (s. Kap. 2.2.5.2, [ARONSTEIN et al. 1991]). In den bei diesem Versuch getesteten höheren Konzentrationen wird das eingesetzte synthetische Tensid, das sich durch gute biologische Abbaubarkeit auszeichnet, selbst abgebaut. Die Zunahme des Proteingehaltes in nahezu allen Kolben deutet darauf hin, daß inhibitorische Effekte bei der Betrachtung der Ergebnisse vernachlässigt werden können. Beim logarithmischen Wachstumstest wurden für Texapon<sup>®</sup> N25-Konzentrationen über 75 mg/L toxische Effekte für *S. yanoikuyae* B1 zwar nicht ausgeschlossen, dort lagen jedoch keine Phenanthrenkristalle vor, an die Tensidmoleküle zusätzlich noch hätten adsorbiert sein können. Toxische Einflüsse sollten sich beim betrachteten Versuch daher erst bei höheren Tensidkonzentrationen (über 100 mg/L) bemerkbar machen. Der linear gestiegene Anteil an abgebautem Tensid laut MBAS-Index und die parallel gestiegene Oberflächenspannung beim Ansatz mit 100 mg/L Tensid unterstützt diese Vermutung. Zellytische Prozesse sind mit einer Zunahme des pH-Wertes verbunden, da basische Inhaltsstoffe freigesetzt werden: In allen Ansätzen fällt jedoch der pH-Wert [BALFANZ 1989]. Die beim Kolben mit 100 mg/L Texapon<sup>®</sup> N25 gemessene Zunahme des Proteingehalts ist vermutlich zu niedrig bestimmt worden, da fallender pH-Wert und starker Tensidabbau auf Wachstum schließen lassen. Texapon<sup>®</sup> N25-Konzentrationen bis 15 mg/L steigern den Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 bei Experimenten in Schüttelkolben, weshalb diese Mengen ebenfalls bei Flüssigkultivierungen im Bioreaktor getestet werden sollen.

#### 5.1.6.2 Wirkung verschiedener Konzentrationen an Sophoroselipiden

Abb. 27 auf der folgenden Seite zeigt die Veränderungen wichtiger Meßgrößen beim Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 in Schüttelkultur in Abhängigkeit verschiedener Sophoroselipidkonzentrationen.

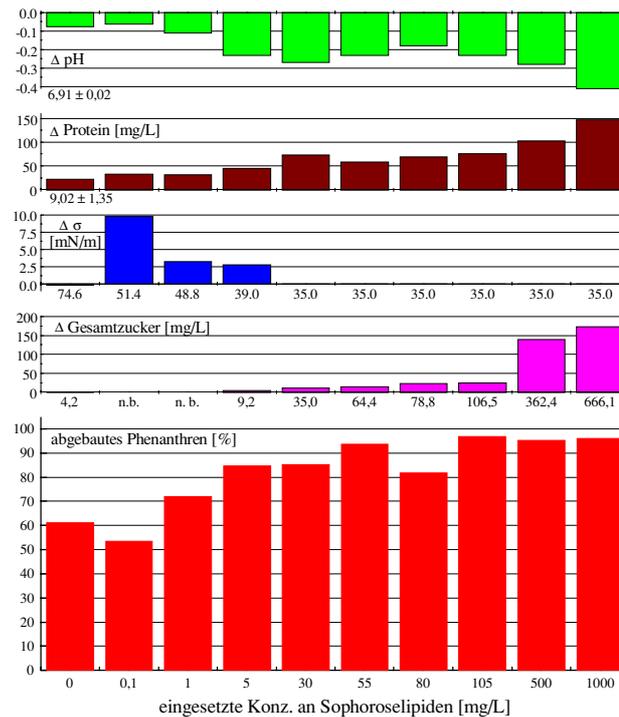


Abb. 27: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 in Schüttelkultur in Abhängigkeit verschiedener Sophoroselipidkonzentrationen.

Wie in Abb. 26 geben die Säulen der oberen vier Teildiagramme die Zu- oder Abnahmen der jeweiligen Meßgrößen wieder. Die Anfangs-pH- und Proteinwerte wurden gemittelt und unter die entsprechenden Teildiagramme gedruckt, während die Werte Oberflächenspannung und Gesamtzuckerkonzentration unter die Säulen geschrieben wurden. (n.b. = nicht bestimmt, da außerhalb des Meßbereiches)

Diese Versuche wurden zeitlich vor denen mit Texapon® N25-Zusatz durchgeführt. Die Schwankungen der Meßergebnisse sind überwiegend auf nicht homogen große Phenanthrenkristalle zurückzuführen, die bei den späteren Versuchen mit dem synthetischen Tensid durch eine modifizierte Versuchsvorbereitung erreicht werden konnte (s. Kap. 3.7.5.4). Dargestellt sind die Ergebnisse dreier unterschiedlicher Versuche, die in Kooperation mit MÜLLER [1996] durchgeführt wurden. Die erste Probenahme erfolgte 20 min nach der Beimpfung, während die Endprobe nach 22 oder 24 h gezogen wurde.

Wie bei dem Versuch mit Texapon® N25 weisen die Anfangs-pH-Werte nur eine geringe Streuung auf. Über den Versuchszeitraum fällt der pH-Wert in allen Kolben. Tendenziell ist der Abfall um so größer, je höher die vorgelegte Sophoroselipidkonzentration ist. So ist er bei 0,1 mg/L relativem Sophoroselipidgehalt mit 0,06 Einheiten am kleinsten, während bei 1.000 mg/L Tensid ein Abfall von über 0,4 Einheiten gemessen werden konnte.

Die Proteingehalte liegen anfänglich, wie erwartet, in der gleichen Größenordnung wie bei der Parallelversuchsreihe mit dem synthetischen Tensid. Über den Versuchszeitraum sind jedoch wesentlich größere Zunahmen meßbar, die noch deutlicher als beim pH-Wert mit steigender Tensidkonzentration anwachsen. So wurde beim Ansatz mit 1.000 mg/L rel. Sophoroselipidgehalt eine Zunahme von 147,3 mg/L gemessen, während in der Referenz eine Steigerung um 21,7 mg/L Protein verzeichnet wurde.

Die Oberflächenspannungen zu Beginn des Versuchs fallen im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 5 mg/L drastisch auf 39,0 mN/m ab. Ab dem nächsthöher konzentrierten Ansatz bleibt dieser Wert konstant bei 35,0 mN/m. Die kritische Mizellbildungskonzentration unter diesen Versuchs-

bedingungen liegt im Bereich zwischen 5 und 30 mg/L relativer Sophoroselipidkonzentration. Sie ist somit höher als die im Vorversuch (4,0 mg/L) bestimmte, was wiederum auf das Vorliegen von bakteriellen Zellen und Phenanthrenkristallen zurückgeführt werden kann. Bei den Parallelversuchen mit Texapon<sup>®</sup> N25 war ebenfalls eine Steigerung der kritischen Mizellbildungskonzentration im Vergleich zu den Ergebnissen des Vorversuchs festgestellt worden.

Die gemessenen Gesamtzuckerkonzentrationen zu Beginn des Versuchs steigen zwar mit höherem Sophoroselipidgehalt an; sie stehen damit jedoch nicht in dem erwarteten direkten Zusammenhang. Über die Kultivierungszeit nimmt diese Meßgröße in allen Kolben zu, wobei bei höheren Konzentrationen an eingesetztem Sophoroselipid auch höhere Zuwächse zu verzeichnen sind. Die Messung des Gesamtzuckergehalts wurde hauptsächlich zur Bestimmung des relativen Sophoroselipidgehaltes von Stammlösungen durchgeführt. Zum Einsatz in Schüttelkolbenexperimenten ist sie weniger gut geeignet, was einerseits auf die nicht-reproduzierbare Probenahme aufgrund von Flocken u.a. Inhomogenitäten im Kultivierungsmedium zurückzuführen ist [s. auch MÜLLER 1996]. Andererseits beschrieben KAKAC und VEJDELEC [1997], daß auch andere bakterielle zelleigene Stoffe wie die verschiedenen Desoxyribo- und Ribonukleinsäuren die Messung des Gesamtzuckergehaltes durch Anthron stören können.

Im Parallelversuch mit Texapon<sup>®</sup> N25 im getesteten Konzentrationsbereich von 0 - 100 mg/L wurde bezüglich des Phenanthrenabbaus eine typische Optimumkurve erhalten. In Gegenwart von Sophoroselipiden baut *S. yanoikuyae* B1 demgegenüber in nahezu allen eingesetzten Tensidkonzentrationen mehr Phenanthren ab als in der Referenz ohne Tensid. Lediglich bei 0,1 mg/L Sophoroselipidzugabe konnte kein verbesserter Abbau festgestellt werden. Während bei den Ansätzen mit 1 bis 30 mg/L ein Anstieg an abgebautem Phenanthren von 72 auf 85% gemessen wurde, sind im Konzentrationsbereich von 55 bis 1.000 mg/L durchschnittlich Werte über 90% erreicht worden. In der Referenz wurde im gleichen Zeitraum 61% des Phenanthrens abgebaut. Dabei wird das Sophoroselipidgemisch im betrachteten Zeitraum offenbar auch als zusätzliche Kohlenstoffquelle genutzt. Hinweis dafür sind die starken Zuwächse des Proteingehaltes und die deutlich fallenden pH-Werte vor allem bei den Ansätzen mit den höheren Konzentrationen. Der hier meßbare starke Anstieg des Gesamtzuckergehaltes repräsentiert ebenfalls die Zunahme an Biomasse: Verunreinigungen des Sophoroselipidgemisches, die Alkylkettenreste der Tenside und das Phenanthren können in Hexosen umgebaut werden, so daß trotz des Abbaus von Sophoroselipiden ein Netto-Gesamtzuckerzuwachs plausibel ist. Die Änderungen der Oberflächenspannungen zeigen bei den Kolben mit relativen Sophoroselipidgehalten unterhalb der vorliegenden kritischen Mizellbildungskonzentration, daß Tenside verstoffwechselt werden. Jedoch ist die Zunahme an Biomasse in diesen Kolben so hoch, daß neben dem Sophoroselipidgemisch nachweislich auch das Phenanthren als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Toxische Effekte des Tensidgemisches sind, übereinstimmend mit den Ergebnissen des logarithmischen Wachstumstests, nicht zu beobachten.

Der Zusatz von Texapon<sup>®</sup> N25 führt zu einem verbesserten Schadstoffabbau bei nur minimal variierenden Biomassezuwächsen, was eindeutig auf einen positiven Einfluß des Tensids hinweist. Demgegenüber kann bei den gemessenen drastischen Proteinzuwächsen mit dem Sophoroselipidgemisch nicht zweifelsfrei gezeigt werden, ob die Steigerung des Phenanthrenabbaus durch tensidbedingte Erhöhung der Bioverfügbarkeit, oder/und einfach durch die wesentlich größere Biomasse verursacht wurde. Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch, daß bereits bei Werten unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration im Vergleich zur Referenz mehr Schadstoff abgebaut wurde, ein Phänomen, das bisher für diese Tensidgruppe noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden weitere Versuche mit weitergehender

Analytik nötig, die im folgenden beschrieben werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollten dabei Konzentrationen von über 55 mg/L getestet werden, um einen optimalen Phenanthrenabbau zu erreichen (s. Kap. 5.2.5).

## 5.2 Ergebnisse der Flüssigkultivierungen von *S. yanoikuyae* B1 im Bioreaktor

Durch chemisch-physikalische und biologische Voruntersuchungen wurde gezeigt, daß der Einsatz von Sophoroselipiden und Texapon<sup>®</sup> N25 für weitere Experimente vielversprechend ist. Um praxisnaher zu arbeiten und um mehr Möglichkeiten für Analytik, wie etwa die Online-2D-Fluoreszenzspektroskopie, nutzen zu können, wurde nun mit einem 2 L Bioreaktorsystem gearbeitet. In einem ersten Schritt sollten die Bedingungen gefunden werden, mit denen Kultivierungen unter Zusatz von Tensiden in einem vertretbaren Zeitrahmen durchführbar sind.

### 5.2.1 Phenanthrenabbau in Abhängigkeit variierender Animpfdichte

Zu Beginn der Arbeiten mit dem vorhandenen Biostat B-Reaktorsystem (Braun, Melsungen) mit einem Arbeitsvolumen von 2 L wurden einige Parameter beibehalten, andere aufgrund von Erfahrungswerten neu festgelegt. Wie bei den Schüttelkolbenversuchen wurde das Mineralsalzmedium (MM<sub>Brun.</sub>) verwendet und die Kultivierungstemperatur auf 28°C geregelt. Diese Bedingungen sind einerseits laut DSMZ-Katalog [1993] für den eingesetzten Stamm *S. yanoikuyae* optimal, andererseits war so die Vergleichbarkeit mit den geschilderten Vorversuchsergebnissen gewährleistet. Die Begasungsrate wurde bei den ersten Arbeiten mit dem Originalbegasungsring auf 1 - 2 vvm und die Rührergeschwindigkeit auf 500 rpm festgelegt. Die einzusetzende Phenanthrenmenge wurde mit 100 mg/L auf einen Wert weit über dem Löslichkeitsprodukt festgesetzt, um die Wirkung des Tensidzusatzes ermitteln und den Abbau analytisch gut erfassen zu können. Um die Kultivierungsdauer zu verändern wurde daher die Animpfmenge variiert.

Die Resultate von Reaktorläufen mit differierenden Anfangszellzahlen, die in Kooperation mit BUSCH [1995] durchgeführt wurden, sind in Abbildung 28 anhand der Phenanthrenmenge wiedergegeben (s. S. 97).

Durch die Erhöhung der Animpfdichte über  $2,1 \cdot 10^6$  auf  $1 \cdot 10^8$  ( $6,6 \cdot 10^7$ ) Zellen/mL kann die Abbauphase deutlich reduziert werden. So erreicht die Kultivierung mit der niedrigeren Ausgangszellzahl die Phase verminderter Abbauraten nach ca. 50 h Inkubationszeit, während durch Erhöhung der Animpfzellzahl auf das 25- bzw. 50fache das gleiche Stadium bereits nach 12 - 13 h erreicht wurde. Je höher die Ausgangszellzahl, desto geringer werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungen, da die Zellzahl ab einem gewissen Zeitpunkt nicht mehr limitierend auf den Abbau wirkt. Die Kontrollkultivierung zeigt, daß in dem eingesetzten System vor allem während der ersten drei Stunden abiotische Eliminationsvorgänge zur Reduktion der analytisch nachweisbaren Phenanthrenmenge führen (s. Kap. 5.2.5).

Die Animpfdichte für die folgenden Kultivierungen wurde aufgrund der vorliegenden Resultate auf  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL festgesetzt, eine für Schadstoffabbauversuche übliche Zahl [SCHIPPERS 1993 und dort zit.].

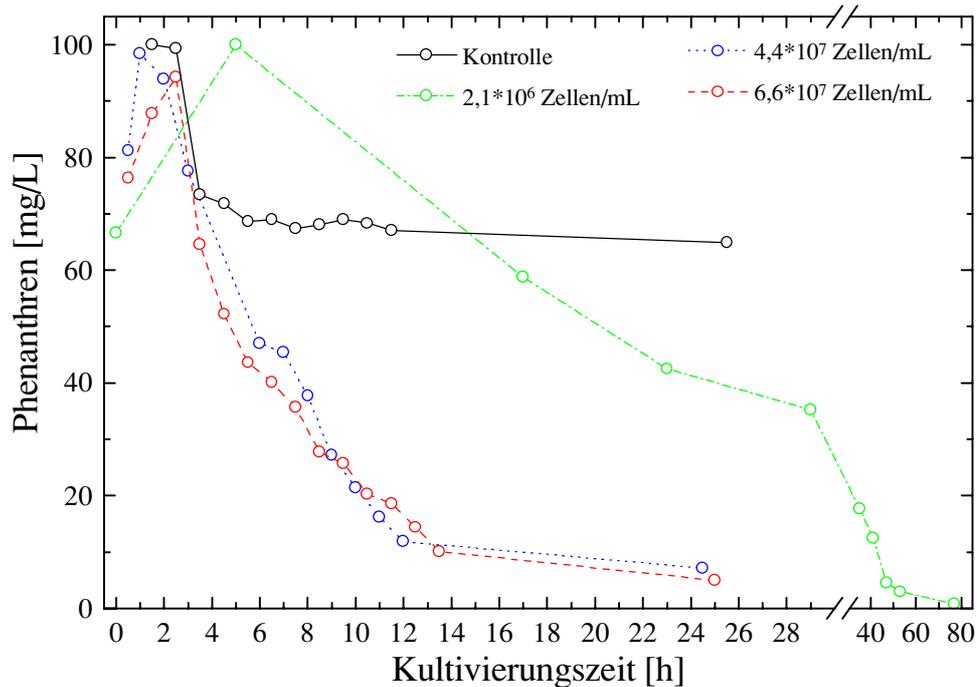


Abb. 28: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 im 2 L Bioreaktor mit verschiedenen Animpfmengen.  
 (Biostat B Standardsystem mit Originalbegasungsring und Schikanekorb (Braun, Melsungen), Begasungsrate: 2 L/min)  
 Bei der höchsten Animpfmenge von  $6,6 \cdot 10^7$  Zellen/mL wurden im weiteren Versuchsverlauf nur Zählergebnisse von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL und mehr erzielt, sodaß das erste - in der Legende wiedergegebene - Resultat zu stark nach unten abweicht.

### 5.2.2 Wachstum von *S. yanoikuyae* B1 auf zwei Kohlenstoffquellen: Phenanthren und Glucose

Beim Einsatz bioabbaubarer Tenside besteht die Gefahr, daß die Mikroorganismen, die eigentlich die Schadstoffe abbauen sollen, diese zusätzliche, in der Regel besser verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle bevorzugen [MULKINS-PHILLIPS und STEWART 1974]. In realen Sanierungsfällen können zusätzlich organische Nähr- oder Zuschlagstoffe wie Nährbouillon, Melasse, Borke oder Stroh eingesetzt werden [LFU 1991]. Diese sollen sich günstig auf die Schadstoffelimination auswirken.

Für das angewandte System sollte daher geklärt werden, ob der an Phenanthren adaptierte Stamm *S. yanoikuyae* B1 den Schadstoff im Bioreaktor auch dann noch abbaut, wenn eine sehr leicht verstoffwechselbare C-Quelle, Glucose, im Medium vorhanden ist.

Dazu wurde wieder mit dem Standard-Kultivierungssystem gearbeitet und dem  $MM_{\text{B,run}}$  neben 100 mg/L Phenanthren zusätzlich noch 1 g/L Glucose zugesetzt. Abbildung 29 gibt die wichtigsten der dabei aufgenommenen Meßgrößen wieder.

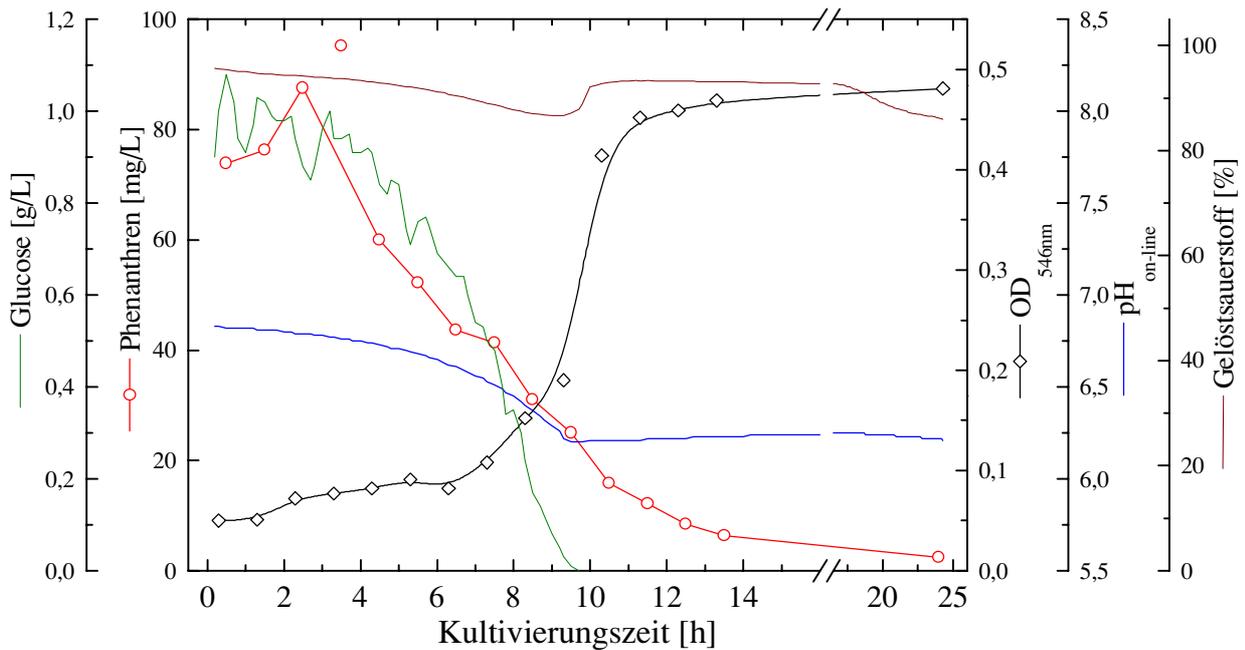


Abb. 29: Abbau von Phenanthren durch *S. yanoikuyae* B1 unter Zusatz von Glucose. (Biostat B Standardsystem mit Originalbegasungsring und Schikanekorb, Begasungsrate: 2 L/min, Bypass zur Fluoreszenzmessung und zur Online-Glucosemessung, Animpfmenge  $1,25 \cdot 10^8$  Zellen/mL) Die Glucosekonzentration wurde online durch einen Analysator (YSI 2700 Select, Yellow Springs Instruments) verfolgt, der über ein im Bypass installiertes Crossflow-Filtrationsmodul (ASEP, Applikon) an das System angeschlossen war [HILMER 1996]. Die optische Dichte ist mit einem idealisierten Graphen dargestellt.

Wie auch schon bei der Untersuchung des Wachstums von *S. yanoikuyae* B1 in Vorkultur läßt sich hier ein gleichzeitiger Abbau von Phenanthren und Glucose feststellen, welcher jedoch aufgrund eines höheren Inokulums und der im Bioreaktor optimaleren Bedingungen wesentlich schneller einsetzt (s. Kap. 5.1.1).

Der Abfall des pH-Wertes ist ebenfalls reproduzierbar; er steigt nach dem Verbrauch der Glucose ebenso wieder leicht an. Bei der Vorkultur fiel der pH jedoch nur um 0,3 Einheiten, während er nun um 0,6 Einheiten fällt. Das kann auf die wesentlich höhere Zahl an Zellen zurückgeführt werden, die, bei optimaleren Bedingungen im Bioreaktor, auch mehr Säure produzieren können. Der Gelöstsauerstoffgehalt fällt parallel mit der Glucosekonzentration ab und steigt nach dem Verbrauch dieser Kohlenstoffquelle innerhalb kürzester Zeit wieder an. Letzteres kann zum Beispiel auch bei vergleichbaren Kultivierungen von *E. coli* festgestellt werden [HESSE 1997]. Mit einem minimalen Wert von 87% ist der Gelöstsauerstoffgehalt in der vorliegenden Kultivierung jedoch zu keinem Zeitpunkt in einem das Wachstum negativ beeinflussenden Bereich. Der Graph der optischen Dichte weist nach einer anfänglich minimalen Zunahme einen starken Anstieg auf, der mit dem Verbrauch der Kohlenstoffquellen einhergeht. Bei dem in den ersten zwei Stunden gemessenen geringen Anstieg handelt es sich jedoch wahrscheinlich um eine Meßungenauigkeit und nicht um den Beginn einer diauxischen Wachstumskurve, da einerseits die Kohlenstoffquellen gleichzeitig verbraucht werden, andererseits bei einem Parallelversuch mit pH-Regelung die OD einen normalen sigmoiden Verlauf zeigte. Zu Beginn der beiden Kultivierungen ist die Vergleichbarkeit gegeben, da die pH-Werte dann noch übereinstimmten. Die nicht dargestellte Referenzkultivierung wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben [HILMER 1996].



Während der Phenanthrenabbau in den ersten 6 h bei beiden Kultivierungen vergleichbar verläuft, verlangsamt er sich in der Folge beim neuen Begasungssystem. Hier steigt die optische Dichte zusätzlich später an, wenngleich die insgesamt gemessenen Änderungen nur sehr gering ausfallen und die OD-Messung in einer Suspension problematisch ist (s. Kap. 3.5.1.4).

Das neue Begasungssystem ohne Schikanen führt folglich zu einer Verlangsamung des Wachstums und des Phenanthrenabbaus im Vergleich zu einer Kultivierung mit dem Standardbegasungsring und Schikanekorb.

Der Gelöstsauerstoffgehalt war in allen Kultivierungen stets über 90% (Daten nicht gezeigt), so daß eine Beeinflussung des aeroben Bioabbaus ausgeschlossen werden kann. Stripeffekte - aufgrund der physikalischen Eigenschaften des Phenanthrens sowieso eher unwahrscheinlich - lassen sich zusätzlich durch Kontrollexperimente ausschließen (s. Kap. 5.2.5).

Die gemessenen Unterschiede lassen sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse zurückführen. Das von Braun gelieferte Standardsystem ist für aerobe Kultivierungen optimiert. Durch den Schikanekorb und die im Medium aufsteigenden Luftblasen ist unter Berücksichtigung der Rührerdrehzahl eine optimale Durchmischung gewährleistet. Im neuen System ist diese zwangsläufig ungünstiger, da nur verschiedene Elektroden und das Probenahmerohr zur Turbulenzerzeugung dienen und wesentlich weniger Luftblasen auftreten.

Trotz der etwas schlechteren Phenanthrenabbauergebnisse wurden die im folgenden dargestellten Untersuchungen mit dem neuen Begasungssystem durchgeführt, da dabei die Schaumzerstörung effektiver verlief und dadurch Bioreaktor-Kultivierungen unter Tensidzusatz erst möglich wurden.

#### 5.2.4 Wirkung eines Bypass auf den Kultivierungsverlauf im Bioreaktor

MUKHERJEE [1996] hatte bei Kultivierungen von *Enterobacter aerogenes* festgestellt, daß der Einsatz eines Bypass im Bioreaktorsystem eine starke Auswirkung auf die Kultivierungsergebnisse hatte [LINDEMANN 1998]. Daher wurden mit dem in der Arbeit eingesetzten System ebenfalls Kultivierungen mit und ohne Bypass durchgeführt, um dessen Wirkung auf den Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 testen zu können.

Die Gefahr war, daß im Bypass die Temperatur und der Sauerstoffgehalt prägnant abfallen, Phenanthren adsorbiert oder photochemisch durch die eingesetzte Fluoreszenzanalytik zersetzt werden könnte.

Abbildung 31 auf S. 101 gibt die ermittelten Phenanthren- und Proteingehalte der beiden Vergleichskultivierungen wieder.

Die Entwicklung der Biomasse ist bei beiden Ansätzen vergleichbar, während bei den Phenanthregehalten alle Werte in gewissen Grenzen, die Anfangs- und Endgehalte dagegen sehr gut übereinstimmen. Deshalb wurde der Einfluß des Bypass auf die Kultivierung von *S. yanoikuyae* B1 unter den angewendeten Bedingungen als vernachlässigbar eingestuft.

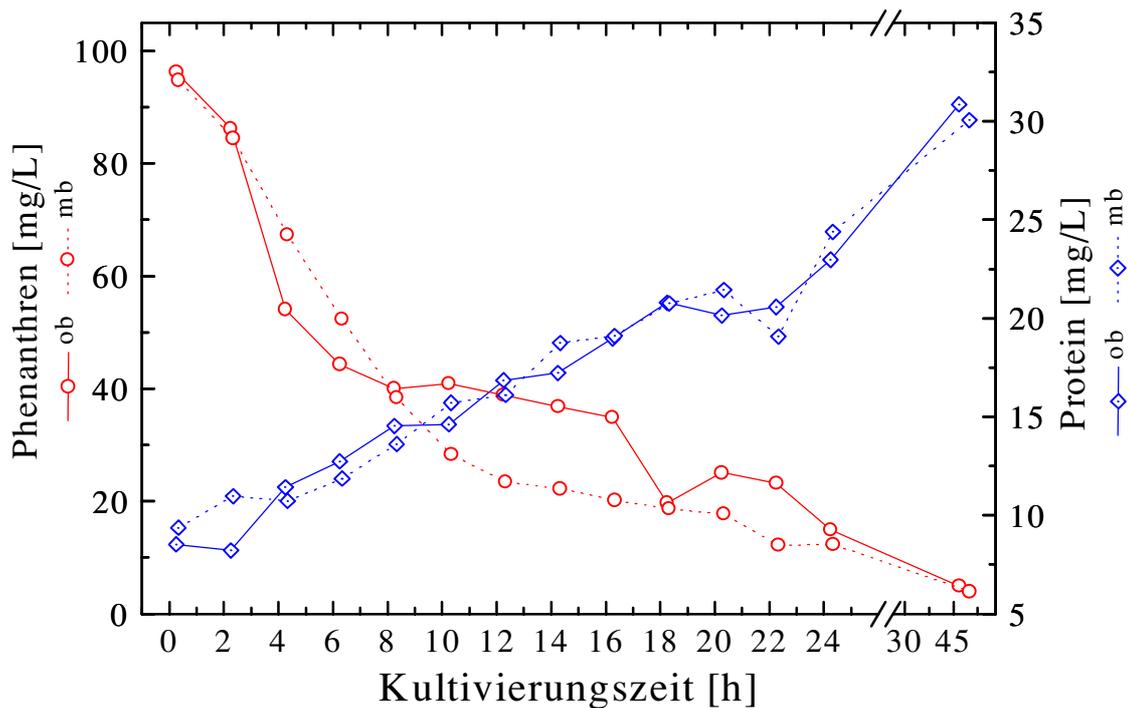


Abb. 31: Phenanthrenabbau und Biomasseentwicklung des eingesetzten Bioreaktorsystems ohne (ob) und mit (mb) Bypass (Begasungsrate: 2 L/min). Durch den Achsenbreak ergeben sich jeweils zwischen den beiden letzten Meßwerten scheinbar extremere Steigungen. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit MÜLLER [1996] durchgeführt.

Diese Aussage wird durch folgende Argumente untermauert: Durch die hohe Pumpgeschwindigkeit von 528,5 mL/min und das geringe Fassungsvermögen von 102,4 mL ist die mittlere Verweilzeit des Mediums im Bypass von etwa 12 s recht kurz (s. Kap. 3.7.5.5). Der Temperaturunterschied zwischen 28°C Kultivierungs- und 21°C Raumtemperatur ist im Vergleich zu anderen Anwendungen nicht sehr groß. Der Sauerstoffabfall im Bypass kann aufgrund des geringen Sauerstoffbedarfs der Zellen beim Phenanthrenabbau, der sich durch die sehr kleinen Änderungen der Gelöstsauerstoffkonzentrationen während der Kultivierungen zeigt, nur minimal sein. Eine Adsorption an die Glaswänden des Bypass kann ausgeschlossen werden, da sowohl der Ansatz mit als auch ohne Bypass in den ersten zwei Kultivierungsstunden einen identischen Verlauf des Phenanthrengehaltes zeigt. Durch Vorversuche wurde desweiteren gezeigt, daß der Schadstoff durch die Fluoreszenzanalytik mit einer zu vernachlässigen Rate zersetzt wird (s. Kap. 4.5).

### 5.2.5 Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 in Flüssigkultur im Bioreaktor mit Tensid

Nach Erarbeitung der notwendigen physikochemischen und biologischen Grundlagen und Etablierung eines geeigneten Reaktorsystems und Kultivierungsverfahrens konnte nun die Wirkung des Tensidzusatzes in größerem Maßstab und mit umfangreicherer Analytik durchgeführt werden.

### 5.2.5.1 Darstellung aller Kultivierungen in Flüssigkultur

Bei den Flüssigkultivierungen wurden nach der Sterilisation des Biostat B-Reaktors inklusive  $MM_{\text{Brun}}$  und weiterer Vorbereitung zuerst die Phenanthren-Stammlösung (Endkonz. 100 mg/L) und im Anschluß daran ggf. das Tensid zugesetzt. Nach einer Wartezeit wurde jeweils die entsprechend vorbereitete Bakteriensuspension zugesetzt, so daß der Anfangstiter  $1 \cdot 10^8$  *S. yanoikuyae*-Bakterien pro mL Medium betrug. Der Zeitpunkt der Inokulation markierte jeweils den Start der Kultivierung und wurde als  $t = 0$  h gesetzt. (Zur näheren Information der Durchführung siehe Kapitel 3.7.5.5.)

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick aller in diesem Abschnitt vorgestellten Flüssigkultivierungen.

Tab. 19: Übersicht der im Biostat B-Bioreaktor mit *S. yanoikuyae* B1 durchgeführten Flüssigkultivierungen mit Tensidzusatz.

Nr.	Tensid	Konzentration [mg/L]	Bemerkungen
1	-	-	Referenz
2	Texapon <sup>®</sup> N25	10	Optimaler Bereich
3	Sophoroselipide	2	unterhalb der CMC
4	"	25	oberhalb der CMC
5	"	100	oberhalb der CMC
6	"	500	oberhalb der CMC
7	"	25	ohne mikrobielle Aktivität

Anmerkung: Die Konzentrationen wurden aufgrund der Resultate der chemisch-physikalischen Voruntersuchungen und Vorkultivierungen in Schüttelkolben bestimmt (s. Kap. 4 und Kap. 5.1.6).

Auf die graphische Darstellung der Online-Daten (pH-Wert, Gelöstsauerstoffgehalt, O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Abgaswerte) wurde verzichtet, weil trotz des Einsatzes der empfindlichsten verfügbaren Meßgeräte überwiegend keine signifikanten Änderungen gemessen wurden. Dies kann sowohl auf biologische als auch apparative Ursachen zurückgeführt werden. Zum ersten sind mögliche Veränderungen der Meßgrößen aufgrund der überwiegend geringen Menge an eingesetzten Kohlenstoffquellen und den vorgegebenen Begasungsraten gering. Darüber hinaus ist die Gleichgewichtseinstellung aufgrund des modifizierten Begasungssystems verlangsamt, da nicht mehr das Medium mit Zuluft begast wurde, sondern nur noch der Kopfraum.

Bei den Kultivierungen wurde das Abgas durch mit Toluol gefüllte Waschflaschen geleitet, um die Erfassung des gestrippten Phenanthrens zu ermöglichen. Hierbei wurden bei den Kultivierungen vernachlässigbare Werte zwischen 0,5 und 3% des eingesetzten Phenanthrens nachgewiesen.

Die hier beschriebenen Versuche wurden in Kooperation mit MENGE [1996], MÜLLER [1996] oder GEBNER [1997] durchgeführt.

### 1. Referenzkultivierung ohne Tenside

Zu Beginn sollte festgestellt werden, wie der Phenanthrenabbau im vorliegenden System ohne Zusatz von Tensiden verläuft. Abbildung 32 gibt die Daten der Offline-Bestimmungen wieder.

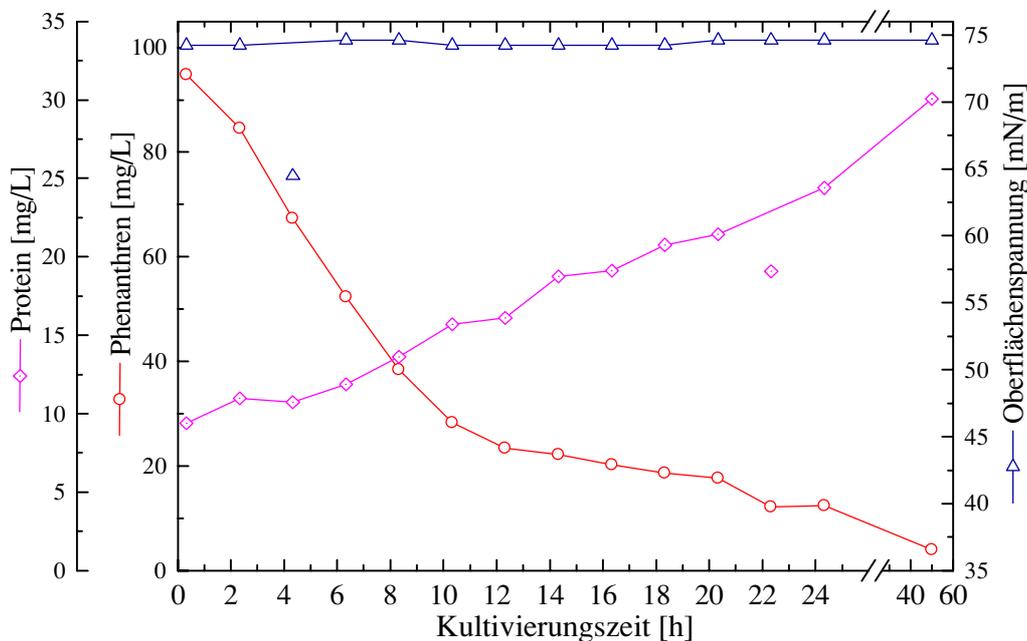


Abb. 32: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 ohne Tensidzusatz im Biostat B-Reaktor.

Der Phenanthrengehalt fällt direkt vom Versuchsbeginn an rapide ab; demgegenüber steigt die Meßgröße der Biomasse - der Proteingehalt - von Beginn an. Eine lag-Phase ist bei dieser Kultivierung nicht zu erkennen. Bis zur zehnten Stunde ist eine vergleichsweise hohe konstante Abbaurate meßbar, die danach in einen Bereich einer auf niedrigerem Niveau gleichbleibenden Rate übergeht. Der Proteingehalt steigt bis zur ca. 24. Inkubationsstunde konstant um etwa 15 mg/L an. Bis zur letzten Probenahme nach 50 h ist noch ein Anstieg um 5,8 mg/L zu verzeichnen. Änderungen der Oberflächenspannung wurden während des Bioreaktorlaufes nicht registriert.

Die Online-Messungen haben folgendes ergeben: Der pH-Wert lag während der gesamten Kultivierung bei  $6,86 \pm 0,01$  Einheiten. Der Sauerstoffgehalt lag immer über 92,5%. Parallelen zu anderen Meßgrößen sind nicht zu erkennen. Der  $\text{CO}_2$ - und der  $\text{O}_2$ -Gehalt in der Abluft zeigten keine signifikanten Änderungen.

### 2. Kultivierung mit 10 mg/L Texapon® N25

Die Konzentration wurde auf Basis der Ergebnisse des Schüttelkolbenversuchs gewählt, bei dem ein optimaler Bereich von 1 - 15 mg/L Texapon® N25, also unterhalb der CMC, festgestellt wurde (s. Kap. 3.7.5.4). Die Graphen der Meßgrößen Phenanthrenmenge, Proteingehalt, Oberflächenspannung und MBAS-Index sind in Abbildung 33 wiedergegeben.

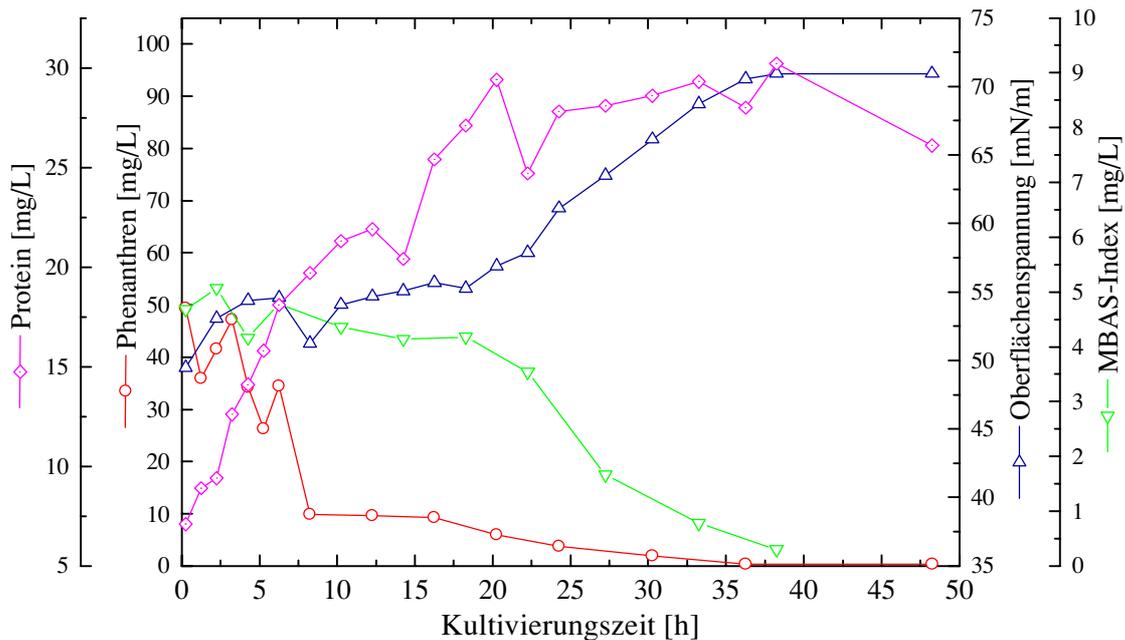


Abb. 33: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 mit 10 mg/L Texapon® N25 im Biostat B-Reaktor.

Die ersten drei Phenanthrenwerte liegen zu niedrig, da bei den entsprechenden Probenahmen durch fehlendes Nachspülen ein Teil der Schadstoffkristalle an der Pipette hängenblieb und so analytisch nicht erfaßt wurde. Es sollte daher von einem realen Anfangswert zwischen 90 - 100 mg/L im Zeitpunkt  $t_0$  ausgegangen werden, der bei den anderen Flüssigkultivierungen im Biostat B in der Regel auch vorlag. Nach 8,25 h ist ein rapider Abfall des Phenanthrengeltes festzustellen. Der Zeitraum hoher Abbauraten ist damit im Vergleich zur zuvor beschriebenen Referenzkultivierung zum einen kürzer, zum anderen wird auch ein niedrigerer Phenanthrengelhalt erreicht. Im Anschluß fällt die Schadstoffkonzentration nahezu linear bis zur 36. Stunde auf 0,3 mg/L.

Die Phasen des Phenanthrenabbaus korrelieren mit der Zunahme des Proteingehaltes, der bis zur 18. Stunde ansteigt. In den ersten 8 h ist dabei die Steigung des Graphen am höchsten, wobei sich bis zur 18. h ein Abschnitt niedrigerer Steigung anschließt. Bis zum Versuchsende ist dann nur noch eine minimale Steigung zu erkennen. Wiederum zeigen beide bisher beschriebenen Meßgrößen, daß es unter diesen Bedingungen keine lag-Phase für *S. yanoikuyae* B1 beim Phenanthrenabbau gibt.

Während die Oberflächenspannung in den ersten 18 Inkubationsstunden nur sehr minimal ansteigt und dann bis zur 36. Stunde einen Wert von über 70 mN/m erreicht, verläuft der Graph der anderen Meßgröße für die Tensidmenge, des MBAS-Indexes, nahezu spiegelbildlich. Die Verläufe beider Meßgrößen sind ein eindeutiger Beleg dafür, daß zuerst Phenanthren und dann das Tensid abgebaut wird. Durch Texapon® N25 kann unter vergleichbaren Bedingungen die Oberflächenspannung maximal bis auf auf 32 mN/m reduziert werden (s. Kap. 3.7.5.4). Die kleinste gemessene Oberflächenspannung bei dieser Kultivierung liegt bei 50 mN/m, was weit oberhalb der CMC ist (s. Kap. 4.1). Während durch den Phenanthrenabbau ein Anstieg des Proteingehaltes gemessen werden kann, wirkt sich die Tensidverstoffwechslung kaum steigernd auf die Biomasse

aus. Dies ist durch die 10fach niedrigere Ausgangskonzentration des Tensids im Vergleich zum Schadstoff zu begründen.

Rückschlüsse auf biologische Prozesse im Bioreaktor sind aufgrund der Meßgrößen der Online-Analytik kaum möglich. Der pH-Wert bleibt konstant bei 6,85; Änderungen des CO<sub>2</sub>-Gehaltes im Abgas sind ebenfalls nicht zu registrieren und auch die Schwankungen im Abgas-O<sub>2</sub>-Gehalt sind minimal. Zu Anfang fällt der Gelöstsauerstoff wie erwartet etwas ab, Korrelationen sind aber im weiteren nicht sichtbar.

### 3. Kultivierung mit 2 mg/L relativer Sophoroselipidkonzentration

Im folgenden wird die Kultivierung mit Biotensidzusatz, die unterhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration durchgeführt wurde, vorgestellt. In Abbildung 34 sind die Werte der Offline-Bestimmungen wiedergegeben. Die Oberflächenspannung liegt zu Anfang bei 40 mN/m, während bei den anderen Kultivierungen unter Einfluß von Sophoroselipiden über der CMC immer Anfangswerte von deutlich niedrigeren Werten gemessen wurden (s. folgende Kapitel).

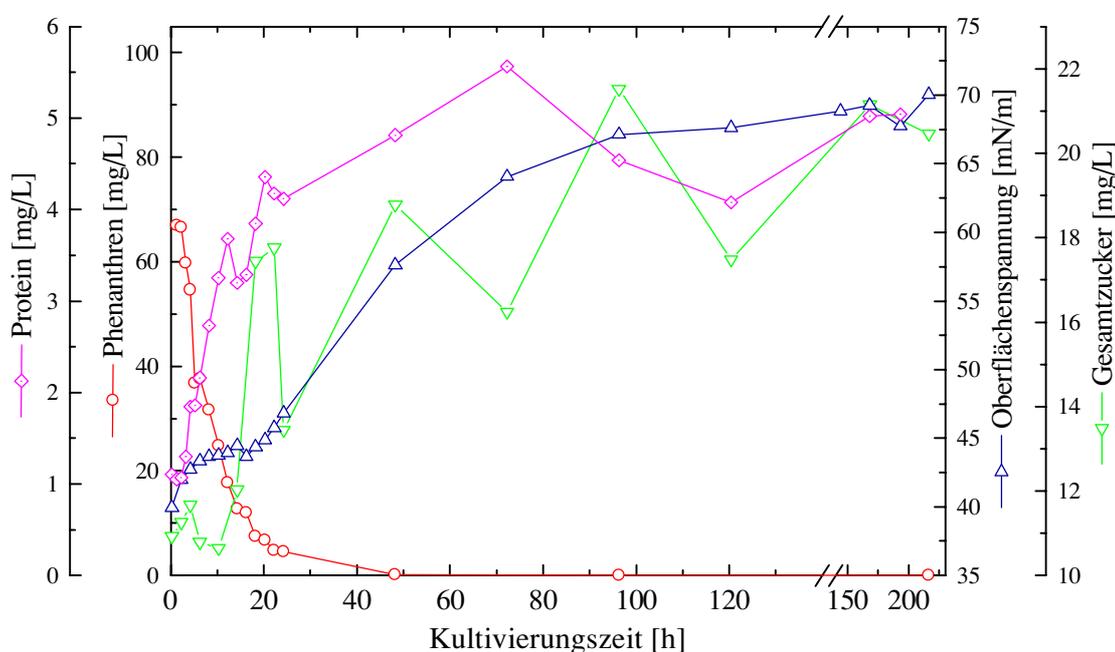


Abb. 34: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 mit 2 mg/L Sophoroselipiden im Biostat B-Reaktor.

Beim Phenanthrenabbau läßt sich bei dieser Kultivierung neben den zwei bereits beschriebenen Phasen unterschiedlicher Abbauraten auch eine lag-Phase erkennen. Die Schadstoffkonzentration liegt nämlich in den ersten zwei Inkubationsstunden konstant um 67 mg/L. Bis zur 18. h - der Phase starken Abbaus - wird dann ein Abfall bis auf 7,5 mg/L gemessen. Zur 48. h ist die Phase mit der niedrigeren Abbaurate beendet, und es werden im Anschluß Werte unter 0,1 mg/L erreicht.

Die Oberflächenspannung steigt in den ersten 18 Kultivierungsstunden nur minimal an. Diese Zunahme kann durch eine Aufnahme von Tensidmolekülen in die bakterielle Zellmembran erklärt werden (s. Kap. 5.1.3). Bis zur 120. h wird ein Wert von nahezu 70 mN/m erreicht, der dann nur

noch leicht ansteigt. Entsprechend dem Abbauversuch mit Texapon® N25 wird auch unter den hier vorliegenden Bedingungen zuerst der Großteil des Schadstoffs und im Anschluß das Tensid verstoffwechselt.

Wie der Phenanthren- bleibt auch der Proteingehalt in den ersten drei Stunden konstant und zeigt damit ebenfalls das Auftreten einer lag-Phase. Diese Meßgröße steigt dann bis zur 20. Inkubationsstunde stark an, was mit dem Phenanthren- und in gewissen Grenzen dem beginnenden Tensidverbrauch korreliert. Neben 100 mg/L Phenanthren wurde nämlich nur 2 mg/L Tensid in den Reaktor vorgelegt, weshalb die geringe Menge an Sophoroselipiden nur eine sehr geringe Proteinzunahme verursachen kann. Die daran anschließende leichte Biomassezunahme ist auf die minimale Verstoffwechslung der Sophoroselipide und des Phenanthrens - letzteres bis zu einer Restmenge von 0,05 mg/L - zurückzuführen.

Der Gesamtzuckergehalt weist aufgrund der Notwendigkeit hoher Ankonzentrierung starke Schwankungen auf, so daß hier keine gesicherten Aussagen getroffen werden können. Über den Kultivierungszeitraum nimmt er jedoch zu, was mit der ansteigenden Biomasse korreliert.

Bei den Online-Messungen fällt der Abfall des Gelöstsauerstoffgehaltes von 97,5 auf 92% von der 10. bis zur 20. h auf, was die Phase maximalen Abbaus repräsentiert. Vorher bleibt der Wert konstant; dies bestätigt neben dem Phenanthren- und Proteingehalt auch das Vorliegen einer lag-Phase. Bis zur 26. h steigt der Sauerstoffgehalt im Medium wieder auf den Ausgangswert und bleibt dann konstant. Weitere Parallelen anderer Online-Daten zum biologischen Prozeß im Bioreaktor lassen sich nicht feststellen.

#### 4. Kultivierung mit 25 mg/L relativer Sophoroselipidkonzentration

Mit einem Biotensidgehalt von 25 mg/L wurde eine Konzentration oberhalb der CMC gewählt. In Abbildung 35 sind die Verläufe der offline bestimmten Meßgrößen dargestellt.

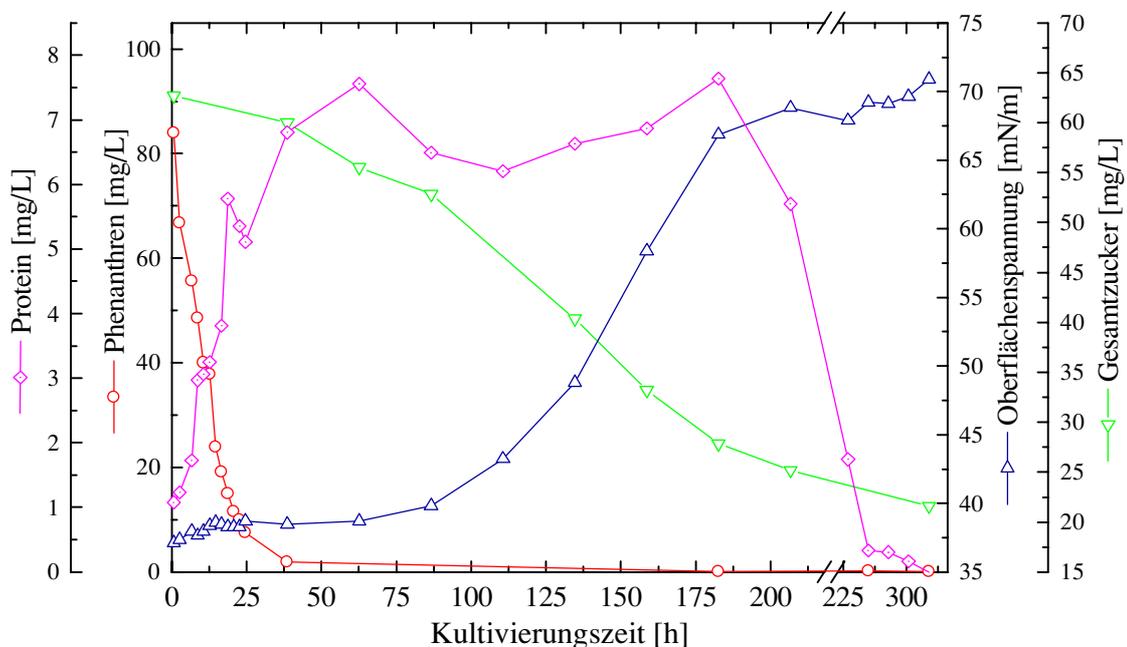


Abb. 35: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 mit 25 mg/L Sophoroselipiden im Biostat B-Reaktor.

Bei dieser Kultivierung wird Phenanthren durch *S. yanoikuyae* B1 ohne lag-Phase abgebaut. Bis zur 18. Stunde liegt ein Zeitraum mit hoher Abbaugeschwindigkeit vor, in dem der Phenanthrengehalt von 84 auf 15 mg/L abfällt. Es folgt eine Phase mit niedrigerer Abbaurrate, die nach 38 h abgeschlossen ist. Danach ist der nachgewiesene Abfall des Phenanthrengehaltes nur noch minimal.

Der Proteingehalt steigt bis zur 62. Stunde von 1 auf 7,5 mg/L an und durchläuft zur 110. h ein Minimum, das um 1,3 mg/L niedriger liegt. Danach steigt die Biomassemeßgröße bis zur 182. h wieder auf den Maximalwert, um dann nach einem rapiden Abfall zur 254. h nahe 0 zu liegen. Zu Beginn korrelieren die zunehmenden Werte mit dem Abbau des Phenanthrens; später könnten sie mit dem Abbau des Tensides zusammenhängen. Der drastische Abfall der Proteinwerte nach etwa 200 Stunden kann nicht auf ein massenhaftes Absterben von Zellen zurückgeführt werden. Zum ersten haben andere Versuche mit dem Bioreaktor gezeigt, daß *S. yanoikuyae* B1 auch länger als 300 h unter den vorliegenden Bedingungen überlebensfähig ist. Zum zweiten müßte ein Anstieg der Oberflächenspannung einsetzen, da amphiphile bakterielle Substanzen, die hauptsächlich aus der Zellmembran stammen, ins Medium gelangen würden. Zum dritten hätte es einen pH-Wert-Anstieg, der durch Freisetzung alkalischer Verbindungen der Bakterien verursacht werden würde, geben müssen. Vermutet wird daher, daß die Mikroorganismen durch Adsorptionsprozesse nicht mehr analytisch im Bioreaktor erfaßt werden können. Die Abnahme des Proteingehaltes korreliert nämlich in der betrachteten Phase mit der Oberflächenspannung: Vermutlich ändert sich nach Abbau des Tensides die bakterielle Zellhydrophobizität. Zur Verifizierung wären jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Die minimal durch Zusatz des Sophoroselipidgemisches erreichbare Oberflächenspannung wurde bei den Schüttelkolbenversuchen mit 37 mN/m bestimmt. Bei dieser Kultivierung im Biostat B wurde anfänglich der gleiche Wert gemessen. In den ersten 62 h ist ein geringer Anstieg auf 38,7 mN/m meßbar, während in den folgenden 144 h ein Wert nahe 70 mN/m erreicht wird. Anschließend steigt die Oberflächenspannung bis zum Versuchsende kaum noch. Ein Tensidabbau muß sich nicht zwangsläufig sofort auf die Oberflächenspannung auswirken. Diese ändert sich erst, wenn Konzentrationen oberhalb der CMC erreicht werden, was hier nach 62 h der Fall ist. Weitere Aussagen sollten die Daten des Gesamtzuckergehaltes geben. Bei dieser Meßgröße lassen sich drei Phasen unterschiedlicher Abnahmeraten erkennen. In den ersten 86 Stunden fällt der Gesamtzuckergehalt um  $1,2 \text{ mg/L} \cdot 10 \text{ h}$ , dann im Zeitraum bis zur 182. Stunde um  $2,6 \text{ mg/L} \cdot 10 \text{ h}$ , anschließend bis zur 206. h wieder wie in der ersten Phase. Damit stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Gesamtzuckerbestimmungen aller anderen Kultivierungen, die aufgrund der Zunahme an Biomasse immer einen Anstieg des Gesamtzuckergehaltes erkennen lassen. Für den ungewöhnlichen Verlauf kann derzeit keine Erklärung gegeben werden.

Die online gemessenen CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Abgaswerte sind, wie auch der pH-Wert, über den Kultivierungsverlauf konstant. Einzig die Gelöstsauerstoffkonzentration zeigt nennenswerte Änderungen; die beobachteten Schwankungen weisen jedoch keinen Bezug zu den biologischen Vorgängen auf und sind wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Elektrode zurückzuführen.

##### 5. Kultivierung mit 100 mg/L relativer Sophoroselipidkonzentration

Mit dem Zusatz von 100 mg/L Biotensid wurde eine im Vergleich zur vorhergehenden Kultivierung vierfach höhere Menge gewählt. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Offline-Messungen wiedergegeben.

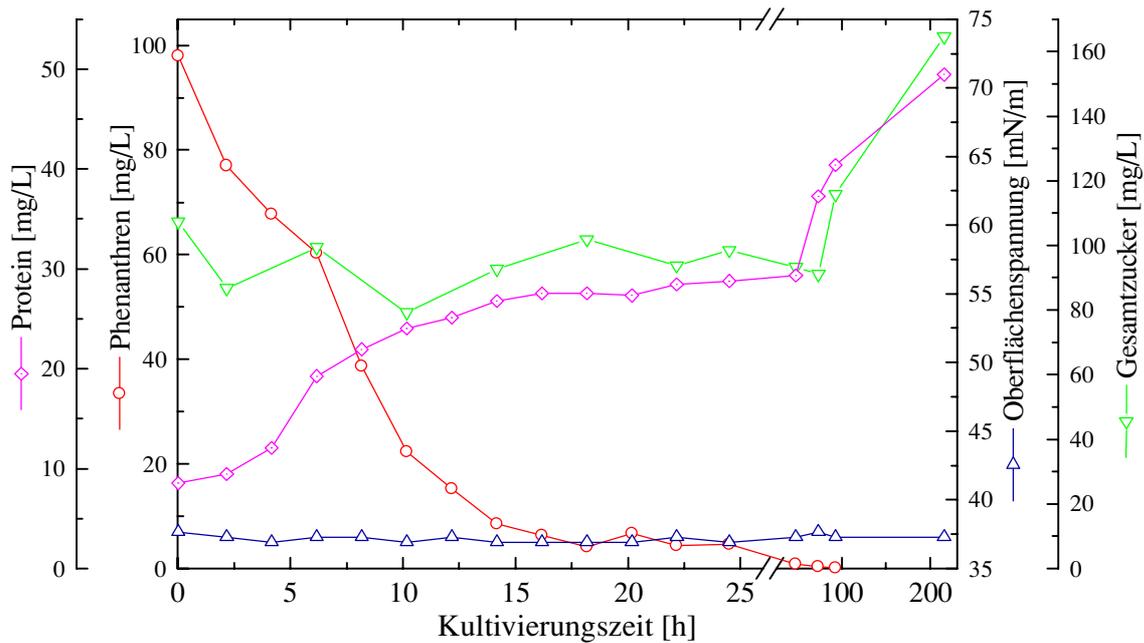


Abb. 36: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 mit 100 mg/L Sophoroselipiden im Biostat B-Reaktor.

Bei diesem Versuch ist wie beim vorhergehenden keine lag-Phase beim Phenanthrenabbau zu erkennen. Bis zur 14. Inkubationsstunde kann per GC-Analytik eine große Schadstoffabnahme von 98,0 auf 8,6 mg/L nachgewiesen werden, während im folgenden bis zur 100. Stunde ein Abbau bis auf 0,1 mg/L zu messen ist.

Der Phenanthrenabbau korreliert mit der Zunahme des Proteingehaltes, der in den ersten 14 h stark ansteigt und anschließend bis zur 48. h konstant bleibt. Der Anstieg der Biomassemeßgröße fällt hier im Vergleich zu den vorhergehend beschriebenen Kultivierungen wesentlich höher aus. So wies MÜLLER [1996] für den Versuch mit 500 mg/L Sophoroselipiden per Dünnschichtchromatographie nach, daß in den ersten 12 h bereits Verunreinigungen des Tensidgemisches verstoffwechselt werden können (s. Kap. 3.5.2.8.2). Dies fiel bei den bisher beschriebenen Kultivierungen aufgrund des geringen Biotensidgehaltes nicht ins Gewicht, wird aber mit höherem Tensidgehalt bedeutender. Nach 48 h ist wieder eine starke Zunahme des Proteingehaltes meßbar, die auf die Verstoffwechslung von Tensiden zurückzuführen ist. Dieser zweite starke Anstieg wird, wenn auch mit zeitlicher Verzögerung, ebenfalls durch die Messungen des Gesamtzuckerghaltes bestätigt.

Die Oberflächenspannung bleibt während des gesamten Versuchs konstant bei 37 mN/m, d.h. in der Kultivierungszeit nahm die Tensidkonzentration nicht soweit ab, daß sie unter die CMC erniedrigt wurde.

Die Online-Messungen lassen folgende Aussagen zu: Der pH-Wert liegt bis zur 70. Stunde gleichbleibend im Bereich von 6,89 - 6,91, danach ist die Pufferkapazität des Mediums erschöpft und die Meßgröße fällt bis zum Versuchsende auf 6,71 Einheiten. Dieser Abfall korreliert mit der Verstoffwechslung von Tensiden. Die Abgaswerte sind über die Meßdauer konstant. Der Gelöstsauerstoffgehalt fällt von 95% zu Beginn auf 89% zur 5. Kultivierungsstunde ab, was mit der starken Zunahme des Proteingehaltes und einer hohen Abnahme des Phenanthrengaltes korreliert. Im Anschluß daran steigt der Gelöstsauerstoffgehalt bis zur 9. h wieder auf nahezu 95% und bleibt dann konstant. Nach 50 h fällt er bis zum Versuchsende auf 81%, was ebenfalls auf die Verstoffwechslung des Tensides zurückzuführen sein dürfte.

### 6. Kultivierung mit 500 mg/L relativer Sophoroselipidkonzentration

Die höchste eingesetzte Tensidmenge bei Bioreaktorversuchen betrug 500 mg/L. Abbildung 37 zeigt die Offline-Daten Proteingehalt, Phenanthrenmenge und Oberflächenspannung dieser Kultivierung.

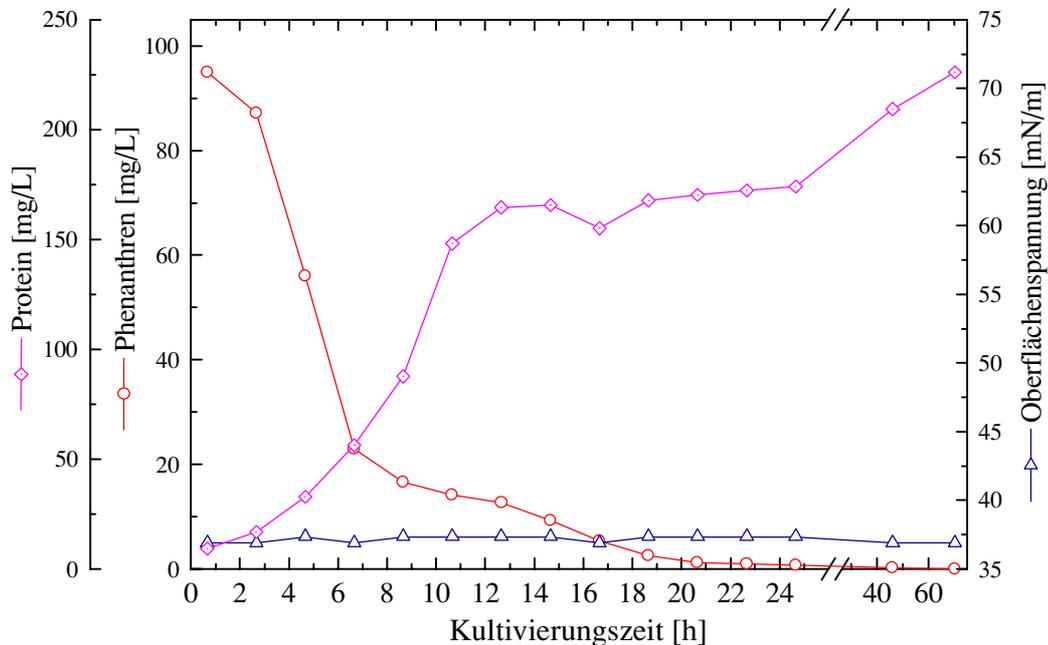


Abb. 37: Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 mit 500 mg/L Sophoroselipiden im Biostat B-Reaktor.

Innerhalb von 6 h fällt der Phenanthrengehalt bei dieser Kultivierung von 95,0 auf 23,0 mg/L; danach beginnt die bereits bei anderen Kultivierungen beschriebene Phase mit geringerer Abbaurrate. Nach 20 h kann noch 1,2 mg/L Phenanthren analytisch nachgewiesen werden; bis zum Versuchsende ist nur eine geringe weitere Abnahme meßbar.

Wie bei den vergleichbaren Kultivierungen korreliert zu Beginn der Protein- mit dem Phenanthrengehalt. Der starke Anstieg um mehr als 150 mg/L in den ersten 14 Stunden ist wie bei der Kultivierung mit 100 mg/L Sophoroselipid wohl auch Folge der Verwertung von Bestandteilen des Tensidgemisches. Dies betrifft vor allem den großen Zuwachs von der 6. bis zur 10. h, da hier nur noch wenig Phenanthren abgebaut wird. Wie bei der Kultivierung mit 100 mg/L Biotensid bereits beschrieben, ist nach einer Phase konstanten Proteingehaltes wieder ein erneuter sprunghafter Anstieg meßbar, der auf die Verwertung von Tensiden zurückzuführen ist.

Der Gesamtzuckergehalt wurde bei dieser Kultivierung nicht vermessen, da genaue Ergebnisse durch die dann notwendige hohe Verdünnung nicht erwartet wurden.

Die Oberflächenspannung weist durchgehend Werte um 37 mN/m auf; die Tensidkonzentration fällt also nicht unter die CMC.

Die gemessenen Online-Daten zeigen, daß die Änderungen aufgrund der hohen Biotensidmenge sehr viel größer sind als bei den anderen Kultivierungen. Der Gelöstsauerstoffgehalt fällt innerhalb der ersten 10 Kultivierungsstunden von 98 auf 79% ab und steigt bis zum Versuchsende auf 100%. Der Verlauf in den ersten 25 h repräsentiert den gesteigerten bakteriellen katabolen Stoff-

wechsel. Die Sauerstoffwerte im Abgas lassen keine eindeutigen Aussagen zu. Demgegenüber weist der  $\text{CO}_2$ -Gehalt im Abgas zur 10. h einen zum Gelöstsauerstoff entgegengesetzten Peak auf. Ansonsten ist diese Meßgröße konstant.

Der pH-Wert fällt in den ersten 10 Stunden von 6,76 auf 6,68 und bleibt danach konstant auf diesem Wert. Zur 40. h ist dann noch ein nicht näher erklärbarer plötzlicher Abfall um 0,04 Einheiten meßbar, der im Gelöstsauerstoff- und Sauerstoffabgasgehalt als Steigung bemerkbar ist. Sowohl der pH-Wert als auch der Gelöstsauerstoffgehalt und der  $\text{CO}_2$ -Gehalt im Abgas korrelieren also in den ersten 25 h mit den biologischen Vorgängen im Bioreaktor.

### 7. Kultivierung mit 25 mg/L relativer Sophoroselipidkonzentration ohne mikrobielle Aktivität

Um festzustellen, wieviel Phenanthren dem System durch abiotische Prozesse entzogen wird, wurde eine Kultivierung unter Zusatz einer durch intermittierendes Erhitzen abgetöteten Bakteriensuspension durchgeführt (s. Kap. 3.7.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

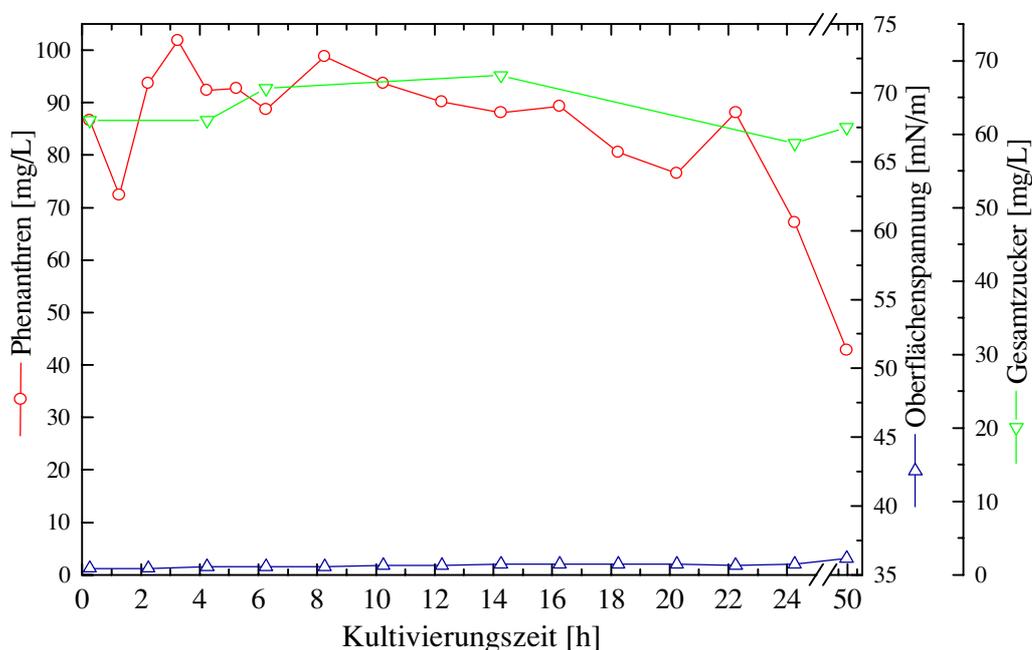


Abb. 38: Kultivierung mit 100 mg/L Phenanthren und 25 mg/L Sophoroselipiden ohne mikrobielle Aktivität im Biostat B-Reaktor.

Während die ersten drei Phenanthrenwerte stark gestreut sind, weisen die anderen Meßwerte einen linearen Verlauf auf. Die berechnete Abnahmerate beträgt  $1,3 \text{ mg/L} \cdot \text{h}$ : Nach 24 h sind noch 67,2 mg/L Phenanthren nachweisbar, nach 48 h 42,8 mg/L. Der lineare Abfall des Phenanthrengehaltes könnte auf eine Fixierung des Phenanthrens durch eine Art „Huminstoffbildung“ mit bakteriellen Zellbestandteilen zurückzuführen sein, da sich braune Ablagerungen bildeten. Stripeffekte, Autooxidation durch Licht, biologischer Abbau und Einflüsse durch die Probenahme können durch den Versuchsaufbau, Vorversuche, begleitende Untersuchungen und die vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen werden [s. auch GEBNER 1997].

Die Oberflächenspannung bleibt über den ganzen Versuch hinweg bei etwa 37 mN/m und auch der Verlauf des Gesamtzuckergehaltes weist keine bemerkenswerten Änderungen auf.

Die Online-Messungen (pH-Wert, Gelöstsauerstoffkonzentration,  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Gehalt im Abgas) verlaufen innerhalb der Meßgenauigkeit konstant.

### 5.2.5.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen: Ein Beispiel

Bei allen in diesem Abschnitt dargestellten Kultivierungen wurden mittels des F-4500 Fluoreszenz-Spektralphotometers (Hitachi, Japan), das über einen Lichtleiter an einen Bypass angeschlossen war, online 2D-Fluoreszenzspektren aufgenommen (s. Kap. 3.6.3).

In diesem Kapitel sollen anhand der Kultivierung von *S. yanoikuyae* B1 mit jeweils 100 mg/L Sophoroselipiden und Phenanthren beispielhaft die Resultate der von Marose durchgeführten Fluoreszenzuntersuchungen behandelt werden (s. Abb 36). Weitere Ergebnisse zur Fluoreszenzanalytik der in diesem Abschnitt beschriebenen *S. yanoikuyae*-Kultivierungen sind der Doktorarbeit von MAROSE [1999] zu entnehmen.

Nach der Aufnahme von 2D-Fluoreszenzspektren lassen sich durch die Berechnung von Differenzspektren Bereiche, in denen Änderungen auftreten, sehr gut identifizieren. In der Abbildung 39 sind charakteristische Differenzspektren der angesprochenen Kultivierung dargestellt. Tiefblaue Farben repräsentieren dabei Bereiche großer Abnahmen der Fluoreszenzintensitäten, während tiefrote Farben starke Zunahmen zeigen. Moderatere Änderungen werden entsprechend durch Zwischenfarben angezeigt.

Durch Voruntersuchungen, die im Kapitel 4.5 behandelt wurden, konnte gezeigt werden, daß durch die 2D-Fluoreszenzanalytik apparent gelöstes von kristallinem Phenanthren unterschieden werden kann. Das Streulicht 1. Ordnung repräsentiert unter anderem Partikel im Meßmedium und eignet sich daher bei Flüssigkultivierungen von Phenanthren als Maß für die vorhandenen Schadstoffkristalle.

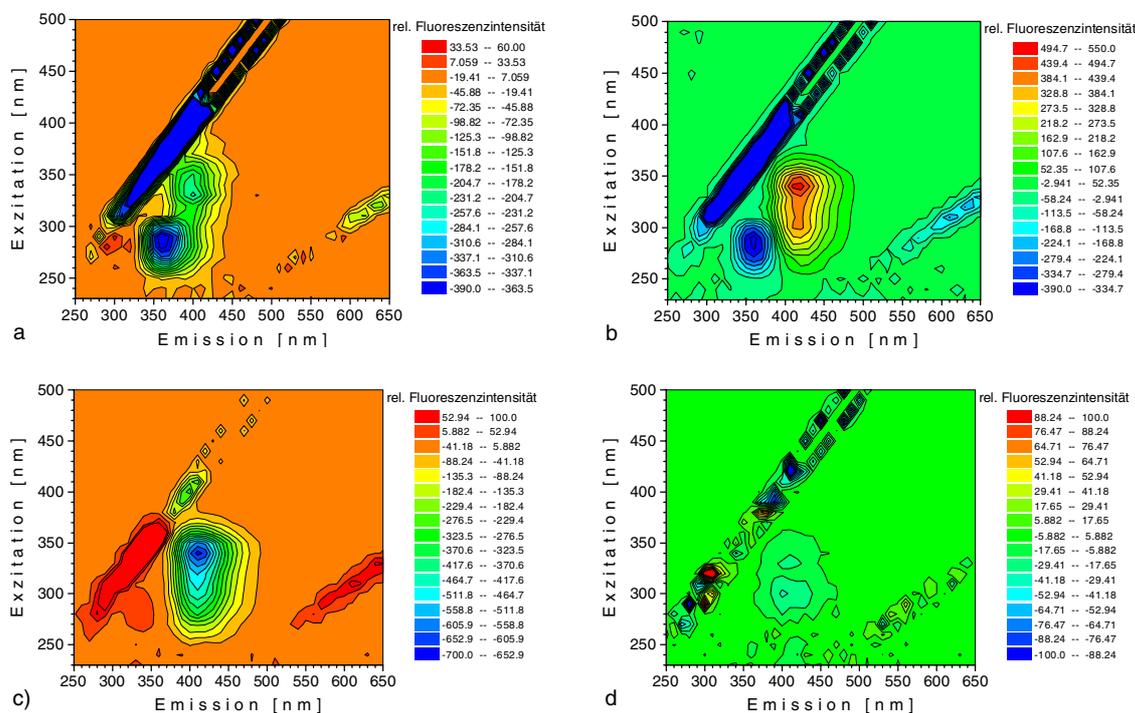


Abb. 39: Darstellung verschiedener Differenzspektren der *S. yanoikuyae*-Kultivierung im Biostat B mit 100 mg/L Phenanthren und 100 mg/L Sophoroselipiden. Jeweils drei benachbarte Fluoreszenzspektren, die bei 0, 6, 20, 24 Kultivierungsstunden aufgenommen worden sind, wurden gemittelt und für die einzelnen Differenzspektren folgendermaßen voneinander abgezogen: a) 24 h - 0 h b) 6 h - 0 h c) 20 h - 6 h d) 24 h - 20 h

Wird unter diesen Aspekten das Differenzspektrum in Abb. 39a (24 - 0 h) untersucht, so sind vor allem im Bereich des apparent gelösten Phenanthrens bei 290 nm/360 nm Abnahmen detektierbar. Das Streulicht 1. Ordnung ist tiefblau gefärbt. Auch im Bereich des kristallinen Phenanthrens ist eine Verringerung der Fluoreszenz über die 24 h meßbar. Durch dieses Differenzspektrum läßt sich zeigen, daß in allen drei Bereichen der Phenanthrenfluoreszenz Abnahmen auftreten. Durch eine zeitliche Auflösung, wie sie durch die drei anderen Spektren in Abbildung 39 repräsentiert wird, lassen sich weitere Schlußfolgerungen ziehen.

In den ersten sechs Kultivierungsstunden nimmt die Fluoreszenz des kristallinen Phenanthrens zu, die des apparent gelösten Schadstoffs ab (Abb. 39b). In den darauf folgenden 14 h nimmt vor allem die Fluoreszenz kristallinen Phenanthrens ab, während nun rote Bereiche bei der Proteinfluoreszenz detektiert werden, die die starke Zunahme der Biomasse repräsentieren (Abb. 39c). Im Zeitintervall von der 20. bis zur 24. h sind in Übereinstimmung mit den Offline-Daten nur noch geringe Änderungen zu messen (s. Abb. 36 und 39c).

Die jeweiligen charakteristischen Fluoreszenzbereiche eines Spektrums für apparent gelöstes und kristallines Phenanthren lassen sich mit mathematischen Verfahren mitteln [MAROSE 1999]. In Abbildung 40 wurde das Resultat im Vergleich mit dem durch GC-Analytik ermittelten Phenanthrengehalt für die gesamte Kultivierungsdauer aufgetragen. Dabei lassen sich die zuvor zu den Differenzspektren gemachten Angaben zeitlich besser differenzieren. In den ersten 4 Stunden fällt die Fluoreszenz des apparent gelösten Phenanthrens stark ab. Nach 6 h ist die Fluoreszenz im kristallinen Bereich auf den Maximalwert angestiegen; danach fällt sie stark ab. Der anfängliche Anstieg geht vermutlich auf die zunehmende Verkleinerung der Phenanthrenkristalle zurück. Dies wird einerseits durch die Oberflächenvergrößerung bewirkt, andererseits erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß zum Meßzeitpunkt festes Phenanthrens fluoreszenzspektroskopisch erfaßt wird [s. auch MAROSE 1999]. Das Streulicht 1. Ordnung im Bereich um 360 - 400 nm korreliert am besten mit den gaschromatographisch bestimmten Schadstoffwerten. Nach 18 h erreichen alle Graphen einen konstanten minimalen Wert.

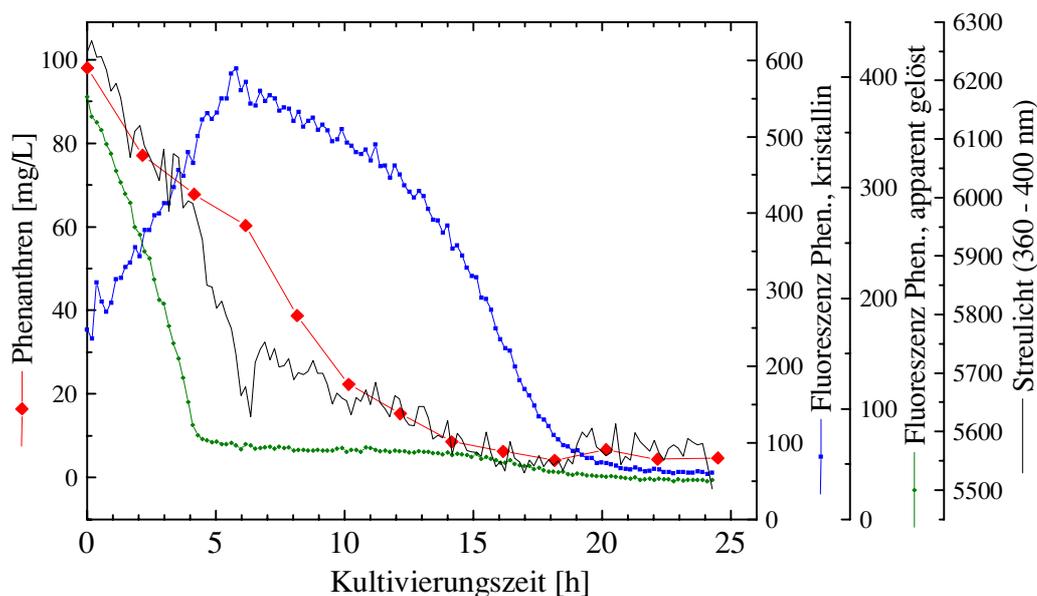


Abb. 40: Resultate der Fluoreszenzuntersuchungen der Kultivierung mit 100 mg/L Phenanthren und 100 mg/L Sophoroselipiden [MAROSE 1999].

Für den Phenanthrenabbau lassen sich aufgrund der in diesem Kapitel dargestellten Untersuchungen folgende Schlüsse ziehen.

- *S. yanoikuyae* B1 kann apparent gelöstes - also durch Sophoroselipide mizellar gelöstes und wässrig gelöstes - Phenanthren sehr schnell verstoffwechseln. Dadurch ist auch das Fehlen einer lag-Phase beim überwiegenden Teil der Kultivierungen zu erklären. Die eingesetzten *S. yanoikuyae*-Bakterien sind durch die Art der Vorkultur optimal auf den Phenanthrenabbau eingestellt und können den gesamten bioverfügbaren Schadstoff schnell verstoffwechseln. Beim Versuch mit dem Biotensidgehalt unterhalb der CMC ist dagegen eine lag-Phase erkennbar (s. Abb. 34). Der das Wachstum limitierende Schritt scheint für das vorliegende System daher der Massentransfer von kristallinem zum apparent gelösten Phenanthren zu sein und nicht der Transfer von der Mizelle in die Zelle. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen stützen dieses Resultat; es gibt jedoch auch Autoren, die den zweiten Schritt als limitierend ansehen [TIEHM 1997 und dort zit.].
- Der per GC gemessene Abfall von Phenanthren weist nur begrenzt Korrelationen mit den Fluoreszenzdaten auf. Am besten gelingt dieses, wie oben bereits beschrieben, mit Streulicht im Bereich 360 - 400 nm (s. Abb. 40). Marose [1999] zeigte, daß das auch für die anderen Tensidkultivierungen mit *S. yanoikuyae* B1 in Flüssigkultur gilt. Durch die Gaschromatographie wird das gesamte Phenanthren erfaßt, während bei der Interpretation der Fluoreszenzdaten ebenfalls die Phasenverteilung des Schadstoffs berücksichtigt werden muß.
- Wie das kristalline bzw. wässrige Phenanthren verstoffwechselt wird, ob direkt oder per Mizelle, kann mit den bisher vorliegenden Materialien nicht beantwortet werden. Dazu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

### 5.2.5.3 Vergleich des Phenanthrenabbaus bei den Kultivierungen im Flüssigmedium

Zum Abschluß wird anhand der Daten Restmenge<sub>nach 24 h</sub> und maximale Abbaurate ein Vergleich aller Flüssigkultivierungen im Biostat B vorgenommen. Die Angaben werden in Abb. 41 gezeigt.

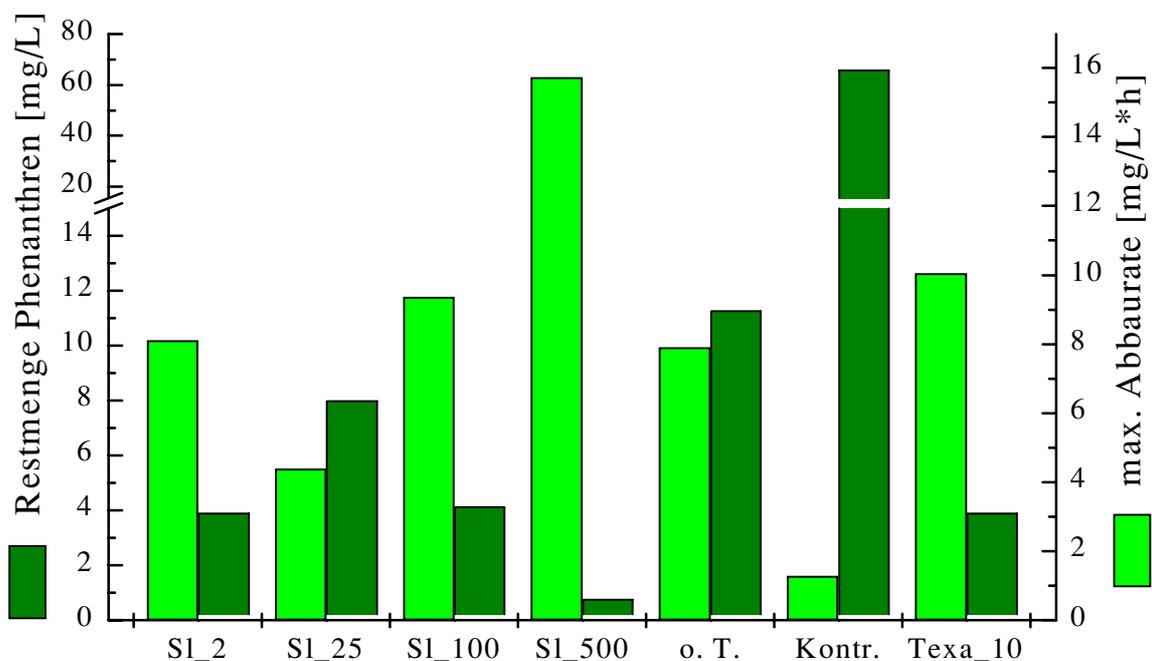


Abb. 41: Restmengen nach 24 h Kultivierung und maximale Abbauraten aller vorgestellten Biostat B-Kultivierungen im Flüssigmedium.

(S1 = Sophoroselipide, Texa = Texapon® N25, o.T. = ohne Tensidzusatz, Kontr. = Kontrolle (Kultivierung ohne mikrobielle Aktivität), angegebene Zahlen repräsentieren die jeweils eingesetzte Menge Tensid in mg/L.

Bei der Kultivierung ohne Tensidzusatz wurde eine maximale Abbaurate von 8 mg/L \* h und eine Restmenge von 12 mg/L erreicht. Im Kontrollexperiment ohne mikrobiologische Aktivität war eine maximale Phenanthrenabnahme von 1 mg/L \* h und ein Restgehalt von 67 mg/L meßbar.

Im Vergleich zur Referenz ohne Tensidzusatz wurde die Restmenge durch 10 mg/L Texapon® N25 auf ein Drittel reduziert und mit 10 mg/L \* h ebenfalls eine bessere maximale Abbaurate ermittelt.

Bei den Kultivierungen mit Biotensidzusatz weisen die nach 24 h nachweisbaren Restmengen eine Abhängigkeit auf, nämlich einen exponentiellen Abfall (mit Ausnahme der Kultivierung mit 2 mg/L,  $X^2 = 0,27284$ ). In der Vergangenheit wurden bei biologischen Sanierungsverfahren vielfach die erforderlichen Grenzwerte nicht erreicht, da die im Boden verbliebene, nicht mehr weiter abbaubare Restmenge zu hoch war. Durch den Zusatz von Tensiden - so die Vermutung nach den Kultivierungen in Flüssigkultur - könnte dieses Problem gelöst werden. Diese Aussage muß natürlich noch anhand der Bodensuspensionskultivierungen verifiziert werden (s. Kap. 5.3). Der Abbau des Schadstoffs verläuft in Flüssigkultur mit Tensidzusatz effektiver: So wurde etwa durch Zusatz von 500 mg/L Biotensid im Vergleich zur Kultivierung ohne Tensid die Restmenge<sub>nach 24 h</sub> um mehr als das zwölfwache reduziert. Ebenso steigen die maximalen Abbauraten der Kultivierungen mit zunehmender Biotensidmenge an. Die Werte mit 0, 2, 100 und 500 mg/L Biotensid weisen dabei eine lineare Abhängigkeit auf ( $R^2 = 0,99908$ ). Die bei der Kultivierung mit 500 mg/L gemessene Abbaurate liegt beispielsweise doppelt so hoch, wie die der Kultivierung ohne Tensidzusatz.

Vergleichbare PAK-Abbaukurven unter Zusatz oberflächenaktiver Substanzen werden auch von anderen Autoren beschrieben. So etwa bei SOEDER et al. [1996], die den Einfluß eines pflanzlichen Biotensids auf den Bioabbau von Phenanthren und Fluoranthren untersuchten. ZHANG und Mitarbeiter [1997] testeten den Einfluß von Rhamnolipiden auf den Bioabbau von Phenanthren und konnten ebenfalls steigende Abbauraten und fallende Restmengen mit steigender Tensidkonzentration nachweisen.

Sowohl durch Texapon als auch durch Sophoroselipide können also im Vergleich zur Kontrolle ohne Tensidzusatz mit dem vorhandenen System deutlich bessere Abbauergebnisse erzielt werden. Die bei den Schüttelkolbenexperimenten erzielten Ergebnisse lassen sich dabei im Bioreaktor reproduzieren.

### **5.3 Ergebnisse der Kultivierungen von *S. yanoikuyae* in 10%iger Bodensuspension im Bioreaktor**

Zum Abschluß der Arbeit wurde der Einfluß von Sophoroselipiden auf den mikrobiellen Schadstoffabbau in 10% Bodensuspension untersucht. Dazu wurden Kultivierungen mit lebenden Bakterien mit und ohne Zusatz des Biotensidgemisches durchgeführt. Ein weiteres Experiment sollte Aufschluß darüber geben, wieviel Phenanthren über den Kultivierungszeitraum durch abiotische Prozesse verloren geht und analytisch nicht mehr nachweisbar ist. Für diesen Versuch wurde dem Kultivierungsmedium Natriumazid zugesetzt, was sich zur Sterilisation des Bodens als einzig wirksame Methode herausstellte (s. Kap. 3.7.1). Darüber hinaus wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine Suspension zugesetzt, die wie bei der entsprechenden Flüssigkultivierung durch intermittierendes Erhitzen sterilisiert war (s. Kap. 5.2.5.1).

Die Durchführung der Versuche erfolgte prinzipiell analog zu den Flüssigkultivierungen. Der vorbehandelte Boden wurde jeweils mehrere Stunden vor Inokulation mit  $1 \cdot 10^8$  *Sphingomonas*-Bakterien/mL Suspension in den zuvor autoklavierten Bioreaktor gefüllt. Phenanthren und Tensid wurden der Bodensuspension vergleichsweise kurz vor Versuchsbeginn, der durch den Zeitpunkt der Inokulation festgelegt wurde, zugesetzt. Dies war nötig, um das Wachstum autochthoner Schadstoffabbauer nicht zu fördern (s. Kap. 3.7.5.5). Ebenso wurde die Probenahme im Vergleich zu der der Flüssigkultivierungen modifiziert; sie ist ausführlich in Kapitel 3.7.5.5.3 beschrieben.

Durch die Erfassung einer Vielzahl weiterer Meßgrößen sollten bei den Bodensuspensionskultivierungen weiterführende Aussagen ermöglicht werden. Zusätzlich zu den bei entsprechenden Flüssigkultivierungen analysierten Meßgrößen wurden noch der Gehalt an DOC, Phosphat, Nitrit, Nitrat und Ammonium sowie die Anzahl der KBE und die Dehydrogenaseaktivität gemessen. Im DOC wurde die Menge organischer Verbindungen erfaßt, die nach Abzentrifugation des Bodens noch im Überstand vorlagen. Es kann sich dabei um Bestandteile des Sophoroselipidgemisches, Schadstoff und Abbauprodukte, organische Verbindungen des Bodens oder Bakterien bzw. Bestandteile von ihnen handeln. Die Messung der Konzentrationen verschiedener anorganischer Stoffe sollte zusätzliche Aussagen über den bakteriellen Stoffwechsel ermöglichen. Neben dem Proteingehalt wurden die beiden anderen Biomassemeßgrößen - Ermittlung der KBE und Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität - untersucht, um zu klären, welche Methode für weitere Kultivierungen am geeignetsten ist. Online-Fluoreszenzmessungen wurden jedoch nicht durchgeführt, da aufgrund der Bodenpartikel im Medium kein Bypass eingesetzt werden konnte.

### 5.3.1 Phenanthrenabbau ohne Zusatz von Sophoroselipiden

Die Meßergebnisse der Bodensuspensionskultivierung im Biostat B mit 100 mg/L Phenanthren ohne Zusatz von Tensiden werden in vier Graphiken dargestellt. Abbildung 42 veranschaulicht die Offline-Daten Phenanthren, DOC, Oberflächenspannung und Gesamtzucker.

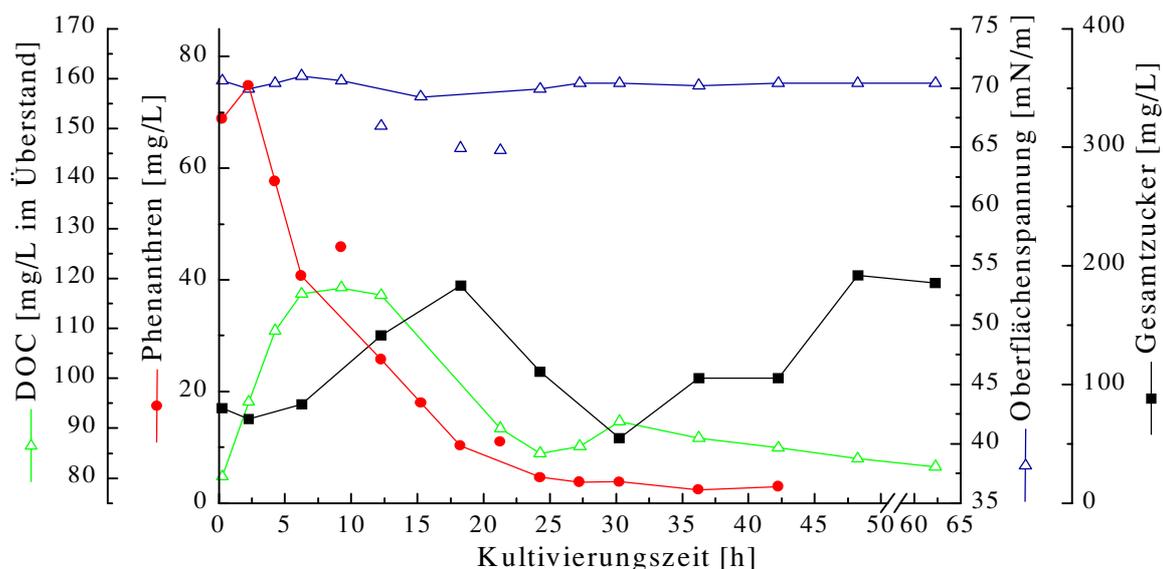


Abb. 42: Phenanthrenabbau in 10% Bodensuspension ohne Zusatz von Sophoroselipiden: Offline-Daten organischer Verbindungen inklusive der Oberflächenspannung.

In den ersten zwei Kultivierungsstunden steigt die analytisch nachweisbare Phenanthrenmenge von 68,8 auf 74,8 mg/L. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Anstieg wird in Kap. 5.3.3 im Zusammenhang mit der Kontrollkultivierung gegeben. Im Anschluß an den Anstieg ist ein starker Abfall sichtbar: Nach 27 h werden noch 3,7 mg/L Phenanthren im Medium nachgewiesen, anschließend gibt es nur noch einen leichten Abfall.

Der DOC im Überstand steigt in den ersten 6 Stunden, bleibt dann für weitere 6 Stunden konstant und fällt bis zur 24. h wieder ab. Danach durchläuft diese Meßgröße noch ein kleines Maximum und fällt bis zum Ende der Kultivierung wieder leicht ab. Auf den Verlauf des DOC wird bei der Behandlung der Biomassemeßgrößen noch einmal eingegangen.

Wie auch bei den Flüssigkultivierungen liegt die Oberflächenspannung von Medien ohne Tensidzusatz immer bei Werten über 70 mN/m.

Der Gesamtzuckergehalt liegt in den ersten zwei Kultivierungsstunden bei 75 mg/L und steigt dann zur 18. h um über 100 mg/L an. Bis zur 30. h wird ein starker Abfall detektiert; danach ist bis zum Versuchsende ein erneuter Anstieg erkennbar. Wenngleich zu Beginn konstante Werte ebenfalls eine lag-Phase andeuten, so erscheint die Methode der Gesamtzuckerbestimmung für Bodenproben aufgrund der vielen Störstoffe nur bedingt geeignet zu sein. Dies wird durch die entsprechenden Messungen bei der Kultivierung mit Sophoroselipiden bestätigt (s. Kap. 5.3.2).

In Abbildung 43 sind die Resultate der verschiedenen Verfahren zur Biomassebestimmung gegen die Phenanthrenkonzentration aufgetragen. Dabei handelt es sich um die Dehydrogenaseaktivität, die Anzahl an KBE und den Proteingehalt. Alle Bestimmungen wurden nicht mit dem Überstand, sondern direkt mit der Suspension durchgeführt, um ebenfalls am Boden adsorbierte Mikroorganismen mitzuerfassen.

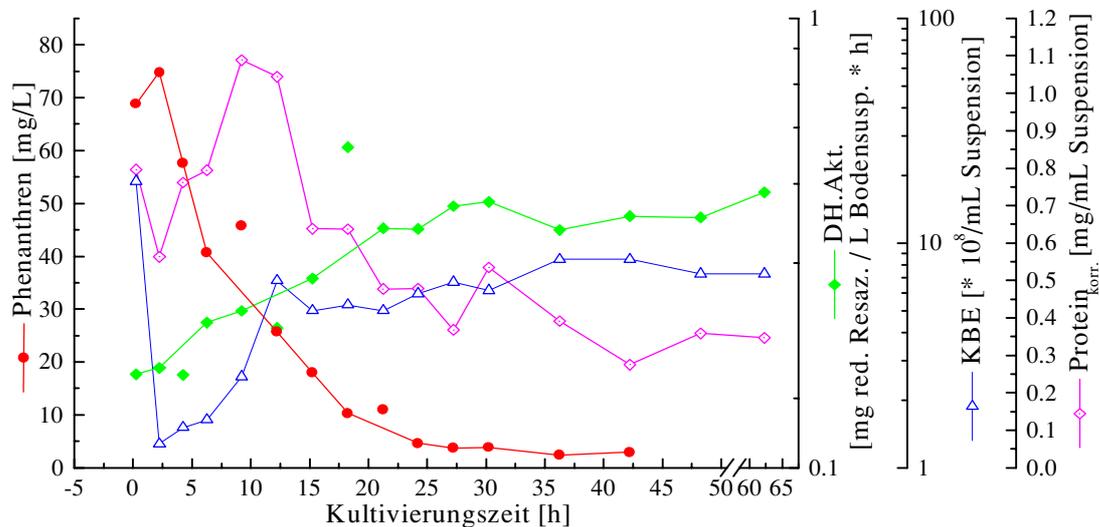


Abb. 43: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension ohne Zusatz von Sophoroselipiden: Verschiedene Bestimmungsmethoden des mikrobiellen Wachstums im Vergleich zum Phenanthrenegehalt.

Die Dehydrogenaseaktivität bleibt in den ersten zwei Kultivierungsstunden konstant und steigt dann bis zur 27. h auf einen Wert, der bis zum Kultivierungsende weitgehend konstant bleibt. Die Kurve der Anzahl an koloniebildenden Einheiten verläuft dazu nahezu parallel; demgegenüber ist beim Proteingehalt ein ganz anderer Verlauf zu erkennen, nämlich ein Anstieg bis zur 10. h und dann ein Abfall. Die Meßwertzunahme der ersten beiden Bestimmungsmethoden korreliert mit dem abnehmenden Phenanthrengehalt. Darüber hinaus bleiben alle drei Meßgrößen nach 30 h konstant. Dies beweist, daß die Abnahme der Schadstoffkonzentration durch mikrobielle Verwertung und nicht durch abiotische Faktoren erfolgt.

Die Proteinbestimmung, mit der bei den Flüssigkultivierungen gute Ergebnisse erzielt wurden, ist zur Vermessung von Bodensuspensionsproben aufgrund der vielen im Boden vorhandenen Störstoffe weniger geeignet. Dagegen liefern unter diesen Bedingungen sowohl die Messung der Dehydrogenaseaktivität als auch die Ermittlung der Zahl der KBE gute Resultate zur Bestimmung des mikrobiellen Wachstums. Aufgrund des einfacheren Verfahrens und des geringeren Materialverbrauchs wird der Aktivitätstest für weitere Kultivierungen empfohlen.

Der Verlauf des DOC in den ersten 27 Stunden korreliert mit dem bakteriellen Stoffwechsel, da diese Meßgröße zu Zeiten starken Phenanthrenabbaus hoch ist und mit fallender Schadstoffkonzentration abnimmt. Dieser DOC-Verlauf könnte durch desorbierte Schadstoffe und/oder Metabolite verursacht werden.

In Abbildung 44 sind die Ergebnisse der verbleibenden Offline-Bestimmungen des Phosphats und der Stickstoffverbindungen dargestellt.

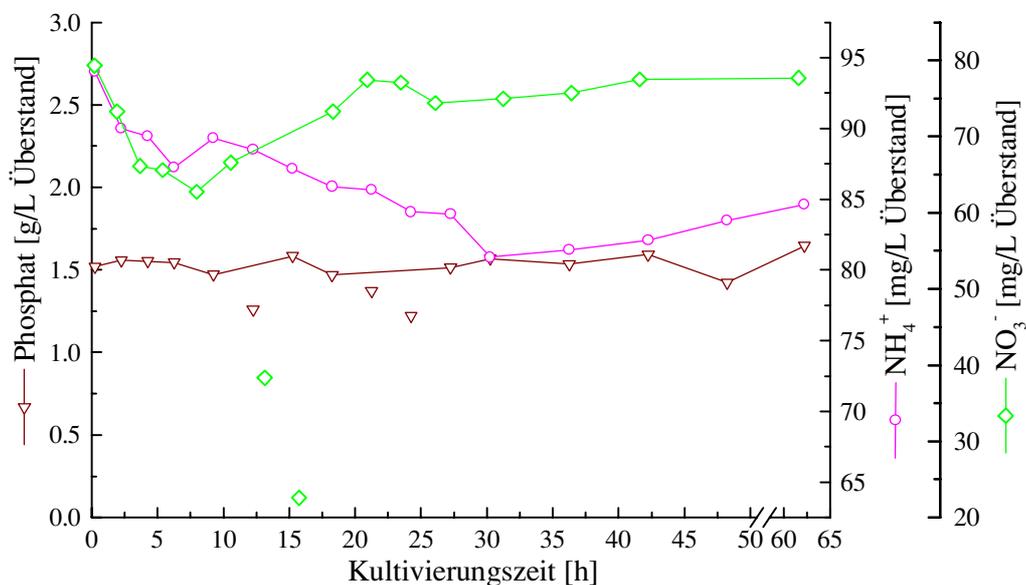


Abb. 44: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension ohne Zusatz von Sophoroselipiden: Offline-Daten von Phosphat und Stickstoffverbindungen im Überstand.

Die Phosphatkonzentration bleibt für die Dauer der ganzen Kultivierung konstant um 1,55 g/L. Sowohl der Ammonium- als auch der Nitratgehalt fallen in den ersten Kultivierungsstunden ab. Während sich die NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Abnahme bis zur 30. Stunde fortsetzt, ist sie beim NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nur bis zur 9. Stunde meßbar. Jeweils darauf folgend zeigen beide Meßgrößen eine steigende Tendenz. Beim Wachstum nutzen die Bakterien das Ammonium, das direkt in die Zelle aufgenommen und

verstoffwechselt werden kann [SCHLEGEL 1992]. Der Verbrauch dieser Meßgröße korreliert mit der durch die Schadstoff- und Biomassebestimmungen ermittelten Wachstumsphase. Demgegenüber zeigt der Graph des Nitratgehaltes eine zum DOC spiegelbildliche Entwicklung, für die noch keine Erklärung gefunden wurde. Wie im Kap. 3.5.2.5.1 gezeigt wurde, konnte Nitrit nicht im Medium nachgewiesen werden. Dieses wird bei Bodensuspensionskultivierungen meist nur dann gebildet, wenn anaerobe Verhältnisse vorliegen [BRINKMANN 1997]. Bei allen Bodensuspensionskultivierungen trat jedoch kein Sauerstoffmangel auf.

Die Resultate zeigen, daß genügend Stickstoffverbindungen zum mikrobiellen Wachstum in der 10%igen Bodensuspension mit  $MM_{\text{Brun.}}$  vorhanden sind.

Die letzte Abbildung zu dieser Kultivierung gibt die online aufgenommenen Meßgrößen wieder.

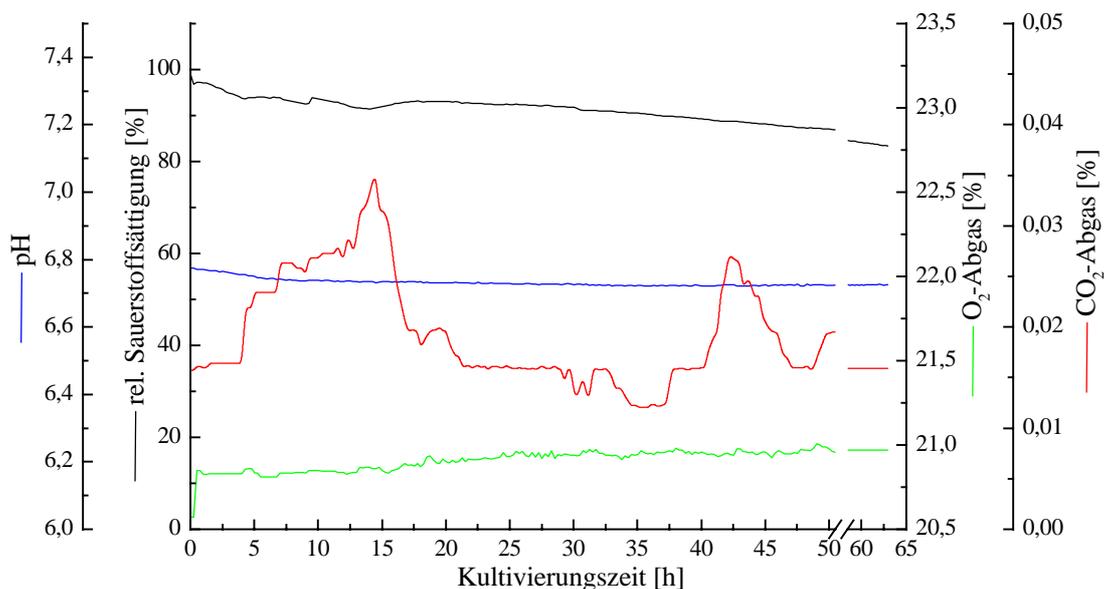


Abb. 45: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension ohne Zusatz von Sophoroselipiden: Online-Daten.

Die relative Sauerstoffsättigung weist über den gesamten Kultivierungszeitraum einen nahezu linearen Abfall auf, wobei bis zur 15. Kultivierungsstunde geringe Schwankungen sichtbar sind. Dieser Verlauf deutet eher auf abiotische Einflüsse hin, wie z.B. die zunehmende Verunreinigung oder Beschädigung der Elektrodenmembran. Starke Änderungen des Sauerstoffgehaltes wurden bei den entsprechenden Kultivierungen im flüssigen Medium ebenfalls nicht registriert (s. Kap. 5.2.5.1).

Der pH-Wert liegt innerhalb der Meßgenauigkeit konstant bei Werten um 6,75, was auf den pH-neutralen Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 und die Pufferkapazität des Bodens zurückzuführen ist.

Der Verlauf des  $CO_2$ -Gehalts im Abgas weist bei der 15. und der 42,5. Stunde Maxima auf, die jedoch nicht mit den biologischen Vorgängen im Bioreaktor korreliert werden können. Der  $O_2$ -Gehalt im Abgas zeigt eine minimale Steigung, die - wie bei der relativen Sauerstoffsättigung - eher auf abiotischen Faktoren basiert.

### 5.3.2 Phenanthrenabbau mit 100 mg/L Sophoroselipid-Zusatz

Bei dieser Kultivierung in Bodensuspension wurden neben 100 mg/L Phenanthren auch 100 mg/L Sophoroselipide zugesetzt. Damit lag die Tensidkonzentration über der für diese Bedingungen ermittelten CMC (s. Kap. 4.1). Diese Kultivierung wurde in Zusammenarbeit mit GEBNER [1997] durchgeführt.

In der ersten Abbildung (Nr. 46) sind die Meßgrößen Phenanthren, DOC, Gesamtzucker und Oberflächenspannung aufgetragen.

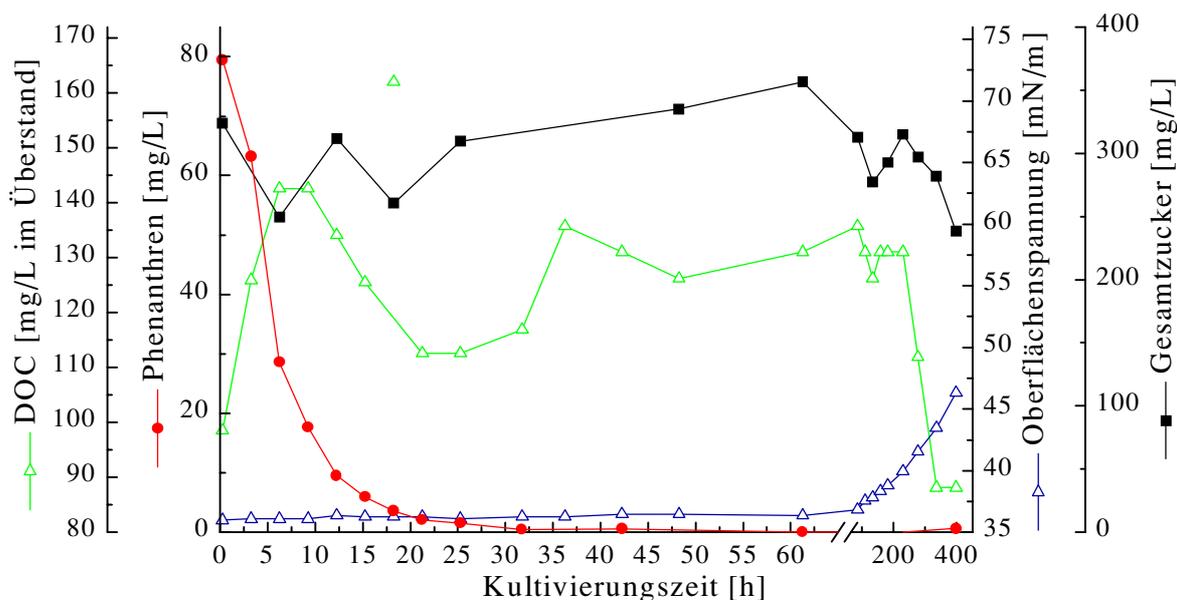


Abb. 46: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension mit 100 mg/L Sophoroselipiden: Offline-Daten organischer Verbindungen inklusive der Oberflächenspannung.

Der Phenanthrengehalt nimmt ohne eine lag-Phase innerhalb von 18 h von 80 auf 4 mg/L ab. Bei dieser Kultivierung werden somit Werte unter 4 mg/L 9 Stunden früher als beim Referenzversuch ohne Tensid erreicht. Im Anschluß daran fällt der Schadstoffgehalt bis nahe 0 mg/L ab (s. auch Kap. 5.3.3).

Beim Vergleich der DOC-Meßergebnisse mit denen der Referenzkultivierung fällt der parallele Verlauf in den ersten 50 h auf: Konstante Werte folgen wieder einem drastischen Anstieg in den ersten Stunden; nach einem Abfall bis fast auf den Ausgangswert ergibt sich ein erneutes Maximum, dem dann leicht abfallende Meßergebnisse folgen. Aufgrund des Tensidzusatzes liegen die gemessenen DOC-Werte im Durchschnitt 20 - 30 mg/L höher als die der Referenzkultivierung. Auch hier hängen vermutlich die gemessenen Werte mit dem mikrobiellen Stoffwechsel zusammen (s. Kap. 5.3.1).

Die Oberflächenspannung liegt zu Beginn bei Werten um 37 mN/m, womit der auch bei Flüssigkultivierungen durch Sophoroselipidzugabe minimal detektierbare Wert erreicht wurde. Die Meßgröße steigt nach der 100. Kultivierungsstunde an. Diese Zunahme ist durch mikrobiellen Abbau des Tensidgemisches auf Konzentrationen unterhalb der CMC zu erklären.

Wie bei der Referenzkultivierung ohne Tenside streuen die ermittelten Gesamtzucker-Meßwerte stark, was die unbefriedigende Einsetzbarkeit dieser Methode bei Bodensuspensionsproben bestätigt.

In Abb. 47 ist der Phenanthrengehalt gegen die Biomassemeßgrößen aufgetragen.

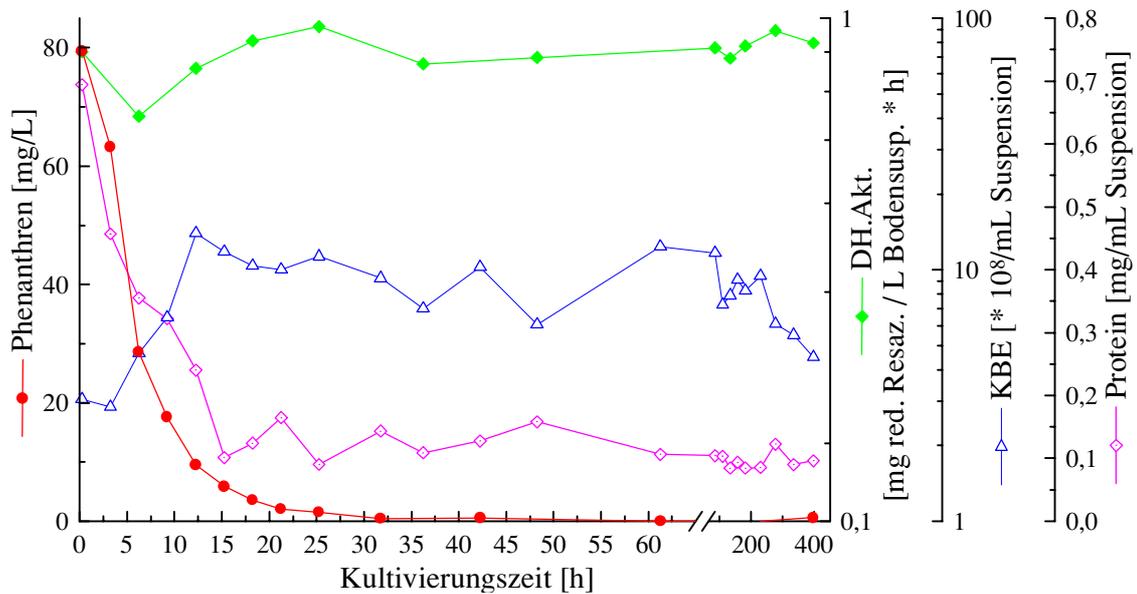


Abb. 47: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension mit 100 mg/L Sophoroselipiden: Verschiedene Bestimmungsmethoden des mikrobiellen Wachstums im Vergleich zum Phenanthrengehalt.

Die Dehydrogenaseaktivität steigt in den ersten 25 Stunden an und korreliert damit - wie bei der Kultivierung ohne Tensid - mit dem Phenanthrengehalt. Danach bleiben die Aktivitätswerte wieder vergleichsweise konstant. Die Zunahme in „mg reduzierten Resazurin/L \* h“ erfolgt in einer der Referenzkultivierung ohne Tenside vergleichbaren Größenordnung. Der durch die Oberflächenspannung nachgewiesene Tensidabbau wirkt sich offensichtlich nicht auf die Dehydrogenaseaktivität aus.

Die Zahl der KBE steigt in den ersten Stunden ebenfalls an, danach streuen die Meßwerte vergleichsweise stark. Diese Streuung geht auf die ungenauere Durchführung im Vergleich zur Referenzkultivierung zurück.

Die Proteinwerte weisen einen Verlauf auf, der eher dem der Phenanthrenabbaukurve ähnelt. Diese ist tendenziell auch bei den Proteinwerten des Versuchs ohne Tensid zu erkennen, was jedoch derzeit nicht erklärt werden kann.

Die Ergebnisse der Bestimmung anorganischer Verbindungen im Überstand sind in Abbildung 48 dargestellt.

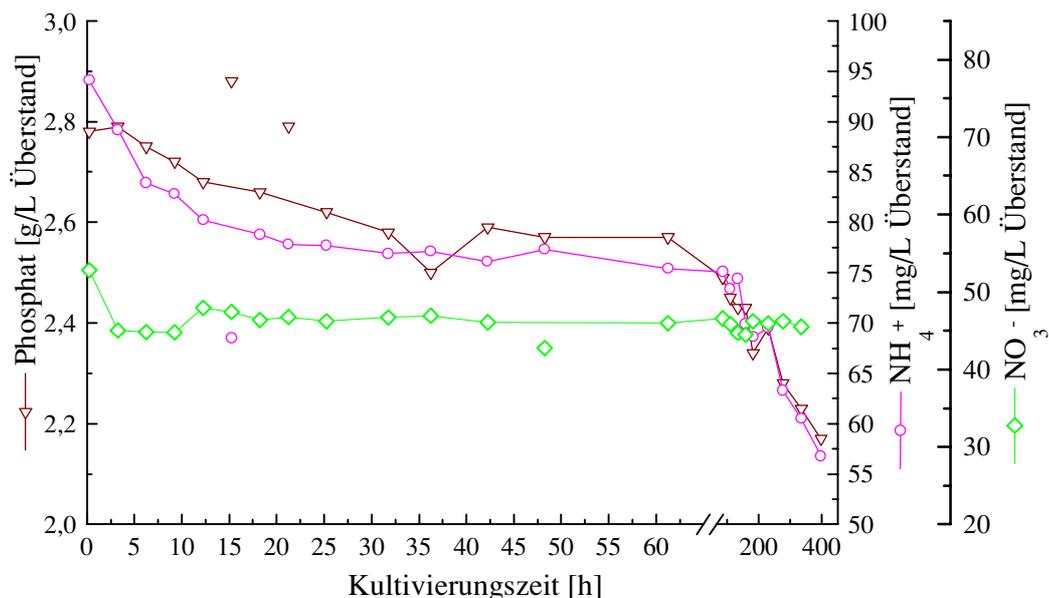


Abb. 48: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension mit 100 mg/L Sophoroselipiden: Offline-Daten von Phosphat und Stickstoffverbindungen im Überstand.

Die Nitratkonzentration im Überstand nimmt in den ersten 2 Stunden um 8 mg/L ab und bleibt danach bei 45 mg/L konstant. Die Graphen des Phosphat- und Ammoniumgehaltes verlaufen nahezu parallel. In den ersten 30 Kultivierungsstunden weisen beide Meßgrößen einen auf den Phenanthrenabbau zurückzuführenden Abfall auf. Bis zur etwa 70. h sind sie dann konstant. Danach korrelieren  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NO}_3^-$  mit dem Tensidabbau, denn mit steigender Oberflächenspannung fallen die gemessenen Konzentrationen beider Verbindungen im Überstand ab. Sowohl Phosphat als auch Ammonium können direkt von Bakterien für ihren Stoffwechsel verwertet werden [SCHLEGEL 1992]. Durch den Verlauf der Ammonium- und Phosphatkonzentrationen läßt sich zeigen, daß bis zur 30. Kultivierungsstunde der Schadstoff und nach einer lag-Phase von etwa 20 h das Tensid verbraucht wird.

Die Graphen der online detektierten Meßgrößen pH, relative Sauerstoffsättigung und der Konzentrationen von  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  im Abgas werden in Abb. 49 gezeigt.

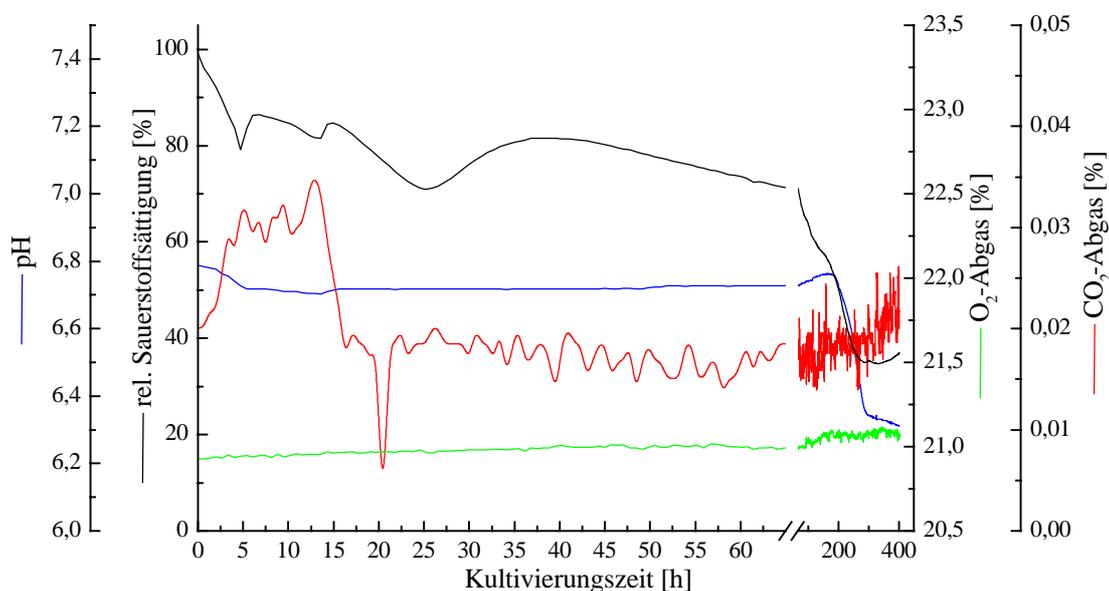


Abb. 49: Phenanthrenabbau in 10%iger Bodensuspension mit 100 mg/L Sophoroselipiden: Online-Daten.

Die rel. Sauerstoffsättigung im Medium nimmt in den ersten 5 Kultivierungsstunden von 99 auf 78% ab und korreliert hier - anders als bei der Referenzkultivierung ohne Tenside - mit dem Phenanthrenabbau. In den nächsten 1,5 Stunden steigt die Meßgröße auf 86% und fällt bis zur 13,5. h auf 81%. Dieser Verlauf wiederholt sich im Anschluß, jedoch langsamer. Nach etwa 70 h ist dann ein rapider Abfall bemerkbar, der durch Verunreinigungen auf der Elektrodenmembran bedingt ist.

Der pH-Wert fällt zu Beginn minimal von 6,79 auf 6,72 und bleibt dann konstant. Nach etwa 180 h fällt diese Meßgröße auf 6,3 Einheiten ab, was wahrscheinlich auf die Verschmutzung der Membran durch Bodenpartikel zurückzuführen ist. Durch Flüssigkultivierungen wurde ermittelt, daß der Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 pH-neutral verläuft, während der Verbrauch des Tensides mit einem Abfall des pH-Wertes verbunden ist (s. Kap. 5.2.5.1 und Kap. 5.3.1). Neben dem Medium ist jedoch auch noch Boden vorhanden, der als starker Puffer wirken kann, so daß pH-Wert-Änderungen sehr unwahrscheinlich sind.

Die CO<sub>2</sub>-Abgaswerte schwanken stark. Sie liegen in den ersten 20 h höher als danach. Zusammen mit dem Gelöstsauerstoffgehalt kann somit eine erhöhte bakterielle Stoffwechselaktivität durch den Phenanthrenabbau nachgewiesen werden. Demgegenüber bleibt der O<sub>2</sub>-Abgaswert während der gesamten Kultivierung konstant.

### 5.3.3 Vergleich der Phenanthrenabbaukurven bei den Bodensuspensionskultivierungen

Abschließend werden die Phenanthrenabbaukurven beider Bodensuspensionskultivierungen im Vergleich mit den Ergebnissen des Blindversuchs dargestellt (s. Abb. 50).

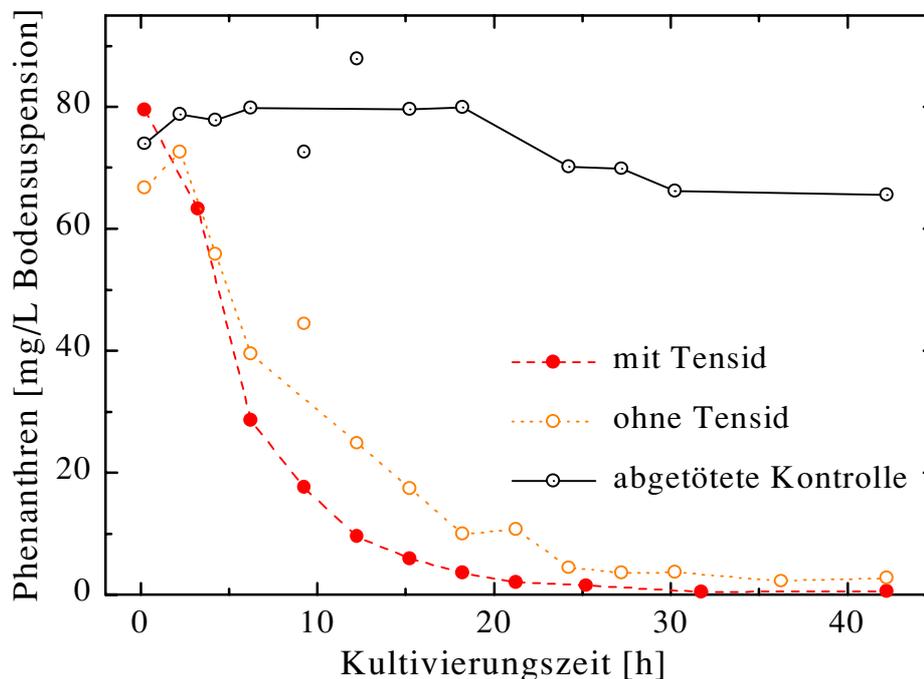


Abb. 50: Phenanthrenabbaukurven der verschiedenen *S. yanoikuyae*-Kultivierungen in Bodensuspension.

Beim Kontrollversuch ohne biologische Aktivität ist in den ersten zwei Stunden ein geringer Anstieg des Phenanthrengehaltes meßbar. Danach bleibt die Schadstoffmenge in den nächsten 16 h bei etwa 79 mg/L konstant. In den darauf folgenden 12 h fällt der Phenanthrengehalt auf

66,2 mg/L und bleibt danach wieder konstant. Die anfänglich meßbare Zunahme des analytisch nachweisbaren Phenanthrens ist in vergleichbarer Größenordnung auch bei der biotensidfreien Kultivierung aufgetreten. Das legt den Schluß nahe, daß durch Zusatz von vitaler Bakterien-suspension oder entsprechenden Zelltrümmern Phenanthrenmoleküle vom Boden desorbiert werden können. Dies sollte ebenfalls bei der Kultivierung mit Tensidzusatz auftreten, wird aber wahrscheinlich durch den schnellen Abbau apparent gelösten Schadstoffs überdeckt, was auch durch die Fluoreszenzuntersuchungen bei den Flüssigkultivierungen gezeigt werden konnte (s. Kap. 5.2.5.2). Aus diesem Grund ist wohl auch bei der Biotensidkultivierung keine lag-Phase zu detektieren. Desweiteren ist durch Tensidzusatz eine maximale Abbaurate von 127 mg/L Bodensuspension \* 10 h gemessen worden, die der Referenzkultivierung ohne Tensid liegt dagegen bei 80 mg/L Bodensuspension \* 10 h. Wie bei den Flüssigkultivierungen lassen sich auch wesentlich niedrigere Restmengen erreichen (s. Kap. 5.2.5.3). So ist nach 36 h bei der Kultivierung mit Tensid nahezu 5mal weniger Phenanthren nachzuweisen als in der Referenzkultivierung (0,5 im Vergleich zu 2,3 mg/L Bodensusp.).

Ein direkter Vergleich mit dem bei Flüssigkultivierungen ermittelten Phenanthrenabbau ist aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen aber nur eingeschränkt möglich. So haben beispielsweise Voruntersuchungen gezeigt, daß etwa 25% Phenanthren innerhalb von 22 h so an den Boden festgelegt wird, daß es analytisch nicht mehr nachweisbar ist (s. Kap. 4.2).

Auch bei den Kultivierungen mit Bodensuspension kann im untersuchten System der mikrobielle Phenanthrenabbau durch Zugabe von Sophorolipiden gefördert werden: Wieder lassen sich Restmengen reduzieren und Abbaugeschwindigkeiten steigern.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Hauptgegenstand dieser Doktorarbeit war die Untersuchung des Einflusses von Tensiden auf den mikrobiellen Abbau geringlöslicher Schadstoffe, die zu den Problemfällen mikrobiologischer Bodensanierungsvorhaben gehören. Zu Beginn stand die Etablierung eines Systems, mit dem Untersuchungen auf diesem Arbeitsgebiet durchgeführt werden konnten. Folgende Komponenten kamen dabei zum Einsatz:

- Als Schadstoff wurde **Phenanthren** gewählt, das sich durch eine vergleichsweise geringe Toxizität und einen für die Gruppe der schwerlöslichen PAK exzellenten Modellcharakter auszeichnet.
- Aus einer Gruppe von sieben Bakterien wurde durch Wachstumstests mit *S. yanoikuyae* B1 ein GRAM-negativer Vertreter ermittelt, der über eine gute Phenanthrenabbaukapazität verfügt und in Böden und Gewässern weit verbreitet ist.
- Nach Voruntersuchungen wurde **Texapon® N25** (ein Natriumdodecylethersulfat) als Vertreter eines synthetischen Tensids gewählt. Eine Literaturrecherche ergab, daß die Wirkung dieses anionischen oberflächenaktiven Sulfates auf den mikrobiellen Schadstoffabbau bisher nicht getestet wurde. Das Tensid findet aber aufgrund guter Eigenschaften in der Industrie breite Anwendung.

Als Biotensid wurde ein **Sophoroselipidgemisch** eingesetzt, das vom Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt und dort durch eine zweistufige Kultivierung von *Candida bombicola* gewonnen wurde. Neben Rhamnoselipiden sind Sophoroselipide die am besten untersuchten Biotenside des Glycolipidtyps, die zudem kostengünstig erworben werden können. Der Einsatz verschiedener Biotensidgemische beim mikrobiellen Schadstoffabbau wurde bereits mit widersprüchlichem Erfolg getestet.

- Der eingesetzte Boden wurde vom Institut für Biochemie der Technischen Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt. Er wurde dort bereits intensiv untersucht und als **sandiger Schluff** charakterisiert.
- Für die Kultivierungen sollte neben Standardgefäßen auch ein Biostat B-Reaktorsystem eingesetzt werden. Ein Problem stellte dabei jedoch die starke tensidbedingte Schaumentwicklung dar, für dessen Lösung seitens des Herstellers nur chemische Methoden vorgesehen waren. Diese konnten aufgrund der Beeinträchtigung der Tensidwirkung nicht eingesetzt werden. Durch die Entwicklung eines **modifizierten Begasungssystems** konnte jedoch eine effektive Schaumzerstörung erreicht werden.

Eine weitere Voraussetzung für die Untersuchungen war die Erarbeitung geeigneter Analysemethoden. Zum ersten waren bereits bestimmte Methoden am Institut geläufig, die ohne großen Aufwand übernommen werden konnten. Zum zweiten mußte die Anwendbarkeit verschiedener etablierter Verfahren bei PAK-, tensid- oder bodenhaltigen Proben ermittelt werden. Zum dritten mußten ebenfalls neue Analysemethoden erarbeitet werden. Im folgenden sind die wichtigsten Resultate dieser Arbeiten zusammenfassend dargestellt.

- **Mikroskopische Auszählung**, Messungen der **optischen Dichte** und Standardverfahren zur Bestimmung von **Protein** liefern mit den PAK- und/oder tensidhaltenden Kultivierungsproben keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Der käuflich erworbene Bio-Rad *Detergent Compatible* Protein Assay erlaubt zuverlässige Bestimmungen der Biomasse in den vorliegenden

Flüssigproben. Aufgrund der vielen Störstoffe kann damit jedoch nicht der Proteingehalt bodenhaltiger Proben vermessen werden, was die Etablierung einer weiteren Methode erforderlich machte (s. nächsten Punkt).

- Die Bestimmung sowohl der **Zahl der KBE**, als auch der **Dehydrogenaseaktivität** erwiesen sich zur Erfassung des mikrobiellen Wachstums in den vorliegenden Bodensuspensionsproben als geeignet. Die erste Methode hat jedoch die Nachteile eines großen Agarplattenverbrauchs und einer anspruchsvolleren und störungsanfälligeren Durchführung.
- Zur Bestimmung des Tensidgehaltes wurden verschiedene Verfahren etabliert. Zur Messung der **Oberflächenspannung** konnte ein Ringtensiometer in Betrieb genommen werden. Die Messung des **MBAS-Index** nach vorhergehender Membranfiltration zur Abtrennung der Mikroorganismen eignet sich zur Bestimmung des Texapons<sup>®</sup> N25 in flüssigen Proben. Zur Bestimmung der Sophoroselipide wurden die **Dünnschichtchromatographie** und die **Anthronmethode** eingesetzt. Während erstere nur qualitative Aussagen zuläßt, dient letztere zur spezifischen quantitativen Bestimmung von Hexosen. Dadurch war zwar die Messung des relativen Sophoroselipidgehaltes in Stammlösungen möglich, bei Flüssigkultivierungsproben wurden jedoch bakterielle Hexosen miterfaßt. Die Anthronmethode liefert bei Bodensuspensionsproben aufgrund der vielen Störstoffe keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Anwendbarkeit der Messung des MBAS-Index in bodenhaltigen Proben wurde nicht getestet.

In einem nächsten Schritt wurden verschiedene chemisch-physikalische Parameter der eingesetzten Tenside und des Phenanthrens unter Versuchsbedingungen ermittelt. Die Ergebnisse waren für die Auslegung der Kultivierungen und Interpretation der dabei erhaltenen Resultate relevant.

- Die **kritischen Mizellbildungskonzentrationen** des eingesetzten Sophoroselipidgemischs und des Texapons im Mineralsalzmedium waren 4,0 und 60,6 mg/L. Dies ließ eine bessere Wirkung des Biotensids beim Schadstoffabbau vermuten. In Gegenwart des Bodens war die CMC des Sophoroselipidgemischs mit 45,5 mg/L wesentlich höher als in reinem Flüssigmedium, was auf die zusätzlichen Wechselwirkungen mit den Bodenpartikeln zurückzuführen ist.
- Wird 100 mg/L Phenanthren zu einer vergifteten 10% Bodensuspension zugesetzt, so ist innerhalb von 30 min nur noch 80% des Schadstoffs GC-analytisch nachweisbar. Nach 4 Tagen ist dieser Wert um weitere 10% gesunken, bleibt in der Folge aber konstant. Die Ergebnisse dieser **Phenanthrenanalytik** konnten bei den Kultivierungsexperimenten reproduziert werden.
- Die **Festlegung der Sophoroselipide** an den eingesetzten Boden wurde per Oberflächenspannung gemessen. Einem Anstieg in den ersten drei Stunden steht ein anschließender Abfall gegenüber, der nicht erklärt werden kann. Der ermittelte gewichtsbezogene **Solubilisierungskoeffizient** betrug im  $MM_{\text{Brun}}$  232,0 mg Phenanthren pro g rel. Sophoroselipidkonzentration. Dies ist ein im Vergleich zu kommerziellen synthetischen Tensiden eine Verbesserung um den Faktor 10 [TIEHM 1994, WODARCZAK 1997].
- Aufgrund seines aromatischen Charakters eignet sich das Phenanthren gut zur Erfassung durch die **2D-Fluoreszenzspektroskopie**. Während das Mineralsalzmedium und die eingesetzten Tenside - wie erwartet - nicht fluoreszieren, liefert dieser Schadstoff Peaks hoher Intensität. Unter den bei den Kultivierungen eingesetzten Bedingungen konnte eine photolytische Zersetzung des PAKs nicht detektiert werden.

Bei Flüssigkultivierungen sind durch Online-Fluoreszenzmessungen Aussagen über den Abbau des Schadstoffs, vor allem auch über dessen Phasenverteilung möglich. So kann zwischen mizellar und wässrig gelöstem Phenanthren auf der einen und kristallinem Schadstoff auf der anderen Seite unterschieden werden. Zusätzlich konnte die Fluoreszenzintensität eines Streulichtbereichs gut mit der mittels Gaschromatographie bestimmten Phenanthrenkonzentration korreliert werden.

Bei Bodensuspensionskultivierungen war die 2D-Fluoreszenz nicht meßbar, was auf die vorhandene Spektrometersausstattung zurückgeführt wurde. So wiesen eine Huminsäure bzw. der verwendete Braunschweiger Boden keine Fluoreszenzpeaks auf; auch zugesetztes Phenanthren konnte - wenn überhaupt - nur minimal detektiert werden.

Vor den Versuchen im Bioreaktor wurden einige Kultivierungsexperimente in Schüttelkolben durchgeführt. Dadurch können in kürzerer Zeit mehr unterschiedliche Bedingungen getestet werden. So konnten beispielsweise schnell Aussagen über die bei den Bioreaktorexperimenten optimal einzusetzenden Tensidkonzentrationen gewonnen werden.

- Das leicht flüchtige **Dichlormethan** wurde zur reproduzierbaren und schnellen Zugabe der PAK zu den Kultivierungsmedien genutzt. Dabei stellte sich durch entsprechende Untersuchungen in Schüttelkolben heraus, daß diese Lösemittel in den eingesetzten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf *S. yanoikuyae* B1 zeigten.
- Darüber hinaus wurde auch die **Toxizität der eingesetzten Tenside** getestet. Dabei kam einerseits ein Plattendiffusionstest und andererseits der logarithmische Wachstumstest zum Einsatz. Der erste erlaubt den Test einer großen Menge unterschiedlicher Mikroorganismen in vergleichsweise kurzer Zeit, der andere ist dafür empfindlicher und besser an die Bedingungen der Kultivierungen angepaßt.

Bei den Plattendiffusionstests wiesen sowohl die Sophoroselipide als auch Texapon<sup>®</sup> N25 bei den getesteten GRAM-positiven Bakterien die größten Wirkungen auf. GRAM-negative Mikroorganismen waren aufgrund ihrer äußeren Membran unempfindlicher gegenüber den eingesetzten Tensiden. Bei den Pilzen konnte demgegenüber keine toxische Wirkung festgestellt werden. Bei *S. yanoikuyae* B1 wurden beim Ansatz mit Texapon<sup>®</sup> N25 in Konzentrationen bis 1 g/L keine Hemmhöfe gemessen, während eine minimale toxische Wirkung durch die Sophoroselipide ab Konzentrationen über 100 mg/L festgestellt wurde. Durch den logarithmischen Wachstumstest mit dem gleichen Bakterium wurden andere Ergebnisse gewonnen. Beim Texapon<sup>®</sup> N25 wurden ab 100 mg/L wachstumshemmende Wirkungen festgestellt, während bei den Sophoroselipiden im Ansatz mit 1.000 mg/L sogar eine Biomassezunahme im Vergleich zur Referenz ermittelt wurde.

Die bei den beiden Toxizitätstests ermittelten differierenden Ergebnisse beim Stamm *S. yanoikuyae* B1 mit den gleichen Tensiden wurden auf die Physiologie zurückgeführt. Die Wirkung der Tenside ist folglich abhängig davon, ob die Testbakterien in der stationären Phase wie beim Plattendiffusionstest oder in der exponentiellen Phase wie beim logarithmischen Wachstumstest mit den oberflächenaktiven Substanzen konfrontiert werden.

Bei Mengen bis 75 mg/L sind bei beiden Tensiden keine inhibitorischen Effekte zu erwarten, während bei höheren Konzentrationen die Versuchsbedingungen ausschlaggebend sind.

- Auch nach **zehnfachem sukzessiven Überimpfen** auf nicht-schadstoffhaltiges Medium bleibt die Zahl der *S. yanoikuyae*-Bakterien, die Phenanthren abbauen können, konstant. Deshalb liegen die Gene für die phenanthrenabbauenden Enzyme vermutlich nicht auf einem Plasmid,

sondern auf dem „Bakterienchromosom“. Während in den Vorkulturmedien neben Glucose auch Phenanthren als Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde, kann in Zukunft auf die Zugabe des Schadstoffs verzichtet werden.

- Durch **Flüssigkultivierungen in Schüttelkolben mit den Tensiden** konnte gezeigt werden, daß Konzentrationen von 1 - 15 mg/L Texapon<sup>®</sup> N25 den mikrobiellen Abbau von Phenanthren fördern. Dieses lag unter der für die vorliegenden Bedingungen ermittelten CMC. Bei den Ansätzen mit Sophoroselipden wurden im Bereich von 1 - 1.000 mg/L bessere Abbaugerichte als in der Referenz ermittelt. Während der gesteigerte Phenanthrenabbau in Gegenwart von Texapon<sup>®</sup> N25 auf einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit basiert, waren die Biomassezunahmen bei den Ansätzen mit den Sophoroselipden sehr hoch. Die Frage, ob der verbesserte Abbau durch eine tensidbedingte Löslichkeitssteigerung oder einfach durch das starke mikrobielle Wachstum verursacht wurde, konnte aufgrund der vorliegenden Versuchsergebnisse daher nicht beantwortet werden.

Neben den Arbeiten mit *S. yanoikuyae* B1 wurde auch ein Mikroorganismenkonsortium durch Anreicherung auf einem Gemisch dreier polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe gewonnen. Durch eine Kultivierung im Schüttelkolben konnte die Phenanthren- und Pyrenabbaufähigkeit der angereicherten Kultur nachgewiesen werden. Im betrachteten Zeitraum war jedoch keine Verstoffwechslung des Benzo[ghi]perylens nachzuweisen.

Mit den durch die Experimente in Schüttelkolben erhaltenen Ergebnissen konnten Experimente im Bioreaktor durchgeführt werden. Dieser läßt den Einsatz von mehr Analytik, wie etwa die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, zu. Zusätzlich konnte der zeitliche Verlauf des Schadstoffabbaus besser verfolgt werden, da in Schüttelkolben keine reproduzierbare Probenahme PAK-haltiger Medien möglich war.

- Um Bioreaktorversuche in einer vertretbaren Zeit durchführen zu können, wurden zu Beginn Versuche mit **unterschiedlichen Animpfdichten** vorgenommen. Mit einem Inokulum von  $1 \cdot 10^8$  *S. yanoikuyae*-Bakterien/mL wurde der überwiegende Teil des Phenanthrens innerhalb von 24 h abgebaut. Daher wurden alle folgenden Kultivierungen mit diesem Anfangstiter durchgeführt.
- Ein nächstes Experiment mit dem Bioreaktor ergab, daß der durch die Vorkultur an Phenanthren adaptierte Stamm *S. yanoikuyae* B1 den **Schadstoff auch in Gegenwart von Glucose abbaut**. Beide Kohlenstoffquellen werden gemeinsam verstoffwechselt; der PAK-Abbau ist dabei dem der Ansätze ohne Kohlenhydrat vergleichbar. Das Bakterium sollte also auch in Gegenwart von Tensiden oder von bei Bodensanierungen häufig verwendeten weiteren Zuschlagstoffen wie etwa Stroh oder Borke den Schadstoffabbau nicht einstellen.
- Das **neue Begasungssystem** zur Schaumzerstörung führt zu einer leichten Verlangsamung des Phenanthrenabbaus im Bioreaktor. Dieses wurde auf die schlechtere Durchmischung zurückgeführt: Zum einen steigen im Medium durch die Überkopf-Begasung keine Luftblasen mehr auf, zum anderen wurde zur Vermeidung zusätzlicher Schaumbildung ebenfalls der Schikankorb entnommen. Der Vorteil dieses modifizierten Reaktorsystems war jedoch eine effektive Schaumzerstörung, so daß Kultivierungen mit Tensidzusatz im Biostat B dadurch erst möglich wurden. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung fand dennoch statt.
- Für die Online-Fluoreszenzuntersuchungen wurde ein **Bypass** eingesetzt. Eine Auswirkung auf die Kultivierungsergebnisse konnte dabei nicht festgestellt werden.

- Der Phenanthrenabbau im **Bioreaktor mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen im flüssigen Medium** ergab zu den bereits mit Schüttelkolben erzielten Ergebnissen vergleichbare Resultate: Alle eingesetzten Konzentrationen führten ebenfalls zu niedrigeren Restmengen nach 24 h. Dabei wurde Texapon<sup>®</sup> N25 in einer Konzentration von 10 mg/L und Sophoroselipide in 2, 25, 100, 500 mg/L getestet. Darüber hinaus wurden auch bessere maximale Abbauraten gemessen.  
Durch die bei den Flüssigkultivierungen vorgenommenen Fluoreszenzuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß der Stamm *S. yanoikuyae* B1 durch Sophoroselipide apparent gelöstes Phenanthren sehr schnell verstoffwechseln kann. Die bei den Schüttelkolbenversuchen unklare Ursache für den effektiveren Phenanthrenabbau in Gegenwart des Biotensids kann dementsprechend wie beim Texapon<sup>®</sup> N25 durch die tensidbedingte Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Schadstoffs erklärt werden. Der optimal an den PAK adaptierte Stamm *S. yanoikuyae* B1 kann apparent gelöstes Phenanthren ohne lag-Phase verstoffwechseln, wie dies durch die Kultivierungen mit den Sophoroselipiden oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration gezeigt werden konnte. Bei Tensidkonzentrationen unterhalb der CMC wurde demgegenüber eine lag-Phase registriert.
- In der Bodensuspension war durch Biotensidzusatz ebenfalls ein gesteigerter Abbau meßbar. Die analytisch nachweisbare Restmenge konnte dabei auf nahezu 0 mg/L Phenanthren reduziert werden: Dies ist für die praktische Anwendung sehr wichtig, da bei biologischen Verfahren häufig große, nicht mehr abbaubare Restmengen im Boden verbleiben. Auch in der Bodensuspension wird zuerst Phenanthren und im Anschluß daran das Tensid verstoffwechselt.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein System etabliert, mit dem weitere Untersuchungen zum tensidgesteigerten Abbau schwerlöslicher Schadstoffe durchgeführt werden können. Zum einen könnten damit mehr fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen, zum andern auch praxisbezogenere Experimente durchgeführt werden.

1. Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie hat sich als gute Methode erwiesen, den Abbau des Schadstoffs und dessen Verteilung bei Flüssigkultivierungen zu verfolgen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zum Phenanthrenabbau in flüssigem Medium wurden fluoreszenzspektroskopisch gut untersucht und die Ergebnisse mit verschiedenen mathematischen Methoden ausgewertet [HILMER 1996, MAROSE 1996 und 1999, WEI 1998, PEKELER 1998]. Bei den Sophoroselipiden konnte durch die Fluoreszenzspektroskopie gezeigt werden, daß mizellar gelöster Schadstoff sehr gut verstoffwechselt werden kann. Texapon<sup>®</sup> N25, das unterhalb seiner CMC abbausteigernde Wirkung hat, ist nur in einer Kultivierung im Bioreaktor eingesetzt worden. Weitere Experimente mit 2D-Fluoreszenzspektroskopie könnten hier Aufschluß über den Wirkungsmechanismus dieses Tensids geben.  
Bisher wurde das Tensid dem Medium immer vor der Inokulation zugesetzt. Bei Insitu-Sanierungen wird das Tensid jedoch ständig in kleinen Mengen zugesetzt, daher sollte auch die intermittierende Tensidzugabe mit dem etablierten System getestet werden [s. auch MAROSE 1999].
2. Zur Erhöhung des Praxisbezuges könnten Kultivierungen unter Tensidzusatz mit dem isolierten Mikroorganismenkonsortium durchgeführt werden, anstatt mit nur einem Bakterium. Darüber hinaus wäre die Untersuchung des Abbaus von Phenanthren in Kombination mit anderen PAK oder weiteren Kohlenwasserstoffverbindungen sinnvoll. Dabei wären neben frischen kontaminierten Böden auch solche mit gealterten Schadstoffen zu berücksichtigen, die meist

wesentlich schlechter biologisch abgebaut werden können. Neben dem Einsatz des Biostat B-Reaktors als Kultivierungsgefäß könnten In situ- oder Mietenverfahren simuliert werden, um Erkenntnisse über den Einsatz der Tenside bei derartigen Sanierungsmethoden zu gewinnen. Möglich wäre auch die Verwendung des Drehrohrreaktorsystems, welches am Institut zur Verfügung steht [BRINKMANN 1996].

Bei der Analytik sind im Bereich der Tenside noch Verbesserungen nötig. Die Methode der Gesamtzuckerbestimmung für die Sophorose lipide ist nur von begrenzter Aussagekraft, wenn keine Stammlösung vorliegt. Die Dünnschichtchromatographie erlaubt allenfalls qualitative, aber keine quantitativen Aussagen. Bessere Ergebnisse würden mit einer HPLC-Analytik für Sophorose lipide, wie sie beispielsweise von DAVILA [1992] beschrieben wurde, erzielt werden. WODARCZAK [1997] entwickelte eine HPLC/ELSD-Methode zur Bestimmung von Alkylmonoglucosiden aus Abwässern. Hier wäre eine Weiterentwicklung in Richtung Sophorose lipide in Böden sehr vielversprechend.

Die Aussagekraft der Fluoreszenzanalytik bei Bodenkultivierungen ist begrenzt. Es sollte überlegt werden, inwieweit durch Anschaffung eines geeigneten Laserfluoreszenzgerätes auch hier verbesserte Aussagen ermöglicht würden.

Bei der GC-Analytik steht ein Massenspektrometer zur Verfügung, welches zur Bestimmung eventuell auftretender Metabolite genutzt werden könnte. Die Arbeitsgruppe von KIM und ZYLSTRA [1997 u.a.] untersucht derzeit den PAK-Abbau durch *S. yanoikuyae* B1 auf molekularbiologischer und genetischer Ebene, so daß tiefergehende Untersuchungen in dieser Richtung nicht sinnvoll erscheinen.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde ein System für Untersuchungen des mikrobiellen Schadstoffabbaus unter Tensidzusatz in Flüssig- und in Bodensuspensionsmedien etabliert. Dabei wurden zuerst geeignete Komponenten - Mikroorganismus, Schadstoff, Tensid, Boden - gesucht: Nach Etablierung verschiedener Analyseverfahren wurden zum einen physikochemische Parameter charakterisiert und zum anderen in Schüttelkolben- und Agarplattenexperimenten grundlegende Fragen zur Biologie geklärt. Darauf aufbauend bildeten Kultivierungen in einem modifizierten Biostat B-Reaktor, die zuerst in Flüssigkultur und anschließend in 10% Bodensuspension durchgeführt wurden, den Abschluß der Arbeiten zum mikrobiellen Phenanthrenabbau mit Tensidzusatz.

In der Literatur werden dabei vielfach hemmende Wirkungen des Zusatzes von oberflächenaktiven Substanzen auf den Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beschrieben. Demgegenüber konnten mit Texapon<sup>®</sup> N25 und dem Sophorose lipidgemisch zwei Tenside gefunden werden, die den Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* B1 steigern. Das Biotensid entfaltet diese Wirkung oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration, da der mizellar gelöste Schadstoff sehr gut bioverfügbar ist. Demgegenüber wurde beim Texapon<sup>®</sup> N25 eine abbausteigernde Wirkung unterhalb der CMC festgestellt, die auf einen anderen Wirkungsmechanismus schließen läßt. Für weitere Untersuchungen wurde ein Mikroorganismenkonsortium auf einem Drei-PAK-Gemisch angereichert.

## 7 Anhang

### 7.1 Flüssigmedien

#### 10fach konzentrierte Mineralsalzlösung

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	24,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	15,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O .....	2,0 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> .....	ad 1000 mL

#### Spurenelementelösung SL-6

ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O.....	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,3 g
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O.....	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O .....	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O.....	0,03 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> .....	ad 1000 mL

#### Spurenelementelösung SL-4

EDTA .....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Spurenelementelösung SL-6.....	100 mL
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> .....	ad 1000 mL

#### Mineralmedium<sub>Brunner</sub>

10fach konzentrierte Mineralsalzlösung .....	100 mL
Spurenelementelösung SL-4.....	10 mL
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> .....	ad 1000 mL

Das Medium wurde auf einen pH-Wert von 6,9 eingestellt.

### 7.2 Festmedien

#### Mineralmedium<sub>Brunner</sub>-Agarplatten mit Phenanthren

pro Agarplatte:
20 mL Mineralmedium <sub>Brunner</sub>
15 g/L Agar-Agar
150 mg/L Phenanthren

**Mineralmedium<sub>Brunner</sub>-Agarplatten mit Glucose**

- pro Agarplatte:
- 20 mL Mineralmedium<sub>Brunner</sub>
- 15 g/L Agar-Agar
- 1 g/L D(+)-Glucose

**Standard I-Agarplatten**

- pro Platte:
- 20 mL Mineralmedium
- 25 g/L Standard I Nährbouillon 7882 von Merck
- 15 g/L Agar-Agar

**PDA-Agarplatten**

- pro Platte:
- 20 mL Mineralmedium
- 39 g/L Potato Dextrose Agar (DIFCO Laboratories, Detroit, USA)
- 5 g/L Agar-Agar

**7.3 Reagenzien****Reagenzien für den Biorad DC Protein Assay**

- Reagenz A: wäßrige Lösung aus 1 - 5% NaOH, < 1% Natriumtartrat, < 1% CuSO<sub>4</sub>
- Reagenz S: wäßrige Lösung aus 5 - 10% Natriumdodecylsulfat
- Reagenz A': 1 mL Reagenz A, 20 µL Reagenz S
- Reagenz B: wäßrige Lösung aus < 1% LiSO<sub>4</sub>, Na-Salz der Wolframsäure, < 1% Na-Salz der Molybdänsäure, < 1% Salzsäure, < 1% Phosphorsäure

**Reagenzien für den Test der Dehydrogenaseaktivität**

- Resazurinlösung: 75 mg/L Resazurin in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- Pufferlösung A: 6,8 g/L Imidazol, mit 1 N HCl auf pH 6,3 eingestellt
- Pufferlösung B: 3,8 g/L Natriumtetraborat, mit 1 N NaOH auf pH 11 eingestellt

**Reagenzien für die Phosphatanalytik**

- P-1A und P-2A (Zusammensetzung s. Beiblatt des Merck (PMB) Phosphor-Tests)

**Reagenzien für den Nitrittest**

- Phosphorsäure-Lösung: etwas H<sub>2</sub>O vorlegen, 10 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ρ = 1,71 g/mL) zugeben und auf 100 mL auffüllen
- Reagenzlösung: 4 g Sulfanilamid in einer Mischung von 10 mL Phosphorsäure-Lösung und 50 mL H<sub>2</sub>O auflösen, dann 0,2 g N-(Naphthyl)-ethylendiamino-dihydrochlorid zugeben und auf 100 mL auffüllen (Die Lösung ist - in einer braunen Flasche aufbewahrt - bei 4°C ca. 1 Monat haltbar)
- Stammlösung: NaNO<sub>2</sub> (z.A.) bei 105°C trocknen

**Reagenzien für den Nitrattest**

- Säuremischung: 1 Volumen  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\rho = 1,84 \text{ g/mL}$ , z.A.) und 1 Volumen  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\rho = 1,71 \text{ g/mL}$ , z.A.)
- Dimethylphenol-Lösung: 0,12 g 2,6-Dimethylphenol (z.A.) in 100 mL Essigsäure (wasserfrei, z.A.) lösen (wöchentlich neu ansetzen)
- Stammlösung:  $\text{KNO}_3$  (z.A.) bei  $105^\circ\text{C}$  trocknen

**Reagenzien für den Ammoniumtest**

- Salicylat-Citratlösung: je 13 g Natriumsalicylat und Trinatriumcitrat-dihydrat in 80 mL  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  lösen, anschließend 0,0970 g Dinatriumpentacyanonitrosylferrate-dihydrat zugeben und mit  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  auf 100 mL auffüllen (unter Lichtausschluß 2 Wochen haltbar)
- Reagenzlösung: 3,2 g NaOH in 50 mL  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  lösen, 0,2 g Natriumdichlorisocyanurat zugeben und mit  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  auf 100 mL auffüllen (jeweils frisch ansetzen)
- Stammlösung:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  vor dem Ansatz bei  $105^\circ\text{C}$  trocknen

**Reagenzien für den enzymatischen Glucosetest**

- Lösung 1: 5 g Pulvergemisch zusammengesetzt aus Triethylaminpuffer, pH 6,7; ca. 64 mg NADP; ca. 160 mg ATP; Magnesiumsulfat; Stabilisatoren; gelöst in 27 mL  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$
- Lösung 2: Suspension aus Hexokinase (ca. 200 U), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (ca. 100 U)
- Lösung 3: Suspension aus Phosphoglucose-Isomerase (ca. 490 U)

**Reagenzien für die Bestimmung von Texapon<sup>®</sup> N25 (Methylenblau-Methode)**

- Neutrale Methylenblau-Lösung: 0,350 g Methylenblau (Fa. Sigma) in  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  und auf 1000 mL auffüllen; mind. 24 h vor Gebrauch herstellen
- Saure Methylenblau-Lösung: 0,350 g Methylenblau (Fa. Sigma), 6,5 mL konz. Schwefelsäure, in  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  lösen und auf 1000 mL auffüllen; mind. 24 h vor Gebrauch herstellen
- Pufferlösung: 24 g  $\text{NaHCO}_3$  und 27 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  lösen und auf 1000 mL auffüllen, pH = 10
- Stammlösung für Kalibrationen: 420 mg Natriumdodecylsulfat in  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  lösen und auf 1000 mL auffüllen

**Reagenz für die Gesamtzuckerbestimmung (Hexosen, Anthron)**

- Anthronreagenzlösung: 80 mg Anthron in 100 mL 80%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lösen (am Vortag der Messung ansetzen)

## 7.4 Verwendete Chemikalien

Aceton, reinst .....	Riedel de Haën
Agar-Agar, hochrein .....	Merck
Ameisensäure p.a., konz.....	Merck
Anisaldehyd z. Synthese.....	Fluka
Anthracen p.a.....	Fluka oder Merck
Anthron p.a.....	Merck
Benzo[ghi]perylen p.a. ....	Aldrich
Chloroform p.a. ....	Fluka oder Merck
Dichlormethan p.a.....	Fluka
Essigsäure p.a., 99% .....	Riedel De Haën
Essigsäureethylester p.a. ....	Merck
D(+)-Glucose, wasserfrei p.a.....	Merck
Huminsäure, Natriumsalz, tech.....	Aldrich
Kaliumchlorid p.a.....	Merck
Methanol Lichrosolv <sup>®</sup> .....	Merck
Methylenchlorid p.a. ....	Fluka
Natriumdodecylsulfat .....	Merck
Phenanthren p.a. ....	Merck
i-Propanol, techn.....	Riedel de Haën
Pyren p.a.....	Fluka
Rinderserumalbumin .....	Sigma
Salzsäure p.a., konz. ....	Fluka/Merck
Schwefelsäure p.a., konz.....	Merck/Fluka
Toluol purum.....	Merck
Trifluoressigsäureanhydrid p.a.....	Merck

## 7.5 Der modifizierte Begasungsring

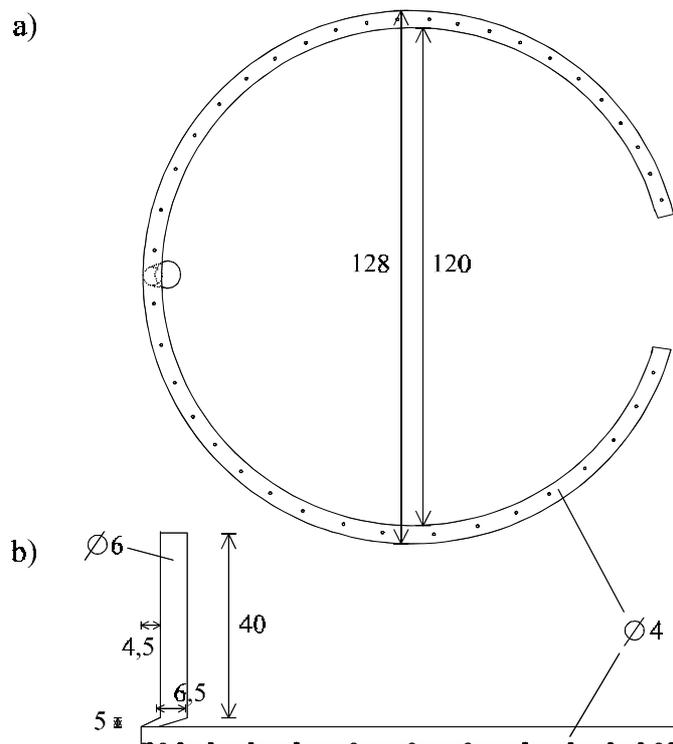


Abb. 51: Modifizierter Begasungsring: Ansicht von unten (a) sowie Seitenansicht (b) (Mechanische Werkstatt TCI, Universität Hannover).

## 8 Literaturverzeichnis

- Alef, K. (1991) *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie - Aktivitäten • Biomasse • Differenzierung* -. Landsberg, Ecomed Verlagsgesellschaft mbH
- Alef, K. (Hrsg.) (1994) *Biologische Bodensanierung - Methodenbuch* -. Weinheim • New York • Basel • Cambridge • Tokyo, VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Almgren, M.; Grieser, F.; Thomas J. K. (1979) *Dynamic and static aspects of solubilization of neutral arenes in ionic micellar solutions*. *J. Am. Chem. Soc.* 101 (2), S. 279 - 291
- Arino, S; Marchal, R.; Vandecasteele J.-P. (1998) *Involvement of a rhamnolipid-producing strain of Pseudomonas aeruginosa in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community*. *J. Appl. Microbiol.* 84, S. 769 - 776
- Aronstein B. N.; Alexander, M. (1992) *Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries*. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, S. 1227 - 1233
- Aronstein, B. N.; Calvillo, Y. M.; Alexander, M. (1991) *Effect of surfactant at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil*, *Environ. Sci. Technol.* 25, S. 1728 - 1731
- Asmer H. J.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V. (1988) *Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65 (9), S. 1460 - 1466
- Atlas, R. M. (1981) *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. *Microbiol. Rev.* 45 Nr. 1, S. 180 - 209
- Balfanz, J. (1989) *mündliche Mitteilung. Mikrobiologisches Labor Dr. J. Balfanz, Münster*
- Balkwill, D. L.; Drake, G. R.; Reeves, R. H.; Fredrickson, J. K.; White, D. C.; Ringelberg, D. B.; Chandler, D. P.; Romine, M. F.; Kennedy, D. W.; Spadoni, C. M. (1997) *Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of Sphingomonas aromaticivorans sp. nov., Sphingomonas subterranea sp. nov., and Sphingomonas stygia sp. nov.* *Int. J. System. Bacteriol.* 47 Nr. 1, S. 191 - 201
- Becher, P. (1973) *The emulsifier*. In: *Pesticides Formulations*. W. van Valkenburg (Hrsg.), New York, Marcel Dekker, Inc., S. 65 - 92
- Bio-Rad Laboratories (1994) *DC protein assay instruction manual*. LIT-448 94-0617 0894 SIG 071494
- Blumer, M. (1976) *Polycyclic aromatic compounds in nature*. *Scientific American* 234, S. 34 - 45
- Böhnke, B.; Pöppinghaus, K.; Schaar, H. (1990) *Technologieregister zur Sanierung von Altlasten (TERESA)*. Umweltbundesamt, Fachgebiet III 2.2, Projektträgerchaft Abfallwirtschaft und Altlastensanierung (Hrsg.), Bundesminister für Forschung und Technologie (Auftraggeber)
- Bossert, I.; Bartha, R. (1994) *The fate of petroleum in soil ecosystems*. In: *Petroleum Microbiology*. Atlas, R. M. (Hrsg.), New York, Mc Millan Publishers, S. 435 - 471
- Bouwer, E. J. (1992) *Bioremediation of organic contaminants in the subsurface*. In: *Environmental Microbiology*. R. Mitchell (Hrsg.), New York, Wiley-Liss, Inc., S. 287 - 318
- Bradford, M. M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.* 72, S. 248 - 254
- Brinkmann, D. (1996a) *mündliche Mitteilung*
- Brinkmann, D. (1996b) *Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Diesel-Hauptbestandteilen und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen und deren On-line-Analyse in einem Drehrohrreaktor*. Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover. (veröffentlicht: Düsseldorf, VDI Verlag GmbH (1996))
- Brinkmann, D. (1997) *mündliche Mitteilung, 08. Oktober 1997*
- Brock, T. D.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (1994) *Biology of microorganisms*. 7. Auflage. New Jersey 07632, Prentice-Hall., Inc.

- Brüschweiler, H. (1975) *Eigenschaften und biologisches Abbauverhalten von grenzflächenaktiven Verbindungen (Tensiden)*. *Chimia* 29 (1), S. 31 - 42
- Busch, N. (1995) *2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßkontrolle beim mikrobiellen Phenanthrenabbau*. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Buschmann, N. (1997) *eMail vom 06. Oktober 1997*
- Buschmann, N.; Wodarczak, S. (1995) *Analytical methods for alkylpolyglucosides - Part I: Colorimetric determination*. *Tens. Surf. Det.* 32 (4), S. 336 - 339
- Carmichael, L. M.; Pfaender, F. K. (1997) *The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils*. *Biodegrad.* 8, S. 1 - 13
- Carrera, P.; Robertiello, A. (1992) *Soil cleanup in Europe: feasibility and costs*. In: *Integrated soil and sediment research: a basis for proper protection*. Eijsackers, H. J. P. und Hamers, T. (Hrsg.), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers
- Cerniglia, C. E. (1981) *Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae*. *Rev. Biochem. Toxicol.* 3, S. 321 - 361
- Cerniglia, C. E. (1984a) *Microbial transformation of aromatic hydrocarbons*. In: *Petroleum Hydrocarbons*. Atlas, R. M. (Hrsg.), London, Macmillan, S. 99 - 128
- Cerniglia, C. E. (1984b) *Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Adv. Appl. Microbiol.* 30, S. 31 - 71
- Cerniglia, C. E. (1993) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4, S. 331 - 338
- Cerniglia, C. E.; Heitkamp, M. A. (1989) *Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. In: *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Varanasi, U. (Hrsg.), Boca Raton, Fl. USA, CRC Press, S. 41 - 68
- Cooper, D. G.; Zajic, J. E.; Gerson, D. F. (1979) *Proceedings of workshop: Microbial degradation of pollutants in marine environments*. Washington, D. C., Environmental Protection Agency, S. 231 - 240
- Cooper, D. G.; Zajic, J. E. (1980) *Surface-active compounds from microorganisms*. *Adv. Appl. Microbiol.* 26, S. 229 - 253
- Cutright, T. J.; Lee, S. (1994) *In situ soil remediation: bacteria or fungi?* *Energy Sources* 17, S. 413 - 419
- Czeschka K. (1995) *Einfluß von Starterkulturen und Tensiden auf den Abbau von Kohlenwasserstoffen in Bodenfestbettreaktoren*. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Techn. Universität Braunschweig
- Daniel, H.-J. (1996) *eMail vom 25. März 1996*
- Daniel, H.-J. (1997) *mündliche Mitteilung*
- Daniel, H.-J.; Otto, R. T.; Reuss, M.; Syldatk, C. (1998a) *Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose*. *Biotechnol. Let.* 20 (8), S. 805 - 807
- Daniel, H.-J.; Reuss, M.; Syldatk, C. (1998b) *Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using Candida bombicola ATCC 22214 and Cryptococcus curvatus ATCC 20509*. *Biotechnol. Let.* 20 (12), S. 1153 - 1156
- Davila, A. M.; Marchal, R.; Vandecasteele, J. P. (1992) *Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by Candida bombicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, S. 6 - 11
- Deckwer, W.-D.; Weppen, P. (1987) *Technologien zur Sanierung von Bodenkontaminationen und Altlasten*. *Chem.-Ing.-Tech.* 59 (6), S. 457 - 464
- Delmhorst, B. (1996) *Das Bundes-Bodenschutzgesetz und das untergesetzliche Regelwerk*. In: *Sanierung kontaminierter Standorte und Bodenschutz*. Im Auftrage des Fortbildungszentrums Gesundheits- und Umweltschutz Berlin e. V., Berlin, Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., S. 17 - 26
- Desai, J. D.; Desai, A. J. (1993) *Production of biosurfactants*. In: *Kosaric, N. (Hrsg.) Biosurfactants - production - properties - applications*. *Surfactant science series vol. 48*, New York • Basel • Hong Kong, Marcel Dekker, Inc., S. 65 - 98

- DIN 19 683 Teil 9 (1973) *Bodenuntersuchungsverfahren im landwirtschaftlichen Wasserbau. Physikalische Laboruntersuchungen. Bestimmung der Wasserdurchlässigkeit in wassergesättigten Stechzylinderproben.*
- DIN 19 684 Teil 1 (1977) *Bodenuntersuchungsverfahren im landwirtschaftlichen Wasserbau. Physikalische Laboruntersuchungen. Bestimmung des pH-Wertes des Bodens und Ermittlung des Kalkbedarfs.*
- DIN 19 684 Teil 3 (1977) *Bodenuntersuchungsverfahren im landwirtschaftlichen Wasserbau. Physikalische Laboruntersuchungen. Bestimmung des Humusgehaltes im Boden.*
- DIN 19 684 Teil 11 (1977) *Bodenuntersuchungsverfahren im landwirtschaftlichen Wasserbau. Physikalische Laboruntersuchungen. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit von Wasser und Bodensättigungsextrakten.*
- DIN 38 405 Teil 9 (1979) *Anionen (Gruppe D) - Bestimmung des Nitrat-Ions. Mai '79*
- DIN 38 406 Teil 5 (1983) *Kationen (Gruppe E) - Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs. Oktober '83*
- DIN 38 407 Teil 8 (1993) *Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F) - Bestimmung von 6 polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Wasser mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion.*
- DIN 38 409 Teil 13 (1981) *Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) - Bestimmung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trinkwasser.*
- DIN 38 414 Teil 6 (1986) *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Schlamm und Sedimente (Gruppe S). Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate.*
- DIN EN 903 (1994) *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von anionischen oberflächenaktiven Stoffen durch Messung des Methylenblau-Index MBAS.*
- DIN EN 26 777 (1993) *Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von Nitrit - Spektrometrisches Verfahren.*
- DSMZ (1993) *Catalogue of Strains. 5. edit. '93, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig*
- DSMZ (1995) *Supplement. Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig*
- Eaton, S. L.; Resnick, S. M.; Gibson, D. T. (1996) *Initial reactions in the oxidation of 1,2-dihydronaphthalene by Sphingomonas yanoikuyae strains. Appl. Environ. Microbiol. 62 (12), S. 4388 - 4394*
- Edwards, D. A.; Luthy, R. G.; Liu, Z. (1991) *Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar non-ionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. 25 (1), S. 127 - 133*
- EPA (1979) *The Environmental Protection Agency, Polynuclear aromatic hydrocarbons - Method 610. US Federal Register Vol. 44, No. 233, S. 69514 - 69517*
- Eschenbach, A.; Kästner, M.; Bierl, R.; Schaefer, G.; Mahro, B. (1994) *Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. Chemosphere 28 (4), S. 683 - 692*
- Evans, W. C.; Fernley, H. N.; Griffiths, E. (1965) *Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. Biochem. J. 95, S. 819*
- Ewald, M.; Herman, K.; Weidmann, M. (1987) *Kurzzeittest für die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität von Belebtschlämmen. Vom Wasser 68, S. 165 - 175*
- Fabry, B. (1991) *Tenside - Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. Chemie in unserer Zeit, 25. Jahrg. Nr. 4, S. 214 - 222*
- FCI (Hrsg.) (1992) *Tenside. Folienserie incl. Textheft des Fonds der Chemischen Industrie. 2., aktualisierte und überarbeitete Fassung*
- FAZ (1997) *Grundstückseigentümer sollen für Sanierungsgewinne zahlen - Ausgleichsregelung für die Bauern nach Landesrecht / Einigung zum Bodenschutzgesetz. Frankfurter Allgemeine Zeitung vom 08. November 1997, Teil „Wirtschaft“ Nr. 260, S. 13*
- Falbe, J.; Regitz, M. (Hrsg.) (1989 - 1992) *Römpp Chemie Lexikon. 6 Bände. 9., erweiterte und neubearbeitete Aufl., Stuttgart • New York, Georg Thieme Verlag*

- Ferdinandy-van Vlerken, M. M. A. (1998) *Chances for biological techniques in sediment remediation*. *Wat. Sci. Tech.* 37 (6 - 7), S. 345 - 353
- Fiechter, A. (1992) *Biosurfactants: moving towards industrial application*. *TIBTECH* 10, S. 208 - 217
- Foght, J. M.; Gutnick, D. L.; Westlake, D. W. S. (1989) *Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1), S. 36 - 42
- Franzius, V. (1993) *Stand der Bodenreinigungsverfahren bei der Altlastensanierung*. *UTA, Umwelt Technologie Aktuell* Nr. 6, S. 463 - 472
- Franzius, V. (1998) *Anforderungen an die Altlastensanierung aus der Sicht des Bodenschutzgesetzes. Tagungsband zum Statusseminar „Forschungsverbund ‘Biologische Verfahren zur Bodensanierung’“*. Zusammenge stellt von Michels, J. und Gehrke, U., DECHEMA, Clausthal-Zellerfeld, 06. - 07. Mai 1998, S. 78 - 84
- Georgiou, G.; Lin, S. C.; Sharma, M. M. (1992) *Surface-active compounds from microorganisms - review*. *Bio/Technology* 10, S. 60 - 65
- Geßner, K. (1997) *Untersuchungen zum Phenanthrenabbau durch Sphingomonas yanoikuyae in Flüssigkultur und Bodensuspension unter Zusatz von Sophorolipiden*. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hannover
- Gibson, D. G. (1968) *Microbial degradation of aromatic compounds*, *Science* 161: S. 1093 - 1097
- Gibson, D. T.; Roberts, R. L.; Wells, M. C.; Kobal, V. M. (1973) *Oxidation of biphenyl by a Beijerinckia spec.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50, S. 211 - 219
- Griffin, W. C. (1949) *In: J. Soc. Cosmet. Chem., Bd. 1, S. 311*
- Griffin, W. C. (1954) *In: J. Soc. Cosmet. Chem., Bd. 5, S. 249*
- Grimberg, S. J.; Aitken, M. D. (1995) *Biodegradation kinetics of phenanthrene solubilized in surfactant micelles*. *In: Hinchee, R. E.; Brockman, F. J.; Vogel, C. M. (Hrsg.) Microbial processes for bioremediation, Bioremediation 3* (8), Columbus, Ohio, Battelle Press, S. 59 - 66
- Gutnick, D. L.; Minas, W. (1987) *Perspectives on microbial surfactants*. *Biochem. Soc. Transact.* 15: S. 22 S - 35 S
- Haferburg, D.; Hommel, R.; Claus, R.; Kleber, H. P. (1986) *Extracellular microbial lipids as biosurfactants*. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 33, S. 53 - 93
- Halbig (1997) (Mitarbeiter der F & E Abt. von LAUDA (Lauda-Königshofen)) telephonische Mitteilung am 28.08.'97
- Hamby, D. M. (1996) *Site remediation techniques supporting environmental restoration activities - a review*. *Sci. Tot. Environ.* 191, S. 203 - 224
- Hatzinger, P. B.; Alexander, M. (1995) *Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability*. *Environ. Sci. Technol.* 29, S. 537 - 545
- HAZ (1997) *Die „Sünden der Vergangenheit“ kosten Millionen*. *Hannoversche Allgemeine Zeitung*, 29. März 1997, S. 17
- Henkel KGaA (1985) *Produktinformationsblatt TEXAPON® N25*. Ausgabe 5, Register 6 KOSMETIK, Henkel KGaA R-CFC COSPHA PM Düsseldorf, Juni 1985
- Henne, A.; Burg, A.; Schmitz, Ch.; Klinner, U. (1995) *Screening for biosurfactant production among microorganisms isolated from hydrocarbon-contaminated sites*. Poster PA078, vorgestellt auf der Frühjahrs tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e. V. (VAAM) vom 26. - 29. März, Stuttgart. *Biospektrum Sonderausgabe* 1995, S. 67
- Hesse, M. (1998) *Einfluß der Sauerstoffversorgung auf den Metabolismus von Escherichia coli LJ110 IMW107 bei Batch- und Chemostat-Kultivierungen unter Einbeziehung der Stoffflußanalyse*. Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover.
- Hilmer J .M. (1996) *In-situ-Bioprozeßkontrolle am Beispiel der In-vivo-Biolumineszenz und der 2D-Fluoreszenzspektroskopie*. Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover. (veröffentlicht: Düsseldorf, VDI Verlag GmbH (1996))

- Hommel, R.; Stüwer, O.; Stuber, W.; Haferburg, D.; Kleber, H. P. (1987) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, S. 199
- Hughes, J. B.; Beckles, D. M.; Chandra, S. D.; Ward, C. H. (1997) *Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, S. 152 - 160
- Hugo, W. B. (1965) *Some aspects of the action of cationic surfactants on microbial cells with special reference to their action on enzymes. In: Surface activity and the living cell. Soc. Chem. Ind. (London) Monograph 19, Kent, GB, Staples Printers Ltd., S. 67 - 82*
- Isoda, H.; Kitamoto, D.; Shinmoto, H.; Matsumura, M., Nakahra, T. (1997). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61: S 609 - 614
- Inoue, S.; Kimura, Y.; Kinta, M. (1979). *Offenlegungsschrift 29 05 252, Deutsches Patentamt.*
- Itoh, S.; Honda, H.; Tomita, F.; Suzuki, T. (1971) *Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin (mixture of C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub> fractions). J. Antibiot.* 24, S. 855 - 859
- Jahan, K.; Ahmed, T.; Maier, W. J. (1997) *Phenanthrene mineralisation in soil in the presence of nonionic surfactants. Tox. Environm. Chem.* 64, S. 127 - 143
- James, A. M. (1965) *Surface active agents in microbiology. In: Surface activity and the microbial cell. Soc. Chem. Ind. (London) Monograph 19, Kent, GB, Staples Printers Ltd., S. 3 - 21*
- Jerina, D. M.; van Bladeren, P. J.; Yagi, H.; Gibson, D. T.; Mahadevan, V.; Neese, A. S.; Koreeda, M.; Sharma, N. D.; Boyd, D. R. (1984) *Synthesis and absolute configuration of the bacterial cis-1,2-, cis-8,9- and cis-10,11-dihydrodiol metabolites of benz[a]anthracene formed by a strain of Beijerinckia. J. Org. Chem.* 49, S. 3621 - 3628
- Jermyn, M.A. (1975) *Increasing the sensitivity of the anthrone method for Carbohydrate. Anal. Biochem.* 68, S. 332 - 335
- Jones, K. C.; Stratford, J. A.; Waterhouse, K. S.; Furlong, E. T.; Giger, W.; Hites, R. A.; Schaffner, C.; Johnston, A. E. (1989a) *Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. Environ. Sci. Technol.* 23, S. 95 - 101
- Jones, K. C.; Stratford, J. A.; Waterhouse, K. S.; Vogt, N. B. (1989b) *Organic compounds in Welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol.* 23, S. 540 - 550
- Kästner, M.; Mahro, B.; Wienberg, R. (1993) *Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe. Hamburger Berichte 5. Wienberg • Bonn, Economica Verlag*
- Kakac, B.; Vejdelek, Z. J. (1977) *Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen. Weinheim • New York, Verlag Chemie, Erg. Band I, S. 343 - 345*
- Kampe, W.; Zürcher, C.; Jobst, H. (1988) *VDLUFA-Schriftenreihe 23, Kongreßband 1987, S. 507 - 532*
- Karcher, W.; Ellison, S.; Ewald, M; Garrigues, P.; Gevers, E.; Jakob, J. V (1988) *Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds. Vol. 2, Kluwer Academic Publishers (for the Commission of the European Communities)*
- Karcher, W.; Fordham, R. J.; Dubois, J. J. Glaude, P. G. J. M.; Ligthart, J. A. M. (1985) *Spectral atlas of polycyclic aromatic compounds. Vol. 1, Reidel Publishing Company (for the Commission of the European Communities)*
- Keweloh, H.; Heipieper, H.-J.; Rehm, H.-J. (1989) *Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, S. 383 - 389
- Keuth, S. (1990) *Mikrobiologische Charakterisierung eines Altlastenstandortes unter besonderer Berücksichtigung des Polyaromaten-Abbaus. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*
- Khan, A. A.; Wang, R.-F.; Cao, W.-W.; Franklin, W.; Cerniglia, C. E. (1996) *Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, Beijerinckia sp. strain B1, as Sphingomonas yanoikuyae by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, S. 466 - 469

- Kim, E.; Aversano, P. J.; Romine, M.; Schneider, R. P.; Zylstra, G. J. (1996) *Homology between genes for aromatic hydrocarbon degradation in surface and deep-subsurface Sphingomonas strains*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (4), S. 1467 - 1470
- Kim, E.; Zylstra, G. J. (1995) *Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and m-xylene degradation by Beijerinckia sp. strain B1*. *J. Bacteriol.* 177, S. 3095 - 3103
- Kim, E.; Zylstra, G. J.; Freeman, J. P.; Heinze, T. M.; Deck, J.; Cerniglia, C. E. (1997) *Evidence for the role of 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in the degradation of anthracene by Sphingomonas yanoikuyae B1*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, S. 479 - 484
- Kiyohara, H.; Nagao, K. (1978) *The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 105, S. 69 - 75
- Kiyohara, H.; Sugiyama, M.; Mondello, F. J.; Gibson, D. T.; Yano, K. (1983) *Plasmid involvement in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a Beijerinckia species*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111(3), S. 939 - 945
- Klein, J. (Hrsg.) (1992) *Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung. 2. Bericht des Interdisziplinären Arbeitskreises „Umweltbiotechnologie - Boden“ Ad-hoc-Arbeitsgruppe „Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung“*. DEHEMA-Fachgespräche Umweltschutz, Frankfurt am Main
- Knackmuss, H.-J. (1996) *Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds*. *J. Biotechnol.* 51, S. 287 - 295
- Köchling, C. (1996) *Erwartungshorizont Altlasten-Sanierungsmarkt - Realität und ökonomische Möglichkeiten*. In: *Sanierung kontaminierter Standorte und Bodenschutz*. Im Auftrage des Fortbildungszentrums Gesundheits- und Umweltschutz Berlin e. V., Berlin, Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., S. 147 - 157
- Kotzick, R.; Niessner, R. (1996) *Application of time-resolved, laser-induced and fiber-optically guided fluorescence for monitoring of a PAH-contaminated remediation site*. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1), S. 72 - 76
- Krebs, K. G.; Heusser, D.; Wimmer, H. in: Stahl, E. (Hrsg.) (1967) *Dünnschichtchromatographie*. Berlin, Springer Verlag, S. 813
- Kumke, M. U.; Löhmannsröben, H.-G.; Roch, T. (1995) *Fluoreszenzspektroskopie in der Umweltanalytik - PAK - Huminstoffe - Böden*. *GIT Fachz. Lab.* 2/95, S. 112 - 116
- Laha, S.; Liu, Z.; Edwards, D. A.; Luthy, R. G. (1995) *Surfactant solubilization of phenanthrene in soil-aqueous systems and its effects on biomineralization*. *Adv. Chem. Ser.* 244, S. 339 - 361
- Laha, S.; Luthy, R. G. (1991) *Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems*. *Environ. Sci. Technol.* 25 (11), S. 1920 - 1930
- Laha, S.; Luthy, R. G. (1992) *Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems*. *Biotechnol. Bioeng.* 40, S. 1367 - 1380
- Lang, S.; Wagner, F. (1987) *Structure and properties of biosurfactants*. In: *Kosaric, N.; Cairns, W. L.; Gray, N. C. C. (Hrsg.) Biosurfactants and biotechnology. Surfactant science series vol. 25*, New York • Basel • Hong Kong, Marcel Dekker, Inc., S. 21 - 46
- Laor, Y.; Strom, P. F.; Farmer, W. J. (1996) *The effect of sorption on phenanthrene bioavailability*. *J. Biotechnol.* 51, S. 227 - 234
- Leger, A.; d'Hendecourt, L.; Boccara, N. (Hrsg.) (1987) *Polycyclic aromatic hydrocarbons and astrophysics*. NATO ASI series C, Vol. 191. Dordrecht, D. Reidel Publ. Comp.
- LFU (Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Hrsg.)) (1991) *Materialien zur Altlastenbearbeitung. Band 7, Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung*. Bearbeiter: Berberich, G.; Brauch, H.-J.; Geller, A.; Werner, P.
- Li, X.-F.; Cullen, W. R.; Reimer, K. J.; Le, X.-C. (1996) *Microbial degradation of pyrene and characterization of a metabolite*. *Sci. Tot. Environ.* 177, S. 17 - 29

- Lichtenberg, D.; Robson, R. J.; Dennis, E. A. (1983) *Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. Biochim. Biophys. Acta* 737, S. 285 - 304
- Lide, D. R.; Kehiaian, H. V. (1994) *CRC handbook of thermophysical and thermochemical data. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc., S. 203*
- Lindemann, C. (1994) *Grundlegende Untersuchungen für die Anwendbarkeit von 2D-Fluoreszenzmessungen zur Bioprozeßkontrolle. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*
- Lindemann, C. (1997) *Anwendungen der 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Bioprozeßbeobachtung. Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover*
- Liu, D.; Strachan, W. M. J. (1977) *Measurement of microbial oxygen consumption in lake sediment. Can. Res.* 10, S. 30 - 31
- Liu, Z.; Edwards, D. A.; Luthy, R. G. (1992) *Sorption of non-ionic surfactants onto soil. Wat. Res.* 26, S. 1337 -
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall R. J. (1951) *Protein measurements with the folin reagent. J. Biol. Chem.* 193, S. 265 - 275
- LUA NRW (Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (Hrsg.)) (1998) *Materialien zur Altlastensanierung und zum Bodenschutz. Band 5, Leistungsbuch Altlastensanierung & Flächenentwicklung 1997/1998. Bearbeiter: Bracke, R.; Klümpen, C.; Kreuzer, S.; Laube, E.; Roosen, H.*
- MacDonald, J. A.; Rao, P. S. (1998) *Cleanup technologies - strengthening the soil and groundwater markets. Wat. Environ. Technol.* 10 (1), S. 44 - 49
- Mahro, B. (1996) *Möglichkeiten und Grenzen des biologischen Abbaus von PAK in unterschiedlich kontaminierten Bodenmaterialien. Vortrag auf den DEHEMA-Jahrestagungen '96, Wiesbaden, 21. - 23. Mai 1996*
- Mahro, B.; Rode, K.; Kasche, V. (1995) *Non-selective precultivation of bacteria able to degrade different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Acta Biotechnol.* 15 (4), S. 337 - 345
- Marose, S. (1995) *Untersuchungen zur Anwendung eines Prozeßspektralfluorometers für die On-line-Bioprozeßbeobachtung. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*
- Marose, S. (1999) *Bioprozeßanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie. Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover*
- Matthess, G.; Ubell, K. (1983) *Lehrbuch der Hydrogeologie. Bd. 1: Allgemeine Hydrogeologie, Grundwasserhaushalt. Berlin • Stuttgart, Verlag Gebr. Bornträger*
- Menge, M. (1996) *Untersuchungen zum Phenanthrenabbau durch Sphingomonas yanoikuyae unter Zusatz von Texapon® N25 und Anreicherung einer PAK-verwertenden Mischkultur. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hannover*
- Mihelcic, J. R.; Luthy, R. G. (1988) *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. Appl. Environ. Microbiol.* 54 (5), S. 1182 - 1187
- Miller, R. M.; Bartha, R. (1989) *Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. Appl. Environ. Microbiol.* 55 (2), S. 269 - 274
- Miyoshi, M. (1895) *Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. Jahrb. Wiss. Bot.* 28, S. 269 - 289
- Momose, T.; Ueda, Y.; Sawada, K.; Sugi, A. (1957) *Reaction Mechanism of Anthrone with Sugars. Chem. Pharm. Bull.* 5, S. 31 - 36
- Mukherjee, J. (1996) *Studies on production, isolation and properties of L-Asparaginase from Enterobacter aerogenes NCIM 2340, Dissertation, Faculty of engineering and technology, Jadavpur University, Kalkutta, Indien*
- Mückenhausen, E. (1957) *Die wichtigsten Böden der Bundesrepublik Deutschland, Frankfurt*
- Müller, T. (1996) *Untersuchungen zum Phenanthrenabbau durch Sphingomonas spec. DSM 6900 unter Zusatz von Sophoroselipiden. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hannover*
- Mulkins-Phillips, G. J.; Stewart, J. E. (1974) *Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. Appl. Microbiol.* 28 (4), S. 547 - 552

- Murl, Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen (1991) (Hrsg.) *Altlasten ABC. Münster, Landwirtschaftsverlag GmbH*
- Mull, R. (1995) *Aus den Augen, aus dem Sinn - Altlasten. Hannover UNI-Magazin Nr. 3, S. 10 - 13*
- Nakamura, H. (1968) *Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethylalcohol and sodium dodecyl sulfate in Escherichia coli. J. Bact. 96, S. 987 - 996*
- Neu, T. R. (1996) *Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiol. Rev. 60, S. 151 - 166*
- Neufeld, R. J.; Zajic, J. E.; Gerson, D. F. (1980) *Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrates fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 39 (3), S. 511 - 517*
- Neumaier, H.; Weber, H. H. (Hrsg.) (1996) *Altlasten: Erkennen, Bewerten, Sanieren. Mithrsg.: Fresenius, W., 3., grundlegend überarb. und erg. Auflage. Berlin • Heidelberg • u. a., Springer-Verlag*
- Niebelschütz, H. (1996) *Biotensideinsatz im Rahmen einer In-situ-Sanierung eines Hydraulikölschadens. Vortrag auf der 13. Sitzung des IAK „Umweltbiotechnologie - Boden“ bei der DECHEMA e.V., Frankfurt am Main, 27. Juni '96*
- Oberbremer, A. (1990) *Einfluß von Biotensiden auf den mikrobiellen Ölabbau in einem Ackerboden: Untersuchungen in Rühr- und Festbettreaktoren. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Techn. Universität Braunschweig*
- Oberbremer, A.; Müller-Hurtig, R.; Wagner, F. (1990) *Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, S. 485 - 489*
- Okx, J. P.; Hordijk, L.; Stein, A. (1996) *Managing soil remediation problems. Environ. Sci. & Pollut. Res. 3 (4), S. 229 - 235*
- Ou, Z.; Yediler, A.; He, Y.; Kettrup, A.; Sun, T. (1995) *Effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the adsorption behaviour of phenanthrene on soils. Chemosphere 30 (2), S. 313 - 325*
- Overcash, M. (1996) *European soil remediation research: 1992-1994. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 26 (4), S. 337 - 368*
- Pekeler, T. (1998) *laufende Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover.*
- Pearlman, R. S.; Yalkowsky, S. H.; Banerjee, S. (1984) *Water solubilities of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds. J. Phys. Chem. Ref. Data Bd. 13 Nr. 2, S. 555*
- Poeton, T. S.; Stensel, H. D.; Strand, S. E. (1999) *Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by marine bacteria: Effect of solid phase on degradation kinetics. Wat. Res. 33 (3), S. 868 - 880*
- Poremba, K.; Gunkel, W.; Lang, S.; Wagner, F. (1991) *Marine Biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. Z. Naturforsch. 46c, S. 210 - 216*
- Rehm, H.-J. (1996) *mündliche Mitteilung*
- Resnick, S. M.; Gibson, D. T. (1996) *Oxidation of 6,7-dihydro-5H-benzocycloheptene by bacterial strains expressing naphthalene dioxygenase, biphenyl dioxygenase, and toluene dioxygenase yields homochiral monol or cis-diol enantiomes as major products. Appl. Environ. Microbiol. 62 (4), S. 1364 - 1368*
- Rogoff, M. H. (1961) *Oxidation of aromatic compounds by bacteria. Adv. Appl. Microbiol. 3, S. 193 - 221*
- Rosenberg, E. (1986) *Microbial surfactants. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 3 (2), S. 109 - 132*
- Rouse, J. D.; Sabatini, D. A.; Suflita, J. M.; Harwell, J. H. (1994) *Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 24 (4), S. 325 - 370*
- Rulkens, W. H.; Tichy, R.; Grotenhuis, J. T. C. (1998) *Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures. Wat. Sci. Tech. 37 (8), S. 27 - 35*
- Saleh, H. (1995) *Untersuchungen zum Einsatz eines rekombinanten E. coli-Stammes zur Charakterisierung von Bioprozessen über Biolumineszenzsysteme. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*

- Schachtschabel, P.; Blume, H.-P., Brümmer, G.; Hartge, K.-H.; Schwertmann, U. (1989) *Scheffer/Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde. 12. Aufl., Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag*
- Scheper, T. (1991) *Bioanalytik: Messung des Zellzustands und der Zellumgebung in Bioreaktoren. Braunschweig, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH*
- Schinner, F.; Öhlinger, R.; Kandeler, E.; Margesin, R. (Hrsg.) (1993) *Bodenbiologische Arbeitsmethoden. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin • Heidelberg • New York • London • Paris • Tokyo • Hong Kong • Barcelona • Budapest, Springer-Verlag*
- Schippers, C. (1995) *Mikrobieller Abbau von Phenol mit Sauerstoff aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*
- Schlegel, H. G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie. 7., überarbeitete Auflage unter Mitarbeit von Christiane Zaborosch, Stuttgart • New York, Georg Thieme Verlag*
- Schmid, K. (1996) *Tensidunterstützte und biologische Sanierung der Feinkornfraktion aus der Bodenwäsche bei kohlenwasserstoffhaltigen Altlasten. Dissertation, Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Universität Karlsruhe (TH). (veröffentlicht: München • Wien, Oldenbourg Verlag, GmbH)*
- Schöberl, P.; Bock, K. J.; Huber, L. (1988) *Ökologisch relevante Daten von Tensiden in Wasch- und Reinigungsmitteln. Tens. Surf. Det. 25 (2), S. 86 - 98*
- Sell, D. (1998) *Aufgaben und Ziele des Forschungsverbundes „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“. Tagungsband zum Statusseminar „Forschungsverbund ‘Biologische Verfahren zur Bodensanierung’“. Zusammengestellt von Michels, J. und Gehrke, U., DECHEMA, Clausthal-Zellerfeld, 06. - 07. Mai 1998, S. 15 - 16*
- Schnabel C. (1995) *Analytik von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen aus Extrakten real kontaminierter Böden mittels GC-MS. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hannover*
- Simmleit, N.; Herrmann, R. (1987) *Water, Air and Soil Pollut. 34, S. 79 - 95, 97 - 109*
- Sims, R. C.; Overcash, M. R. (1983) *Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. Residue Rev. 88, S. 1 - 68*
- Soeder, C. J.; Papaderos, A.; Kleespies, M.; Kneifel, H.; Haegel, F.-H.; Webb, L. (1996) *Influence of phytogenic surfactants (quillaya saponin and soya lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 (5), S. 654 - 659*
- Spröer, M. (1996) *Biologische Bodensanierung kontra Bodendeponierung - (k)eine Kostenfrage (mehr)?! Umwelttechnik Forum 6/97, S. 12*
- SRU (Der Rat von Sachverständigen in Umweltfragen) (1989) *Altlasten. Sondergutachten Dezember 1989, Stuttgart. Metzler-Poeschel Verlag 1990*
- SRU (Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen) (1995) *Altlasten II, Sondergutachten Februar 1995, Stuttgart. Metzler-Poeschel Verlag*
- Standort Chemie (1996) *Das Erbe der Sorglosigkeit. Nr. 3, 9. Februar 1996, S. 22*
- Strotmann, U.; Zaremba, S.; Bias, W.-R. (1992) *Kurzzeit-Toxizitätstests zur Messung der Toxizität von Chemikalien gegenüber Belebtschlamm. Acta hydrochim. hydrobiol. 20, S. 136 - 142*
- Stryer, L. (1990) *Biochemie. völlig Neubearb. Aufl., Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft*
- Swisher R. D. (1987) *Surfactant Biodegradation. Surfactant science series vol. 18, 2., überarbeitete und erweiterte Aufl., Marcel Dekker, Inc., New York • Basel • Hong Kong*
- Takeuchi, M.; Kawai, F.; Shimada, Y.; Yokota, A. (1993) *Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing Bacteria: Emended description of the genus Sphingomonas and new descriptions of Sphingomonas macrogoltabidus sp. nov., Sphingomonas sanguis sp. nov. and Sphingomonas terrae sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 16, S. 227 - 238*
- Tang, W.-C.; White, J. C.; Alexander, M. (1998) *Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, S.117 - 121*

- Thoenes, H. W. (1998) *International verbindliche Bodenkonvention - Chancen für weltweite Altlastensanierungen? ITVA-Symposium Altlasten: Erfolgreiche Altlastensanierung - Perspektiven, Innovationen und Qualitätssicherung. IWU (Institut für Weiterbildung und Beratung im Umweltschutz e.V., Magdeburg und Ingenieurtechnischer Verband Altlasten e.V., Berlin (Hrsg.), Kassel, 19. - 20. November 1998, S. 5 - 13*
- Thomas, W.; Herrmann, R. (1980) *Staub-Reinhalt. Luft 40, S. 440*
- Thomas, J. M.; Ward, C. H. (1989) *In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. Envir. Sci. Technol. 23, S. 760 - 766*
- Tiehm, A. (1994) *Der Einfluß von Tensiden auf die Mobilisierung und den mikrobiellen Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Dissertation, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe*
- Tiehm, A.; Fritsche, C. (1995) *Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a Mycobacterium spec. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42 (6), S. 964 - 968*
- Tiehm, A.; Stieber, M.; Werner, P.; Frimmel, F. H. (1997) *Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. Environ. Sci. Technol. 31, S. 2570 - 2576*
- Tulloch, A. P.; Spencer, J. F. T.; Gorin, P. A. J. (1962) *The fermentation of long-chain compounds by Torulopsis magnoliae. Can. J. Chem. 40, S. 1326 - 1338*
- UBA, Umweltbundesamt (1994a) (Hrsg.) *Daten zur Umwelt 1992/1993. Berlin, E. Schmid*
- UBA, Umweltbundesamt (1994b) *schriftliche Mitteilung vom 23. Oktober 1994*
- Verschueren K. (1983) *Handbook of environmental data on organic chemicals. 2. Aufl., New York, van Norstrand Reinhold Company*
- Volkering, F.; Breure, A. M.; Rulkens, W. H. (1998) *Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodeg. 8, S. 401 - 417*
- Walter, U.; Beyer, M.; Klein, J.; Rehm, H.-J. (1990) *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial mixed culture. In: DECHEMA Biotechnology Conferences 4. Weinheim • New York • Basel • Cambridge • Tokyo, VCH Verlagsgesellschaft, Part A, S. 489 - 492*
- Wei, J. (1998) *Untersuchung von Verfahren zur Auswertung der zweidimensionalen Fluoreszenzspektren. Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hannover.*
- Weißenfels, W. D. (1990) *Mikrobieller Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in definierten Submerskulturen und kontaminierten Böden, Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*
- Weißenfels, W. D.; Klewer, H.-J.; Langhoff, J. (1992) *Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, S. 689 - 696*
- Werner, P. (1992) *Praktische Erfahrungen mit der mikrobiologischen Bodensanierung im in-situ Verfahren. In: DECHEMA-Fachgespräche Umweltschutz, Mikrobiologische Reinigung von Böden. D. Behrens und J. Wiesner (Hrsg.), Frankfurt / Main, Schön & Wetzels GmbH, S. 181 - 203*
- Wilson, S. C.; Jones, K. C. (1993) *Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ. Poll. 81, S. 229 - 249*
- Willumsen, P. A.; Karlson, U. (1997) *Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegrad. 7, S. 415 - 423*
- Wodarczak, S.; Buschmann, N. (1995) *Analytische Verfahren für Alkylpolyglucoside. GIT Fachz. Lab. 5, S. 410 - 412*
- Yabuuchi, E.; Yano, I.; Oyaizu, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T.; Yamamoto, H. (1990) *Proposals of Sphingomonas paucimobilis gen. nov. and comb. nov., Sphingomonas parapaucimobilis sp. nov., Sphingomonas yanoikuyae sp. nov., Sphingomonas adhaesiva sp. nov., Sphingomonas capsulata comb. nov., and two genospecies of the genus Sphingomonas. Microbiol. Immunol. 34, S. 99 - 119*
- Ye, D.; Siddiqi, M. A.; Maccubbin, A. E.; Kumar, S.; Sikka, H. C. (1996) *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas paucimobilis. Environ. Sci. Technol. 30, S. 136 - 142*

- Yeom, I.-T.; Ghosh, M. M. (1998) *Mass transfer limitation in PAH-contaminated soil remediation. Wat. Sci. Tech.* 37 (8), S. 111 - 118
- Zhang, W.-x.; Bouwer, E. J.; Ball, W. P. (1998) *Bioavailability of hydrophobic organic contaminants: Effects and implications of sorption-related mass transfer on bioremediation. GWNR Winter 1998, S. 126 - 138*
- Zhang, Y.; Maier, W. J.; Miller, R. M. (1997) *Effect of Rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. Environ. Sci. Technol.* 31, S. 2211 - 2217
- ZoBell, C. E. (1946) *Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol. Rev.* 10, S. 1 - 49
- Zylstra, G. J.; Kim, E. (1997) *Aromatic hydrocarbon degradation by Sphingomonas yanoikuae B1. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, S. 408 - 414



# Lebenslauf

Name: Christopher Schippers  
Geburtsdatum: 11. November 1966  
Geburtsort: 48 683 Ahaus

## Schulbildung

August '73 - Juli '77 Hermann-Löns-Grundschule in 48 599 Gronau  
August '77 - Juni '86 Werner-von-Siemens-Gymnasium in 48 599 Gronau  
12. Juni '86 Allgemeine Hochschulreife

## Wehrdienst

Juli '86 - September '87 Stabsdienst im Luftwaffenversorgungsregiment 6 in  
26 123 Oldenburg

## Diplomstudium

Wintersemester '87/'88 Aufnahme des Diplomstudienganges Biologie an der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster  
21. März '90 Vordiplom im Fach Biologie  
September '92 - Anfertigung der Diplomarbeit „Mikrobieller Abbau von Phenol mit  
Oktober '93 Sauerstoff aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>“ im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Rehm  
nach vorher abgelegten mündlichen Prüfungen  
16. November '93 Diplom im Fach Biologie, Endnote: sehr gut

## Promotion

01. Juli '94 - Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bio-  
30. September '95 chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Ar-  
beitskreis von Herrn Prof. Dr. Scheper  
01. Oktober '95 - Fortsetzung der Tätigkeit am Institut für Technische Chemie der  
31. Dezember '97 Universität Hannover  
11. Oktober 1999 Promotionsprüfung

## Berufstätigkeit

seit 01. April '98 Referent bei der Zentralen Evaluationsagentur der niedersächsischen  
Hochschulen, Hannover

