

**Mikrobieller Abbau von <sup>14</sup>C-markiertem Benzo[a]pyren  
durch PAK-adaptierte Bakterienmischkulturen**

Von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Susanne Schwiening

aus Bocholt

Berichter: Universitätsprofessor Dr. I. Schuphan  
Universitätsprofessor Dr. U. Klinner

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 1998

„D 82 (Diss. RWTH Aachen)“



Akademische Edition Umweltforschung  
Publikationsreihe des interdisziplinären  
Umwelt-Forums der RWTH Aachen

Band 3/99

**Susanne Schwiening**

**Mikrobieller Abbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Benzo[a]pyren  
durch PAK-adaptierte Bakterienmischkulturen**

Herausgeber:  
Univ.-Prof. Dr. W. Dott  
Institut für Hygiene und Umweltmedizin

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag  
Aachen 1999

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Schwiening, Susanne:*

Mikrobieller Abbau von <sup>14</sup>C-markiertem Benzo[a]pyren durch PAK-adaptierte  
Bakterienmischkulturen/Susanne Schwiening. –Als Ms. gedr.-

Aachen: Shaker, 1999

(Akademische Edition Umweltforschung; Bd. 99,3)

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 1998

ISBN 3-8265-4968-6

Copyright Shaker Verlag 1999

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen  
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen  
und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-4968-6

ISSN 1437-532X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

Die vorliegende Dissertation wurde am Lehrstuhl für Biologie V (Institut für Ökologie, Ökotoxikologie und Ökochemie) der RWTH Aachen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. I. Schuphan für die Themenvergabe und für die im Verlauf dieser Arbeit gewährte Unterstützung. Weiterhin danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskriptes sowie für seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Klinner vom Lehrstuhl für Biologie IV (Lehr- und Forschungsgebiet Angewandte Mikrobiologie) möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates und seine stete Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft bedanken. Seinen Mitarbeitern Anja Henne und Christoph Schmitz möchte ich danken, sie hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen.

Allen jetzigen und früheren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologie V danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Matthias Eberius danke ich für seine stete Unterstützung bei allen Problemen des Laboralltags.

Andrea Breitschwerdt, Judith Breuer und Katja Malcherek danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen konstruktiven Gespräche und besonders für die sorgfältige und kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und mir immer Verständnis und liebevollen Rückhalt gegeben haben.

Uwe möchte ich für seine große Geduld danken und dafür, daß er nie an dem Gelingen dieser Arbeit gezweifelt hat.



gewidmet meiner Oma Leni Behrend



---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Entstehung und Vorkommen von PAK.....	1
1.2	Eigenschaften und Verhalten von PAK in der Umwelt .....	2
1.3	Mikrobieller Abbau von PAK.....	4
1.4	Mikrobieller Abbau von Benzo[a]pyren .....	7
1.5	Limitierung des PAK-Abbaus.....	10
1.6	Erhöhung der Bioverfügbarkeit schwer wasserlöslicher Substanzen.....	11
1.7	Strukturen und Eigenschaften von Tensiden.....	12
1.8	Tensideffekte auf den Abbau von PAK .....	13
1.9	Ziele der Arbeit .....	18
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.1	Tenside .....	21
2.1.2	<sup>14</sup> C-markiertes Benzo[a]pyren .....	23
2.1.3	PAK.....	24
2.1.4	Szintillationscocktails .....	24
2.1.5	Lösungsmittel.....	24
2.1.6	Chemikalien und Reagenzien für die PCR.....	24
2.1.7	Sonstige Chemikalien und Reagenzien .....	25
2.2	Geräte und Hilfsmittel.....	25
2.2.1	Geräte für die Radioanalytik .....	25
2.2.2	Geräte für die PCR.....	26
2.2.3	Gaschromatographie.....	26
2.2.4	Sonstige Geräte .....	26
2.2.5	Hilfsmittel .....	27
2.3	Nährmedien .....	27
2.3.1	Mineralmedium .....	27
2.3.2	Festmedien .....	28

---

2.4 Herkunft der Bakterienmischkultur .....	28
2.5 Stammhaltung und Vorkultivierung der Mischkultur.....	29
2.6 Lebendkeimzahlbestimmung.....	29
2.7 Bestimmung der optischen Dichte (OD) .....	29
2.8 Charakterisierung der Mischkultur.....	29
2.8.1 Optische Charakterisierung .....	29
2.8.2 PCR.....	30
2.8.3 Gram-Färbung.....	32
2.8.4 Oxidase-Reaktion .....	32
2.8.5 API-Test.....	33
2.9 Bestimmung der Oberflächenspannung.....	34
2.9.1 Bestimmung der CMC von Tensidlösungen.....	34
2.9.2 Bestimmung der Oberflächenspannung des Kulturmediums .....	35
2.10 Bestimmung des Solubilisierungsvermögens von Tensiden .....	35
2.10.1 Solubilisierung von Benzo[a]pyren durch Tenside .....	35
2.10.2 Solubilisierungsvermögen von Plantacare im Kulturmedium.....	36
2.11 DMSO-Test .....	37
2.12 Abbaustudien mit <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren .....	38
2.12.1 Aufbau der Biometer-Flaschen.....	38
2.12.2 Ansetzen der Abbauprobungen .....	39
2.12.3 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer I.....	39
2.12.4 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer II.....	40
2.12.5 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer III .....	42
2.12.5.1 Begleitversuch zur Versuchsreihe Biometer III.....	44
2.12.6 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer IV .....	44
2.12.7 Durchführung der Abbauprobungen.....	45
2.12.8 Aufarbeitung des Kulturmediums.....	45
2.12.9 Dünnschichtchromatographische Analyse der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte.....	47
2.12.10 Gaschromatographische Analyse der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte.....	47
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Bestimmung der CMC der Tenside .....	49

3.2 Solubilisierende Eigenschaften der Tenside .....	50
3.3 Solubilisierungsvermögen von Plantacare im Kulturmedium .....	55
3.4 DMSO-Test .....	56
3.5 Keimzahlbestimmung im Boden.....	58
3.6 Optische Charakterisierung der Mischkultur .....	58
3.7 Ergebnisse der Abbaustudien mit <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren .....	59
3.7.1 Versuchsreihe Biometer I, Ansätze M5 bis M9 .....	59
3.7.1.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer I, Ansätze M5 bis M9.....	59
3.7.1.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren.....	60
3.7.1.3 Keimzahlbestimmung .....	61
3.7.1.4 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium.....	61
3.7.1.5 pH-Wert im Kulturmedium.....	63
3.7.1.6 Bilanzierung der Radioaktivität .....	63
3.7.1.7 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte...	64
3.7.2 Versuchsreihe Biometer I, Ansätze 1 bis 11 .....	64
3.7.2.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer I, Ansätze 1 bis 11 .....	64
3.7.2.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren.....	64
3.7.2.3 Keimzahlbestimmung .....	70
3.7.2.4 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium.....	72
3.7.2.5 pH-Wert im Kulturmedium.....	75
3.7.2.6 Bilanzierung der Radioaktivität .....	75
3.7.2.7 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte...	77
3.7.2.8 Gaschromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte.....	77
3.7.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer I .....	82
3.7.3 Versuchsreihe Biometer II.....	83
3.7.3.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer II.....	83
3.7.3.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren.....	83
3.7.3.3 Keimzahlbestimmung .....	96
3.7.3.4 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium.....	100
3.7.3.5 pH-Wert im Kulturmedium.....	102
3.7.3.6 Bilanzierung der Radioaktivität .....	102

---

3.7.3.7	Dünnschichtchromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte	104
3.7.3.8	Gaschromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte	104
3.7.3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer II	107
3.7.4	Versuchsreihe Biometer III	108
3.7.4.1	Ziel der Versuchsreihe Biometer III	108
3.7.4.2	Oberflächenspannung in den Stammkulturen	108
3.7.4.3	Keimzahlbestimmung der Stammkulturen	109
3.7.4.4	Mineralisation von <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren	109
3.7.4.5	Entwicklung der Oberflächenspannung	123
3.7.4.6	Keimzahlbestimmung	123
3.7.4.7	Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium	131
3.7.4.8	pH-Wert im Kulturmedium	133
3.7.4.9	Bilanzierung der Radioaktivität	134
3.7.4.10	Dünnschichtchromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte	135
3.7.4.11	Gaschromatographische Untersuchung der CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakte	136
3.7.4.12	Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer III	139
3.7.5	Versuchsreihe Biometer IV	140
3.7.5.1	Ziel der Versuchsreihe Biometer IV	140
3.7.5.2	Mineralisation von Benzo[a]pyren	140
3.7.5.3	Keimzahlbestimmung	145
3.7.5.4	Aufarbeitung der Kulturmedien von Versuchsreihe Biometer IV	147
3.7.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer IV	147
3.7.5.6	Versuche zur molekularbiologische Charakterisierung der Bakterientypen der Versuchsreihe Biometer IV mittels PCR	148
3.7.5.7	Gram-Färbung	149
3.7.5.8	Physiologische Charakterisierung der Bakterientypen mittels A-Testsystem	149
4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und Diskussion	153
4.1	Auswahl des Tensids	153
4.2	Abbau von <sup>14</sup> C-markiertem Benzo[a]pyren	158
4.3	Einfluß des Plantacare	160

---

4.4 Einfluß der anderen PAK .....	166
4.5 Die Mischkultur .....	169
5 Zusammenfassung.....	153
6 Ausblick .....	179
7 Literaturverzeichnis.....	181
8 Bilderverzeichnis.....	197
9 Tabellenverzeichnis.....	209



## Abkürzungsverzeichnis

ai	anionisch
Anthr.	Anthracen
AS	Aktivsubstanz
BaP	Benzo[a]pyren
BiAS	Wismutaktivsubstanz
bidest.	bidestilliert
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMC	kritische Micellbildungskonzentration
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
d	Tage
d.h.	das heißt
DC	Dünnschichtchromatographie
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	dissolved organic carbon
dpm	decay counts per minute
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EC <sub>0</sub>	0 % Effektkonzentration
EC <sub>50</sub>	50 % Effektkonzentration
EG	Europäische Gemeinschaft
EK	Einzelkolonie
EO	Ethylenoxid
EPA	Environmental Protection Agency
et al.	et alii (und andere)
Fluora.	Fluoranthen
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
k.A.	keine Angaben
KBE	koloniebildende Einheiten
K <sub>OC</sub>	Verteilungskoeffizient Wasser/organischer Kohlenstoff
kont.	kontaminiert
K <sub>OW</sub>	Verteilungskoeffizient n-Octanol/Wasser

---

Lsg.	Lösung
max.	maximal
min.	Minute, Minuten
mind.	mindestens
n.n.	nicht nachweisbar
Naph.	Naphthalin
ni	nichtionisch
OD	optische Dichte
OD <sub>564</sub>	optische Dichte bei 564 nm
OECD	Organisation of Economic Cooperation and Development
p.A.	pro Analysis
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	polymerase-chain-reaction
Phen.	Phenanthren
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
Pyr.	Pyren
Rf	Ratio of fronts, Retentionsfaktor
<i>sacch.</i>	<i>saccharophila</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunden
sp.	species
techn.	technisch
theor.	theoretisch
U	Einheit der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
unkont.	unkontaminiert
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteilen pro Volumen
w	Wochen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
zi	zwitterionisch

# 1 Einleitung

## 1.1 Entstehung und Vorkommen von PAK

Die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) sind eine relevante Stoffgruppe innerhalb der organischen Xenobiotica. In der EG-Verordnung über gefährliche Substanzen gehört diese Gruppe zu den 129 Chemikalien, die auf der Liste I („schwarze Liste“) aufgeführt sind.

PAK entstehen bei jeglicher Art unvollständiger Verbrennung unter Sauerstoffmangelbedingungen, d.h. bei Pyrolyseprozessen mit organischen Materialien, wie z.B. Kohle, Öl oder Holz. Die bedeutendsten Emissionsquellen sind heute zum einen die Verbrennung von fossilen Energieträgern in Wärme- und Energiekraftwerken, Hausfeuerung und Müllverbrennung, zum anderen industrielle Prozesse wie die Steinkohleverkokung, die Teerdestillation oder die Gasproduktion und außerdem Kraftfahrzeuge und offene Feuer, wie z.B. Feldabbrände. Neben diesen anthropogenen Quellen entstehen PAK – allerdings in weit geringerem Umfang – auf natürlichem Weg, z.B. durch Waldbrände, Präriefeuer und Vulkanismus. Eine biogene Synthese dieser Verbindungen in sehr niedrigen Mengen durch Pflanzen und Mikroorganismen wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht eindeutig bewiesen (BLUMER 1976, NEFF 1979, EDWARDS 1983, SIMS & OVERCASH 1983, ZANDER 1995).

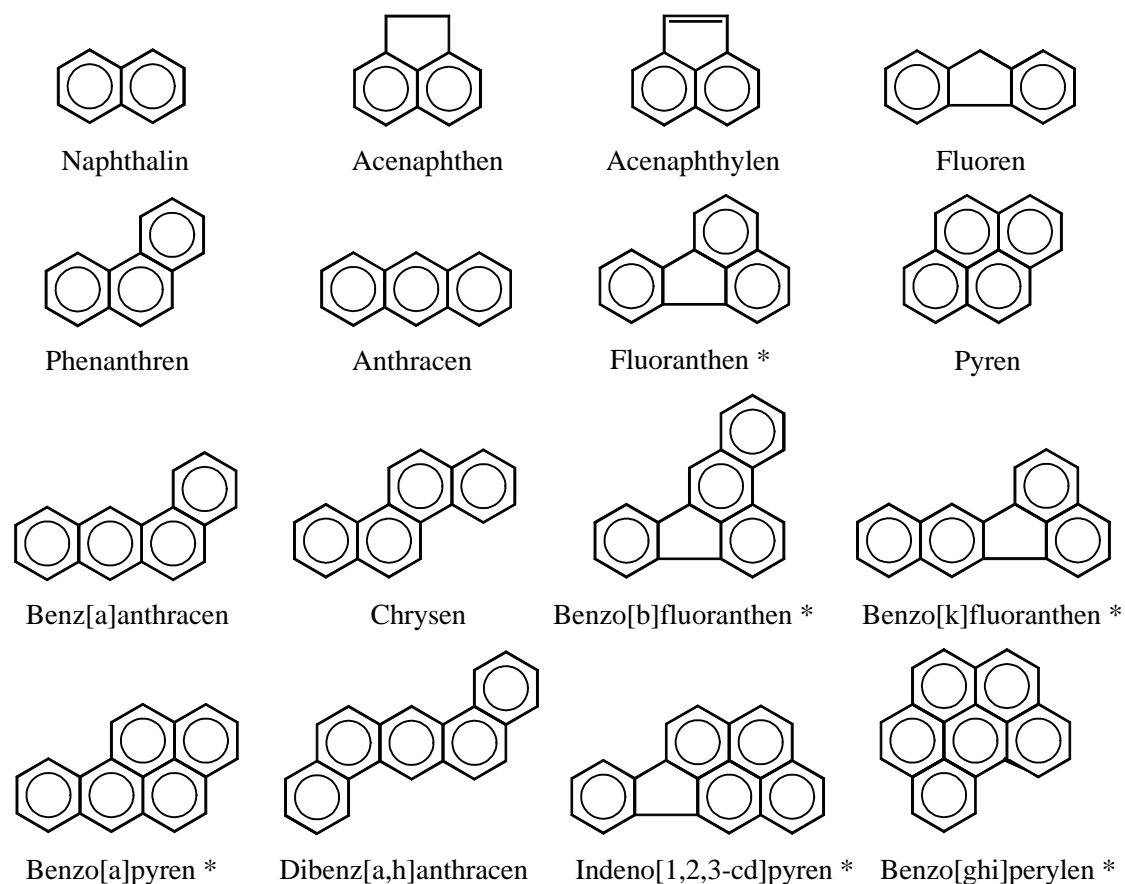
FÜHR et al. (1986) schätzte die Gesamtemission an PAK für die BRD im Jahre 1981 auf ca. 500–1000 t, davon 20 t Benzo[a]pyren. Durch die meisten der oben genannten Emissionsquellen gelangen die PAK zunächst in die Atmosphäre und von dort über trockene oder nasse Deposition in die verschiedensten Ökosysteme und Umweltmedien. PAK sind daher ubiquitär verbreitet.

Neben einer dadurch resultierenden Grundbelastung von Böden und Sedimenten, die letztendlich die Senken für alle PAK-Verbindungen darstellen, finden sich vor allem an Standorten von erdöl- und kohleverarbeitenden Industriebetrieben, Kokereien, Mineralöllagern, auf Gaswerksgeländen sowie unter alten Deponien hohe Altlast-PAK-Konzentrationen im Boden. In solchen Böden werden häufig Konzentrationen von mehreren Gramm PAK/kg Boden gefunden (KÄSTNER et al. 1993, LEISCHNER et al. 1993). Auch in Böden an den Rändern stark befahrener Fahrbahnen finden sich erhöhte PAK-Gehalte, die mit zunehmender Entfernung vom Fahrbahnrand abnehmen (TEBAAY et al. 1991). Als durch Kraftfahrzeugverkehr bedingte PAK-Emissionsquellen werden hierbei partikelgebundene teilverbrannte Kraftstoffe, verbrauchte Schmieröle, Autoreifenabrieb und erodierte Straßenasphalt diskutiert (ZÜRCHER et al. 1980). Wegen der früheren Verwendung von Steinkohlenteerpech im Asphalt ist der Straßenabrieb bei älteren Fahrbahnen von Relevanz. Da Steinkohlenteer wegen seines Gehaltes an PAK zu den krebs-

erzeugenden Arbeitsstoffen zählt, haben Teerprodukte im heutigen Straßenbau keine Bedeutung mehr.

## 1.2 Eigenschaften und Verhalten von PAK in der Umwelt

Als polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe bezeichnet man organische Verbindungen, die aus zwei oder mehreren kondensierten Benzolringen in linearer, angularer oder verzweigter Anordnung bestehen. Die amerikanische Umweltbehörde EPA hat 16 Vertreter dieser Stoffklasse als Leitsubstanzen in eine Liste umweltgefährdender Chemikalien aufgenommen. Sechs dieser Verbindungen sind ebenfalls in der deutschen Trinkwasserverordnung berücksichtigt (s. [Bild 1-1](#)).



**Bild 1-1:** Chemische Struktur der 16 EPA-PAK, mit \* gekennzeichnet sind die 6 PAK der deutschen Trinkwasserverordnung (aus [BLANKENHORN 1990](#))

Aufgrund ihres chemischen Aufbaus aus kondensierten Benzolringen besitzen PAK eine hohe negative Resonanzenergie, wodurch eine hohe thermodynamische Stabilität resultiert. Trotz des gemeinsamen Grundbausteins, dem Benzolring, unterscheiden sich die einzelnen PAK stark in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften (s. [Tabelle 1-1](#)).

**Tabelle 1-1:** Chemisch-physikalische Eigenschaften von PAK (zusammengestellt aus SIMS & OVERCASH 1983, KOCH 1989, BLUME 1990, STREIT 1991, KÄSTNER et al. 1993, RIPPEN 1997)

PAK	Ring- zahl	Molekül- masse [g/mol]	Dampfdruck bei 20 °C [Torr]	Wasserlöslich- keit bei 25 °C [µg/l]	log K <sub>ow</sub>	log K <sub>oc</sub>
Naphthalin	2	128	4,9*10 <sup>-2</sup>	30.000	3,37	2,94
Acenaphthen	3	154	2,0*10 <sup>-2</sup>	3470	4,33	3,8
Acenaphthylen	3	152	2,9*10 <sup>-2</sup>	3930	4,07	-
Fluoren	3	166	1,3*10 <sup>-2</sup>	1980	4,18	3,4–3,9
Phenanthren	3	178	6,8*10 <sup>-4</sup>	950	4,46	4,1
Anthracen	3	178	1,96*10 <sup>-4</sup>	48	4,45	4,41
Fluoranthen	4	202	6,0*10 <sup>-6</sup>	260	5,33	4,3
Pyren	4	202	6,85*10 <sup>-7</sup>	150	5,32	4,8
Benz[a]anthracen	4	228	5,0*10 <sup>-9</sup>	9–14	5,61	4,8
Chrysen	4	228	6,3*10 <sup>-7</sup>	1,5–2,2	5,61	4,9
Benzo[b]fluoranthen	5	252	5,0*10 <sup>-7</sup>	1,2	6,57	6,2
Benzo[k]fluoranthen	5	252	5,0*10 <sup>-7</sup>	0,55	6,84	5,6
Benzo[a]pyren	5	252	5,0*10 <sup>-7</sup>	3,8–14	6,04	6,65
Dibenz[a,h]anthracen	5	278	1,0*10 <sup>-10</sup>	0,5	5,97	6,31
Indeno[1,2,3-cd]pyren	6	276	1,0*10 <sup>-10</sup>	62	7,66	6,2
Benzo[ghi]perylen	6	276	1,0*10 <sup>-10</sup>	0,26	7,23	-

-: keine Literaturangaben

Die wichtigsten chemisch-physikalischen Eigenschaften der PAK – aus denen sich ihr Verhalten in der Umwelt und ihr ökotoxikologisches Gefährdungspotential ergeben – sind: der niedrige Dampfdruck, die geringe Wasserlöslichkeit, der hohe n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient – aus dem eine hohe Lipophilie resultiert – und der hohe Sorptionskoeffizient. Aus der [Tabelle 1-1](#) wird ersichtlich, daß diese Eigenschaften im allgemeinen mit der Ringzahl und der Molekülmasse korreliert sind. Mit zunehmender Molekülgröße sinken Dampfdruck und Wasserlöslichkeit der Verbindung, die Koeffizienten der Verteilung zwischen n-Octanol und Wasser und der Sorption an Bodenpartikel steigen. Von dieser Regel gibt es jedoch auch Ausnahmen, z.B. besitzt Benzo[a]pyren als Verbindung aus 5 Ringen eine Wasserlöslichkeit, die etwa fünfmal so hoch liegt wie die des 4-Ring-Vertreters Chrysen.

Die umweltgefährdende Wirkung der PAK beruht zunächst auf dem mutagenen und carcinogenen Potential einiger Verbindungen dieser Stoffgruppe. Insbesondere Vertreter der höhermolekularen 4-, 5- oder 6-Ringsysteme, wie z.B. Benz[a]anthracen, Dibenz[a,h]anthracen, Benzo[b]fluoranthen und Benzo[a]pyren besitzen eine carcinogene

Wirksamkeit (PREUSSMANN 1975, GRIMMER et al. 1991), wobei sie diese jedoch erst durch den Umbau zu reaktiven elektrophilen Metaboliten in der Säugetierzelle entfalten. Die Entdeckung dieser carcinogenen Wirkung von PAK-Vertretern führte dazu, daß diese Verbindungen lange Zeit als die bedeutendsten Umweltcarcinogene galten und von daher seit längerem Gegenstand intensiver Forschungen sind. Ihre ubiquitäre Verbreitung, ihre z.T. hohe Persistenz und ihre immer noch andauernde Freisetzung erfordern weiterhin aktive und intensive Forschungsaktivitäten, besonders auch im Bereich der ökotoxikologischen Wirkungen von PAK.

Unter dem Aspekt der biologischen Altlastensanierung ist in den letzten Jahren die Frage der biologischen Abbaubarkeit dieser Stoffgruppe und ihr Verhalten in Böden und Sedimenten in den Mittelpunkt der Forschung gerückt.

### 1.3 Mikrobieller Abbau von PAK

Die intensive Forschung auf dem Gebiet der biologischen Altlastensanierung führte in den letzten Jahren zu einer Vielzahl von identifizierten PAK-Abbauern und zur Aufklärung einiger der von ihnen benutzten Stoffwechselwege. Die Fähigkeit zum PAK-Abbau findet sich bei Bakterien, Cyanobakterien, Pilzen und Algen. Für die biotechnologische Nutzung des PAK-Abbaus im Rahmen der Sanierung stellen Bakterien und Pilze die Organismengruppen dar, die zum Einsatz kommen. Von Bedeutung ist hierbei der aerobe Abbau: der erste enzymatische Angriff auf ein PAK-Molekül ist immer mit einer Inkorporation von molekularem Sauerstoff verbunden. Grundsätzlich unterscheiden sich hierbei Eukaryonten und Prokaryonten.

Pilze verfügen als Eukaryonten über ein Cytochrom P-450-abhängiges Monooxygenasesystem, welches die Einbindung von einem Atom des Sauerstoffmoleküls in das aromatische Ringsystem katalysiert: als Produkt entsteht ein Arenoxid (GIBSON & SUBRAMANIAN 1984, CERNIGLIA et al. 1992, CERNIGLIA 1993). Dieses kann dann zum entsprechenden Phenol isomerisieren oder enzymatisch zu einem *trans*-Dihydrodiol umgewandelt werden. Weißfäule-Pilze, wie z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, produzieren extrazellulär wirkende Lignin-abbauende Enzymsysteme, diese können unspezifisch auch PAK abbauen (BUMPUS 1989, QIU & MCFARLAND 1991).

Der initiale Angriff auf den aromatischen Ring durch Bakterien erfolgt in der Regel unter Beteiligung einer Dioxygenase, wobei molekularer Sauerstoff eingebaut wird und so ein *cis*-Dihydrodiol entsteht (GIBSON & SUBRAMANIAN 1984, CERNIGLIA 1993, ASHOK & SAXENA 1995). Dieses wird dann durch eine Dehydrogenase in ein Dihydroxy-Derivat rearomatisiert. Der nächste Schritt ist dann die Ringspaltung, diese kann zwischen den beiden hydroxylierten C-Atomen (ortho- oder Intradiol-Spaltung) oder zwischen einem hydroxylierten und einem benachbarten nicht hydroxylierten C-Atom (meta- oder Exradiol-Spaltung) erfolgen. Nach dieser Ringspaltung kann eine Vielzahl möglicher Reaktionen erfolgen. Der Hauptabbauweg für die niederkernigen, linearen (z.B. Anthracen) oder angularen (z.B. Phenanthren) PAK läuft über Abspaltung

von Pyruvat, der weitere Abbau erfolgt an dem bereits substituierten Ring wie schon beschrieben. Als zentrale Metaboliten des Aromatenabbaus sind Catechol und Hydroxybenzoesäure anzusehen, deren Spaltprodukte in mehreren Schritten in Pyruvat, Acetyl-CoA, Acetaldehyd etc. umgewandelt und in den bakteriellen Bau- und Energiestoffwechsel eingeschleust werden. Auf diese Art kann die Verbindung komplett zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O abgebaut werden. Im Falle der clusterförmigen PAK (z.B. Pyren, Fluoranthen) sind die Abbauwege komplexer, da durch Recyclisierung oder Nebenreaktionen Produkte auftreten können, die möglicherweise nur durch komplementäre Abbausequenzen in Mischkulturen abgebaut oder als nicht weiter abbaubare Metaboliten freigesetzt werden.

Für den bakteriellen Abbau von Naphthalin, Phenanthren und Anthracen sind vollständige Abbauwege nach dem oben beschriebenen Mechanismus seit längerem eingehend untersucht und gesichert (CERNIGLIA 1984a und 1984b, GIBSON & SUBRAMANIAN 1984, CERNIGLIA & HEITKAMP 1989, WEIBENFELS 1990). Der vollständige Abbau anderer PAK mit weniger als 4 Ringen, wie Acenaphthen und Acenaphthylen, ist ebenfalls nachgewiesen: es wurden Metaboliten identifiziert, die Rückschlüsse auf die Abbauwege und auf beteiligte Enzymsysteme ermöglichen (KOMATSU et al. 1992). Gleiches gilt für Fluoren, ein bislang nur wenig untersuchter Dreiring-Aromat, doch auch hier ist die prinzipielle Abbaubarkeit durch Bakterien gesichert (WEIBENFELS 1990, TRENZ 1992).

Für PAK mit mehr als drei Ringen sind die Abbauwege der mikrobiellen Umsetzung noch nicht so vollständig aufgeklärt wie bei Naphthalin, Phenanthren und Anthracen. Eine Nutzung dieser höhermolekularen PAK durch Mikroorganismen als alleinige C- und Energiequelle wird für Fluoranthen (MUELLER et al. 1990, WEISSENFELS et al. 1991, KELLEY et al. 1993), Pyren (WALTER et al. 1991, BOLDRIN et al. 1993, LI et al. 1996, JUHASZ 1997) und Chrysen (WALTER et al. 1991) beschrieben.

Wachsen Bakterien auf einer PAK-Verbindung als einzige C- und Energiequelle, so ist das ein deutlicher Hinweis für eine mögliche vollständige Mineralisierung dieser Substanz: CO<sub>2</sub> entsteht als Hauptprodukt bei diesen Metabolisierungsvorgängen. Auch bei dieser Art der Verwertung kann es aber zur Akkumulation bzw. Ausscheidung von Stoffwechsel-Intermediaten kommen, wie z.B. beim Umsatz von Phenanthren oder Anthracen zur Aufstauung von Hydroxysäuren (KIYOHARA et al. 1976, GUERIN & JONES 1988a). Diese Metaboliten werden in späteren Wachstumsstadien weiter abgebaut.

Vom Abbautyp der vollständigen Mineralisierung, welcher von KÄSTNER et al. (1993) „als der Königsweg des Xenobiotika-Abbaus“ bezeichnet wurde, unterscheidet man den Prozeß der cometabolischen Transformation von Substraten. Der cometabolische Abbau von PAK, d.h. die Umwandlung der PAK-Verbindung in Gegenwart eines Wachstumssubstrates, erweitert das Spektrum der mikrobiell abbaubaren PAK erheblich und vergrößert den Kreis der PAK-Abbauer um viele Boden- und Wasserbakterien verschiedener Gattungen. Mono- und Dioxygenasen sind mit ihrer breiten Substratspezifität grundsätzlich häufig in cometabolische Prozesse eingebunden (MCCARTHY et al. 1991).

Der Mechanismus des Abbaus unterscheidet sich dabei in der Regel nicht grundsätzlich von dem oben beschriebenen Abbaumuster. Jedoch gibt es beim cometabolischen Abbau auch einige wenige Bakterien, welche die initiale PAK-Oxidation mit Monoxygenasen durchführen, so daß *trans*-Diol-Verbindungen entstehen, diese waren lange nur durch Bildung von Eukaryonten bekannt. Ein *Mycobacterium* sp. produziert so beim cometabolischen Abbau von Pyren neben dem *cis*-4,5-Pyrendihydrodiol durch eine Dioxygenase auch das *trans*-4,5-Dihydrodiol (HEITKAMP et al. 1988a). Weil die Organismen beim Abbau der Substrate durch Cometabolismus diese nicht zum Wachstum benötigen, bleibt der PAK-Stoffwechsel nach der initialen Oxidation oft auf einer frühen Stufe stehen und es kann so zur Akkumulation teiloxidierten Metaboliten – sogenannter dead-end Produkte – kommen. Da aber einige mikrobielle PAK-Metaboliten, wie z.B. das Benzo[a]pyren-*cis*-7,8-Dihydrodiol, genotoxische Aktivitäten besitzen können (FU et al. 1981), muß die komplette Mineralisation dieser Substanzen das Ziel einer biologischen Sanierung sein. Bezüglich der Metabolitenfreisetzung beim Abbau von PAK-Gemischen besteht noch erheblicher Forschungsbedarf (BOLDRIN 1992, BRYNIOK 1997).

Im Verbund einer Mischkultur findet sich ein wesentlich weiteres Spektrum physiologischer Eigenschaften und Fähigkeiten als in Reinkulturen, so daß Mischkulturen oft zum Abbau von Xenobiotica, wie z.B. PAK, fähig sind (HEITKAMP & CERNIGLIA 1988). In einer Mischkultur kann eine initiale cometabolische Transformation einer Verbindung den Weg bahnen für einen folgenden Angriff durch einen anderen Organismus (ATLAS & BARTHA 1980, BHATNAGAR & FATHEPURE 1991). Das Problem der Freisetzung unerwünschter und gefährlicher Metaboliten ist dadurch zumindest stark verringert (BOLLAG & BOLLAG 1992, SINGLETON 1994). Der Abbau von PAK durch natürliche Mischkulturen an kontaminierten Standorten ist daher auch Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen (BAUER & CAPONE 1985, MUELLER et al. 1989, SHIARIS 1989). Aber auch in Laborversuchen wurden Mischkulturen zum Abbau von PAK eingesetzt (WIESEL et al. 1993). Diese Kulturen zeigten häufig hohe Abbaukapazitäten, weil sich die einzelnen Mitglieder ergänzten, indem z.B. die einen abbauende Enzyme zur Verfügung stellten, andere Tenside oder Wachstumsfaktoren lieferten. Daher verfügen diese Mischpopulationen im Vergleich zu den Reinisolaten zumeist über ein ungleich höheres degradatives Potential. TRZESICKA-MLYNARZ & WARD (1995) verglichen die PAK-Abbauleistung einer definierten Mischkultur mit denen der einzelnen isolierten Reinkulturen und stellten fest, daß besonders die wenig wasserlöslichen PAK, wie Pyren und Anthracen, durch die Mischkultur in einem wesentlich höheren Maße abgebaut wurden.

Neben den Interaktionen von Mitgliedern einer mikrobiellen PAK-Abbaugemeinschaft untereinander, gibt es auch mögliche inhibierende oder synergistische Effekte zwischen den einzelnen Verbindungen eines PAK-Gemisches auf den Abbau der jeweils anderen Verbindungen. Diese Wechselwirkungen sind insbesondere beim cometabolischen Abbau von Bedeutung, jedoch auch bei nicht-cometabolischen Abbauprozessen zu finden (BOUCHEZ et al. 1995a). Allgemein wird beobachtet, daß der PAK-Abbau in einem Substanzgemisch in Reihenfolge sinkender Wasserlöslichkeiten der einzelnen Verbindun-

gen erfolgt (WALTER et al. 1990, KELLEY & CERNIGLIA 1995) und daß 4-Ring PAK grundsätzlich langsamer als 3-Ring PAK abgebaut werden (BANARJEE et al. 1995). Durch Zugabe eines wasserlöslicheren PAK-Vertreters kann der Abbau eines anderen PAK inhibiert werden (BOUCHEZ et al. 1995a). Jedoch wurden auch gegenteilige Wirkungen beobachtet, z.B. konnte die Zugabe von Fluoren den Umsatz von Phenanthren fördern: es lag ein Cometabolismus von Fluoren mit synergistischem Effekt vor. Bei demselben Stamm bewirkte das Vorliegen von Phenanthren und Fluoranthren nebeneinander einen verringerten Abbau beider PAK: Grund dafür war ein Substratantagonismus (BOUCHEZ et al. 1995a). Prozesse, die für solche Wechselwirkungen verantwortlich sein können, sind z.B. kompetitive Hemmung (STRINGFELLOW & AITKEN 1995), Akkumulation von dead-end Produkten und Interaktionen auf dem Level der Enzyminduktion (MUELLER et al. 1990, YE et al. 1996).

## 1.4 Mikrobieller Abbau von Benzo[a]pyren

Die 5-Ring Verbindung Benzo[a]pyren dient gewissermaßen als Leitsubstanz der höherkernigen PAK. Aufgrund ihres hohen mutagenen und carcinogenen Potentials liegen über diese Substanz bezüglich ihrer Toxizität und Wirkung auf den Säugetierorganismus sehr viele Ergebnisse vor. Der mikrobielle Abbau dieser Verbindung ist jedoch noch weitgehend ungeklärt, obwohl sich bereits seit Mitte der 40er Jahre Forschergruppen mit dem biologischen Abbau von Benzo[a]pyren beschäftigen. SHABAD untersuchte 1967 die Verbreitung von Benzo[a]pyren in der Umwelt und die Bedeutung von Bodenmikroorganismen bei Abbauvorgängen. POGLAZOVA et al. (1967) ergänzten diese Forschungsergebnisse, indem sie herausfanden, daß Benzo[a]pyren abbauende Bakterien, die in Medium kultiviert wurden, welches kein Benzo[a]pyren enthielt, ihre Fähigkeit zum Abbau dieser Verbindung verloren. KHESINA et al. (1969) wiesen in Böden einen Benzo[a]pyren-Abbau durch die autochthone Mikroorganismenpopulation nach und fanden eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Kontamination und der Abbaukapazität der jeweiligen Bakterienpopulation. GIBSON et al. (1975) gelang es, mit *Beijerinckia* sp. einen Bakterienstamm zu isolieren, der mit Hilfe von Succinat und Biphenyl Benz[a]anthracen und Benzo[a]pyren cometabolisch umsetzen konnte. Er identifizierte dabei als Hauptmetaboliten *cis*-9,10-Dihydroxy-9,10-dihydrobenzo[a]pyren und mit 10%igem Anteil als Nebenprodukt *cis*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyren.

Einen Überblick zum bisherigen Forschungsstand des Benzo[a]pyren-Abbaus durch Bakterien gibt die [Tabelle 1-2](#).

**Tabelle 1-2:** Beispiele für den Abbau von Benzo[a]pyren durch Bakterien (-: kein Einsatz von markiertem Benzo[a]pyren, +: Einsatz von <sup>14</sup>C-markiertem Benzo[a]pyren)

Mikroorganismen	Medium	<sup>14</sup> C-BaP	Abbau und Inkubationsdauer	Quelle
3 verschiedene <i>Pseudomonas</i> sp. <i>E. coli</i>	Flüssigkultur, C-Quelle: Succinat	-	<i>Ps.</i> : 0,05 – 0,13 µM/h nach 6 Stunden Inkubation in der stationären Phase, <i>E. coli</i> : kein Umsatz	BARNSELY 1975
Mischkultur	ölkontaminiertes und unbelastetes Sediment	+	< 0,3 % <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> im kont. Sediment, im unkont. Sediment nach 26 Tagen kein <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nachweisbar; berechnete Halbwertszeiten: für kont. Sediment: > 3,3 Jahre, für unkont. Sediment: > 60 Jahre	HERBES & SCHWALL 1978
Mischkultur	Sediment als Slurry	+	6,4 % als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 37 Tagen	DELAUNE et al. 1981
Mischkultur	Boden + Ölschlamm	-	44,4 % Abbau nach 1280 Tagen	BOSSERT et al. 1984
Mischkultur	Sediment als Slurry	+	< 0,2 %, 0,5 % und 3,1 % <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 8 Wochen; geschätzte Halbwertszeiten von über >200 bis > 300 Wochen (je nach Sediment)	HEITKAMP & CERNIGLIA 1987
isolierter PAK-Abbauer	Flüssigkultur, C-Quellen: Hefeextrakt + Pepton + Stärke + Pyren	+	24,7 % als Metaboliten extrahiert, <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 2 Wochen nicht nachweisbar	HEITKAMP & CERNIGLIA 1988
Mischkultur	Boden + Raffinerieabfälle	+	7,68 % als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 4 Monaten	HOSLER et al. 1988
<i>Mycobacterium</i> sp.	unbelastetes Sediment als Slurry	+	3,6 % als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 28 Tagen	HEITKAMP & CERNIGLIA 1989
Mischkultur	unterschiedlich kontaminierte Böden	-	berechnete Halbwertszeiten: 151–309 Tage (je nach Matrix der Kontamination)	KECK et al. 1989

**Tabelle 1-2 (Fortsetzung)**

Mikroorganismen	Medium	<sup>14</sup> C-BaP	Abbau und Inkubationsdauer	Quelle
Mischkultur	PAK belastetes Sediment als Slurry	+	11 % als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> , 57 % als polare Metaboliten nach ca. 15 Monaten	SHIARIS 1989
Mischkultur	unbelasteter Boden	-	persistent, berechnete Halbwertszeit: > 300 Tage	PARK et al. 1990b
Mischkultur	PAK belastete Böden	+	von 0 bis 25 % (je nach Boden) als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach > 180 Tagen	GROSSER et al. 1991
daraus isoliertes <i>Mycobacterium</i> sp.	Flüssigkultur, C-Quellen: Hefeextrakt + Pepton + Stärke + Pyren		21 % <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 2 Wochen	
<i>Rhodococcus</i> sp.	Flüssigkultur, C-Quelle: Pyren	-	11 % Abbau nach 2 Wochen	WALTER et al. 1991
Mischkultur	PAK belastete Böden als Slurry	+	2 %, 10 %, 12 % (je nach Boden) nach 4 Wochen	SANSEVERINO et al. 1993
Mischkultur	PAK belastete Böden	-	< 8 % nach 160 Tagen	GROSSER et al. 1995
<i>Mycobacterium</i> sp.	Flüssigkultur, C-Quellen: Hefeextrakt + Pepton + Stärke + Pyren	+	28 % nach 32 Tagen als Metaboliten extrahiert: 6 Metaboliten gefunden, Abbauweg propagiert	SCHNEIDER et al. 1996
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Flüssigkultur ohne weitere C-Quelle	-	20–30 % nach 63 Tagen	JUHASZ et al. 1996
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Flüssigkultur, C-Quelle: Fluoranthren	+	28 % als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 48 Stunden	YE et al. 1996
Mischkultur	PAK belastete Böden als Slurry	+	2–9 % als <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> nach 8 Wochen	CARMICHAEL & PFAENDER 1997a
<i>Burkholderia cepacia</i>	Flüssigkultur, C-Quelle: Phenanthren	-	41 % nach 46 Tagen	JUHASZ et al. 1997
Mischkultur	Boden + PAK-Gemisch Boden-Kompost Gemisch + PAK-Gemisch	-	kein Abbau nach 15 Wochen 46 % nach 15 Wochen, 73 % nach 25 Wochen	WISCHMANN & STEINHART 1997

Daß Benzo[a]pyren grundsätzlich biologisch abbaubar ist, zeigen die in [Tabelle 1-2](#) zusammengefaßten Forschungsergebnisse. Aus der Zusammenstellung wird deutlich, daß der cometabolische Abbau in der Regel in komplexen Medien oder aber mit niederkernigeren PAK-Verbindungen wie Fluoranthen oder Pyren erfolgte. Das Wachstum von Mikroorganismen auf Benzo[a]pyren als alleinige C- und Energiequelle wurde von [JUHASZ et al. \(1996\)](#) nachgewiesen, bei Anwesenheit niederkerniger Aromaten waren die Abbauraten von Benzo[a]pyren auch hier wesentlich erhöht. [SCHNEIDER et al. \(1995\)](#) isolierten mehrere von einem *Mycobacterium* sp. gebildete Benzo[a]pyren-Metaboliten und präsentierten damit Ringspaltungsprodukte eines möglichen Abbauweges. Der Einsatz von <sup>14</sup>C-markiertem Benzo[a]pyren in den Abbaustudien wurde in der [Tabelle 1-2](#) mitaufgeführt, da der Analytik zum Verbleib der Chemikalien, durch den Nachweis der radioaktiven Markierung, eine zusätzliche Aussagekraft verliehen wird. Dieses gilt insbesondere für die oft langen Versuchsdauern mit niedrigen Umsatzraten. PAK können, neben der normalen Adsorption an organische Verbindungen, mit Huminstoffen eine komplexartige Bindung eingehen ([QIU & MCFARLAND 1991](#), [MAHRO & KÄSTNER 1993](#), [KÄSTNER et al. 1993](#)). Sie können dann mit üblichen organischen Lösungsmitteln nicht mehr extrahiert werden und entgehen somit der Analyse. Dieses Verschwinden wird dann oft fälschlicherweise mit einem Abbau gleichgesetzt ([ESCHENBACH et al. 1994](#)). Der Einsatz von radioaktiv markierten Substanzen ermöglicht hingegen die Quantifizierung solchermaßen gebundener Rückstände.

Zu allen Aspekten des PAK-Abbaus – dabei insbesondere unter Berücksichtigung der persistenten höherkernigen Verbindungen – besteht noch ein intensiver Forschungsbedarf. Die Schwerpunkte sollten dabei u.a. Forschung über Abbauwege und Metaboliten, die Untersuchung limitierende Stoffübergänge, die Charakterisierung der Enzyme des Abbaus, die Suche nach geeigneten Cosubstraten, die Erhöhung von Schadstoffaufnahme und -umsatz bei Mikroorganismen sowie den Abbau durch Mischkulturen mit Aufklärung von Sukzessionen zum Ziel haben.

## 1.5 Limitierung des PAK-Abbaus

Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen biologischen Abbau von PAK ist das Vorhandensein einer hierzu befähigten Mikroorganismenpopulation. Beeinflußt wird ein möglicher Abbau jedoch durch mehrere abiotische Faktoren: Temperatur ([WEIBENFELS et al. 1990a](#), [SINGLETON 1994](#)), pH-Wert ([WEIBENFELS et al. 1990a](#), [KÄSTNER et al. 1998](#)), Nährstoffversorgung ([MORGAN & WATKINSON 1989](#), [LEAHY & COLWELL 1990](#), [SINGLETON 1994](#)), Salzgehalt ([SHIARIS 1989](#), [KÄSTNER et al. 1998](#)), Bodentyp ([KÄSTNER et al. 1993](#)), Sauerstoffversorgung ([MORGAN & WATKINSON 1989](#), [LEAHY & COLWELL 1990](#)), Wassergehalt ([MORGAN & WATKINSON 1989](#), [LEAHY & COLWELL 1990](#)) und Redoxpotential ([MIHELICIC 1988](#), [KÄSTNER et al. 1993](#)). Weiterhin spielen auch die chemisch-physikalischen Stoffeigenschaften der abzubauenen Verbindung eine Rolle. Bei den PAK sind hier die geringe Wasserlöslichkeit, der hohe n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient – aus dem eine hohe Lipophilie resultiert – und der hohe

Sorptionskoeffizient von Bedeutung (s. [Tabelle 1-1](#)). Zwischen den genannten Faktoren können außerdem Wechselwirkungen bestehen, so daß es viele Ursachen geben kann, warum eine Verbindung sich als nicht oder schlecht abbaubar erweist.

Entscheidend aber für den Abbau einer Verbindung ist – sofern Mikroorganismen mit der nötigen Enzymausstattung anwesend sind – in der Regel die Aufnahme dieser Verbindung in den Organismus. Die Substanz muß bioverfügbar sein. Wenn ein unzureichender Transfer dieser Substanz den biologischen Abbau hemmt, so spricht man von limitierter Bioverfügbarkeit. Kristalline organische Verbindungen wie die PAK werden von Bakterien im allgemeinen nicht verwertet. Erst der Stoffübergang in die gelöste Form kann zur Aufnahme in die Bakterienzelle und zur Verstoffwechslung führen ([WODZINSKI & COYLE 1974](#), [BOETHLING 1984](#), [STUCKI & ALEXANDER 1987](#), [BOUCHEZ et al. 1995b](#), [BOUCHEZ et al. 1997a](#)). Daher wird im wässrigen System unter idealen Laborbedingungen die Abbaurate von PAK im wesentlichen vom Stoffübergang in die wässrige Phase bestimmt ([VOLKERING et al. 1992](#), [BOUCHEZ et al. 1995b](#)), dieses erklärt auch, warum die Geschwindigkeit des mikrobiellen Abbaus mit zunehmender Komplexität der PAK abnimmt.

Im System Boden wird die Bioverfügbarkeit von PAK noch um einige Einflußgrößen erweitert. Ein die Verfügbarkeit von PAK wesentlich bestimmender Parameter ist die Adsorption dieser organischen Verbindungen an Bodenpartikel ([MANILAL & ALEXANDER 1991](#)). Da die höhermolekularen PAK die höchsten Sorptionskoeffizienten besitzen, erklärt dieses auch die beobachteten unterschiedlichen Halbwertszeiten von PAK im Boden ([PARK et al. 1990a](#)). Mit zunehmender Sorptionskapazität des Bodens wird die Bioverfügbarkeit der PAK limitiert und der Abbau reduziert ([WEISSENFELS et al. 1992](#)).

## 1.6 Erhöhung der Bioverfügbarkeit schwer wasserlöslicher Substanzen

Ist die limitierte Bioverfügbarkeit einer Verbindung Ursache für einen verlangsamten biologischen Abbau dieser Substanz, so liegt es nahe, durch geeignete Maßnahmen eine Steigerung der Bioverfügbarkeit zu erreichen und damit auch den biologischen Umsatz zu beschleunigen. Eine Erhöhung des Massentransfers einer kristallinen Verbindung in die wässrige Phase kann durch gesteigertes Rühren oder Schütteln des Kulturmediums, durch Vergrößerung der Kontaktfläche oder durch Steigerung der Wasserlöslichkeit erreicht werden ([VOLKERING et al. 1993](#)). [KÖHLER \(1992\)](#) wies nach, daß durch eine Reduktion der Korngröße von Phenanthrenkristallen die so erreichte Vergrößerung der Oberfläche zu einer Steigerung der mikrobiellen Abbaurate führte. [KEUTH & REHM \(1991\)](#) vermuteten, daß die nach Erhöhung der Phenanthrenkonzentration im Medium beobachtete Steigerung der Abbaurate, auf die vergrößerte Kristalloberfläche zurückzuführen war. Auch eine Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit steigerte den Phenanthrenabbau ([KÖHLER 1992](#)). Der Einsatz einer nicht mit Wasser mischbaren organischen Phase, wie z.B. 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan oder Dibutylphthalat als substrat-

tragendes Lösemittel, konnte den mikrobiellen PAK-Abbau ebenfalls beschleunigen (EFROYMSON 1991, EICHLER 1991, BRYNIOK 1993, BIRMAN & ALEXANDER 1996).

Um lipophile Substrate mit geringer Wasserlöslichkeit zu verwerten, haben einige Mikroorganismen entsprechende physiologische Anpassungen entwickelt. Speziell von alkanabbauenden Bakterien ist bekannt, daß sie oberflächenaktive Substanzen bilden können, die allgemein als Biotenside bezeichnet werden (COOPER & ZAJIC 1989, KOSARIC 1993, HOMMEL 1990, NEU 1996). Diese Biotenside bestehen aus einem hydrophilen und einem lipophilen Molekülanteil, aufgrund der Struktur des hydrophilen Anteils werden sie in Glycolipide, Lipopeptide, Fettsäuren, Phospholipide und neutrale Lipide eingeteilt (HOMMEL 1990). Werden solche Biotenside von Bakterien in das umgebende Medium ausgeschieden, (pseudo-)solubilisieren sie dort vorhandene Kohlenwasserstoffverbindungen, erhöhen also die (scheinbare) Wasserlöslichkeit dieser Stoffe und machen sie damit leichter für Mikroorganismen verfügbar. Eine solche Steigerung der Wasserlöslichkeit lipophiler Substanzen ist natürlich ebenso durch den Einsatz technischer Tenside erreichbar.

## 1.7 Strukturen und Eigenschaften von Tensiden

Das Tensidmolekül besitzt, aufgrund seines Aufbaus aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil, einen amphiphilen Charakter und verhält sich in Lösungsmitteln, insbesondere in Wasser, grenzflächenaktiv:

Tenside reichern sich in den Grenzflächen der wässrigen Phase an, unabhängig davon, ob diese an eine gasförmige, eine flüssige oder eine feste Phase angrenzt. Diese Grenzflächenakkumulation führt dazu, daß die Grenzflächenspannung reduziert wird und sich die Benetzungseigenschaften zwischen Wasser und Feststoffen verändern. Beim Überschreiten einer charakteristischen Konzentration bilden die Tensidmoleküle untereinander durch reversible Aggregation größere Molekülverbände von 20–200 Molekülen. Diese haben in der Regel Kugelform, können aber auch stäbchen- oder scheibenförmig ausgebildet sein. Diese Aggregate werden als Micellen bezeichnet, zwischen den Monomeren und den Micellen besteht ein thermodynamisches Gleichgewicht.

Der für jedes Tensid charakteristische Konzentrationsschwellenwert, ab dem die Bildung dieser Micellen erfolgt, ist die kritische Micellbildungskonzentration (CMC). Ist diese maximale Konzentration an Tensidmonomeren erreicht, nimmt auch die Oberflächenspannung des Wassers nicht mehr weiter ab.

In den Micellen sind die hydrophoben Gruppen der Tensidmoleküle möglichst ohne direkten Kontakt mit dem Wasser, während die hydrophilen Gruppen auf der Micelloberfläche sitzen und die Micelle in Lösung halten.

Teilt man die Tenside nach ihren hydrophilen Gruppen ein, ergeben sich folgende Untergruppen (KOSSWIG & STACHE 1993):

- \* Anionische Tenside: z.B. Carboxylate, Sulfonate, Sulfate, Phosphate
- \* Kationische Tenside: z.B. Ammoniumsalze, Salze von Aminoxiden, Sulfoniumsalze
- \* Zwitterionische oder amphothere Tenside: z.B. Aminoxide, Betaine, Sulfobetaine, Lecithine (Phospholipide)
- \* Nichtionische Tenside: z.B. Polyglycolether, Polyalkohole, Polyamine, Polypropylen glycolether, Zuckertenside

Die Bildung von Micellen führt dazu, daß sich hydrophobe Substanzen in das hydrophobe Zentrum dieser Aggregate einlagern, diesen Vorgang bezeichnet man als Solubilisierung (LIU et al. 1991, WEST & HARWELL 1992). Dieses Phänomen kann die Konzentration einer Substanz erheblich über seine Wasserlöslichkeit hinaus steigern. Die Solubilisierung hydrophober Substanzen beginnt gewöhnlich bei der CMC und ist oberhalb dieser Tensidkonzentration in der Regel über einen weiten Konzentrationsbereich eine lineare Funktion (EDWARDS et al. 1991a und 1991b, EDWARDS et al. 1992b, TIEHM 1994).

## 1.8 Tensideffekte auf den Abbau von PAK

Der Einsatz von (Bio-)Tensiden zur Steigerung des biologischen Abbaus von schlecht wasserlöslichen Schadstoffen in der Sanierung kontaminierter Standorte ist in den letzten Jahren auf beträchtliches Interesse gestoßen (ROBICHAUX & MYRICK 1972, ELLIS et al. 1990, ARONSTEIN et al. 1991, EFROYMSON & ALEXANDER 1991, FRANCY et al. 1991, EDWARDS et al. 1992a, BURY & MILLER 1993, BUNZEL et al. 1995). Schwerpunkt der Forschung und Anwendung lag hierbei bei den Kontaminationen mit Rohöl sowohl im Meer als auch auf dem Land. Umweltkatastrophen, wie Tankerhavarien, z.B. die der Exxon Valdez (BRAGG et al. 1994) und die Ölverschmutzungen in Kuwait durch die irakische Besatzungsmacht (BADER & CLARKSON 1995), aber auch die Förderung und Verarbeitung von Erdöl (VAN DYKE et al. 1991, KOSSWIG & STACHE 1993, BANAT 1995), sind Einsatzgebiete, in denen die solubilisierende Fähigkeit von Tensiden genutzt wird.

Der biologische Abbau von Alkanen – und die damit verbundene Bedeutung der Biotensidbildung durch Bakterien – ist intensiv untersucht, und wenn auch bisher die Zusammenhänge hierbei noch nicht vollständig geklärt sind, so ist es doch bewiesen, daß die Biotensidbildung oft eine Voraussetzung für die Alkanverwertung ist (KOCH et al. 1991, ZHANG & MILLER 1995). Im Unterschied dazu scheint eine Biotensidbildung durch PAK-Verwerter keine solche Bedeutung zu haben. Wenn auch DÉZIEL et al. (1996) bei PAK-Abbauern Biotensidbildung nachweisen konnten, so findet sich in der Literatur keine zwingende Bestätigung für einen Zusammenhang zwischen Biotensidbildung und PAK-Abbau.

Da aber Tenside in der Lage sind, PAK zu solubilisieren, liegt es nahe, Tenside zum einem bei Sanierungstechniken, wie z.B. der Bodenwäsche, einzusetzen (LIU et al. 1991, YEOM et al. 1996, SCHEIBENBOGEN et al. 1994), zum anderen aber auch durch ihren Einsatz die Bioverfügbarkeit von PAK für Mikroorganismen zu steigern (s. [Tabelle 1-3](#)).

**Tabelle 1-3:** Beispiele für mikrobiellen PAK-Abbau unter Tensideinfluß (+: Steigerung des PAK-Abbaus, - Inhibierung des PAK-Abbaus, 0: kein Effekt auf den PAK-Abbau)

Mikroorganismen	Name des Tensids	Tensid - typ	Tensid-konz.	PAK; Medium	PAK-Abbau	Quelle
<i>Mycobacterium</i> sp.	5 Tween-Typen	TT, ni	~ CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Flüssigmedium	+	GUERIN & JONES 1988b
Mischkultur, Reinkulturen	Emulsan	BT, ai		<sup>14</sup> C-Phen., <sup>14</sup> C-Anthr.; Rohöl	Mischkultur: - Reinkulturen: 0, +	FOGHT et al. 1989
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Tween 80	TT, ni	> CMC	Fluora.; Flüssigmedium	+	MUELLER et al. 1990
Mischkultur	Alfonic, Novel II	TT, ni	< CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden	+	ARONSTEIN et al. 1991
<i>Arthrobacter</i> sp.	Triton X-100	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Naph.; Heptamethylnonan	+	EFROYMSON & ALEXANDER 1991
Mischkultur	Brij 30, Tergitol NP-10, Triton X-100	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden-Slurry; Wasser	- (< CMC: 0)	LAHA & LUTHY 1991
Mischkultur	Alfonic, Novel II	TT, ni	< CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden-Slurry; Sand	+	ARONSTEIN & ALEXANDER 1992
Mischkultur	Triton X-100, Brij 30	TT, ni	> CMC < CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden-Slurry	> CMC: - < CMC: 0	EDWARDS et al. 1992a
Mischkultur	10 Tensidtypen	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden-Slurry	- (< CMC: 0)	LAHA & LUTHY 1992
Mischkultur	9 Tensidtypen	TT, ni	> CMC	PAK-Spektrum; Flüssigmedium	- oder +	TIEHM 1994
<i>Pseudomonas</i> sp.	Triton X-100	TT, ni	> CMC	Naph.; Amberlite XAD-4	+	BREURE et al. 1995

BT: Biotensid, TT: Technisches Tensid, ni: nichtionisch, ai: anionisch, zi: zwitterionisch

**Tabelle 1-3 (Fortsetzung)**

Mikroorganismen	Name des Tensids	Tensid - typ	Tensid- konz.	PAK; Medium	PAK-Abbau	Quelle
<i>Pseudomonas saccharophila</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	3 Triton-Typen Inipol EAP22 <sup>a</sup>	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Flüssigmedium	Triton-Typen: <i>Ps. sacch.</i> : + <i>Ps. putida</i> : - Inipol EAP 22: +	CHURCHILL et al. 1995
Mischkultur	Triton X-100, Brij 30	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Naph.; Flüssigmedium	0	LIU et al. 1995
<i>Pseudomonas</i> sp., Reinkultur	5 Tensidtypen	TT, ni	> CMC < CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Flüssigmedium	<i>Ps. sp.</i> : - Reinkultur: +	ROCH & ALEXANDER 1995
Mischkultur	7 Tensidtypen	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Sediment-Slurry	- (Triton X-100: +)	TSOMIDES et al. 1995
Reinkultur	4 Tensidtypen	TT, ni	> CMC	Naph., Phen.; Flüssigmedium	+	VOLKERING et al. 1995
Mischkultur	SDS Rhamnolipid	TT, ai BT, ai	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden 13 PAK-Verbindungen, Boden (gealtert)	<sup>14</sup> C-Phen.: - 3-Ring PAK: 0 4-Ring PAK: -	DESCHÊNES et al. 1996
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Tergitol NP-10	TT, ni	> CMC	Phen.; Flüssigmedium	+	GRIMBERG et al. 1996
Mischkultur	11 Tensidtypen	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Flüssigmedium	für 8 Tenside: + für 3 Tenside: -	GUHA & JAFFÉ 1996a
<i>Mycobacterium</i> sp.	Triton X-100	TT, ni	< CMC > CMC	<sup>14</sup> C-Pyren; Flüssigmedium	< CMC: + > CMC: -	JIMINEZ & BARTHA 1996

<sup>a</sup> Öl-in-Wasser-Microemulsion mit Nährstoffen, BT: Biotensid, TT: Technisches Tensid, ni: nichtionisch, ai: anionisch, zi: zwitterionisch

**Tabelle 1-3 (Fortsetzung)**

Mikroorganismen	Name des Tensids	Tensid - typ	Tensid-konz.	PAK; Medium	PAK-Abbau	Quelle
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., Reinkultur	pflanzliches Saponin und Lecithin	zi	> CMC	Phen., Fluora.; Flüssigmedium	bei Lecithin: + bei Saponin: 0	SOEDER et al. 1996
<i>Pseudomonas</i> sp. (2 Arten)	Witconol SN 70	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Pyren; Boden; Boden-Slurry	im Boden: + im Slurry: -	THIBAUT et al. 1996
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Tween 80 Cyclodextrin <sup>b</sup>	TT, ni ni	> CMC	<sup>14</sup> C-BaP; Flüssigmedium	0	YE et al. 1996
Mischkultur	Triton X-100 Inipol EAP-122 <sup>a</sup>	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Boden	- (0,25 %: 0)	CARMICHAEL & PFAENDER 1997b
Reinkulturen	5 Tensidtypen	TT, ni	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen., <sup>14</sup> C-Pyren; Boden	+	MADSEN & KRISTENSEN 1997
Mischkultur	Arkopal N-300, Sapogenat T-300	TT, ni	> CMC	13 PAK-Verbindungen; Boden (gealtert)	Arkopal N-300: - Sapogenat T- 300: +	TIEHM et al. 1997
<i>Pseudomonas putida</i>	Rhamnolipide	BT, ai	> CMC	<sup>14</sup> C-Phen.; Flüssigmedium	+	ZHANG et al. 1997

<sup>a</sup> Öl-in-Wasser-Microemulsion mit Nährstoffen, <sup>b</sup> cyclisches Oligosaccharid (Produkt des bakteriellen Stärkeabbaus), BT: Biotensid, TT: Technisches Tensid, ni: nichtionisch, ai: anionisch, zi: zwitterionisch

Betrachtet man in [Tabelle 1-3](#) die PAK-Vertreter, die in den Abbaustudien eingesetzt wurden, so fällt auf, daß dabei fast ausschließlich Phenanthren gewählt wurde. Phenanthren gehört aber mit seiner recht hohen Wasserlöslichkeit von etwa 1 mg/l nicht zu den schwer abbaubaren PAK, viele Mikroorganismen können diese Verbindung auch sehr schnell ohne eine Solubilisierung durch Tenside abbauen. Der Verbleib des 5-Rings Benzo[a]pyren – mit einer im Vergleich zu Phenanthren um den Faktor 150 geringeren Löslichkeit als schwer abbaubare Verbindung bekannt (s. [Tabelle 1-2](#)) – wurde nur von drei Arbeitsgruppen untersucht. [DESCHÊNES](#) et al. (1996) und [TIEHM](#) et al. (1997) prüften den Einfluß von Tensiden auf jeweils 13 PAK-Verbindungen einer gealterten Bodenkontamination, in beiden Studien wurde kein signifikanter Benzo[a]pyren-Abbau nachgewiesen. [YE](#) et al. (1996) untersuchten den cometabolischen Abbau von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren durch *Sphingomonas paucimobilis* in Flüssigkultur mit dem Wachstumssubstrat Fluoranthren (s. [Tabelle 1-2](#)). Die Abbaurate betrug 28 % nach 48 Stunden Inkubation, der Einsatz von Tween 80 oder Cyclodextrin zur Solubilisierung der PAK zeigte keinen Einfluß auf diese Abbaurate. Die Forschergruppe schloß daraus, daß der Abbau höherkerniger PAK-Verbindungen nicht durch die geringe Wasserlöslichkeit limitiert wird.

Wie aus der [Tabelle 1-3](#) deutlich wird, gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Ergebnisse über den Einsatz von Tensiden zur Steigerung des mikrobiellen PAK-Abbaus. Die Versuchsergebnisse reichen von fördernden Effekten über keinen Einfluß bis hin zur Inhibierung. Da über den Mechanismus der Aufnahme von PAK in die Bakterienzelle noch nicht sehr viel bekannt ist, beruht die Interpretation der Ergebnisse oft auf Hypothesen. Hinzu kommt die Vielfalt der PAK-Abbauer, das breite Spektrum an einsetzbaren Tensiden, die Konzentration der Tenside, der Einfluß des Mediums und die Unterschiede zwischen den einzelnen PAK-Verbindungen.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Verbindung Benzo[a]pyren. Als Leitsubstanz der höherkernigen PAK gilt der Abbau dieser Substanz durch Bakterien zwar als gesichert, wenig ist jedoch darüber bekannt, warum sich diese Verbindung als so schlecht abbaubar erweist.

Durch selektive Anreicherung und Isolierung sollten spezialisierte Mischkulturen etabliert und optimiert werden, die Benzo[a]pyren mineralisieren können. Diese sollten dann für weitergehende Untersuchungen des bakteriellen Benzo[a]pyren-Abbaus eingesetzt werden können.

Wenn der Grund für die schlechte Verwertbarkeit dieser Verbindung in der limitierten Bioverfügbarkeit liegt, so könnte der Einsatz eines geeigneten Tensids diese Bioverfügbarkeit steigern und den Abbau von Benzo[a]pyren ermöglichen oder verbessern. Dazu mußten zunächst die solubilisierenden Eigenschaften verschiedener Tenside für Benzo[a]pyren bestimmt werden. Zum Einsatz in die PAK-Abbauversuche war es not-

wendig, die Toxizität der Tenside auf die Mischkultur zu ermitteln. Die Auswahl des Tensids sollte zudem nach ökologischen und ökotoxikologischen Gesichtspunkten erfolgen, wobei auch eine mögliche Anwendung in der Saniertechnik berücksichtigt werden mußte.

Abbauversuche mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Benzo[a]pyren ermöglichen Aussagen über eine Mineralisierung dieser Substanz und erlauben über die kontinuierliche Erfassung des  $^{14}\text{CO}_2$  lange Inkubationszeiten mit wechselnden Bedingungen. Mit diesem Versuchssystem sollten die Tensideffekte bei der Inkubation von Benzo[a]pyren mit anderen PAK als PAK-Gemisch erfaßt werden.

Darüber hinaus war die Bedeutung des PAK-Gemisches und seiner Einzelkomponenten als Wachstumssubstrat für die Bakterien bezüglich des Benzo[a]pyren-Abbaus von Interesse. Interaktionen zwischen den einzelnen PAK-Komponenten sollten beobachtet werden und ein geeignetes Cosubstrat für den Benzo[a]pyren-Abbau ermittelt werden. Die gaschromatographische Erfassung der nicht radioaktiv markierten PAK sollte über ihre Verwertung durch die Mischkultur Auskunft geben.

Die PAK-verwertenden Mischkulturen sollten näher charakterisiert und differenziert werden, wobei hier die Möglichkeiten verschiedener Methoden genutzt werden konnten.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

#### 2.1.1 Tenside

Die eingesetzten Tenside waren handelsübliche Produkte technischer Reinheit und wurden freundlicherweise von den Herstellern kostenlos zur Verfügung gestellt. Die chemischen und ökotoxikologischen Eigenschaften der Tenside konnten den technischen Datenblättern entnommen werden und eine Auswahl davon ist in [Tabelle 2-1](#) und [Tabelle 2-2](#) aufgelistet.

**Tabelle 2-1:** Chemische Daten der eingesetzten Tenside

Tensid (Hersteller)	Tensidstruktur	Tensidtyp	AS in Wasser [%]	Molekül- masse [g/mol]
Lutensol ON 70 (BASF)	Alkylpolyethylenglykolether auf Basis eines kurz- kettigen, synthetischen Fett- alkohols	nichtionisch	100	ca. 470
Lutensit A-PS (BASF)	Alkylsulfonat, Na-Salz	anionisch	65	ca. 400
Texapon N 70 (Henkel)	Natriumlaurylethersulfat mit ca. 2 Mol EO	anionisch	68–73	ca. 382
Dehyton K (Henkel)	Fettsäureamid-Derivat mit Betainstruktur	amphoter	29–32	ca. 355
Dehyquart A (Henkel)	Trimethylhexadecyl- ammoniumchlorid	kationisch	24–26	ca. 325
Plantacare 2000 UP (Henkel)	C <sub>8</sub> –C <sub>16</sub> Fettalkoholpoly- glycoside, Alkylpolyglyco- side	nichtionisch	51–55	ca. 390

AS: Aktivsubstanz, EO: Ethylenoxid

**Tabelle 2-2:** Ökotoxikologische Daten der eingesetzten Tenside

Tensid (Hersteller)	Biologische Abbaubarkeit	akute Bakterientoxizität <sup>b</sup>	chronische Bakterientoxizität <sup>c</sup>
Lutensol ON 70 (BASF)	90 % <sup>d</sup>	k.A.	k.A.
Lutensit A-PS (BASF)	90 % <sup>d</sup>	k.A.	k.A.
Texapon N 70 (Henkel)	mind. 70 % <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> : > 100 mg Prod./l	k.A.
Dehyton K (Henkel)	mind. 70 % <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> : > 100 mg Prod./l	EC <sub>50</sub> : > 100 mg Prod./l
Dehyquart A (Henkel)	> 80 % <sup>e</sup>	EC <sub>50</sub> : = 1–10 mg Prod./l	k.A.
Plantacare 2000 UP (Henkel)	mind. 70 % <sup>a</sup>	EC <sub>0</sub> : > 100 mg Prod./l	EC <sub>0</sub> : > 100 mg Prod./l

<sup>a</sup>DOC-Abnahme im modifizierten OECD Screening Test (OECD-Grenzwert für Klassifizierung „readily biodegradable“/„leicht abbaubar“: mind. 70 % DOC)

<sup>b</sup>O<sub>2</sub>-Konsumptionstest mit *Pseudomonas putida* nach OECD

<sup>c</sup>Zellvermehrungs-Hemmtest mit *Pseudomonas putida*

<sup>d</sup>BiAS: Abnahme an Wismutaktivsubstanz (nach deutscher Tensidverordnung)

<sup>e</sup>biologische Eliminierbarkeit in Kläranlagen

Alle Tenside wurden als technische Produkte ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt. Dazu wurden mit Aqua bidest. verschieden konzentrierte Verdünnungen hergestellt: das Tensid wurde in definierter Menge eingewogen und mit Aqua bidest. auf das entsprechende Gewicht aufgefüllt. Die Konzentrationsangaben für die Tensidlösungen in % sind daher immer als Gewichtsprozent des technischen Produktes in Wasser zu verstehen. Dieser Bezug wurde gewählt, weil die Menge an Aktivsubstanz (AS) im Produkt nicht genau definierbar ist und je nach Charge gewisse Schwankungen aufweisen kann (s. [Tabelle 2-1](#)). Auch die neben der AS vorhandenen Beistoffe der technischen Produkte waren nicht bekannt.

Die Namen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tenside sind eingetragene Warenzeichen der Firmen BASF und Henkel, auch wenn dieses im Text nicht weiter kenntlich gemacht ist.

### 2.1.2 $^{14}\text{C}$ -markiertes Benzo[a]pyren

Für die Versuche mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Benzo[a]pyren wurden drei verschiedene Chargen dieser Verbindung benutzt. Die radioaktive Markierung befand sich immer an der 7er und 10er Position (s. Bild 2-1). Die radiochemischen Eigenschaften der einzelnen Chargen sind in Tabelle 2-3 aufgelistet.

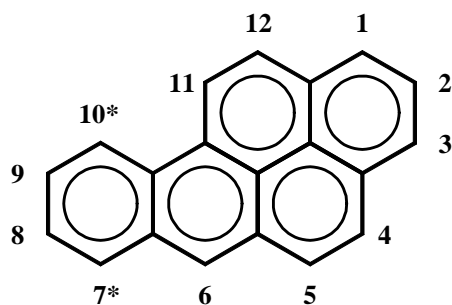


Bild 2-1: Chemische Struktur des  $[7,10-^{14}\text{C}]$ Benzo[a]pyren

Tabelle 2-3: Technische Daten der verwendeten  $[7,10-^{14}\text{C}]$ Benzo[a]pyren-Chargen

Hersteller	spezifische Aktivität	Molekülmasse <sup>a</sup> [g/mol]	radiochemische Reinheit <sup>b</sup> [%]
Amersham	2,18 GBq/mmol	254	97,8
Sigma	395,9 MBq/mmol	252,3	> 98
Amersham	2,26 GBq/mmol	254	97,1

<sup>a</sup>bei dieser spezifischen Aktivität

<sup>b</sup>Herstellerangabe

Die Reinheit des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren wurde vor jedem Versuch mit folgenden Fließmittelsystemen dünnschichtchromatographisch überprüft:

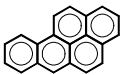
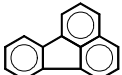
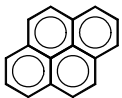
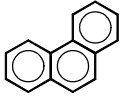
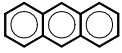
- Petrolether
- Petrolether:Toluol 1:1, v/v
- Methanol:Dichlormethan 3:1, v/v

Für alle Anwendungen wurde das  $^{14}\text{C}$ -markierte Benzo[a]pyren mit nicht-markiertem Benzo[a]pyren auf die gewünschte spezifische Aktivität der Zugabelösung eingestellt.

### 2.1.3 PAK

Als Substrate für die Mischkultur wurden folgende PAK verwendet (s. [Tabelle 2-4](#)).

**Tabelle 2-4:** Als Substrate in den Abbaustudien eingesetzte PAK

PAK	Struktur	Reinheit	Hersteller
Benzo[a]pyren		98 %	Fluka Chemie AG
Fluoranthren		98 %	Aldrich
Pyren		99 %	Aldrich
Phenanthren		97 %	Fluka Chemie AG
Anthracen		99 %	Aldrich

### 2.1.4 Szintillationscocktails

Für die Bestimmung der Menge an Radioaktivität in flüssigen Proben mit Hilfe des Szintillationszählers wurden – je nach Probe – drei verschiedene Cocktails benutzt. Das Mischungsverhältnis von Probe und Cocktail wurde dabei den Datenblättern der Cocktails entnommen.

**Tabelle 2-5:** Verwendete Szintillationscocktails

Name	Firma	Verwendungszweck
* Hionic-Fluor <sup>TM</sup>	Packard Instrument CO., Inc.	NaOH
* Quicksafe A	Zinsser Analytic	wässrige Proben
* Hydroluma	Lumac-LSC, B.V.	wässrige Proben

### 2.1.5 Lösungsmittel

Alle verwendeten organischen Lösungsmittel waren p.A. reinst oder 1 \* destilliert.

### 2.1.6 Chemikalien und Reagenzien für die PCR

- \* Taq-Polymerase: Goldstar..... Eurogenteg
- \* DNA-Agarose ..... Biozym Diagnostik GmbH
- \* Primer Oligo H2: 5'-GCCAAGGCATCCACN ..... MWG-Biotech GmbH
- \* Primer Oligo K2: 5'-GAAGTCGTAACAAGN ..... MWG-Biotech GmbH

- \*  $MgCl_2$  .....Eurogenteg
- \* dNTP Set, 4 \* 25  $\mu$ mol, 0,25 ml 100 mM Lösung  
von dATP, dCTP, dGTP, dTTP .....MBI Fermentas
- \* Inkubationspuffer.....Eurogenteg
- \* TBE-Puffer .....Eurogenteg
- \* Lambda DNA/Eco471(AvaII) Marker, 13MBI .....Fermentas
- \* 100bp DNA Ladder PlusMBI .....Fermentas
- \* pBR322 DNA/AluI Marker, 20MBI .....Fermentas

### 2.1.7 Sonstige Chemikalien und Reagenzien

- \* Oxidase-Reagenz OX .....bioMérieux
- \* API 20 NE .....bioMérieux
- \* NIT 1 und NIT 2 .....bioMérieux
- \* Zinkpulver .....bioMérieux
- \* JAMES-Reagenz .....bioMérieux
- \* Paraffinöl .....bioMérieux
- \* McFarland Standard .....bioMérieux
- \* DMSO .....Merck KGaA
- \* DMS .....Merck KGaA
- \* Gram-color Färbeset (Färbebank) .....Merck KGaA  
mit Lösung 1: Grams Karbolgentianaviolettlösung,  
Lösung 2: Lugols Lösung, Lösung 3 und 4: Entfärbelösung,  
Lösung 5: Ziehl-Neelsens Karbofuchsinlösung

## 2.2 Geräte und Hilfsmittel

### 2.2.1 Geräte für die Radioanalytik

- \* Flüssig-Szintillationszähler:  
Liquid Scintillation Analyser, 1500 Tri-Carb.....Packard  
LS 5000 TD .....Beckman Instruments GmbH
- \* Automatische DC-Auftragsmaschine, Linomat IV .....Camag
- \* Radio-Dünnschicht-Scanner:  
Flexible Format Multisample Counter MSC 2000  
mit Software Tracemaster 40, Version 7.25, 12/91 .....Berthold

### 2.2.2 Geräte für die PCR

- \* Thermocycler PTC-100<sup>TM</sup>  
Programmable Thermal Controller ..... MJ Research, Inc.
- \* Mikrowelle
- \* Laufmittelkammer
- \* UV-Transilluminator

### 2.2.3 Gaschromatographie

- \* Gaschromatograph: HP 5890 Series II ..... Hewlett Packard GmbH
- \* Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)..... Hewlett Packard GmbH
- \* Trennsäule für DMSO-Test:  
HP-5 Crosslinked 5 % Ph Me Silicon  
25 m \* 0,2 mm \* 0,33 µm ..... Hewlett Packard GmbH
- \* Vorsäule für PAK-Analytik:  
HP Retention GaP: 5 m \* 0,320 mm ..... Hewlett Packard GmbH
- \* Trennsäule für PAK-Analytik:  
HP-5 Crosslinked 5 % Ph Me Silicon  
30 m \* 0,25 mm \* 0,25 µm ..... Hewlett Packard GmbH
- \* Autosampler: HP 7673 Injektor ..... Hewlett Packard GmbH

### 2.2.4 Sonstige Geräte

- \* pH-Meter, E<sub>50</sub>..... WTW GmbH
- \* Agar-Gießmaschine:  
Zinsser Analytic Perfill Dosierpumpe..... Zinsser Analytik GmbH
- \* Rotationsverdampfer..... Büchi
- \* Zählgerät für Bakterienkolonien ..... Schütt
- \* Zentrifugen:
  - \* Laborzentrifuge Labofuge A ..... Heraeus Instruments GmbH
  - \* Kühlzentrifuge J21C ..... Beckman Instruments GmbH
- \* Autoklav
- \* Dampfdrucktopf
- \* Tensiometer: Schultensiometer KG ..... A. Krüss GmbH
- \* UV-Lampe (254 nm und 336 nm) für DCs..... Camag

- \* Spektralphotometer DU 640.....Beckman Instruments GmbH
- \* Ultraschallbad Transsonic T 460.....Elma

### 2.2.5 Hilfsmittel

- \* DC Fertigplatten, SIL G-25 UV<sub>254</sub> .....Macherey & Nagel
- \* Membranfilter Cellulose Acetat .....Nalge Company
- \* Sterilfilter, hydrophob .....Carl Roth GmbH & Co

## 2.3 Nährmedien

### 2.3.1 Mineralmedium

Für die Anreicherung und Kultivierung der Mischkultur wurde ein mineralisches Nährsalzmedium verwendet. Die Zusammensetzung dieses Mediums kann der [Tabelle 2-6](#) entnommen werden.

**Tabelle 2-6:** *Zusammensetzung des Mineralmediums*

Komponente	Menge
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g
NaCl	0,1 g
FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,01 g
Spurenelementlösung (s. <a href="#">Tabelle 2-7</a> )	1 ml
Vitaminlösung (s. <a href="#">Tabelle 2-8</a> )	0,1 ml
Aqua bidest.	998,9 ml
pH: 7,1 mit 1 M HCl	

**Tabelle 2-7:** Zusammensetzung der Spurenelementlösung (nach PFENNIG & LIPPERT 1966)

Komponente	Menge
Dest. Wasser	1000 ml
Titriplex III	500 mg
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	3 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30 mg
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1 mg
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	3 mg

**Tabelle 2-8:** Zusammensetzung der Vitaminlösung (nach KIRK et al. 1978)

Komponente	Menge
Dest. Wasser	1000 ml
Folsäure	2 mg
Thiamin * HCl	5 mg
Riboflavin	5 mg
Pyridoxin * HCl	10 mg
Cyanocobalamin	0,1 mg
Nicotinsäure	5 mg
DL-Calciumpantothenat	5 mg
p-Aminobenzoessäure	5 mg
Liponsäure	5 mg

Alle Lösungen wurden bei 121 °C mindestens 20 Minuten autoklaviert.

Als organische C-Quellen dienten die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen, Pyren und Benzo[a]pyren und in den Abbaustudien ggf. auch das Tensid Plantacare.

### 2.3.2 Festmedien

Zum Ausplattieren der Bakteriensuspensionen dienten als Festmedien R2A-Agar (Difco) und Standard I-Agar (Merck). Die Nährböden wurden jeweils nach den Anweisungen der Hersteller zubereitet, bei 121 °C im Autoklaven für mind. 20 min sterilisiert und im Anschluß mit Hilfe der Dosierpumpe in Portionen zu jeweils 20 ml in Petrischalen gegossen.

## 2.4 Herkunft der Bakterienmischkultur

Die PAK-verwertende Mischkultur wurde aus einer mit PAK belasteten Bodenprobe eines ehemaligen Kokereistandortes in Übach-Pallenberg (Kreis Aachen) gewonnen.

Zur Ablösung der Mikroorganismen wurde eine Bodensuspension hergestellt. Dazu wurde zu 2 g Bodenprobe 100 ml 0,2%ige Tetranatriumpyrophosphat-Lösung gegeben. Die Proben wurden dann bei 100 U/min für 30 min auf einem Schüttler suspendiert. Danach wurden die Proben weitere 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Die groben Bodenpartikel wurden anschließend durch einen Faltenfilter abgetrennt und der Überstand in einen Meßzylinder überführt. Nach der Sedimentation von Schwebstoffen

innerhalb von 5 Minuten wurde von dem partikelfreien Überstand 1 ml abgehoben und in 100 ml Mineralmedium überführt.

## 2.5 Stammhaltung und Vorkultivierung der Mischkultur

Für die Stammhaltung und Vorkultivierung der gewonnenen Mikroorganismen-Mischkultur wurden 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet. In die sterilen Erlenmeyerkolben wurden zunächst die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren und Benzo[a]pyren in Dichlormethan gelöst gegeben. Die Konzentration der einzelnen PAK betrug 10 mg. Das Dichlormethan wurde abgedampft, so daß die PAK am Boden des Erlenmeyerkolbens auskristallisierten. Zu den PAK wurden dann 100 ml Mineralmedium und 1 ml Bakteriensuspension gegeben. Die Inkubation erfolgte stets im Dunkeln, bei 27 °C und auf einem Rundschüttler mit 100 U/min. Die PAK-verwendende Mischkultur wurde alle 8 bis 10 Wochen in frisches Medium überimpft.

## 2.6 Lebendkeimzahlbestimmung

Zur quantitativen Erfassung der lebensfähigen Zellen in der Bodensuspension (s. 2.4) und in den Kulturmedien der Anreicherungskulturen und der Abbauversuche wurden jeweils 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufen von Suspension bzw. Medium auf fünf R2A-Agarplatten bzw. fünf Standard I-Agarplatten ausplattiert. Die Verdünnungsreihen wurden in dekadischen Stufen in 0,9%iger NaCl-Lösung vorgenommen. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach zehn Tagen Inkubation bei 27 °C. Zur Zählung wurden die Verdünnungsplatten ausgewählt, bei denen die Zahl der Keime zwischen 20 und 200 lagen.

## 2.7 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Neben der Bestimmung der Lebendkeimzahl (s. 2.6) wurde zu Beginn der Versuchsreihen das bakterielle Wachstum anhand der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen verfolgt. Die optische Dichte wurde am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 564 nm gemessen.

## 2.8 Charakterisierung der Mischkultur

### 2.8.1 Optische Charakterisierung

Um einen Eindruck über die Zusammensetzung der Mischkultur zu erhalten, wurden die Kolonien auf den Agarplatten der Lebendkeimzahlbestimmung unter optischen Kriterien wie Farbe, Größe, Kolonieforn usw. beschrieben, als Typen klassifiziert und zusammengefaßt. Durch Auszählen wurde die relative Häufigkeit der einzelnen Typen in der Mischkultur bestimmt.

### 2.8.2 PCR

Um die Einteilung der isolierten Kolonien der Mischkultur in Bakterientypen nach rein optischen Gesichtspunkten zu bestätigen, wurde mit Vertretern jedes Typs eine Analyse mit der molekularbiologischen Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Im Vordergrund stand hierbei nicht eine Identifizierung der untersuchten Mikroorganismen sondern deren Typisierung. Die hier gewählte Methode nach [JENSEN et al. \(1993\)](#) basiert darauf, daß ausgewählte Primer nahe den Genen, die für die 16S- und 23S-rRNA codieren, binden. Diese hintereinander angeordneten Gene werden durch für unterschiedliche Bakterien hochvariable repetitive Sequenzen, einer sogenannten Spacer-Region, getrennt. Der Spacerpolymorphismus wird durch die Anzahl und den Typ der in ihnen enthaltenen tRNA-Genen hervorgerufen. Im PCR-Produkt wird dann die Länge der Spacer-Region und der Sequenzpolymorphismus benutzt, um Bakterienarten oder -gattungen auf Grund des spezifischen Bandenmusters zu trennen. Vorteil dieser Methode ist, daß als Ausgangsmaterial eine Suspension von intakten Bakterienzellen einer Kolonie dienen kann, gereinigte, hochmolekulare DNA wird nicht benötigt.

Von der Mischkultur wurde – wie unter [2.6](#) und [2.8.1](#) beschrieben – eine Verdünnungsreihe angelegt, entsprechende Verdünnungsstufen ausplattiert und nach 10tägiger Inkubation die Lebendkeimzahl bestimmt und die Kolonien nach phänotypischen Gesichtspunkten zu Bakterientypen zusammengefaßt. Von jedem Bakterientyp wurden einige Kolonien auf R2A-Agarplatten überimpft und so mehrere Kolonien gleichen Aussehens herangezogen.

In sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml Volumen) wurde 0,5 ml steriles Aqua dest. gefüllt. Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurde etwas Zellmaterial von einer Kolonie abgenommen und in dem Wasser suspendiert. Die so hergestellten Bakteriensuspensionen wurden dann bis zur Weiterverarbeitung bei -18 °C aufbewahrt.

Die Komponenten, die für eine PCR-Reaktion notwendig sind, wurden – mit Ausnahme der Taq-Polymerase – in einem sogenannten Pre-Mix bereits in den entsprechenden Konzentrationen zusammenpipettiert. Die Zusammensetzung dieses Pre-Mix kann der [Tabelle 2-9](#) entnommen werden. Der Pre-Mix wurde vor jeder PCR für die gewünschte Probenanzahl frisch zusammengestellt.

**Tabelle 2-9:** Zusammensetzung des PCR Pre-Mix für einen Ansatz

Komponente	Menge
Aqua dest.	9 µl
10x Inkubationspuffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µl
dNTP (5 mM je Base)	1 µl
Primer H2 (50 µM)	1 µl
Primer K2 (50 µM)	1 µl

Zur Durchführung einer PCR wurden zunächst die Bakteriensuspensionen aufgetaut. 10 µl der Suspension wurden in sterile Reaktionsgefäße (0,2 ml Volumen) überführt. Dazu wurden 20 µl Pre-Mix gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden dann in den Thermocycler gesetzt und das PCR-Programm gestartet. Die einzelnen Programmschritte sind in [Tabelle 2-10](#) aufgeführt. Schritt 1, das Kochen der Proben im Cycler für 5 Minuten, diente dem Aufschluß der Bakterien. Nach dem Aufkochen wurden die Reaktionsgefäße nochmals aus dem Cycler genommen und auf Eis gesetzt, diese drastische Temperaturänderung förderte den Zellaufschluß. In jede Probe wurden 20 µl Taq-Polymerase (entspricht 0,75 U) gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden dann wieder in den Cycler gesetzt und das Amplifizieren der DNA wurde begonnen.

**Tabelle 2-10:** PCR-Programm

Schritt	Zeit und Temperatur	Vorgang
1	5 min bei 99 °C	Aufschluß der Zellen, Denaturierung der DNA
Pause	1 min auf Eis, zufügen der Taq-Polymerase	
2	1 min bei 94 °C	erneute Denaturierung der DNA zur Trennung der DNA-Stränge
3	1 min bei 50 °C	Binden der Primer an die DNA-Stränge
4	2 min bei 72 °C	Synthese neuer DNA-Stränge durch die Polymerase
5	Schritt 2 bis 4 35 * wiederholen	
6	7 min bei 72 °C	Auffüllen der überstehenden Enden der neu synthetisierten DNA

Die PCR-Produkte konnten bei -18 °C gelagert werden.

Die im Amplifizierungszyklus vermehrten DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel sichtbar gemacht. Dazu wurde zunächst die Agarose 1,5 bis 2%ig in TBE-Puffer eingewogen und zur Färbung der Banden 1,5 µl Ethidiumbromidlösung auf 100 ml dieser Agaroselösung gegeben. Diese wurde dann 3x in der Mikrowelle aufgeköcht und mit der abgekühlten, blasenfreien Lösung das Gel gegossen. Das erkaltete Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer gelegt. Von den PCR-Produkten wurden pro Slot 10 µl aufgetragen, als Längen-Marker wurden Lambda DNA/*Eco*471 (*Ava*II) Marker, 13; 100bp DNA Ladder Plus und pBR322 DNA/*Alu*I Marker, 20 verwendet. Nach dem Auftragen der Proben und der Marker wurde eine Spannung von 100 bis 120 V angelegt und die PCR-Produkte durch Elektrophorese nach der Anzahl der Basenpaare getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Banden unter UV-Licht fotografiert. Die Laufstrecken der Banden wurden ausgemessen und durch einen Vergleich der Lauflängen von den definierten Banden der Marker mit Hilfe des Programms DNAsis die Fragmentgrößen bestimmt.

### 2.8.3 Gram-Färbung

Auf R2A-Agarplatten wurden von jedem Bakterientyp einige Kolonien gleichen Aussehens herangezogen. Auf einen Objektträger wurden einige Tropfen steriles Aqua dest. gegeben und mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers etwas Zellmaterial einer Kolonie von der Platte abgenommen und auf dem Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich wurde dann an der Luft getrocknet und danach einige Male durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen. Das Präparat wurde mit Karbolgentianaviolett-Lösung überschichtet, der Farbstoff nach 3minütiger Einwirkzeit abgegossen und mit etwas Aqua dest. nachgespült. Danach wurde das Präparat mit Lugol'scher Lösung überschichtet. Nach 2 Minuten wurde der Farbstoff abgegossen, überschüssiger Farbstoff mit einigen Tropfen 96%igem Ethanol abgespült und anschließend mit Aqua dest. nachgespült. Mit Fuchsinrot wurden die gramnegativen Keime in etwa 10 sek. gegengefärbt, nochmals mit Aqua dest. abgespült und das Präparat trocknen gelassen. Durch ein Mikroskop wurden dann die Bakterienzellen betrachtet. Die grampositiven Bakterien waren dunkelviolett gefärbt, da der gebildete Farbstoff-Jod-Komplex in der dicken Mureinschicht zurückgehalten wird. Aus der dünnen Mureinschicht der gramnegativen Bakterien wurde dieser jedoch durch das Ethanol ausgewaschen, durch die Gegenfärbung der nun farblosen Zellen mit Karbofuchsin erschienen diese dann rosa bis rot.

### 2.8.4 Oxidase-Reaktion

Auf R2A-Agarplatten wurden von jedem Bakterientyp einige Kolonien gleichen Aussehens herangezogen. Auf einen Objektträger wurde ein Stückchen Filterpapier gelegt und mit sterilem Aqua dest. befeuchtet. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde eine Kolonie von der Platte abgenommen und auf dem Papier verrieben. Nach Zutropfen von Oxidase-Reagenz trat bei positiver Oxidase-Reaktion nach 1–2 Minuten eine violette Färbung auf. Zur Absicherung dieser Reaktion wurde zusätzlich mit einigen Kolonien jedes Bakterientyps und 0,5 ml sterilen Aqua bidest. eine Zellsuspension her-

gestellt. Nach Zutropfen von Oxidase-Reagenz zu dieser Suspension mußte sich bei positiver Reaktion nach ein- bis zweiminütiger Inkubation ebenfalls eine blauviolette Färbung einstellen.

### 2.8.5 API-Test

Mit Hilfe eines standardisierten Testsystems, dem API 20 NE von bioMérieux, wurden Isolate der einzelnen Bakterientypen hinsichtlich einer Vielzahl systematisch-physiologischer Parameter untersucht. API 20 NE eignet sich zur Identifizierung von gramnegativen Stäbchen, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceae oder zu den anspruchsvollen und inaktiven Keimen gehören. Die API 20 NE Teststreifen bestehen aus 20 Mikroröhrchen, in denen sich die verschiedenen Medien und/oder Substrate in dehydratierter Form befinden.

Von den auf R2A-Agar isolierten Kolonien jedes Bakterientyps wurden 1–4 Kolonien in 2 ml steriler 0,85%iger NaCl-Lösung suspendiert.

Die 8 Röhrchen mit den konventionellen Tests wurden mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension beimpft, dadurch wurden die Substrate gelöst. Die Stoffwechselprodukte, die während der Inkubation entstanden, bewirkten Farbumschläge, entweder direkt während der Inkubation oder nach Zugabe entsprechender Reagenzien.

Die 12 Röhrchen für die Assimilationsreaktion wurden mit einem Minimalmedium gefüllt und danach mit der Bakteriensuspension beimpft. Die Bakterien konnten nur wachsen, wenn sie das entsprechende Substrat verwerten konnten. Eine Trübung im Röhrchen zeigte eine positive Reaktion an.

Die Ablesung der Reaktionen erfolgte nach 24 h und nach 48 h Inkubation bei 27 °C mit Hilfe einer Ablesetabelle: für jeden getesteten Keim erhielt man eine Anzahl von biochemischen Reaktionen, welche ein numerisches Profil ergaben. Die Identifizierung dieses Profils erfolgte mit der entsprechenden Software durch die Firma bioMérieux. Die Identifizierung erfolgt dadurch, daß das erhaltene Profil mit allen Profilen in der Datenbasis verglichen wird. Beim Vergleich wird die relative Nähe des erhaltenen Profils zu einem Taxon (entweder Spezies, Biotyp, Genus, Gruppe von Genera) ermittelt, dieser Vergleich ergibt den % id Wert, d.h. je kleiner dieser wird, desto weiter ist das Profil des Keims von dem des angegebenen Taxons entfernt. Außerdem wird die relative Nähe des erhaltenen Profils zu dem typischen Profil innerhalb dieses Taxons berechnet, diese Berechnung ergibt den Index T. Wenn ein widersprechender Test vorhanden ist, entfernt sich das gefundene Profil vom typischen Profil des Taxons, d.h. je kleiner der Wert für T wird, desto höher ist die Anzahl der widersprechenden Tests. Für die Qualität der Identifizierung ergeben sich somit verschiedene Kriterien, die es ermöglichen, die Aussagekraft der Identifizierung einzustufen<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Informationen zur API-Identifizierungs-Software wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Zimmermann, bioMérieux Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt

## 2.9 Bestimmung der Oberflächenspannung

Die Messung der Oberflächenspannung ( $\sigma$ ) erfolgte nach der Ringmethode mit einem Platiniridiumring (K 610) und dem Schultensiometer KG der KRÜSS GmbH, Hamburg. Hierbei wird der horizontal aufgehängte Platinring in die Flüssigkeit eingetaucht und anschließend wieder herausgezogen. Die Moleküle der Grenzfläche unterliegen einer Zugspannung. Gemessen wird die maximale Kraft, die erforderlich ist, um den Ring durch die Grenzfläche zu ziehen.

Aufgrund der Temperaturabhängigkeit dieser Messung wurde der gemessene Grenzflächenspannungswert mit einem Korrekturfaktor multipliziert. Dieser Faktor ergab sich aus der Division des theoretischen Wertes der Oberflächenspannung bidestillierten Wassers bei 20 °C von 72,8 mN/m und des tatsächlich gemessenen Wertes von bidestilliertem Wasser während jeder Meßreihe bei Raumtemperatur.

Zur Reduzierung von Meßungenauigkeiten wurde die Oberflächenspannung jeder Probe als Mittelwert von mindestens fünf parallelen Messungen bestimmt. Der Platinring wurde zwischen den Messungen verschiedener Konzentrationsstufen mit Aqua bidest. und Aceton abgespült und dann in der Bunsenbrennerflamme dunkelrot gegläht. Alle verwendeten Glasgeräte wurden zuvor in einem 0,1 M HCl-Bad gereinigt, mit bidestilliertem Wasser gespült und getrocknet.

### 2.9.1 Bestimmung der CMC von Tensidlösungen

Zur Bestimmung der kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) eines Tensids wurde eine wässrige Verdünnungsreihe des Tensids angesetzt. Hierzu wurde zunächst eine 1%ige und eine 0,01%ige Tensidlösung durch Einwiegen des technischen Tensidprodukts und der entsprechenden Menge frisch bidestillierten Wassers hergestellt. Diese wurden zur Äquilibration 24 h bei 100 U/min auf einem Rundschüttler gestellt und dann 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Aus diesen beiden Verdünnungen erfolgte die Herstellung der anderen Konzentrationsstufen.

Nachdem diese ebenfalls über Nacht geschüttelt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen wurden, erfolgte die Bestimmung der Oberflächenspannung der einzelnen Konzentrationsstufen. Dazu wurde eine kleine Glaspetrischale zunächst mit der entsprechenden Verdünnungsstufe durchgespült und dann mit der Tensidlösung befüllt. Die Messung der Oberflächenspannung erfolgte dann wie unter 2.9 beschrieben.

Die CMC wurde graphisch durch Auftragen der Oberflächenspannung gegen die Tensidkonzentration (logarithmische Auftragung) ermittelt. Die Konzentration, bei der die Kurve deutlich abknickte, wurde als CMC definiert. Oberhalb dieser Konzentrationsgrenze findet die Bildung von Micellen statt, die Oberflächenspannung bleibt oberhalb dieser für jedes Tensid charakteristischen Konzentration annähernd konstant.

### 2.9.2 Bestimmung der Oberflächenspannung des Kulturmediums

Um während der Inkubation die Oberflächenspannung des Kulturmediums zu bestimmen, wurde das Tensiometer so modifiziert, daß eine Messung direkt im Erlenmeyerkolben bzw. Biometer erfolgen konnte.

Dafür wurde die Aufhängung des Platinringes am Waagenarm des Tensiometers durch einen Draht so verlängert, daß der Ring in die Kulturflüssigkeit eintauchen konnte. Die eigentliche Bestimmung der Oberflächenspannung erfolgte wie unter 2.9 beschrieben. Die Messungen konnten auf diese Art an der Sterilbank durchgeführt werden, so war die Gefahr der Kontamination des Mediums mit Fremdkeimen geringer und auch die Verluste an Benzo[a]pyren durch ein Überführen von Anteilen des Mediums in ein Meßschälchen wurden vermieden. Die Signifikanz dieser Meßmethode wurde überprüft, indem Messungen der Oberflächenspannung nach beiden Methoden erfolgten und ein Vergleich der ermittelten Werte keinen Unterschied zeigte.

## 2.10 Bestimmung des Solubilisierungsvermögens von Tensiden

### 2.10.1 Solubilisierung von Benzo[a]pyren durch Tenside

Die Solubilisierungsversuche wurden in 10 ml Braunglasfläschchen mit Schraubverschluß und Teflonseptum durchgeführt.

Von den Tensiden wurde eine wässrige Verdünnungsreihe – wie unter 2.9.1 beschrieben – hergestellt.

Damit sich in jeder Versuchsreihe die minimal nach Literaturangabe mögliche Wasserlöslichkeit von Benzo[a]pyren von ca. 4 µg/l noch nachweisen ließ, wurde für die Benzo[a]pyren-Stammlösung jeweils entsprechend viel Benzo[a]pyren und Radioaktivität in Dichlormethan gelöst (s. Tabelle 2-11). Die tatsächliche Wasserlöslichkeit des Benzo[a]pyren unter den Bedingungen der einzelnen Versuchsreihen wurde ermittelt, indem Probenfläschchen statt mit Tensidlösung mit reinem Aqua bidest. befüllt wurden. Dieser Wert wurde dann als aktuelle Wasserlöslichkeit gleich 1 gesetzt und der Faktor der Solubilisierung des Benzo[a]pyren an Hand dessen berechnet. Je nach eingesetzter Benzo[a]pyrenmenge ergab sich so bei Solubilisierung der gesamten eingesetzten Substanz ein maximaler Solubilisierungsfaktor. Die eingesetzte Menge an Benzo[a]pyren, Radioaktivität und die theoretisch maximal möglichen Solubilisierungsfaktoren können der Tabelle 2-11 entnommen werden.

**Tabelle 2-11:** *Eingesetzte Benzo[a]pyren-Konzentrationen mit entsprechenden Radioaktivitätsmengen zur Bestimmung des Solubilisierungsvermögens von Tensiden*

Versuchsreihe	Zugabe und eingesetzte Radioaktivität/Ansatz (5 ml)	nach der Wasserlöslichkeit von 4–14 µg/l theor. max. Solubilisierungsfaktor
1	0,5 µg BaP, 11000 dpm in 250 µl CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7,14 bis 25
2	1 µg BaP, 22000 dpm in 500 µl CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	14,28 bis 50

Von der Stammlösung wurden 250 bzw. 500 µl in ein Braunglasfläschchen pipettiert. Das Lösungsmittel wurde unter dem Abzug abgedampft, so daß sich am Flaschenboden eine Benzo[a]pyrenkristallschicht bildete. In jedes Fläschchen wurde dann 5 ml entsprechend konzentrierter Tensidlösung bzw. Aqua bidest. gegeben. Die Fläschchen wurden verschraubt und über Nacht bei 130 U/min und 27 °C auf einem Rundschüttler inkubiert. Vor der Probenahme wurden die Probengefäße zunächst 4 Stunden ruhig stehen gelassen und auf Raumtemperatur äquilibriert. Dann wurde 1 ml der Tensidlösung entnommen, durch ein Membranfilter aus Cellulose-Acetat mit 0,45 µm Porenweite gefiltert und die gelöste Radioaktivität im Filtrat durch Messung im Szintillationszähler bestimmt. Je Konzentrationsstufe der Tensidlösung wurden 2 Parallelen angesetzt, aus jedem Fläschchen zweimal jeweils 1 ml Proben gezogen. Die so erhaltenen Werte wurden gemittelt.

### 2.10.2 Solubilisierungsvermögen von Plantacare im Kulturmedium

Die Abbauprobversuche mit Benzo[a]pyren fanden in Nährmedium statt, welches – neben Salzen, Spurenelementen und Vitaminen – ein Spektrum an anderen PAK als C-Quelle enthielt. Um den Effekt von Plantacare auf Benzo[a]pyren in diesem Kulturmedium zu ermitteln, wurde ein Solubilisierungsversuch durchgeführt, welcher die Bedingungen im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn eines Abbauprobversuches nachstellte.

Von Plantacare 2000 UP wurde – wie unter 2.9.1 beschrieben – eine wässrige Verdünnungsreihe hergestellt. In Abänderung dazu war das Tensid in dieser Verdünnungsreihe jedoch doppelt so hoch konzentriert, d.h. die Ausgangslösungen wurden durch Einwiegen einer 2%igen bzw. einer 0,02%igen Plantacarelösung hergestellt.

Das Minimalsalzmedium wurde nach 2.3.1 hergestellt und ebenfalls 2fach konzentriert eingewogen.

Von der PAK-Stammlösung wurden je 125 µl in Braunglasfläschchen pipettiert. Diese enthielt: 250 µg Benzo[a]pyren, 700.000 dpm, 125 µg je Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst.

In die Inkubationsfläschchen wurde – nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels – je 2,5 ml doppelt konzentrierte Plantacarelösung und je 2,5 ml doppelt konzentriertes Mineralmedium gegeben. So ergab sich – bezogen auf die 5 ml Volumen – die gewünschte Tensid- und Nährsalzkonzentration des Mediums. Die aktuelle Löslichkeit im Kulturmedium wurde ermittelt, indem Probenfläschchen statt mit Tensidlösung mit 2,5 ml Aqua bidest. befüllt wurden. Der ermittelte Löslichkeitswert dieses Ansatzes wurde gleich 1 gesetzt und die Solubilisierung an Hand dessen berechnet.

Inkubation und Probenahme erfolgte dann wie unter [2.10.1](#) beschrieben.

## 2.11 DMSO-Test

Um den Einfluß des verwendeten Tensids auf die Mikroorganismenpopulation abschätzen zu können, wurden mit Hilfe des DMSO-Tests die Aktivitätsveränderungen der Mikroorganismen auf Basis der Reduktase-Aktivität unter verschiedenen Tensidkonzentrationen ermittelt.

Da dieser Test für die Ermittlung mikrobieller Aktivität in Bodenproben entwickelt wurde ([ALEF & KLEINER 1989](#), [ALEF 1990](#)), wurde zunächst mit einer Verdünnungsreihe einer wässrigen Glucoselösung die Eignung dieses Tests für den Einsatz von Mikroorganismen in Kulturmedium überprüft. In 5 ml Braunglasfläschchen mit Septum wurden 1 ml Bakteriensuspension einer 8 Wochen alten Stammkultur mit 1 ml einer entsprechend konzentrierten Glucoselösung versetzt und nach Zugabe von 125 µl 10%iger wässriger DMSO-Lösung 3 Tage bei 27 °C auf dem Rundschüttler inkubiert. Die während dieses Zeitraums erfolgte Reduktion von DMSO zu dem gasförmigen Produkt DMS wurde gaschromatographisch bestimmt, indem 250 µl der Gasphase über der Kulturflüssigkeit mit einer gasdichten Spritze entnommen und in den GC/FID injiziert wurden. Die Analyseparameter dieser Messungen waren folgende:

- Injektionsvolumen            250 µl
- Split                            1:10
- Trägergas, Gasflußstickstoff, 0,7 ml/min
- Säulenvordruck            105 kPa
- Injektortemperatur        200 °C
- Detektortemperatur        250 °C
- Temperaturprogramm        100 °C, 3 min

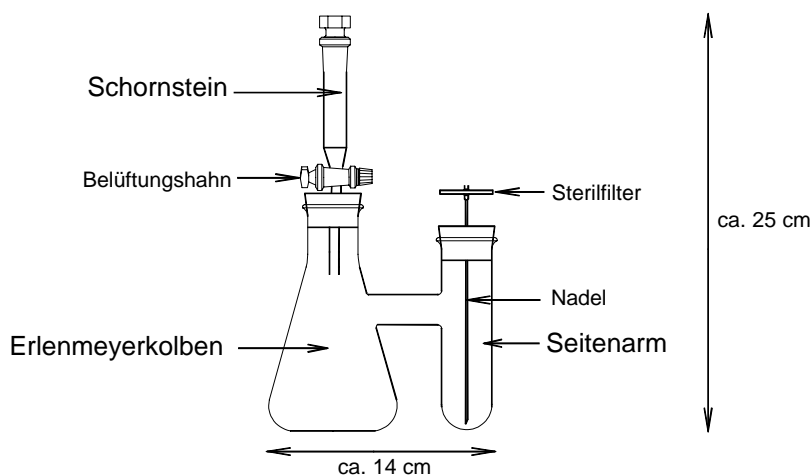
Die Linearität des Detektorsignals wurde in gleichmäßigen Abständen mit einer Eichreihe von DMS überprüft. Nach weiteren 4 Tagen Inkubation wurden die Proben ein zweitesmal vermessen.

Die Testreihen mit den 6 Tensiden erfolgten nach demselben Prinzip. Ein Absinken der Reduktase-Aktivität im Vergleich zur Probe ohne Tensideinfluß wurde als hemmender, eine Steigerung der Aktivität als fördernder Effekt für die Mikroorganismenmischkultur als Gesamtheit gedeutet.

## 2.12 Abbaustudien mit $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren

### 2.12.1 Aufbau der Biometer-Flaschen

Die Abbauprobe mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren fanden in geschlossenen Systemen statt. Ausgewählt wurden dafür sogenannte Biometer-Flaschen nach [BARTHA & PRAMER \(1965\)](#). Diese sind aus einem modifizierten 250 ml Erlenmeyerkolben mit einem Seitenarm aufgebaut, Seitenarm und Kolben stehen über die Gasphase in Verbindung. Als Verschluss des Erlenmeyerkolbens dient ein Silikonstopfen mit aufgesetztem Schornstein, über welchen das gesamte System mittels Hahn belüftet werden kann, Natronkalk im Schornstein dient als Polzeifilter. Der Seitenarm ist ebenfalls mit einem Silikonstopfen verschlossen, dieser ist mit einer Kanüle durchstochen, auf welche ein Sterilfilter gesteckt wurde. Der genaue Aufbau dieser Gefäße kann dem [Bild 2-2](#) entnommen werden.



**Bild 2-2:** Aufbau der Biometer-Flaschen

Das Prinzip dieser Versuchsgefäße ist folgendermaßen:

Im Erlenmeyerkolben befindet sich die markierte Verbindung im entsprechend gewählten Versuchsdesign. Entsteht durch Abbauprozesse  $^{14}\text{CO}_2$ , gelangt dieses über die Gasphase in den Seitenarm, wo es in der dort vorliegenden NaOH als  $\text{Na}^{14}\text{CO}_3$  gebunden wird. Mit Hilfe einer Spritze wird diese NaOH periodisch entfernt und durch frische NaOH ersetzt. Die entnommene NaOH wird mit einem Szintillationscocktail gemischt und die Menge der Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Der Vorteil dieser Systeme besteht darin, daß der Abbau der markierten Verbindung über die  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung kontinuierlich verfolgt werden kann, ohne daß in das System eingegriffen werden muß. Die Entnahme der NaOH aus dem Seitenarm erfolgt in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen, die sich u.a. der Versuchsgestaltung und Versuchsentwicklung anpassen können. Änderungen im Versuchssystem können über ihre Auswirkungen auf die  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung direkt und unter sterilen Bedingungen erfaßt werden. Besonders bei sehr langen Inkubationsdauern ist dieses System von Vorteil.

### 2.12.2 Ansetzen der Abbauversuche

Die Biometer-Flaschen wurden zunächst wie oben beschrieben zusammengesetzt. Der Auslauf des Schornsteins oberhalb des Hahns mit ein wenig Quarzwolle locker verschlossen, darüber wurden 3 g Natronkalk gefüllt. Der Schornstein wurde mit einem Glasschliffstopfen verschlossen. Der Auslauf des Schornsteins wurde durch einen entsprechend gebohrten Silikonstopfen geschoben, so daß dieser die Öffnung des Erlenmeyerkolbens verschloß. Die Öffnung des Seitenarms verschloß ein Silikonstopfen, der von einer Kanüle durchbohrt war, deren Spitze bis auf den Boden des Seitenarms reichte. So zusammengesetzt wurden die Gefäße für 30 min bei 180 °C im Trockenschrank sterilisiert.

Nach dem Abkühlen wurden die Biometer-Flaschen unter der Sterilbank geöffnet und eine Dichlormethanolösung mit den gelösten PAK in den Erlenmeyerkolben pipettiert. Nach dem Abdampfen des Dichlormethans war der Boden des Kolbens von einer PAK-Kristallschicht überzogen. In jeden Biometer wurden dann 25 ml doppelt konzentriertes steriles Minimalmedium und 25 ml entsprechend konzentrierter steriler Tensidlösung gegeben, so daß sich in den 50 ml Gesamtvolumen die gewünschten Konzentrationen einstellten. Anschließend wurde der Kolben mit 1 bis 2 ml Bakteriensuspension beimpft. Auf die Öffnung des Erlenmeyerkolbens wurde der Schornstein gesetzt. In den Seitenarm wurden 3 ml sterile 0,5 M NaOH gefüllt und dieser mit dem Silikonstopfen mit Kanüle verschlossen. Auf die Kanüle wurde ein Sterilfilter gesteckt. Die Biometer wurden im Dunkeln, bei 28 °C und 100 U/min auf einem Rundschüttler inkubiert.

### 2.12.3 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer I

Die [Tabelle 2-12](#) gibt eine Übersicht über die Versuchsgestaltung. Alle Biometer enthielten zu Beginn des Abbauversuches 50 ml Kulturmedium. In den Ansätzen M5 bis M9 lagen als C-Quellen nur Benzo[a]pyren und Plantacare im Kulturmedium vor. Die Ansätze 1 bis 11 enthielten neben Benzo[a]pyren als mögliche weitere C-Quellen die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren und die Ansätze 2 bis 10 zusätzlich Plantacare in verschiedenen Konzentrationen. Ansatz 11 diente als Sterilkontrolle, das Kulturmedium wurde nicht mit Bakterien beimpft. Alle Ansätze lagen als zwei gleich behandelte parallele Systeme vor.

**Tabelle 2-12:** Versuchsgestaltung in der Versuchsreihe Biometer I

Ansatz	Plantacare [%]	Phen., Anthr., Pyr., Flouora. [mg/50 ml]	BaP [mg/50 ml]	<sup>14</sup> C-BaP [μCi/50 ml]
M5a, M5b	0,005	0	5	0,53
M6a, M6b	0,01	0	5	0,53
M8a, M8b	0,1	0	5	0,53
M9a, M9b	0,5	0	5	0,53
1a, 1b	0	1,25	2,5	0,64
2a,2b	0,0001	1,25	2,5	0,64
3a, 3b	0,0005	1,25	2,5	0,64
4a, 4b	0,001	1,25	2,5	0,64
5a, 5b	0,005	1,25	2,5	0,64
6a, 6b	0,01	1,25	2,5	0,64
7a, 7b	0,05	1,25	2,5	0,64
8a, 8b	0,1	1,25	2,5	0,64
9a, 9b	0,5	1,25	2,5	0,64
10a, 10b	1	1,25	2,5	0,64
11a <sup>a</sup> , 11b <sup>a</sup>	0	1,25	2,5	0,64

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Die Biometer wurden mit 2 ml Bakteriensuspension einer Kultur aus der Stammhaltung (s. 2.5) angeimpft.

#### 2.12.4 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer II

Um die Bedeutung der Tensidkonzentration unter- und oberhalb der CMC von Plantacare näher einzugrenzen, wurden für die folgenden Biometer-Versuche zwei Tensidkonzentrationen ausgewählt: 0,005 % und 0,05 %. Die höhere Konzentration lag dabei knapp oberhalb der CMC von Plantacare, die niedrigere Konzentration darunter. Im Vergleich zu Ansätzen ohne Plantacare im Medium sollte so geklärt werden, ob das Auftreten von Micellen den Tensideinfluß verändert.

Die [Tabelle 2-13](#) gibt eine Übersicht über die Versuchsgestaltung. Das Volumen des Kulturmediums betrug zu Inkubationsbeginn 50 ml. Neben Benzo[a]pyren waren als weitere C-Quellen die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren enthalten. Die Kulturmedien der Ansätze 1.2, 4.2 und 8.2 enthielten zusätzlich 0,005 % Plantacare und die Ansätze 1.3, 4.3 und 8.3 0,05 % Plantacare. Ansatz K1 und K2 dienten als

Sterilkontrollen, das Kulturmedium wurde nicht mit Bakterien beimpft. Alle Ansätze lagen als zwei gleich behandelte parallele Systeme vor.

**Tabelle 2-13:** Versuchsgestaltung in der Versuchsreihe Biometer II

Ansatz	Plantacare [%]	Phen., Anthr., Pyr., Flouora. [mg/50 ml]	BaP [mg/50 ml]	<sup>14</sup> C-BaP [μCi/50 ml]
1.1a, 1.1b	0	1,25	2,5	0,51
1.2a, 1.2b	0,005	1,25	2,5	0,51
1.3a, 1.3b	0,05	1,25	2,5	0,51
4.1a, 4.1b	0	1,25	2,5	0,51
4.2a, 4.2b	0,005	1,25	2,5	0,51
4.3a, 4.3b	0,05	1,25	2,5	0,51
8.1a, 8.1b	0	1,25	2,5	0,51
8.2a, 8.2b	0,005	1,25	2,5	0,51
8.3a, 8.3b	0,05	1,25	2,5	0,51
K1 <sup>a</sup>	0	1,25	2,5	0,51
K2 <sup>a</sup>	0,005	1,25	2,5	0,51

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Aus den Ansätzen 1a, 4b und 8b der Versuchsreihe Biometer I wurden am Ende der Inkubation jeweils 2 ml Kulturmedium entnommen und damit nach dem Schema der [Tabelle 2-14](#) die Biometer-Flaschen der Versuchsreihe Biometer II beimpft. Die Auswahl der Ansätze aus dem Biometer-Versuch I für die Entnahme der Inokula richtete sich nach zwei Kriterien: zum einem nach dem Tensidgehalt der Ansätze, zum anderem nach der Höhe der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung. Zu Ansatz 1a wurde kein Plantacare gegeben, die Umsatzrate von Benzo[a]pyren lag bei 6,70 %; Ansatz 4b erhielt Tensidgaben von 0,001 %, 10,5 % der eingesetzten Radioaktivität wurden als <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> aufgefangen und Ansatz 8b hatte einen 0,1%igen Plantacare-Gehalt, die Umsatzrate war mit 23,66 % die höchste der Versuchsreihe Biometer I.

**Tabelle 2-14:** *Animpfschema der Versuchsreihe Biometer II*

Plantacare [%]	2 ml Kulturmedium aus Biometer I, 1a (MK IIa)	2 ml Kulturmedium aus Biometer I, 4b (MK IIb)	2 ml Kulturmedium aus Biometer I, 8b (MK IIc)
0	1.1a	4.1a	8.1a
0	1.1b	4.1b	8.1b
0,005	1.2a	4.2a	8.2a
0,005	1.2b	4.2b	8.2b
0,05	1.3a	4.3a	8.3a
0,05	1.3b	4.3b	8.3b

### 2.12.5 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer III

Nach 149 Tagen Inkubation wurde aus den Ansätzen 8.1a, 8.2a und 8.3b der Versuchsreihe Biometer II — mit 12,19 %, 12,52 % und 36,51 %  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung gehörten sie zu den aktivsten Ansätzen dieser Versuchsreihe zu diesem Zeitpunkt — jeweils 2 ml Kulturmedium entnommen und in Erlenmeyerkolben mit 100 ml Medium überführt. Dieses enthielt je 2,5 mg der PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren und 5 mg Benzo[a]pyren. Das Kulturmedium für die Kultur aus 8.1a enthielt kein Tensid, das für die Kultur aus 8.2a 0,005 % Plantacare und der Plantacare-Gehalt für die Kultur aus 8.3b betrug 0,05 %: diese Konzentrationen entsprachen den Tensidgehalten der Kulturen in der Versuchsreihe Biometer II. Diese neu angelegten Kulturen wurden nicht mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Benzo[a]pyren angesetzt, sie sollten als Stammkulturen dazu dienen, genügend Animpfmaterial für weitere Versuche zur Verfügung zu stellen. Ebenso wie die Biometerkolben wurden sie im Dunkeln, bei 28 °C und 100 U/min auf dem Schüttler inkubiert.

Zur Gewinnung eines Inokulums mit hoher Zelldichte wurde nach einer Inkubationszeit von 181 Tagen die Kulturbrühe dieser Stammkulturen jeweils in sterile Zentrifugenbecher überführt und bei 6000 U/min und 20 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml Kulturflüssigkeit resuspendiert. Mit je 1 ml dieser Suspensionen wurden dann die Biometerflaschen der Versuchsreihe III nach dem Schema der [Tabelle 2-15](#) angeimpft. Mit einem weiteren Milliliter der Suspensionen wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und eine Lebendkeimzahlbestimmung durchgeführt. Im Überstand wurde die Oberflächenspannung bestimmt, um einen Eindruck über eine mögliche Restkonzentration an Plantacare zu erhalten.

Zusätzlich wurden zwei Biometer-Flaschen mit je 1 ml Kulturflüssigkeit aus dem Ansatz 8.3b der Versuchsreihe Biometer II beimpft. Dieser Ansatz war zu diesem Zeit-

punkt 330 Tage alt und in Bezug auf das <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren mit mehr als 50 % Umsatz der leistungsstärkste Ansatz dieser Versuchsreihe.

Außerdem wurden auch in dieser Versuchsreihe zwei abiotische Kontrollansätze mitgeführt.

**Tabelle 2-15:** *Animpfschema der Versuchsreihe Biometer III*

Plantacare [%]	1 ml Kulturmedium aus Stammkultur 8.1a (MK IIIa)	1 ml Kulturmedium aus Stammkultur 8.2a (MK IIIb)	1 ml Kulturmedium aus Stammkultur 8.3b (MK IIIc)	1 ml Kulturmedium aus Biometer II, 8.3b (MK III d)
0	1.1a	2.1a	3.1a	
0	1.1b	2.1b	3.1b	
0,005	1.2a	2.2a	3.2a	
0,005	1.2b	2.2b	3.2b	
0,05	1.3a	2.3a	3.3a	8.3a
0,05	1.3b	2.3b	3.3b	8.3b

Die [Tabelle 2-16](#) gibt eine Übersicht über die Versuchsgestaltung. Alle Biometer enthielten zu Beginn des Abbauersuchs 50 ml Kulturmedium. Die Ansätze enthielten neben Benzo[a]pyren als mögliche weitere C-Quellen die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren. Die Kulturmedien der Ansätze 1.2, 2.2 und 3.2 zusätzlich 0,005 % Plantacare und die der Ansätze 1.3, 2.3, 3.3 und 8.3 0,05 % Plantacare. Ansatz K1 und K2 dienten als Sterilkontrollen, das Kulturmedium wurde nicht mit Bakterien beimpft. Alle Ansätze lagen als zwei gleich behandelte parallele Systeme vor.

**Tabelle 2-16:** *Versuchsgestaltung in der Versuchsreihe Biometer III*

Ansatz	Plantacare [%]	Phen., Anthr., Pyr., Floua. [mg/50 ml]	BaP [mg/50 ml]	<sup>14</sup> C-BaP [μCi/50 ml]
1.1a, 1.1b	0	1,25	2,5	0,49
1.2a, 1.2b	0,005	1,25	2,5	0,49
1.3a, 1.3b	0,05	1,25	2,5	0,49
2.1a, 2.1b	0	1,25	2,5	0,49
2.2a, 2.2b	0,005	1,25	2,5	0,49
2.3a, 2.3b	0,05	1,25	2,5	0,49

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 2-16** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	Phen., Anthr., Pyr., Floura. [mg/50 ml]	BaP [mg/50 ml]	<sup>14</sup> C-BaP [μCi/50 ml]
3.1a, 3.1b	0	1,25	2,5	0,49
3.2a, 3.2b	0,005	1,25	2,5	0,49
3.3a, 3.3b	0,05	1,25	2,5	0,49
8.3a, 8.3b	0,05	1,25	2,5	0,49
K1 <sup>a</sup>	0	1,25	2,5	0,49
K2 <sup>a</sup>	0,05	1,25	2,5	0,49

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

#### 2.12.5.1 Begleitversuch zur Versuchsreihe Biometer III

Parallel zu den in [Tabelle 2-16](#) aufgeführten Biometerkolben wurde aus den Ansätzen 8.1a, 8.2a und 8.3b der Versuchsreihe Biometer II auf die gleiche Art eine Versuchsreihe in 100 ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Diese wurde – was Kulturmedium, C-Quellen, Plantacare-Gehalt und Bakterien betraf – gleich gestaltet, der einzige Unterschied bestand darin, daß kein <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren eingesetzt wurde. Diese Kulturen sollten dazu dienen, begleitende Studien zur Entwicklung der Oberflächenspannung des Kulturmediums durchzuführen, ohne daß durch den Einsatz von radioaktiv markierten Verbindungen zum einen die Handhabung des Kulturgefäßes umständlich wird, zum anderen, um ein ständiges Eingreifen in die Abbauprobungen zu vermeiden.

#### 2.12.6 Gestaltung der Versuchsreihe Biometer IV

Aus den Ansätzen 1.2a, 4.2a und 4.2b der Versuchsreihe Biometer II wurden nach 707 Tagen Inkubation mit jeweils 1,5 ml Kulturmedium die Versuchsreihe Biometer IV mit 6 Biometern angeimpft. Diese drei Ansätze der Versuchsreihe Biometer II wurden als Stammkulturen für jeweils zwei neue Biometer ausgewählt, weil die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzungsraten zu diesem Zeitpunkt in diesen Kulturen sprunghaft angestiegen waren. In der 101. Inkubationswoche ließ sich in Ansatz 1.2a ein Umsatz von 46,02 μg, in Ansatz 4.2a 51,39 μg und in Ansatz 4.2b 68,41 μg Benzo[a]pyren nachweisen.

Das Animpfschema für den Biometer-Versuch IV kann der [Tabelle 2-17](#) entnommen werden.

**Tabelle 2-17:** *Animpfschema der Versuchsreihe Biometer IV*

Plantacare [%]	1,5 ml Kulturmedium aus Biometer II, 1.2a (MK IVa)	1,5 ml Kulturmedium aus Biometer II, 4.2a (MK IVb)	1,5 ml Kulturmedium aus Biometer II, 4.2b (MK IVc)
0,005	1a	2a	3a
0,005	1b	2b	3b

Alle Biometer enthielten zu Beginn des Abbauersuchs 50 ml Kulturmedium. Die Ansätze enthielten 2,5 mg Benzo[a]pyren, 0,45  $\mu\text{Ci}$  <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren und als mögliche weitere C-Quellen die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren mit je 1,25 mg. Die Kulturmedien aller Ansätze enthielten zu Versuchsbeginn 0,005 % Plantacare. Alle Ansätze lagen als zwei gleich behandelte parallele Systeme vor.

### 2.12.7 Durchführung der Abbauersuche

Der Austausch der NaOH aus dem Seitenarm erfolgte in der Regel wöchentlich. Dazu wurden die Biometer unter der Sterilbank aufgestellt, das Sterilfilter von der Kanüle entfernt und mit Hilfe einer Spritze die NaOH aus dem Seitenarm gezogen und in Szintillationsvials überführt. Dann wurde der Glasstopfen des Schornsteins entfernt und der Hahn geöffnet. Durch die Kanüle im Seitenarm wurde mit einer 5 ml Spritze 3 ml sterile 0,5 M NaOH in den Seitenarm gefüllt und mit der gleichen Spritze zehnmals Luft durch die Kanüle gepumpt, so daß das System mit Sauerstoff versorgt wurde. Anschließend wurde das System wieder verschlossen.

Sollte im Versuchssystem eine Änderung vorgenommen werden – wie z.B. Zugabe von Tensid oder von Cosubstraten – wurde nach dem Austausch der NaOH wie oben beschrieben, der Silikonstopfen auf dem Erlenmeyerkolben entfernt und die Zugabe erfolgte direkt ins Medium. Danach wurde der Erlenmeyerkolben wieder verschlossen.

Auch die Bestimmung der CMC des Kulturmediums erfolgte nach dem Austausch der NaOH direkt im Kulturmedium im Erlenmeyerkolben (s. 2.9.2).

Sollte eine Lebendkeimzahlbestimmung im Kulturmedium der Biometer stattfinden, wurden diese nach dem Wechseln der NaOH geöffnet und 0,5 ml Kulturmedium für das Anlegen einer Verdünnungsreihe entnommen.

### 2.12.8 Aufarbeitung des Kulturmediums

Vor der Aufarbeitung des Kulturmediums wurde die NaOH aus dem Seitenarm in Szintillationsvials überführt.

Mit Indikatorpapier wurde der pH-Wert der Kulturbrühe ermittelt. Da der pH-Wert in allen aktiven Ansätzen unterhalb von 9 lag, wurde das Kulturmedium nicht angesäuert,

denn erst oberhalb dieses Wertes erfolgt eine Einbindung von  $^{14}\text{CO}_2$  in Carbonat (DELAUNE et al. 1981).

Die Oberflächenspannung des Kulturmediums wurde gemessen und anschließend das Medium aus dem Biometer in eine zuvor gewogene 100 oder 200 ml Schottflasche überführt, über die Gewichts-differenz wurde das Volumen der Kulturflüssigkeit bestimmt. Ein vorheriger Vergleich der Bestimmung des Kulturvolumens mit einem Standzylinder und der Bestimmung durch Auswiegen hatte ergeben, daß die Dichte im Rahmen der Meßgenauigkeit als 1 angenommen werden konnte.

Durch Zentrifugation von 5–7 ml Medium für 20 min bei 4500 U/min wurden Bakterien und Partikel vom Medium getrennt. Vom Überstand wurde dann mit Hilfe einer Spritze zweimal 1 ml entnommen, die Kanüle der Spritze durch ein Membranspritzenfilter aus Cellulose-Acetat (0,45  $\mu\text{m}$  Porenweite) ersetzt und die Flüssigkeit durch dieses Filter gedrückt. Das Filtrat wurde in einem Szintillationsvial aufgefangen und die Radioaktivität darin durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Dieser Wert ermöglichte die Berechnung des tatsächlich gelösten Benzo[a]pyren im Kulturmedium.

Das restliche Medium aus dem Zentrifugenröhrchen wurde wieder mit der Kulturflüssigkeit in der Schottflasche vereinigt. Die Biometerflaschen und das Zentrifugenröhrchen wurden mit 15 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gespült und das Lösungsmittel in die Schottflasche zur Kulturbrühe gegeben. Lösungsmittel und Medium wurden durch einen Rührfisch auf dem Magnetrührer für 30 min heftig durchgerührt. Die Phasentrennung erfolgte über Nacht, wobei durch Einfrieren des Phasengemisches der Trennungsvorgang beschleunigt wurde. Nach dem Auftauen der Proben konnte die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phase mit Hilfe einer Pipette von der darüberliegenden Wasserphase abgezogen und in einen Rundkolben überführt werden. Die Extraktion der Kultur wurde noch zweimal mit jeweils 15 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wie oben beschrieben wiederholt, die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Phasen im Rundkolben vereinigt. Um mitgeführtes Wasser aus der Lösungsmittelphase zu entfernen, wurde das  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  für eine Stunde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

Das Volumen der wässrigen Phase wurde durch erneutes Auswiegen bestimmt. Aus der Wasserphase wurden 1 ml und 2 ml entnommen und die Menge an Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Der so bestimmte Wert ergibt mit dem Volumen der Wasserphase multipliziert die Gesamtmenge an  $^{14}\text{C}$  in der Wasserphase.

Das  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde aus dem Rundkolben in einen Spitzkolben überführt, das  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  mit Lösungsmittel nachgespült. Bei 40 °C und 600 mbar wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Extrakt in 4 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. Von diesem Extrakt wurde dann 2  $\mu\text{l}$  und 4  $\mu\text{l}$  entnommen und die Radioaktivität über Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Mit diesem Wert ließ sich dann die Gesamtmenge der Radioaktivität im organischen Extrakt ermitteln.

### 2.12.9 Dünnschichtchromatographische Analyse der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

Zur Charakterisierung der radioaktiven Substanzen in den organischen Extrakten wurden Dünnschichtchromatogramme mit Benzo[a]pyren als Referenzsubstanz angefertigt. Dazu wurde mit Hilfe der Auftragmaschine  $35\ \mu\text{l}$  des Dichlormethanextraktes – diese entsprachen etwa  $6000\ \text{dpm}$  – auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. In der Mitte der Platte wurde  $1\ \mu\text{l}$  einer Stammlösung mit  $10\ \mu\text{g}$  nicht-markiertem Benzo[a]pyren/ $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgetragen. Diese Platte wurde im Laufmittel Ethylacetat:Petrolether 1:2, v/v entwickelt. Am Radiodünnschichtscanner wurden die  $^{14}\text{C}$ -Banden der einzelnen Extrakte lokalisiert und ihre Rf-Werte berechnet. Das nicht-markierte Benzo[a]pyren wurde unter der UV-Lampe gekennzeichnet. Über den Vergleich des Laufverhaltens von Referenzsubstanz und markierter Substanz konnte der Anteil der Ursprungssubstanz Benzo[a]pyren im organischen Extrakt ermittelt werden.

### 2.12.10 Gaschromatographische Analyse der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

Um neben dem Verbleib des Benzo[a]pyren in den Kulturen auch einen Eindruck über den Abbau der anderen PAK zu gewinnen, wurden die Extrakte am Gaschromatographen analysiert. Die Analyseparameter hierfür waren folgende:

- Injektionsvolumen  $1\ \mu\text{l}$
- Split splitless Injektion
- Purge  $10\ \text{min}$  geschlossen
- Trägergas, GasflußStickstoff,  $1\ \text{ml}/\text{min}$
- Injektortemperatur  $270\ ^\circ\text{C}$
- Detektortemperatur  $285\ ^\circ\text{C}$
- Temperaturprogramm  $40\ ^\circ\text{C}$  für  $4\ \text{min}$   
mit  $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $280\ ^\circ\text{C}$  (Dauer:  $15\ \text{min}$ )  
 $280\ ^\circ\text{C}$  für  $15\ \text{min}$
- Probengeber HP 7673 Injektor

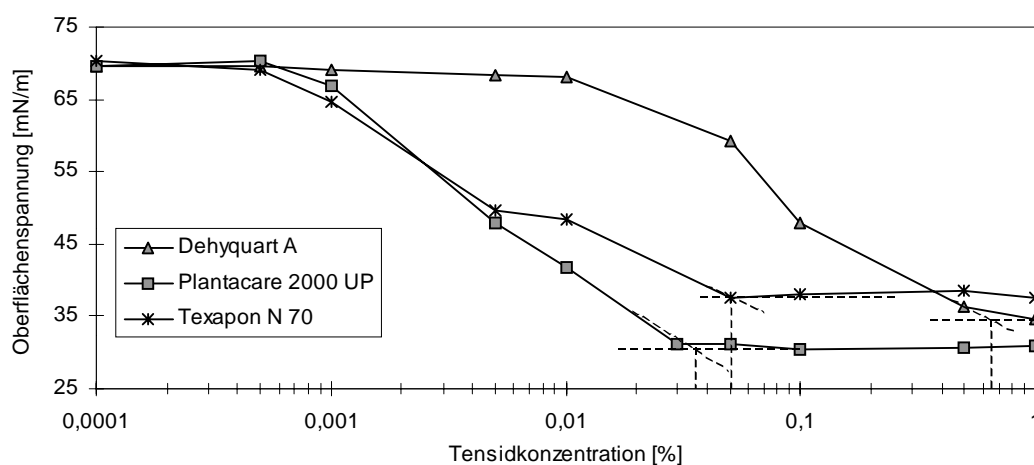
Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über ihre Retentionszeiten. Die Berechnung der im Extrakt enthaltenen Mengen der einzelnen PAK geschah nach einer Einpunkt-eichung mit einem PAK-Standard, welcher die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren und Benzo[a]pyren in einer Konzentration von jeweils  $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  enthielt. Nach einer Meßreihe von 6 Extrakten wurde jeweils eine neue Eichung mit dem Standard durchgeführt. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte über den Vergleich der Peakflächen von Standardsubstanz und identifizierter Substanz im Extrakt.



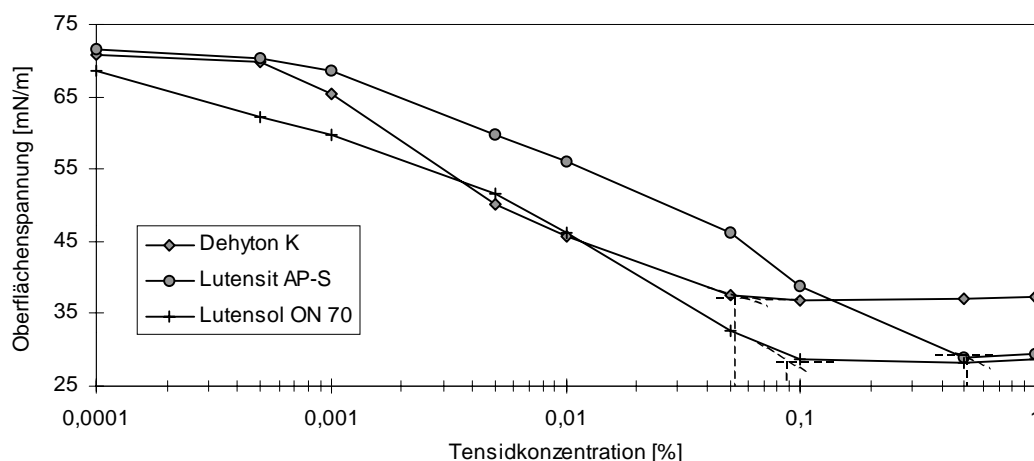
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bestimmung der CMC der Tenside

Von den 6 ausgewählten Tensiden wurden wässrige Verdünnungsreihen der technischen Produkte hergestellt (s. 2.1.1). Die Oberflächenspannungen der Konzentrationsstufen wurden, wie unter 2.9 beschrieben, bestimmt und die gemessenen Werte gegen die Tensidkonzentration aufgetragen (s. Bild 3-1 und Bild 3-2).



**Bild 3-1:** Bestimmung der CMC von Dehyquart A, Plantacare 2000 UP und Texapon N 70 durch Auftragen der Oberflächenspannung gegen die Tensidkonzentration (x-Achse: logarithmische Skalierung), Schnittpunkt der verlängerten Geraden = CMC des Tensids



**Bild 3-2:** Bestimmung der CMC von Dehyton K, Lutensit A-PS und Lutensol ON 70 durch Auftragen der Oberflächenspannung gegen die (x-Achse: logarithmische Skalierung), Schnittpunkt der verlängerten Geraden = CMC des Tensids

Bei allen 6 Tensiden zeigt die grafische Darstellung den typischer Kurvenverlauf für die Messung der Oberflächenspannung einer Verdünnungsreihe oberflächenaktiver Substanzen (s. [Bild 3-1](#) und [Bild 3-2](#)). Mit steigender Tensidkonzentration im Wasser sank die Oberflächenspannung stetig, blieb aber ab einer jeweils spezifischen Konzentration annähernd konstant.

Die Schnittpunkte der verlängerten Geraden der quasilinearen Abschnitte der Kurve bestimmten den Wert der CMC des Tensids. Diese Werte sind in [Tabelle 3-1](#) zusammengefaßt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Tenside als technische Produkte eingesetzt wurden. Diese besitzen eine unterschiedliche Menge an Aktivsubstanz in Wasser (s. [Tabelle 2-1](#)). Ein Vergleich der CMC-Werte der Tenside kann daher auch über die Menge an Aktivsubstanz erfolgen (wobei die unter [2.1.1](#) getroffenen Einschränkungen berücksichtigt werden sollten).

**Tabelle 3-1:** Kritische Micellbildungskonzentrationen (CMC) der 6 verwendeten Tenside

Tensid	CMC für das techn. Gemisch in Wasser [%]	CMC für die AS in Wasser [mg/l]	Oberflächenspannung [mN/m]
Dehyquart A	0,63	1575,0	34
Plantacare 2000 UP	0,03	169,6	30
Texapon N 70	0,05	352,5	37
Dehyton K	0,05	152,5	37
Lutensit A-PS	0,50	3250,0	29
Lutensol ON 70	0,08	800,0	28

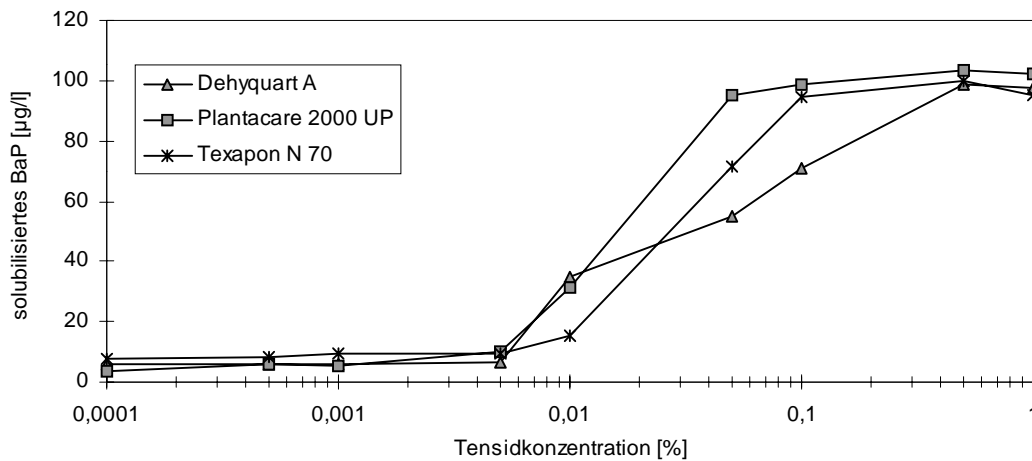
AS: Aktivsubstanz

Die Oberflächenspannung von Aqua dest. beträgt bei 20 °C 72,8 mN/m, die Tenside konnten diese auf Werte zwischen 28 und 37 mN/m herabsetzen. Die Menge an Aktivsubstanz im Wasser, die für diese Wirkung nötig war, war je nach Tensidtyp unterschiedlich und reichte von 152,5 mg/l für Dehyton K bis zu der mehr als zwanzigfachen Menge von 3250 mg/l für Lutensit A-PS.

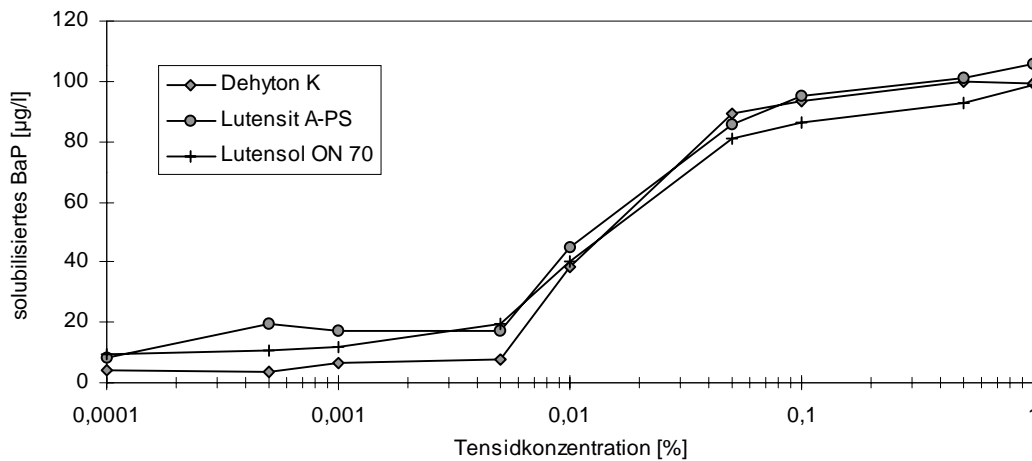
### 3.2 Solubilisierende Eigenschaften der Tenside

Die solubilisierenden Eigenschaften der Tenside für Benzo[a]pyren wurden, wie unter [2.10.1](#) beschrieben, ermittelt. Eingesetzt wurden hierbei zunächst 100 ng <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren/ml Tensidlösung.

Für alle 6 Tenside wurde der Zusammenhang zwischen der Tensidkonzentration und der Menge an solubilisiertem Benzo[a]pyren deutlich (s. [Bild 3-3](#) und [Bild 3-4](#)). Aus den unter [2.1.1](#) genannten Gründen, wurde die Tensidkonzentration auf das technische Produkt bezogen.



**Bild 3-3:** Solubilisierung von Benzo[a]pyren (BaP) in Abhängigkeit von der Konzentration an Dehyquart A, Plantacare 2000 UP und Texapon N 70

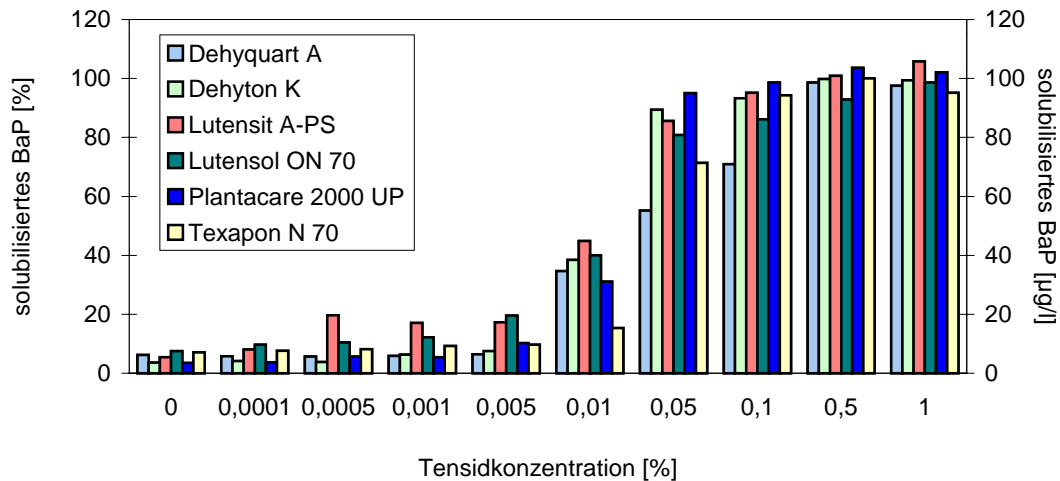


**Bild 3-4:** Solubilisierung von Benzo[a]pyren (BaP) in Abhängigkeit von der Konzentration an Dehyton K, Lutensit A-PS und Lutensol ON 70

Mit steigender Tensidkonzentration stieg die Menge an solubiliertem Benzo[a]pyren, bis schließlich die gesamten 100 ng Benzo[a]pyren/ml Tensidlösung in Lösung gebracht wurden.

Auffällig ist, daß eine Steigerung der Löslichkeit von Benzo[a]pyren bei allen Tensiden bereits auch im Konzentrationsbereich unterhalb der CMC vorlag. Eine deutliche Löslichkeitssteigerung wurde bei einer Konzentration von 0,01 % Tensid sichtbar. In den 0,5%igen Tensidlösungen war sämtliches Benzo[a]pyren in Lösung gegangen. Dieses galt übereinstimmend für alle 6 Tenside.

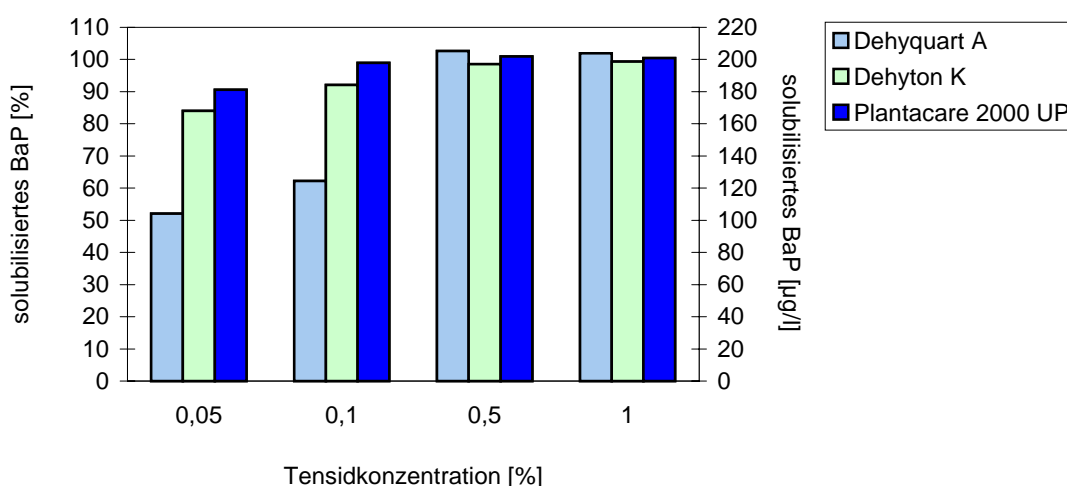
Trägt man die Menge des solubilisierten Benzo[a]pyren als prozentualen Anteil des insgesamt eingesetzten Benzo[a]pyren gegen die Tensidkonzentration auf, so wird die Solubilisierungsfähigkeit der 6 Tenside im Vergleich deutlich (s. Bild 3-5).



**Bild 3-5:** Menge des solubilisierten Benzo[a]pyrens in % des eingesetzten Benzo[a]pyrens (primäre Größenachse) und in  $\mu\text{g/l}$  (sekundäre Größenachse) in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration, 100 % = 100  $\mu\text{g/l}$

Die eingesetzte Benzo[a]pyrenmenge von 100 ng/ml Tensidlösung entsprach, für die in der Literatur angegebenen Wasserlöslichkeiten von 4–14  $\mu\text{g/l}$ , bei vollständiger Solubilisierung einer 7 bis 25fachen Löslichkeitssteigerung. Die Wasserlöslichkeit von Benzo[a]pyren, die jeweils experimentell in dem Ansatz mit 0 % Tensid ermittelt wurde, lag zwischen 3,46 und 7,48  $\mu\text{g/l}$ , im Mittel ergab sich damit ein Wert von 5,52  $\mu\text{g/l}$  (Standardabweichung  $\sigma = 1,55$ ). Wenn 100 ng Benzo[a]pyren in 1 ml Tensidlösung vollständig solubilisiert wurden, lag somit eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit um den Faktor 18 vor.

Exemplarisch wurde die Stoffkonzentration auf 200 ng Benzo[a]pyren/ml Tensidlösung verdoppelt. Diese Versuchsreihe wurde für 3 der 6 Tenside durchgeführt, wobei nur die Tensidlösungen von 0,05 bis 1 % zum Einsatz kamen. Die Ergebnisse sind im Bild 3-6 dargestellt.



**Bild 3-6:** Menge des solubilisierten Benzo[a]pyrens in % des eingesetzten Benzo[a]pyrens (primäre Größenachse) und in µg/l (sekundäre Größenachse) in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration, 100 % = 200 µg/l

Auch die mit 200 ng/ml im Vergleich zum vorherigen Versuch doppelt so hohe Menge an Benzo[a]pyren wurde in den hohen Konzentrationsstufen des Tensids vollständig in Lösung gebracht. Dieses entsprach einer Erhöhung der experimentell bestimmten Wasserlöslichkeit um den Faktor 36. Trotz der doppelten Benzo[a]pyrenmenge zeigten sich im getesteten Konzentrationsbereich bei den 3 eingesetzten Tensiden im Vergleich zum Vorversuch mit 100 ng/ml keine Unterschiede in den Prozentanteilen, die in Lösung gingen.

Bei einem Vergleich der einzelnen Tenside in ihrer Fähigkeit, Benzo[a]pyren zu solubilisieren, erwies sich das Tensid Dehyquart A als am wenigsten effektiv (s. Bild 3-5). Bei einer Konzentration von 0,05 % lagen erst 55 % des Benzo[a]pyren solubilisiert vor, alle anderen Tenside brachten 71 bis 95 % des Benzo[a]pyren in Lösung. Erst in den beiden höchsten Konzentrationsstufen mit 0,5 und 1 % Tensidgehalt solubilisierte Dehyquart A das vorhandene Benzo[a]pyren nahezu vollständig. Diese Eigenschaft des Tensids korrelierte mit dem auffälligen Kurvenverlauf bei der Bestimmung der Oberflächenspannung von Dehyquart A (s. Bild 3-3). Die Oberflächenspannung veränderte sich erst bei höheren Tensidkonzentrationen und die CMC wies mit 0,63 % den höchsten Wert der 6 Tenside auf.

Dieser Zusammenhang zwischen CMC und Solubilisierungsvermögen bestätigte sich bei den anderen Tensiden nicht so eindeutig. Lutensit A-PS besaß eine CMC von 0,5 %, die Kurve der Oberflächenspannung verläuft im Bereich geringerer Konzentrationen flach. Das Tensid hatte jedoch auch schon im unteren Konzentrationsbereich die Fähigkeit, Benzo[a]pyren in hohem Maße in Lösung zu bringen.

Texapon N 70 und Dehyton K besaßen den gleichen Wert von 0,05 % für die CMC und auch die Kurven zur Bestimmung der Oberflächenspannung verlaufen ähnlich. Sie zeigten trotzdem eine unterschiedliche Solubilisierungsfähigkeit für Benzo[a]pyren:

Texapon N 70 hatte in den unteren Konzentrationsstufen ein geringeres Solubilisierungsvermögen als Dehyton K.

Plantacare 2000 UP wies mit 0,03 % von allen Tensiden den niedrigsten Wert für die CMC auf. Dieses korreliert wiederum mit dem Solubilisierungsvermögen: Plantacare 2000 UP war das einzige Tensid, das bei einer Konzentration von 0,05 % bereits mehr als 90 % des Benzo[a]pyren solubilisierte.

Lutensol ON 70 erreichte mit einem Wert von 28 mN/m bei einer CMC von 0,08 % die niedrigste Oberflächenspannung der 6 Tenside. Bei einer Konzentration von 0,1 % waren jedoch erst 86 % des Benzo[a]pyren solubilisiert und erst bei einer 1%igen Lutensol-Lösung war nahezu sämtliches Benzo[a]pyren in Lösung.

Um die Solubilisierungsfähigkeit der einzelnen Tenside besser vergleichen zu können, wurden für die 0,005%igen und 0,05%igen Tensidlösungen Solubilisierungskoeffizienten gebildet (s. [Tabelle 3-2](#)). Diese wurden auf die Aktivsubstanz des Tensids bezogen, daher sind die unter [2.1.1](#) getroffenen Einschränkungen zur Zusammensetzung des technischen Produkts zu bedenken. Als Menge an Aktivsubstanz und als Molmasse der Tenside wurden die in [Tabelle 2-1](#) angegebenen Größenbereiche des jeweiligen technischen Tensidprodukts gemittelt. Die Solubilisierungskoeffizienten geben an, wieviel Benzo[a]pyren in der Tensidlösung durchschnittlich in Lösung gebracht werden kann. Der gewichtsbezogene Solubilisierungskoeffizient (GwSK) veranschaulicht, wieviel Benzo[a]pyren pro Milligramm Aktivsubstanz Tensid solubilisiert wird, der molare Solubilisierungskoeffizient (MSK) zeigt, wieviel Benzo[a]pyren-Moleküle von einem Tensidmolekül in Lösung gebracht werden.

**Tabelle 3-2:** Solubilisierende Eigenschaften der Tenside für Benzo[a]pyren in einer 0,005%igen und einer 0,05%igen Tensidlösung bezogen auf die jeweils durchschnittliche Menge an Aktivsubstanz in den technischen Produkten (s. [Tabelle 2-1](#))

Tensid	GwSK <sub>0,005 %</sub> [µg/mg]	MSK <sub>0,005 %</sub> [mol/mol]	GwSK <sub>0,05 %</sub> [µg/mg]	MSK <sub>0,05 %</sub> [mol/mol]
Dehyquart A	0,51	0,66	0,44	0,57
Dehyton K	0,49	0,70	0,59	0,83
Lutensit A-PS	0,53	0,85	0,26	0,42
Lutensol ON 70	0,39	0,73	0,16	0,30
Plantacare 2000 UP	0,38	0,59	0,36	0,56
Texapon N 70	0,63	0,96	0,47	0,71

GwSK<sub>0,005 %</sub>, GwSK<sub>0,05 %</sub>: gewichtsbezogener Solubilisierungskoeffizient einer 0,005 bzw. 0,05%igen Tensidlösung (bezogen auf den durchschnittlichen Gehalt an Aktivsubstanz)  
 MSK<sub>0,005 %</sub>, MSK<sub>0,05 %</sub>: molarer Solubilisierungskoeffizient einer 0,005 bzw. 0,05%igen Tensidlösung (bezogen auf die durchschnittliche Molmasse der Aktivsubstanz)

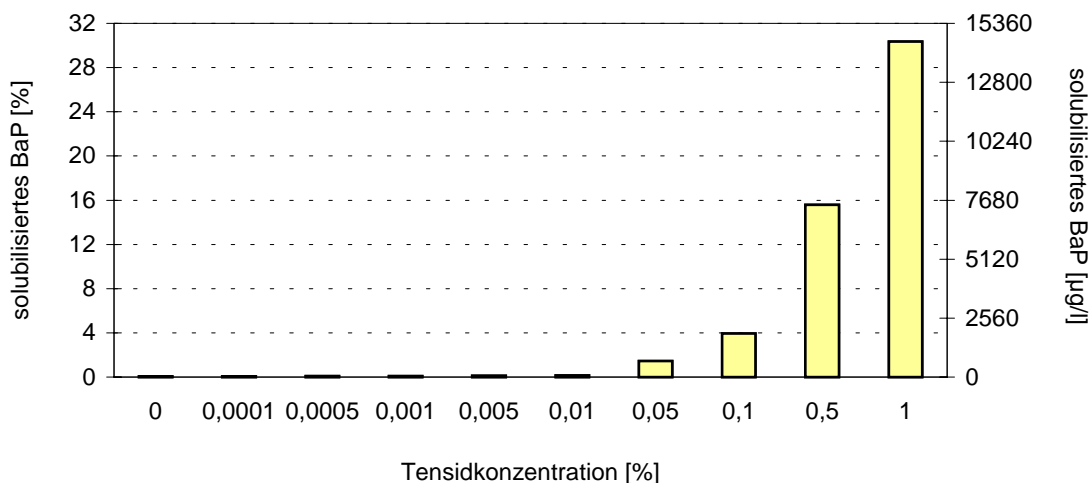
Die Unterschiede in der Solubilisierungseffizienz der einzelnen Tenside waren nicht sehr gravierend. In der niedriger konzentrierten Tensidlösung hatte Texapon N 70 für

Benzo[a]pyren die höchste Effizienz, Plantacare 2000 UP eine nur etwa halb so hohe. In der höheren Konzentrationsstufe veränderten sich die Rangfolgen und die Unterschiede wurden ausgeprägter. Hier zeigte Dehyton K die höchste Effizienz, diese war etwa 4mal so hoch wie die von Lutensol ON 70.

### 3.3 Solubilisierungsvermögen von Plantacare im Kulturmedium

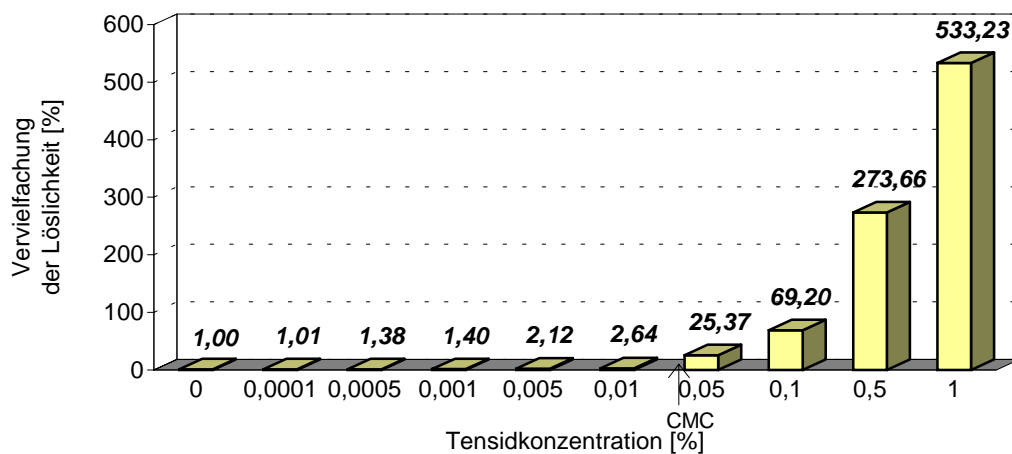
Das Kulturmedium enthielt neben Benzo[a]pyren auch Salze, Spurenelemente, Vitamine und die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren. Die Wirkung eines Tensids in diesem Medium verteilte sich daher, im Unterschied zum System Aqua bidest./Benzo[a]pyren, auf mehrere Komponenten. Außerdem betrug die Konzentration an <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren im Kulturmedium 50 µg/ml, dieses entsprach im Vergleich zum Solubilisierungsversuch mit Aqua bidest. einer 500fachen Menge. Mit dem Tensid Plantacare 2000 UP wurde daher ein Solubilisierungsversuch im Kulturmedium durchgeführt, welcher die geplanten Bedingungen zu Beginn der Abbauprobe simulieren sollte.

Die Startbedingungen der Abbauprobe wurden hierbei im Miniaturmaßstab nachgestellt. Das Kulturmedium enthielt pro ml jeweils 25 µg der PAK Phenanthren, Anthracen, Pyren und Fluoranthen; 50 µg <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren und das Tensid Plantacare in den Konzentrationsstufen 0,0001 % bis 1 %. Als Bezugswert wurde auch hier in einem Ansatz mit 0 % Tensid die Löslichkeit von Benzo[a]pyren unter diesen Versuchsbedingungen ermittelt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind dem Bild 3-7 zu entnehmen.



**Bild 3-7:** Menge des solubilierten <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyrens im Kulturmedium in % des eingesetzten Benzo[a]pyrens und in µg/l in Abhängigkeit von der Plantacarekonzentration, 100 % = 50 mg/l

Die Löslichkeit von Benzo[a]pyren im Kulturmedium ohne Plantacare wurde mit 27,32 µg/l bestimmt. Setzte man diesen Wert = 1, so ergab sich in den Ansätzen mit Plantacare eine Vervielfachung dieses Wertes. Dieser Zusammenhang ist im Bild 3-8 dargestellt.



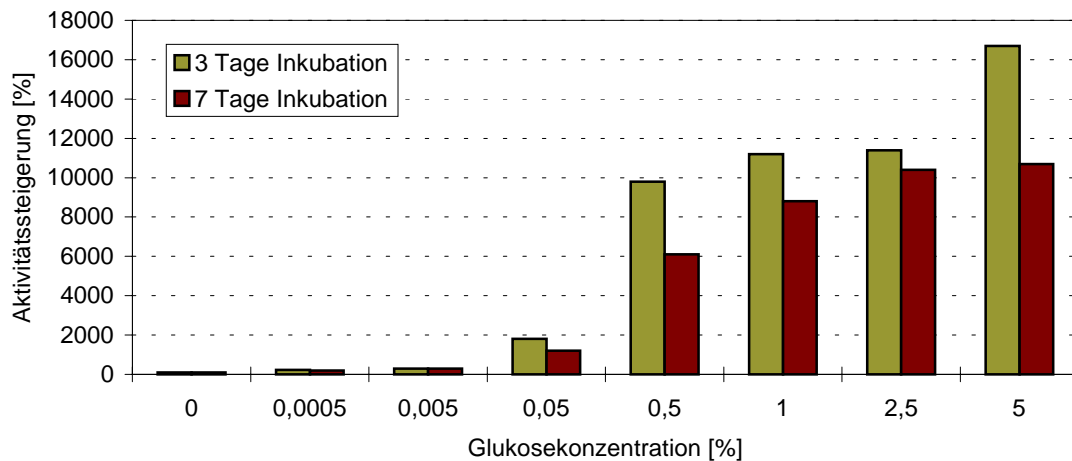
**Bild 3-8:** Vervielfachung der Löslichkeit von Benzo[a]pyren im Kulturmedium in Abhängigkeit von der Plantacarekonzentration,  $\uparrow$  CMC: kritische Micellbildungskonzentration des Tensids: 0,03 % technisches Gemisch

Plantacare war auch im Kulturmedium in der Lage, die Lösungsrate des Benzo[a]pyren bedeutend zu erhöhen. Ab der CMC des Tensids zeigte sich hierbei eine deutlich erhöhte Solubilisierung, aber auch unterhalb der CMC, also dort, wo nur Plantacare-Monomere vorlagen, zeigte sich eine – wenn auch geringe – meßbare Steigerung der Löslichkeit.

### 3.4 DMSO-Test

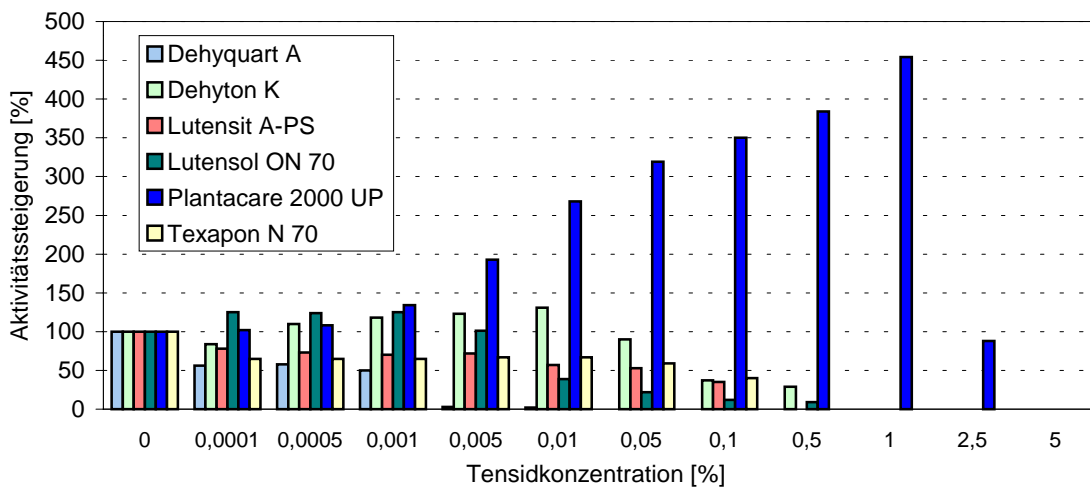
Mit Hilfe des DMSO-Tests sollte ein Vergleich der Tenside bezüglich ihres Einflusses auf die Aktivität der Mikroorganismenmischpopulation vorgenommen werden.

Zunächst wurde die Eignung dieses Tests für den Einsatz von Mikroorganismen in Kulturmedium überprüft. Dazu wurde der Einfluß einer wässrigen Verdünnungsreihe von Glucose auf die Reduktase-Aktivität der Mikroorganismen nach 3 und nach 7 Tagen gemessen. Die Basisaktivität der Mikroorganismen ohne Glucose wurde hierbei als 100 %-Wert betrachtet und die Aktivitätsveränderung entsprechend prozentual berechnet. Wie man [Bild 3-9](#) entnehmen kann, wird die Aktivitätsveränderung der Mischpopulation entlang der Konzentrationsreihe deutlich. Eine 5%ige Glucoselösung steigerte nach 3 Inkubationstagen die Aktivität der Mikroorganismen um mehr als das 160fache. Auch nach 7 Tagen Inkubation ist diese Tendenz, wenn auch etwas abgeschwächt, meßbar.



**Bild 3-9:** Veränderung der DMSO-Aktivität einer Mischkultur unter dem Einfluß verschiedener Glukosekonzentrationen

Nach dem gleichen Versuchsprinzip wurde nun die Änderung der Reduktase-Aktivität unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationsstufen der 6 Tenside untersucht. Vergleichende Messungen zeigten, daß nach 7tägiger Inkubation die Aktivitätsveränderungen deutlicher sichtbar wurden als nach 3tägiger Inkubation. Die Ergebnisse der Veränderungen der DMSO-Reduktionsrate nach 7 Inkubationstagen sind im [Bild 3-10](#) dargestellt.



**Bild 3-10:** Veränderung der DMSO-Aktivität einer Mischkultur unter dem Einfluß der Tenside nach 7 Tagen Inkubation

Die Mikororganismenpopulation reagierte in Bezug auf ihre Reduktase-Aktivität auf die einzelnen Tensidtypen in sehr unterschiedlichem Maße. Dehyquart A wirkte hierbei bereits im ppb-Bereich hemmend, Plantacare 2000 UP dagegen zeigte noch mit mehreren Gramm Substanz pro Liter Wasser einen positiven Effekt auf die mikrobielle Aktivität.

Dehyquart A verringerte die mikrobielle Aktivität bereits in der geringsten Konzentrationsstufe auf nur 56 % der Grundaktivität. Ab der 0,005%igen Tensidlösung kam die Aktivität praktisch zum Erliegen.

Die beiden anionischen Tenside Lutensit A-PS und Texapon N 70 besaßen ebenfalls bereits in der geringsten Tensidkonzentration einen hemmenden Effekt auf die DMSO-Reduktion. Eine Halbierung der Aktivität lag bei Lutensit A-PS in der 0,05%igen Lösung vor. Bei beiden Tensiden fand sich in dem jeweiligen 0,5%igen Ansatz keine Reduktion von DMSO mehr.

Dehyton K als amphoterer Tensid zeigte in den Konzentrationsstufen bis 0,01 % eine Erhöhung der Reduktaseaktivität bis auf 131 % der Basisaktivität. Erst oberhalb dieser Konzentration sank die mikrobielle Reduktaseaktivität.

Die nichtionischen Tenside Lutensol ON 70 und Plantacare zeigten zunächst eine Erhöhung der Basisaktivität der Mikroorganismen. In der Konzentrationsreihe von Lutensol ON 70 sank sie jedoch oberhalb von 0,005 % (= 100 mg AS/l) rasch ab und bei den Konzentrationen größer als 0,5 % fand sich keine Aktivität mehr. Das Alkylpolyglycosid Plantacare erhöhte die Reduktase-Aktivität der Mikroorganismen in den Tensidkonzentrationen 0,001 bis 1 % quasilinear. In der 1%igen Plantacare-Lösung – diese entsprach einem Wirkstoffgehalt von 5,3 g/l – war die Basisaktivität auf 454 % erhöht. Oberhalb dieser Konzentration sank die Aktivität auf 88 % im 2,5%igen Ansatz und darüber hinaus war keine DMS-Freisetzung mehr meßbar.

### 3.5 Keimzahlbestimmung im Boden

Die hoch mit PAK-kontaminierte Bodenprobe, aus der die Mikroorganismenmischpopulation gewonnen wurde, enthielt nach der Bestimmung der Keimzahlen auf R2A-Agar  $1,73 \cdot 10^5$  Kolonien pro g naturfeuchter Boden. Das Ausplattieren der Verdünnungsstufen auf Standard I-Agar ergab einen etwa 3fach niedrigeren Wert von  $6 \cdot 10^4$  Kolonien.

### 3.6 Optische Charakterisierung der Mischkultur

Die bei der Bestimmung der Keimzahl isolierten Mikroorganismen wurden nach optischen Merkmalen der Kolonien in Typen eingeteilt. Die Kolonietypen der Bodenprobe sind in [Tabelle 3-3](#) beschrieben. Die isolierten Mikroorganismen in den Biometer-Abbauversuchen wurden nach den Kriterien dieser Tabellen Kolonietypen zugeordnet.

**Tabelle 3-3:** *Kolonietypen der isolierten Mikroorganismen aus der Bodenprobe (R2A-Agar)*

Typ	Koloniemorphologie
1	blaß zitronengelb, leicht mit einem Stich ins grüngelbe fluoreszierend; glänzend; transparent durchscheinend, in der Mitte massiver, zum Rand transparenter werdend; EK flach, in der Mitte leicht erhaben; Rand glatt; rund; • 4–7 mm
2	hellbeige-cremefarben bis leicht gelblich; stark glänzend; nur schwach transparent; EK flach; Rand glatt; völlig kreisrund; • 1–3 mm
3	ähnlich Typ 2; strahlend weiß; stark glänzend; nicht transparent; EK kugelig erhaben; Rand glatt; völlig kreisrund, • 1–2 mm
4	ähnlich Typ 3, aber etwas matter weiß (eher leicht wollweiß); nicht transparent; EK flach; Rand glatt; völlig kreisrund, • 1–2 mm
5	weiß; stark glänzend, nicht transparent, in der Mitte massiver, zum Rand transparent, • 4–8 mm
6	kräftig gelb-orange; glänzend; nicht transparent; EK leicht erhaben; Rand glatt; kreisrund; • 1–3 mm
7	zart weiß; schwach glänzend; am Rand sehr transparent; • 6–7 mm
8	weiß; sehr transparent; glänzend; rund; flach; • 2–3 mm
9	cremeweiß, zum Rand hin weißer werdend; glänzend; nicht transparent; unregelmäßig geformt; glatter Rand; • 4 mm
10	beige bis dunkel gelblich; in der Mitte massiv, zum Rand hin transparenter; • 10 mm, wirken wie Kolonienansammlungen
11	rosa beige; glänzend; nicht durchscheinend, recht massiv; konzentrisch aufgebaut; Rand leicht gewellt; • 4–8 mm

*EK: Einzelkolonie*

## 3.7 Ergebnisse der Abbaustudien mit <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren

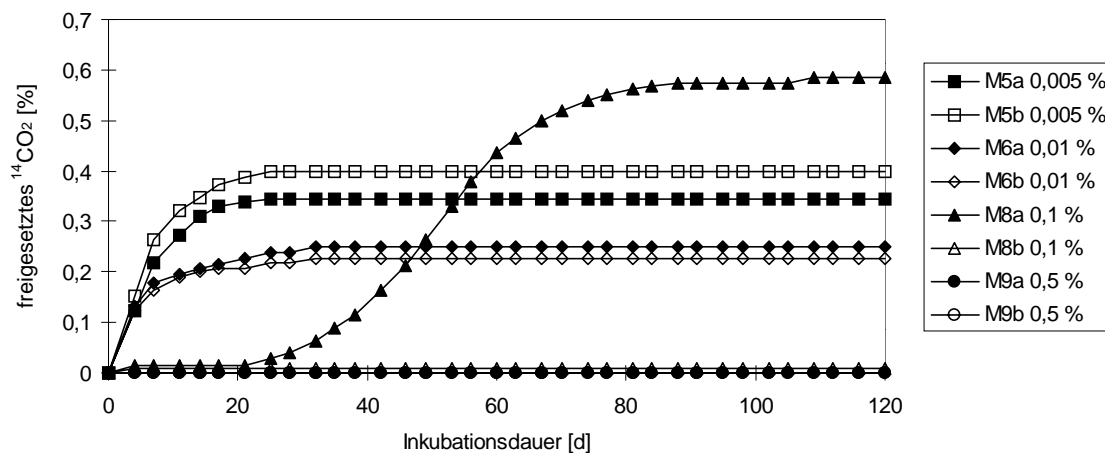
### 3.7.1 Versuchsreihe Biometer I, Ansätze M5 bis M9

#### 3.7.1.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer I, Ansätze M5 bis M9

Die Ansätze M5 bis M9 (s. [Tabelle 2-12](#)) dienten zur Untersuchung der Frage, ob Benzo[a]pyren den Mikroorganismen als alleinige C- und Energiequelle dienen konnte. Die Solubilisierung von Benzo[a]pyren durch Plantacare sollte dabei den bioverfügbaren Anteil des 5-Ring PAK erhöhen und so möglicherweise einen Abbau ermöglichen oder steigern.

### 3.7.1.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren

Bild 3-11 stellt die Menge an freigesetztem  $^{14}\text{CO}_2$  in diesen Ansätzen als kumulative Mineralisation während der gesamten bis dahin verstrichenen Inkubationszeit dar.



**Bild 3-11:** *Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren in Abhängigkeit vom Plantacare-Gehalt des Kulturmediums, Prozentangabe in der Legende: Tensidgehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn (die Kurven der Ansätze M8b und M9b werden durch die Kurve von Ansatz M9a verdeckt)*

In allen Kolben dieser Versuchsreihe – in der neben Benzo[a]pyren als einziger PAK-Verbindung nur Plantacare als weitere mögliche C-Quelle im Kulturmedium vorlag – fand sich während der gesamten Inkubationsdauer von 120 Tagen eine nur geringe, nicht signifikante  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung (s. auch [Tabelle 3-6](#)). Die eingesetzte Mischkultur konnte Benzo[a]pyren unter dem Einfluß von Plantacare nicht verwerten.

Im Ansatz M5 mit 0,005 % Plantacare kam die  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung nach 3 Wochen zum Erliegen, die mittlere  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung der beiden Parallelen betrug 0,37 %. Die beiden Ansätze mit 0,01 % Tensidgehalt zeigten nach 4wöchiger Inkubation keine weitere  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung mehr, im Mittel entwichen 0,24 % der gesamten Radioaktivität als  $^{14}\text{CO}_2$ . Die beiden Parallelen des Ansatzes M8 mit 0,1 % Plantacare-Gehalt im Kulturmedium entwickelten sich unterschiedlich. Die Parallele M8b zeigte bei der ersten Probenahme nach 4 Tagen 0,01 %  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung, danach ließ sich keine Radioaktivität in der NaOH mehr nachweisen. M8a hingegen begann erst nach 3wöchiger Inkubation mit einer Freisetzung von markiertem  $\text{CO}_2$ , diese Phase hielt dann bis etwa zur 13. Inkubationswoche an, dann konnte auch hier kein weiteres radioaktives Kohlendioxid mehr nachgewiesen werden. Der Ansatz M9 zeigte in beiden Parallelen keinerlei Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$ .

### 3.7.1.3 Keimzahlbestimmung

Die Biometer wurden zu Beginn der Kultivierung mit jeweils 2 ml Bakteriensuspension einer 8 Wochen alten Stammkultur angeimpft. Der OD<sub>564</sub>-Wert dieser Suspension betrug 1,54.

Am Ende der Inkubationszeit wurden in allen Ansätzen der OD<sub>564</sub>-Wert und die Lebendkeimzahlen bestimmt. Die Kolonien wurden nach optischen Gesichtspunkten den Typen der [Tabelle 3-3](#) zugeordnet, wobei nur solche Typen berücksichtigt wurden, die mindestens 5 % der Gesamtkolonien auf einer Agarplatte darstellten. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 3-4](#) aufgelistet.

**Tabelle 3-4:** OD<sub>564</sub>-Wert, Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze M5 bis M9, Versuchsreihe Biometer I nach 120 Tagen Inkubation

Ansatz	Plantacare [%]	OD <sub>564</sub>	KBE/ml	Typen [%]			
				1	2	3	6
M5a	0,005	0,01	9,42*10 <sup>6</sup>	26	6	58	10
M5b	0,005	0,06	6,36*10 <sup>6</sup>	33	5	57	5
M6a	0,01	0,02	6,06*10 <sup>6</sup>	48	7	34	11
M6b	0,01	0,02	6,14*10 <sup>6</sup>	40	8	42	10
M8a	0,1	0,37	4,45*10 <sup>8</sup>	87	6	7	-
M8b	0,1	0,28	2,064*10 <sup>8</sup>	65	30	5	-
M9a	0,5	0,11	< 10 <sup>2</sup>	-	-	-	-
M9b	0,5	0,22	1,798*10 <sup>7</sup>	55	45	-	-

-: Anteil an der Gesamtkoloniezahl < 5 %

Die Werte der OD-Bestimmungen und der Lebendkeimzahlen auf R2A-Agar zeigen, daß in den Ansätzen M8 mit 0,1 % Plantacare-Gehalt die höchste Gesamtbakterienzahl vorkam. Die Diversität der Bakterientypen nahm hingegen mit steigendem Tensidgehalt deutlich ab. Fanden sich in den Ansätzen mit 0,005 % und 0,01 % Plantacare-Gehalt noch 4 Typen, so sank diese Zahl im Ansatz mit 0,5 % Tensid auf 2 Typen.

Hauptvertreter waren in den Ansätzen M5 und M6 die Typen 1 und 3, in den Ansätzen mit den höheren Tensidkonzentrationen die Typen 1 und 2.

### 3.7.1.4 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium

Vor der Aufarbeitung des Kulturmediums nach 120 Tagen Inkubation wurde, wie unter [2.12.8](#) beschrieben, die gelöste Menge an Radioaktivität im Kulturmedium bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in [Tabelle 3-5](#) aufgeführt.

**Tabelle 3-5:** Im Kulturmedium gelöste Radioaktivität nach 120 Tagen Inkubation; Versuchsreihe Biometer I, Ansätze M5 bis M9

Ansatz	Plantacare [%]	gelöstes <sup>14</sup> C [%]	gelöstes <sup>14</sup> C <sup>a</sup> [µg/ml]
M5a	0,005	0,25	0,28
M5b	0,005	0,23	0,27
M6a	0,01	0,23	0,27
M6b	0,01	0,39	0,42
M8a	0,1	0,64	0,70
M8b	0,1	0,59	0,64
M9a	0,5	8,76	9,44
M9b	0,5	7,83	9,63

<sup>a</sup>berechnet als <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren

In 50 ml Kulturmedium wurden bei diesen Ansätzen 5 mg Benzo[a]pyren als einziger PAK-Vertreter eingesetzt, so daß sich theoretisch pro ml Kulturlösung eine Konzentration von 100 µg <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren ergeben hätte, wenn alles in Lösung gegangen wäre. Das Volumen des Kulturmediums betrug zum Ende der Inkubation nicht mehr 50 ml, da Proben für die Bestimmung von OD-Wert und Lebendkeimzahl entnommen wurden. Für die Berechnung der gelösten Radioaktivität wurde das tatsächliche Volumen des Kulturmediums, welches durch Auswiegen bestimmt wurde (s. 2.12.8), zu Grunde gelegt.

Mit zunehmendem Tensidgehalt in den Ansätzen stieg der Anteil der Radioaktivität, der im Kulturmedium gelöst vorlag. In den Ansätzen mit 0,5 % Plantacare lösten sich von den 100 µg Benzo[a]pyren 9,44 bzw. 9,63 µg in einem Milliliter Medium. Auch in den Ansätzen mit 0,1 % Tensidgehalt fand sich ein, im Vergleich zu den niedrigeren Tensidkonzentrationen, deutlich erhöhter Wert der gelösten Radioaktivität.

Vergleicht man die bestimmte Menge der gelösten Radioaktivität mit den Ergebnissen des Versuchs zur Bestimmung des Solubilisierungsvermögens von Plantacare im Kulturmedium – welcher die Startbedingungen in den Biometer-Versuchen nachstellte – (s. Bild 3-7 und Bild 3-8), so gibt es in der höchsten Konzentrationsstufe mit 0,5 % Plantacare eine Übereinstimmung (Löslichkeit im Solubilisierungsversuch: 7,48 µg/ml). In der 0,1%igen Plantacare-Lösung ist eine etwa 3fach geringere Menge an Benzo[a]pyren gelöst als in der vergleichbaren Konzentration im Solubilisierungsversuch (1,89 µg/ml). Dieses deutet auf einen Tensidabbau in diesen Ansätzen hin. Die beiden niedriger dosierten Ansätze, deren Plantacare-Konzentration unterhalb der CMC des Tensids lagen, besitzen, im Vergleich zu den Ergebnissen der entsprechenden Konzentrationen im Solubilisierungsversuch, eine 5fach erhöhte Menge an gelöster Radioaktivität. Diese Erhöhung könnte auf den Einfluß der Bakterien im Kulturmedium zurückgeführt werden.

Sie bewirkten möglicherweise durch die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten eine Präsenz von organischer Substanz im Medium, welche, auch wenn es sich dabei nicht um Biotenside handeln mußte, eine oberflächenaktive Wirkung aufwies. Dieser Effekt konnte im Solubilisierungsversuch, der nicht beimpft wurde, nicht auftreten. Die erhöhte Menge an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium könnte aber auch auf polare  $^{14}\text{C}$ -markierte Metaboliten des Benzo[a]pyrens zurückzuführen sein.

### 3.7.1.5 pH-Wert im Kulturmedium

Zu Beginn der Aufarbeitung der Kulturmedien wurden die pH-Werte bestimmt. Diese lagen in allen Ansätzen zwischen pH 7 und 8.

### 3.7.1.6 Bilanzierung der Radioaktivität

Am Ende der Extraktion der Kulturmedien konnte aus den Anteilen der Radioaktivität in den organischen und wässrigen Extrakten und dem Anteil, welcher als  $^{14}\text{CO}_2$  aufgefangen wurde, für jeden Ansatz eine Bilanz erstellt werden (s. [Tabelle 3-6](#)).

**Tabelle 3-6:** Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren durch die Mischkultur MK I in Abhängigkeit vom Plantacare-Gehalt des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz M5 bis M9, Inkubationsdauer: 120 Tage

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamt-wiederfindung [%]
		als $\text{CO}_2$	im $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt	im $\text{H}_2\text{O}$ -Extrakt	
M5a	0,005	0,34	89,99	0,17	90,50
M5b	0,005	0,40	91,16	0,22	91,77
M6a	0,01	0,25	91,33	0,14	91,72
M6b	0,01	0,23	91,76	0,40	92,38
M8a	0,1	0,58	87,81	0,41	88,80
M8b	0,1	0,01	84,94	0,57	85,52
M9a	0,5	n.n.	98,36	0,53	98,90
M9b	0,5	n.n.	99,19	0,37	99,56

*n.n.: nicht nachweisbar*

In allen Ansätzen betrug der Anteil der Radioaktivität im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt mehr als 99 % der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität. Die Anteile an  $^{14}\text{C}$  in den wässrigen Extrakten entsprachen, mit Ausnahme von Ansatz 9, den vor der Extraktion bestimmten Anteilen an gelöster Radioaktivität (s. [Tabelle 3-5](#)). Das Benzo[a]pyren wurde aus den Plantacare-Micellen der 0,5%igen Tensidlösung des Ansatzes 9 extrahiert. Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, daß es sich – mit Ausnahme von Ansatz 9 – bei der im Kulturmedium gelösten Radioaktivität um polare Metaboliten des  $^{14}\text{C}$ -

Benzo[a]pyren handelte. Diese Metaboliten waren nicht mit Dichlormethan extrahierbar, sie verblieben in der polaren Wasserphase. Auch das in Biomasse eingebaute  $^{14}\text{C}$  würde in der Wasserphase verbleiben.

### 3.7.1.7 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

Die Charakterisierung der Radioaktivität in den  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakten der Kulturmedien zeigte, daß diese zu nahezu 100 % aus der Ausgangsverbindung  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren stammte.

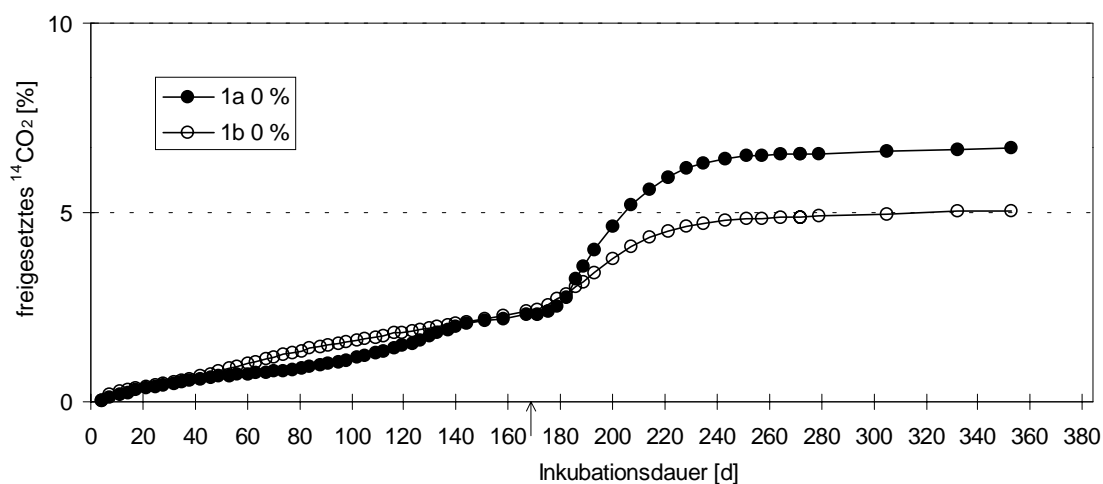
## 3.7.2 Versuchsreihe Biometer I, Ansätze 1 bis 11

### 3.7.2.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer I, Ansätze 1 bis 11

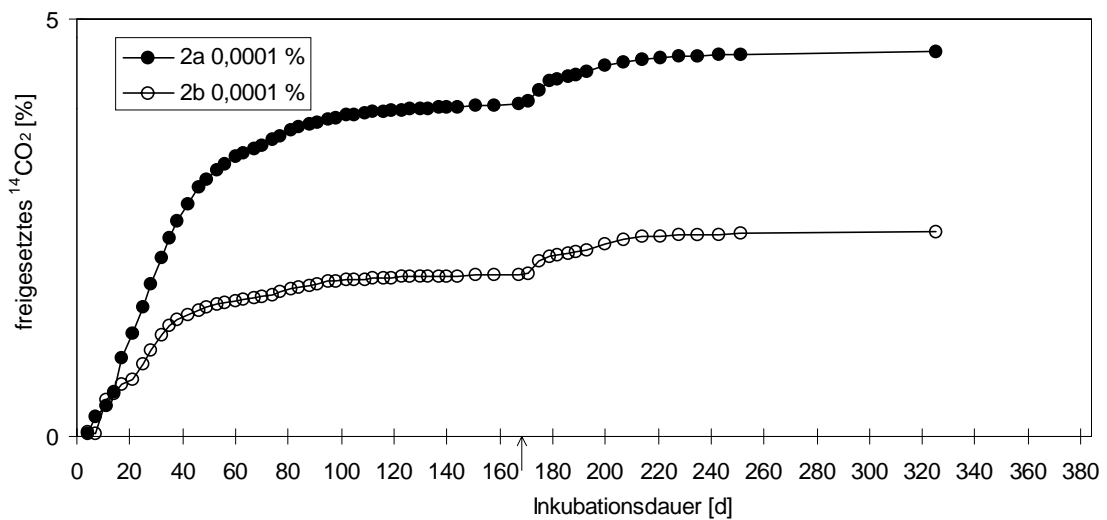
Die Ansätze 1 bis 11 der Versuchsreihe Biometer I (s. [Tabelle 2-12](#)) dienten zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Gegenwart von 3- und 4-Ring PAK im Kulturmedium, als mögliche C- und Energiequellen, einen cometabolischen Abbau von Benzo[a]pyren ermöglichen können. Die Solubilisierung von Benzo[a]pyren durch Plantacare sollte dabei den bioverfügbaren Anteil des 5-Ring PAK erhöhen und so unter Umständen einen Abbau ermöglichen oder steigern.

### 3.7.2.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren

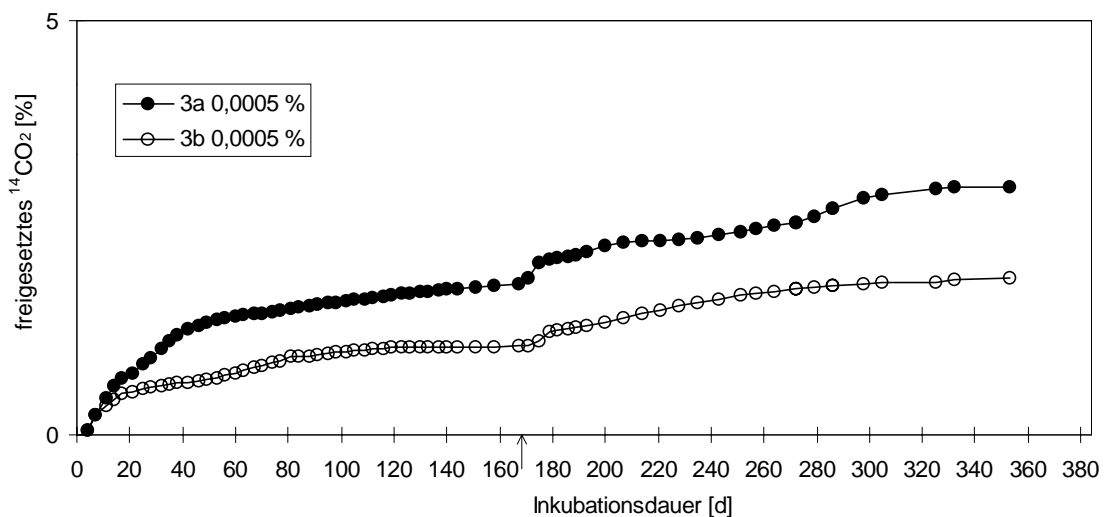
Die bei jeder Probenahme bestimmte Menge an  $^{14}\text{C}$  in der NaOH wurden als prozentualer Anteil der gesamten eingesetzten Radioaktivität je Biometer berechnet und als kumulative Mineralisation während der gesamten bis dahin verstrichenen Inkubationszeit dargestellt (s. [Bild 3-12](#) bis [Bild 3-19](#)).



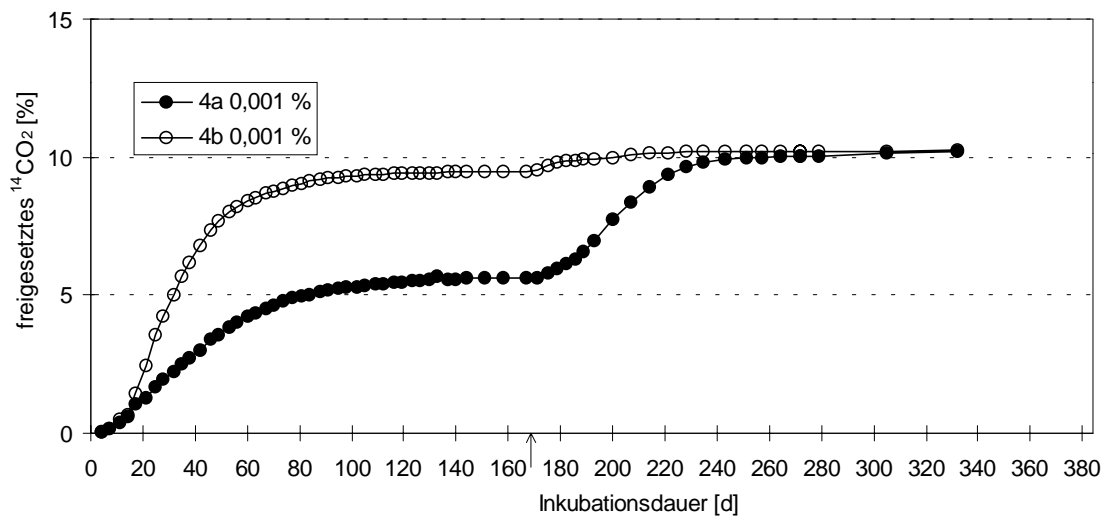
**Bild 3-12:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren ohne Plantacare-Einfluß,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



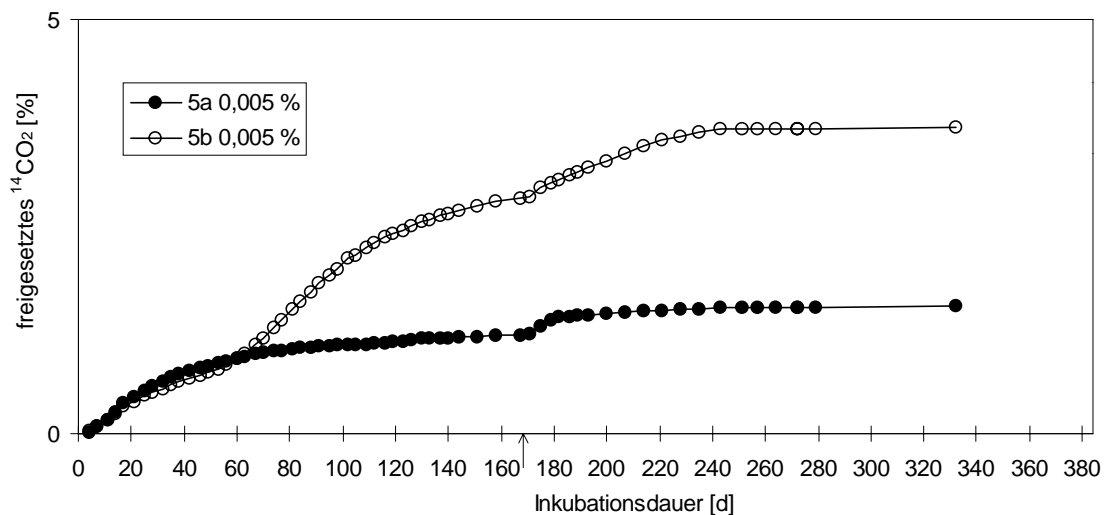
**Bild 3-13:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,0001 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,0001 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



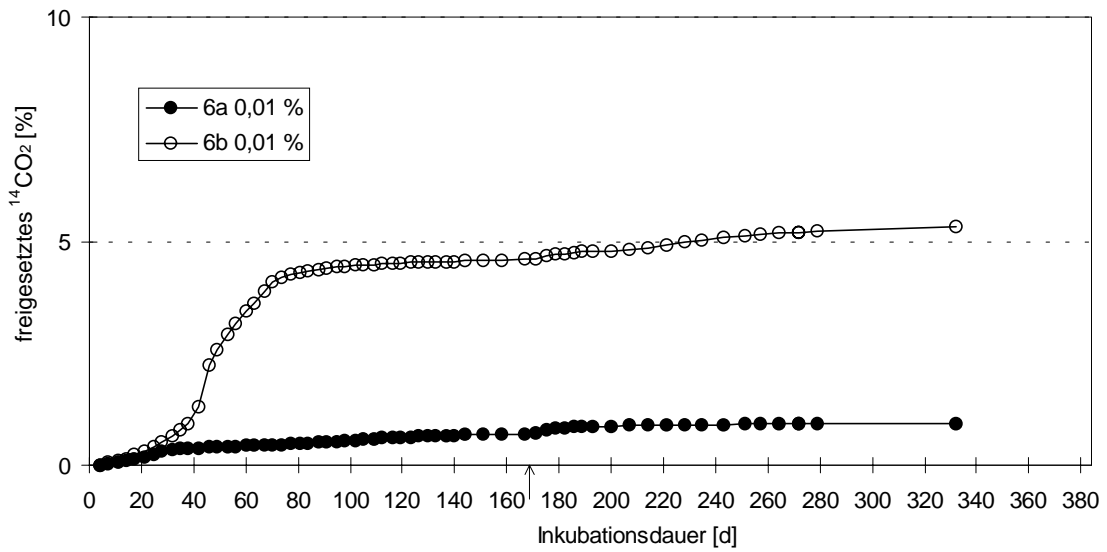
**Bild 3-14:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,0005 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,0005 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



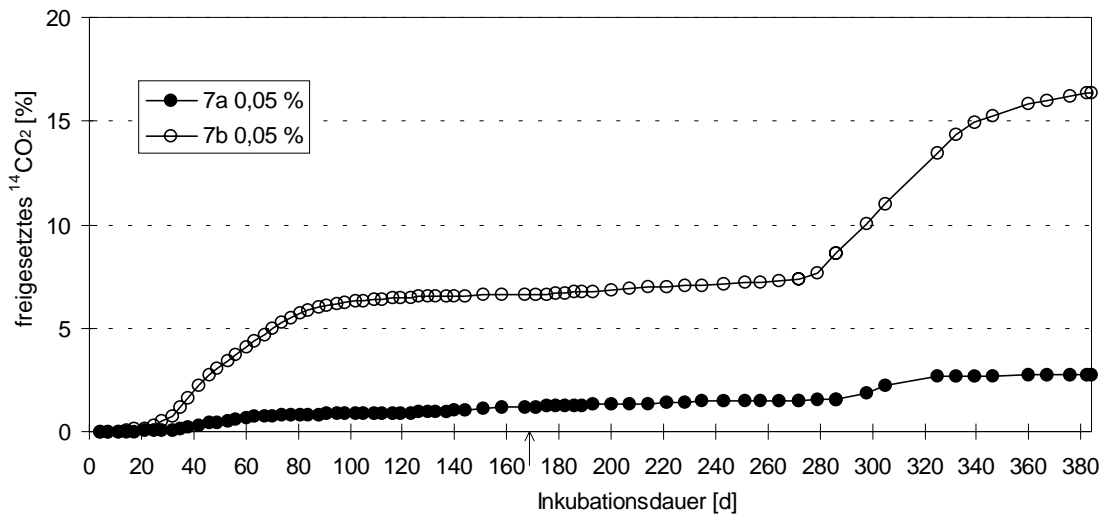
**Bild 3-15:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,001 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,001 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



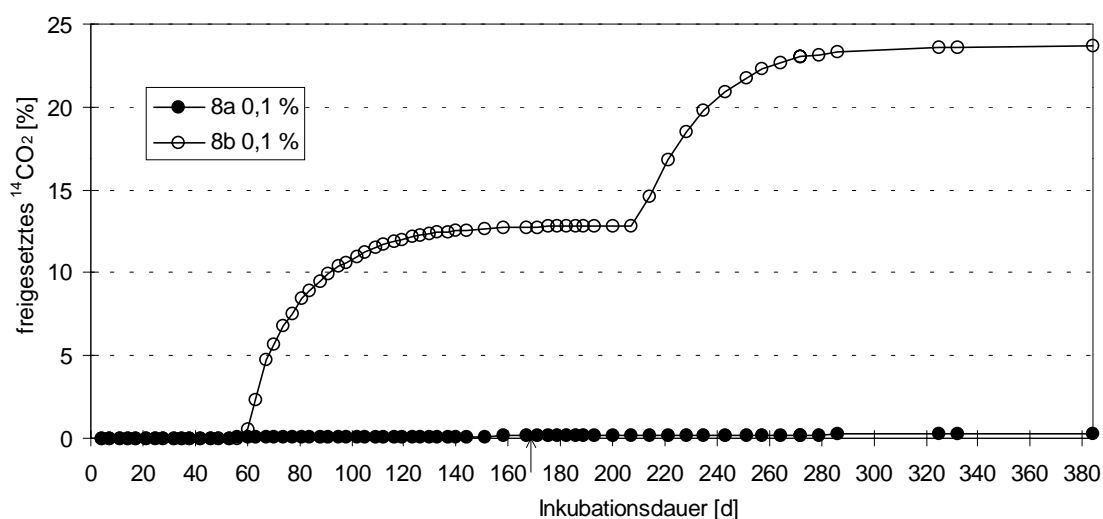
**Bild 3-16:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,005 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,005 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



**Bild 3-17:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,01 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,01 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



**Bild 3-18:** *Mischkultur MK I:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,05 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,05 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren



**Bild 3-19:** *Mischkultur MK I: Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,1 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,1 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren*

Die Ansätze 9 und 10 mit 0,5 % bzw. 1 % Plantacare-Gehalt im Kulturmedium wurden nicht grafisch dargestellt, da bei diesen vier Biometern während der gesamten Inkubationszeit von 325 Tagen keine Freisetzung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> nachweisbar war. Das gleiche galt auch für die Sterilkontrollen, den Ansatz 11.

Betrachtet man die Kurven der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung in den einzelnen Ansätzen, so fällt auf, daß jeweils die beiden parallel behandelten Systeme der Ansätze 1 bis 8 bezüglich der Absolutwerte keine gleichlaufende Entwicklung aufwiesen.

Die beiden Parallelen des Ansatzes 1 zeigten über den anfänglichen Zeitraum von etwa 180 Tagen einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf – auch auf die Absolutwerte bezogen. Erst dann entwickelten sich die Kulturen auseinander: Ansatz 1a zeigte nach 353 Tagen am Ende der Inkubation eine <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung von 6,7 % der eingesetzten Radioaktivität, Ansatz 1b einen Wert von 5,05 %.

Ansatz 2 zeigte wesentlich höhere Unterschiede in der CO<sub>2</sub>-Entwicklung der beiden Parallelen. Insgesamt 4,6 % Freisetzung im Ansatz 2a standen nur 2,45 % im Ansatz 2b entgegen.

Im Ansatz 3 behielten die beiden Parallelen vom ungefähr 40. Inkubationstag einen Unterschied von etwa 1 % in der Höhe der Freisetzung von markiertem CO<sub>2</sub> bei, dieser war jedoch, bei den geringen Entwicklungsraten von 3 bzw. 1,89 %, ein Unterschied, der etwa einem Drittel entsprach.

Ansatz 4 hingegen zeigte, bezogen auf den Endwert der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung in beiden Parallelen etwa 10 %, die zeitliche Entwicklung der Kurven war jedoch anders: 4b zeigte zu Inkubationsbeginn eine steile Freisetzungsrates, 4a wies diese erst nach Zugabe

von weiterem Mineralmedium und den PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren auf.

Ab dem 60. Inkubationstag entwickelten sich die beiden Ansätze 5a und 5b immer weiter auseinander. Ansatz 5a besaß mit einer Wiederfindungsrate von 3,69 % der Radioaktivität als  $^{14}\text{CO}_2$  einen mehr als doppelt so hohen Wert wie der Ansatz 5b mit nur 1,54 %.

Die beiden Ansätze 7 und 8 wiesen in den beiden jeweiligen Parallelen die gravierendsten Unterschiede auf. Ansatz 7b zeigte eine etwa 6fach erhöhte Freisetzung an Radioaktivität wie Ansatz 7a. Beim Ansatz 8 besaß die Parallele 8b mit 23,6 % die höchste Umsatzrate in allen Biometern während die entsprechende Parallele 8a nicht einmal 1 % Umsatz erreichte.

Nur vier Ansätze zeigten eine  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung über 10 %, diese waren 4a (10,18 %), 4b (10,25 %), 7b (16,34 %) und 8b (23,66 %). Eine 1%ige Freisetzung der Radioaktivität als  $^{14}\text{CO}_2$  entsprach hierbei einem Umsatz von 25 µg Benzo[a]pyren, so daß während der 384tägigen Inkubation im Ansatz 8b 591,5 µg Benzo[a]pyren umgesetzt wurden.

Obwohl sich die beiden Parallelen eines Ansatzes, bezogen auf die Absolutwerte, in der Regel sehr unterschiedlich zeigten, ergaben sich jedoch in der Entwicklung der Kulturen in der Gesamtbetrachtung einige deutliche Übereinstimmungen.

Mit steigendem Tensidgehalt in den Ansätzen zeigte sich eine verspätet einsetzende Entwicklung von  $^{14}\text{CO}_2$ . In den Ansätzen 1 bis 4 mit den Plantacare-Konzentrationen 0 % bis 0,001 %, konnte bereits bei der ersten Probenahme nach 4 Inkubationstagen Radioaktivität in der NaOH nachgewiesen werden, beim Ansatz 7b mit 0,05 % Plantacare im Kulturmedium nach 11 Tagen und bei 7a nach 17 Tagen. Erst nach 42 bzw. nach 56 Tagen wurden die Ansätze 8a und 8b mit 0,1 % Plantacare im Kulturmedium mit einer  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aktiv. Die Ansätze mit den höheren Tensidkonzentrationen ließen während der gesamten Inkubationszeit kein markiertes  $\text{CO}_2$  nachweisen.

Der weitere Verlauf der  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung ergab in den Ansätzen mit Plantacare im Kulturmedium ein übereinstimmendes Bild. Nach der Anlaufphase folgte eine exponentielle Phase. Im Unterschied dazu zeigten die Kurven des Ansatzes 1 – der Ansatz ohne Plantacare im Kulturmedium – einen linearen Kurvenverlauf.

Nach 167 Tagen Inkubation wurden alle Biometer mit frischem Kulturmedium supplementiert. In jeden Ansatz wurden 20 ml Medium gegeben, welches Nährsalze, Vitamine, Spurenelemente und je 1,25 mg der PAK Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren sowie eine dem jeweiligen Ansatz entsprechende Plantacare-Menge enthielt. Die Ansätze 1 bis 8 reagierten fast alle mit einer erneuten bzw. verstärkten Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$ . Diese erneute exponentielle Phase verlief jedoch unterschiedlich intensiv. In Ansatz 1 und Ansatz 4b dauerte diese Phase etwa 7 Wochen, in dieser Zeit wurde der bisher erfolgte  $^{14}\text{CO}_2$ -Ausstoß nahezu verdoppelt. Wesentlich weniger intensiv und kürzer war die Steigerung in den Ansätzen 2, 3, 4b, 5 und 6. Ansatz 7 zeigte zunächst keine

Reaktion auf die Supplementierung mit Kulturmedium, erst 112 Tage danach erfolgte ein exponentieller Anstieg der Freisetzung von Radioaktivität. Ansatz 8b reagierte nach 50 weiteren Inkubationstagen mit einem sehr steilen Anstieg der Kurve, 8a zeigte keine Reaktion.

Da auch der Ansatz 1, welcher keine Zugabe an Tensid erhielt, auf die Supplementierung des Kulturmediums mit Mineralmedium und PAK in beiden Parallelen mit einer erneuten Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  reagierte (s. Bild 3-12), kann dieser positive Effekt nicht auf den Einfluß des Tensids zurückzuführen sein. Ursache dieser Umsatzsteigerung mußte daher entweder das Mineralmedium – mit den Nährsalzen und Vitaminen – oder die 3- und 4-Ring PAK-Verbindungen sein.

### 3.7.2.3 Keimzahlbestimmung

Die Ansätze 1 bis 11 wurden zu Beginn der Kultivierung mit 2 ml derselben Bakterien-suspension angeimpft wie die Ansätze M5 bis M9. Der  $\text{OD}_{564}$ -Wert dieser Suspension betrug 1,54.

Nach 167 Tagen Inkubationszeit wurde in allen Ansätzen der  $\text{OD}_{564}$ -Wert und die Lebendkeimzahlen bestimmt. Die Kolonien wurden den Typen der Tabelle 3-3 zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 aufgelistet.

**Tabelle 3-7:**  $\text{OD}_{564}$ -Wert, Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Versuchsreihe Biometer I, Ansätze 1 bis 11 nach 167 Tagen Inkubation

Ansatz	Plantacare [%]	$\text{OD}_{564}$	KBE/ml	Typen [%]					
				1	2	3	6	9	10
1a	0	0,2521	$1,85 \cdot 10^8$	30	29	12	3	26	n.n.
1b	0	0,1402	$5,7 \cdot 10^7$	45	40	5	7	3	n.n.
2a	0,0001	0,2569	$1,87 \cdot 10^7$	9	11	5	12	63	n.n.
2b	0,0001	0,3451	$8,5 \cdot 10^6$	63	5	12	9	11	n.n.
3a	0,0005	0,1146	$1,59 \cdot 10^7$	41	47	7	2	3	n.n.
3b	0,0005	0,1671	$2,3 \cdot 10^6$	14	54	7	7	3	15
4a	0,001	0,2871	$2,69 \cdot 10^7$	74	5	1	11	9	n.n.
4b	0,001	0,2907	$5,8 \cdot 10^6$	13	26	34	26	1	n.n.
5a	0,005	0,1522	$1,9 \cdot 10^6$	23	50	9	6	3	9
5b	0,005	0,0957	$2,2 \cdot 10^6$	2	16	6	7	n.n.	69
6a	0,01	0,1845	$6,2 \cdot 10^6$	77	5	5	13	n.n.	n.n.
6b	0,01	0,4133	$3,9 \cdot 10^6$	76	n.n.	n.n.	24	n.n.	n.n.

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-7** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	OD <sub>564</sub>	KBE/ml	Typen [%]					
				1	2	3	6	9	10
7a	0,05	0,3938	2,13*10 <sup>8</sup>	74	7	n.n.	2	17	n.n.
7b	0,05	0,3795	3,9*10 <sup>7</sup>	85	3	1	11	n.n.	n.n.
8a	0,1	0,4040	1,23*10 <sup>7</sup>	23	77	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
8b	0,1	0,2991	6*10 <sup>7</sup>	21	78	n.n.	1	n.n.	n.n.
9a	0,5	0,4084	8,6*10 <sup>7</sup>	8	10	12	n.n.	n.n.	70
9b	0,5	0,2093	1,31*10 <sup>7</sup>	n.n.	n.n.	12	n.n.	8	81
10a	1	0,2033	n.n.						
10b	1	0,1095	n.n.						
11a <sup>a</sup>	0	0,0193	n.n.						
11b <sup>a</sup>	0	0,0004	n.n.						

*n.n.: nicht nachweisbar*

<sup>a</sup>*Sterilkontrollen*

Die Werte der OD-Bestimmung und die ermittelten Lebendkeimzahlen korrelieren nicht miteinander. Da das Kulturmedium nach so langer Inkubationszeit von den Metaboliten der PAK bräunlich gefärbt war, ist nicht auszuschließen, daß die übliche Bestimmung des OD-Wertes keine verlässliche Aussage über die Bakteriendichte ermöglichte. Im folgenden wurde daher ausschließlich die Ermittlung der Lebendkeimzahlen durchgeführt.

In den Kulturmedien aller Ansätze 1 bis 9 waren Bakterien nachweisbar, im Ansatz 10 und in der Sterilkontrolle fanden sich auch auf den Platten mit der Verdünnungsstufe 10<sup>-1</sup> keine Kolonien.

Die Keimzahlen der einzelnen Ansätze schwankten im Bereich von zwei Zehnerpotenzen. Ein Zusammenhang zwischen den Bakterienzahlen und der Typenzusammensetzung mit der Höhe des freigesetzten <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ließ sich nicht erkennen, wobei aber bedacht werden muß, daß am Tag der KBE-Bestimmung alle Ansätze in einer stagnierenden Phase der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Entwicklung waren.

Im Ansatz 9 fanden sich Bakterien, obwohl keine <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung nachweisbar war, auffällig ist jedoch, daß der dominierenden Typ in diesem Ansatz Typ 10 war, dieser zeigte sich in dieser Dominanz ansonsten nur noch in Ansatz 5b.

Einen Zusammenhang zwischen der Höhe der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung und der Bakterienzahl oder den dominierenden Bakterientypen herzustellen, ist aufgrund der komplexen Vorgänge in einer Bakterienmischkultur und dem Abbau des Benzo[a]pyren im Cometabo-

lismus prinzipiell schwierig. Durch die Verwertung der 3- und 4-Ring PAK und ggf. des Plantacares können Bakterienarten dominieren, welche möglicherweise für den Benzo[a]pyren-Abbau keine relevante Bedeutung haben.

### 3.7.2.4 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium

Am Ende der Inkubation wurde die gelöste Menge an Radioaktivität im Kulturmedium bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in [Tabelle 3-8](#) aufgeführt.

**Tabelle 3-8:** *Im Kulturmedium gelöste Radioaktivität am Ende der Inkubation; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11*

Ansatz	Plantacare [%]	gelöstes $^{14}\text{C}$ [%]	gelöstes $^{14}\text{C}^a$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1a	0	0,83	0,32
1b	0	0,83	0,34
2a	0,0001	1,30	0,53
2b	0,0001	1,15	0,47
3a	0,0005	1,26	0,48
3b	0,0005	0,70	0,28
4a	0,001	1,54	0,60
4b	0,001	1,08	0,51
5a	0,005	1,80	0,70
5b	0,005	1,45	0,80
6a	0,01	2,38	0,92
6b	0,01	2,03	0,82
7a	0,05	1,08	0,39
7b	0,05	2,53	0,97
8a	0,1	0,96	0,40
8b	0,1	2,14	1,06
9a	0,5	20,67	7,86
9b	0,5	21,11	8,70
10a	1	41,12	19,51
10b	1	45,62	18,93

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-8** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	gelöstes <sup>14</sup> C [%]	gelöstes <sup>14</sup> C <sup>a</sup> [µg/ml]
11a <sup>b</sup>	0	0,29	0,12
11b <sup>b</sup>	0	0,38	0,15

<sup>a</sup>berechnet als <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren

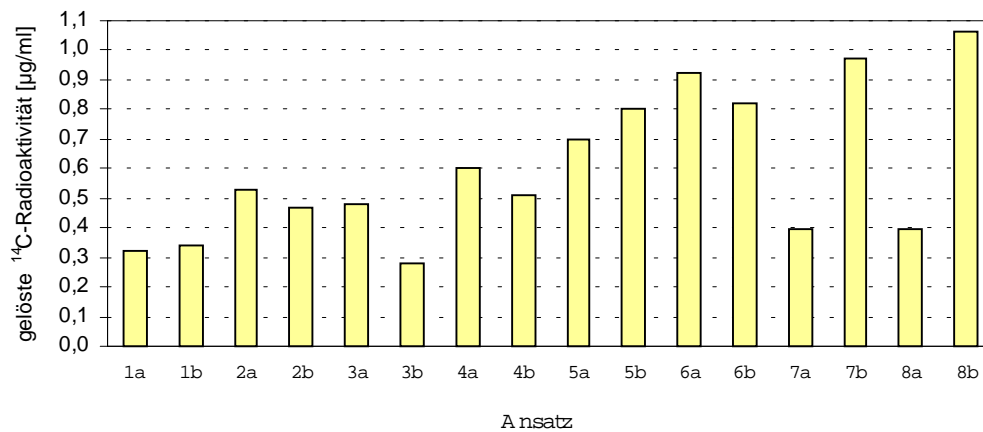
<sup>b</sup>Sterilkontrollen

Im Kulturmedium wurde bei diesen Ansätzen jeweils 2,5 mg (0,64 µCi) <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren eingesetzt. Nach der Bestimmung der Menge des Kulturmediums am Ende des Versuchs konnte quantifiziert werden, welcher Anteil der Gesamtaktivität in einem Milliliter Kulturmedium gelöst war. Nimmt man vereinfacht an, daß es sich hierbei allein um <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren handelte, so kann geschätzt werden, wieviel Benzo[a]pyren im Kulturmedium gelöst vorlag. Eventuelle vorliegende Metaboliten wurden – da nicht näher untersucht – hierbei nicht berücksichtigt.

Alle Ansätze – auch der ohne Plantacare-Einfluß – zeigten im Vergleich zu den nicht beimpften Sterilkontrollen eine erhöhte Menge an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium. Diese muß daher zumindest z.T. allein auf die Aktivität der Mikroorganismen zurückzuführen sein. Sie bewirkten möglicherweise durch die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten eine Präsenz von organischer Substanz im Medium, welche, auch wenn es sich dabei nicht um Biotenside handeln mußte, eine oberflächenaktive Wirkung aufwies. Die erhöhte Menge an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium könnte aber auch auf polare <sup>14</sup>C-markierte Metaboliten des Benzo[a]pyrens zurückgeführt werden.

Die Ansätze 9 und 10, mit einem Plantacare-Gehalt von 0,5 bzw. 1 % zu Beginn der Kultivierung, zeigten zu Versuchsende eine Solubilisierung der <sup>14</sup>C-Radioaktivität, welche im Vergleich zum Ansatz 1 (ohne Tensid) eine Steigerung um den Faktor 25 bzw. um den Faktor 58 im Mittel betrug.

Aber auch die Ansätze mit geringeren Tensidgehalten – welche eine Freisetzung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> zeigten – ließen Unterschiede in der Löslichkeit der <sup>14</sup>C-markierten Substanz(en) erkennen. Trägt man diese Ergebnisse für die Ansätze 1 bis 8 grafisch auf, so ergibt sich das [Bild 3-20](#).



**Bild 3-20:** Menge der gelösten <sup>14</sup>C-Radioaktivität berechnet als Benzo[a]pyren im Kulturmedium der für Benzo[a]pyren abbauaktiven Ansätze 1 bis 8; Versuchsreihe Biometer I

Es zeigte sich, daß auch in diesen Ansätzen mit zunehmendem Tensidgehalt eine Steigerung des Anteils an gelöster radioaktiv markierter Substanz vorlag. Vergleicht man die Mengen dieser Substanz im Kulturmedium mit den entsprechenden Werten der Biometer M5 bis M9 (s. [Tabelle 3-5](#)), so stimmen diese in den Ansätzen deutlich oberhalb der CMC – mit 0,5 % Plantacare – überein. Gleiches gilt auch beim Vergleich der Ergebnisse mit den ermittelten Werten im Solubilisierungsversuch (s. [Bild 3-5](#) und [Bild 3-6](#)). Diese deutet darauf hin, daß in Ansatz 9 und 10 noch bis zum Inkubationsende entsprechend hohe Plantacare-Mengen im Kulturmedium vorhanden waren, die Benzo[a]pyren in den Micellen solubilisierten. Dieses Benzo[a]pyren müßte bei der Extraktion des Kulturmediums in die organische Lösungsmittelphase überführt werden.

In diesen beiden Ansätzen, in denen deutliche Mengen an Radioaktivität gelöst vorlagen, ließ sich keine Entwicklung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> belegen. Bei der Bestimmung der Lebendzellzahl (s. [Tabelle 3-7](#)) wiesen die beiden Parallelen von Ansatz 10 keine Bakterien auf. Ansatz 9 hingegen besaß Zellzahlen in vergleichbarer Höhe zu denen der aktiven Ansätze.

Besonders auffällig waren die Unterschiede der jeweiligen Parallelen von Ansatz 7 und 8. Die Ansätze 7a und 8a besaßen, im Vergleich zu den Ansätzen 7b und 8b, eine deutlich verringerte Konzentration an <sup>14</sup>C-markierter gelöster Substanz im Kulturmedium (s. [Bild 3-20](#)). Betrachtet man sich die Kurven der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung in diesen Ansätzen (s. [Bild 3-18](#) und [Bild 3-19](#)), so fällt auf, daß die Parallelen in der Menge der freigesetzten Radioaktivität ebenfalls sehr stark auseinander lagen. Die Parallelen, die kaum Freisetzung von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> zeigten, waren die mit einem geringen Anteil an gelöster <sup>14</sup>C-markierter Substanz im Medium (Ansätze 7a und 8a). Die beiden Parallelansätze 7b und 8b besaßen mit 16,34 und 23,66 % <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Ausstoß die höchste Umsatzrate an Benzo[a]pyren und für alle aktiven Ansätze die höchste Menge an gelöster Radioaktivität im Medium. Wenn es sich bei dieser gelösten Radioaktivität um solubilisiertes <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren gehandelt hätte, wäre dieses eine Hinweis auf eine Steigerung des Abbau durch verstärkte Solubilisierung. Die hohen Benzo[a]pyren-Umsatzraten können aber

auch in einer verstärkten Bildung von Benzo[a]pyren-Metaboliten resultiert haben, diese könnten, je nach Struktur und Abbaugrad, noch die radioaktive Markierung tragen. Aufschluß darüber kann die Bilanzierung der Radioaktivität nach der Extraktion mit Dichlormethan geben.

Ein Zusammenhang zwischen der Lebendkeimzahl im Kulturmedium und dem  $^{14}\text{CO}_2$ -Ausstoß konnte auch hier nicht erkannt werden, da alle 4 Ansätze ähnliche Werte für die Lebendkeimzahl hatten, Ansatz 7a sogar von allen Ansätzen die höchste Keimzahl besaß. Auch die Zusammensetzung der Bakterientypen zeige keine bedeutenden Unterschiede. Dieses verstärkt die bereits oben angesprochenen Hypothese, daß ein solcher Zusammenhang auch nicht zu erwarten ist (s. 3.7.2.3).

### 3.7.2.5 pH-Wert im Kulturmedium

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die pH-Werte im Kulturmedium bestimmt. Diese lagen in allen Ansätzen zwischen pH 7 und 9.

### 3.7.2.6 Bilanzierung der Radioaktivität

Am Ende der Extraktion der Kulturmedien konnte aus den Anteilen der Radioaktivität in den organischen und wässrigen Extrakten und dem Anteil, welcher als  $^{14}\text{CO}_2$  aufgefangen wurde, für jeden Ansatz eine Bilanz erstellt werden (s. Tabelle 3-9).

**Tabelle 3-9:** Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren durch die Mischkultur MK I in Abhängigkeit vom Plantacare-Gehalt des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamtwiederfindung [%]
		als $\text{CO}_2$	im $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt	im $\text{H}_2\text{O}$ -Extrakt	
1a	0	6,70	87,81	1,35	95,89
1b	0	5,05	87,52	1,23	93,82
2a	0,0001	4,60	91,36	1,74	97,74
2b	0,0001	2,45	93,30	1,21	97,00
3a	0,0005	3,00	91,02	1,56	95,61
3b	0,0005	1,89	97,04	0,83	99,77
4a	0,001	10,18	85,49	2,09	97,79
4b	0,001	10,25	74,96	1,60	86,83
5a	0,005	1,54	92,16	1,45	95,19
5b	0,005	3,69	71,53	1,23	76,50

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-9** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamtwiederfindung [%]
		als CO <sub>2</sub>	im CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt	im H <sub>2</sub> O-Extrakt	
6a	0,01	0,93	77,97	0,85	79,80
6b	0,01	5,31	85,77	2,38	93,50
7a	0,05	2,74	94,03	1,79	98,58
7b	0,05	16,34	74,92	3,07	94,41
8a	0,1	0,29	94,61	1,45	96,39
8b	0,1	23,66	63,24	3,43	90,41
9a	0,5	n.n.	92,98	1,64	95,25
9b	0,5	n.n.	81,92	1,45	84,07
10a	1,0	n.n.	85,55	1,51	87,84
10b	1,0	n.n.	93,87	1,89	96,52
11a <sup>a</sup>	0	n.n.	101,47	0,32	101,80
11b <sup>a</sup>	0	n.n.	100,42	0,42	100,84

n.n.: nicht nachweisbar

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

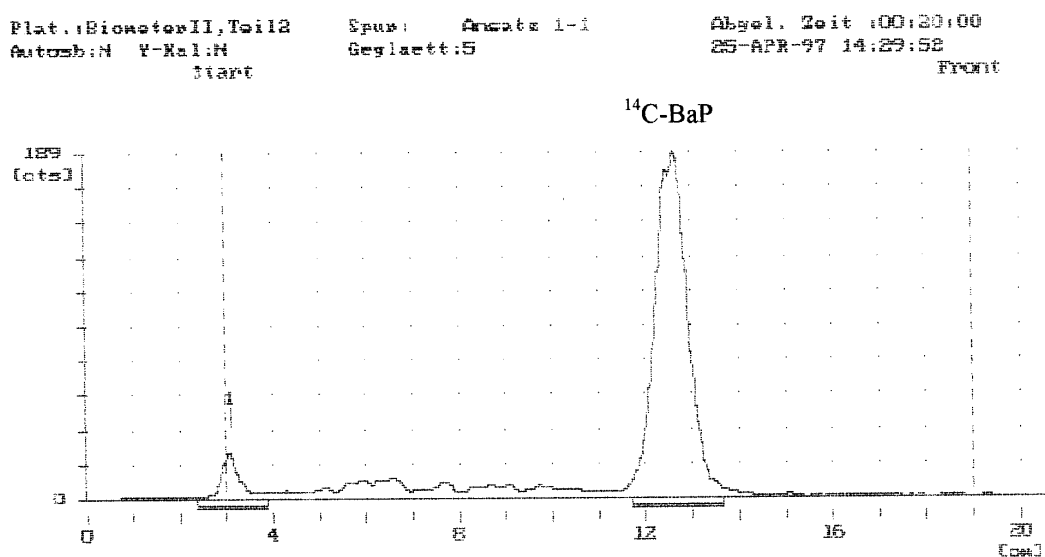
Im Vergleich zu den Sterilkontrollen zeigten alle Ansätze eine erhöhte Radioaktivität im wässrigen Extrakt. Dieses muß auf die bakterielle Aktivität in diesen Ansätzen zurückzuführen sein und deutet auf das Vorhandensein polarer <sup>14</sup>C-markierter Metaboliten oder in Biomasse eingebautes <sup>14</sup>C hin. Mit Ausnahme der beiden Ansätze 7b und 8b betrug bei allen Ansätzen der Anteil an Radioaktivität im wässrigen Extrakt zwischen 1,2 und 2,4 % der Gesamtaktivität. Die Ansätze 7b und 8b waren – bezogen auf die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung – die beiden aktivsten Ansätze und sie wiesen auch mit 3,1 und 3,4 % den höchsten Anteil an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium auf. Daß sich in diesen beiden Ansätzen nun auch die höchste Menge an Radioaktivität im wässrigen Extrakt fand, bestätigt sehr deutlich die Annahme, daß es sich hierbei um polare Metaboliten des <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren handelt.

Ansatz 9 und 10 zeigten bei der Bestimmung der im Kulturmedium gelösten Radioaktivität zu Inkubationsende Werte, die denen des Solubilisierungsversuchs entsprachen (s. [Tabelle 3-8](#)). Die hohe Löslichkeit von Benzo[a]pyren in diesen Kulturmedien war wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Plantacare-Micellen bis zum Inkubationsende zurückzuführen, die Tensidkonzentration lag dabei deutlich oberhalb der CMC. Nach der Extraktion des Kulturmediums mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> waren die Mengen an Radioakti-

vität im wässrigen Extrakt dieser Ansätze nicht höher als in denen der Ansätze mit wenig oder ohne Tensid. Das Benzo[a]pyren wurde vom Lösungsmittel vollständig aus den Micellen extrahiert, nur polare Metaboliten oder auch in Biomasse festgelegtes  $^{14}\text{C}$  verblieben in der Wasserphase.

### 3.7.2.7 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

Die Charakterisierung der Radioaktivität in den  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakten der Kulturmedien zeigte, daß diese zu nahezu 100 % aus der Ausgangsverbindung  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren stammte. [Bild 3-21](#) zeigt als Beispiel das Dünnschichtchromatogramm von Ansatz 1a.



**Bild 3-21:** Dünnschichtchromatogramm der Radioaktivitätsverteilung eines Aliquots des aus dem Kulturmedium von Ansatz 1a gewonnenen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes, (Fließmittel Ethylacetat : Petroleumäther 1 : 2, v/v), Start der Laufstrecke bei 3 cm, Laufmittelfront bei 19 cm

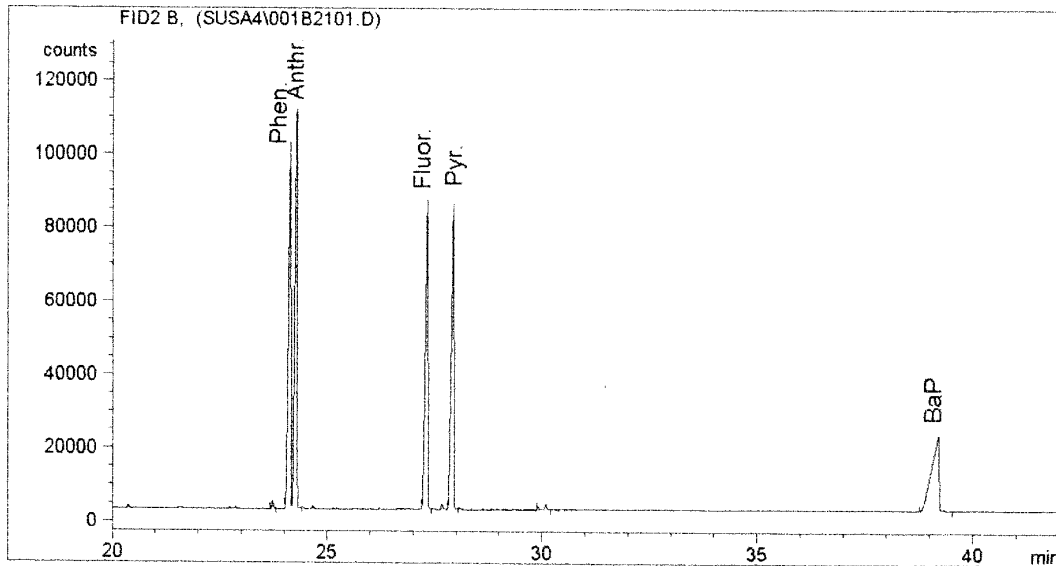
Ein geringer Anteil der Aktivität des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren fand sich nach der Entwicklung im Fließmittel am Start. Dieses zeigte sich bei allen DC-Chromatogrammen (auch bei der Stammsubstanz) und ist ein Ergebnis der Umsetzung des bereits auf Kieselgel aufgetragenen Benzo[a]pyrens durch einfallendes UV-Licht.

### 3.7.2.8 Gaschromatographische Untersuchung der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

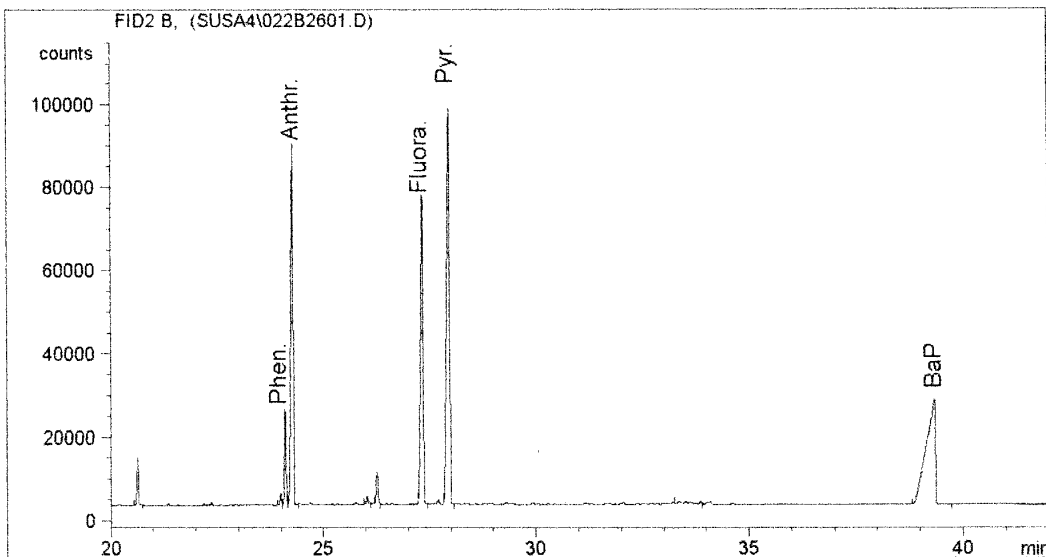
Die Untersuchung der  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte am Gaschromatographen erlaubt eine Aussage über die Verwertung der nicht  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren einschließlich des Benzo[a]pyren durch die Mischkultur. Durch den Vergleich der Wiederfindungsanteile von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren mit radioanalytischen Methoden und dem quantitativen Nachweis von Benzo[a]pyren am GC ließ sich die Aussagekraft und die Qualität der beiden Nachweismethoden überprüfen.

Stellvertretend für die Vielzahl an Extrakten, die in diesem und den nachfolgenden Abbaubersuchen am Gaschromatographen vermessen wurden, sind in [Bild 3-22](#), [Bild 3-23](#)

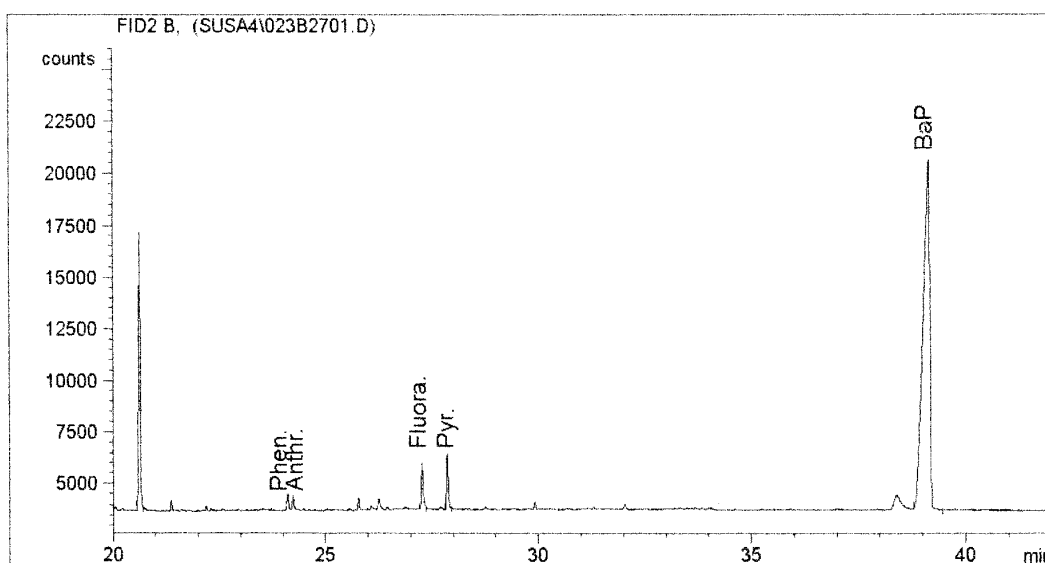
und Bild 3-24 drei Gaschromatogramme abgebildet. Bild 3-22 zeigt das Chromatogramm des Standards, welcher die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren mit je 250  $\mu\text{g/ml}$  und Benzo[a]pyren mit 500  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  enthält. In Bild 3-23 ist das Gaschromatogramm des Ansatzes 8a und in Bild 3-24 das des Ansatzes 8b abgebildet.



**Bild 3-22:** Gaschromatogramm des PAK-Standards, Konzentrationen an Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren je 250  $\mu\text{g/ml}$  und Benzo[a]pyren 500  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$



**Bild 3-23:** Gaschromatogramm des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes von Ansatz 8a



**Bild 3-24:** Gaschromatogramm des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes von Ansatz 8b

Nach den vom GC-Auswerteprogramm angegebenen Retentionszeiten wurden, im Vergleich zum definierten Standard, die Peaks den PAK-Verbindungen zugeordnet. Über die Peakflächen erfolgte dann – aus dem Vergleich von Standard und Extrakt – die Berechnung der PAK-Konzentrationen/ml Extrakt. Aus den berechneten  $\mu\text{g}$  PAK/ml ließ sich dann die PAK-Gesamtmenge im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt (Volumen 4 ml) ermitteln. Im Kulturmedium waren zu Beginn der Versuchsreihe je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren sowie 2,5 mg Benzo[a]pyren enthalten. Nach 167 Tagen Inkubation wurden je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren hinzugefügt, so daß – wenn kein Abbau erfolgt war und die Extraktion erschöpfend erfolgte – am Ende der Inkubation 2,5 mg je PAK 100 % entsprachen.

Die Ergebnisse der Analysen am Gaschromatographen sind der [Tabelle 3-10](#) zu entnehmen, in der letzten Spalte sind die ermittelten Wiederfindungsmengen des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyrens aufgeführt.

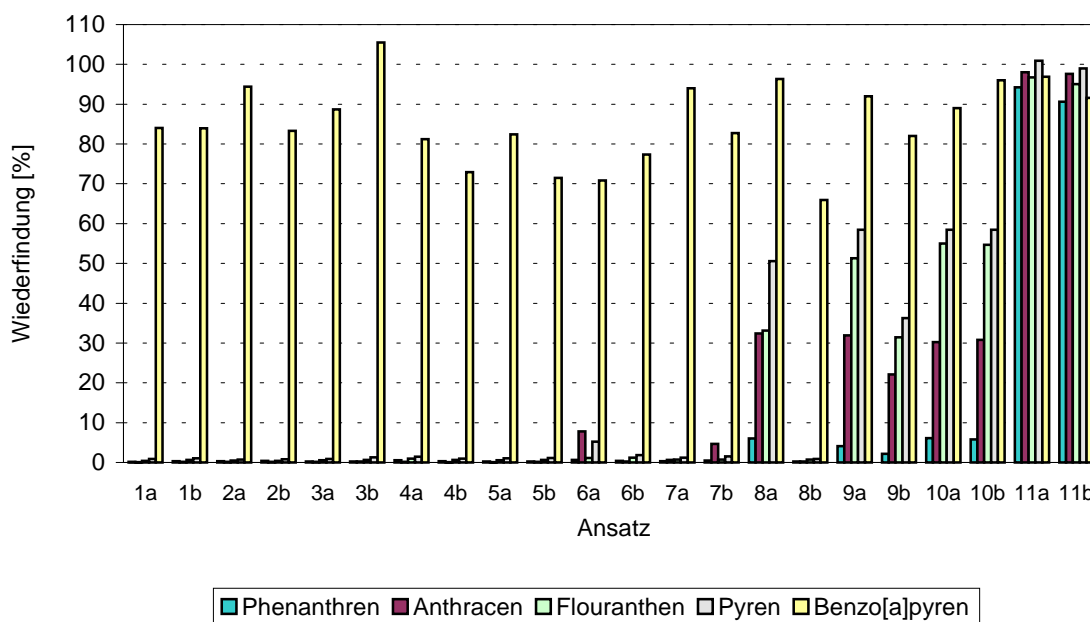
**Tabelle 3-10:** Wiederfindung der PAK im CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt am Inkubationsende nach Extraktion des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11

Ansatz	GC-Analytik [%]					Radio- analytik [%]
	Anthr.	Phen.	Fluora.	Pyren	BaP	<sup>14</sup> C-BaP
1a	0,07	0,14	0,42	0,87	84,02	87,81
1b	0,12	0,3	0,66	1,06	83,97	87,52
2a	0,13	0,31	0,47	0,72	94,41	91,36
2b	0,16	0,4	0,43	0,80	83,32	93,3
3a	0,15	0,25	0,52	0,88	88,72	91,02
3b	0,23	0,25	0,65	1,31	105,47	97,04
4a	0,15	0,53	0,94	1,48	81,2	85,49
4b	0,09	0,34	0,6	0,93	72,92	74,86
5a	0,07	0,24	0,54	1,10	82,45	92,16
5b	0,15	0,22	0,68	1,10	71,48	71,53
6a	7,76	0,62	1,11	5,24	70,87	77,97
6b	0,21	0,37	1,18	1,88	77,32	85,77
7a	0,64	0,32	0,72	1,19	94,00	94,03
7b	4,69	0,45	0,76	1,54	82,72	74,92
8a	32,37	6,04	33,14	50,60	96,32	94,61
8b	0,24	0,26	0,71	0,86	65,94	63,24
9a	31,94	4,14	51,31	58,49	92,01	92,98
9b	22,12	2,19	31,41	36,29	82,05	81,92
10a	30,22	6,13	54,98	58,46	89,05	85,55
10b	30,81	5,80	54,71	58,44	96,01	93,87
11a <sup>a</sup>	35,84	30,43	60,42	63,98	96,92	101,47
11b <sup>a</sup>	33,21	28,21	59,20	65,71	91,61	100,42

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Vergleicht man die Wiederfindungsanteile des Benzo[a]pyren, die mit der Methode der Gaschromatographie ermittelt wurden, mit der jeweiligen Wiederfindung des <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, so ergibt sich im Mittel eine Abweichung von 2 %, wobei die höchste Differenz im Ansatz 2b 9,98 % beträgt, die niedrigste im Ansatz 7a 0,03 %.

Die Wiederfindungsanteile der einzelnen PAK in den Kulturmedien der Ansätze 1 bis 11 sind im [Bild 3-25](#) vergleichend dargestellt.



**Bild 3-25:** Durch GC-Analyse ermittelter Anteil an wiedergefundener PAK im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11

Die Verluste an 3- und 4-Ring PAK nach der etwa einjährigen Versuchsdauer in den Sterilansätzen lassen sich durch eine gewisse Wasserdampflichkeit dieser PAK-Verbindungen erklären. Diese Eigenschaft ist bei Benzo[a]pyren zu vernachlässigen. Bedingt durch die lange Versuchsdauer wurde so ein Anteil der Verbindungen aus dem System ausgetragen und in die Silikonstopfen adsorbiert.

In den bezüglich des Benzo[a]pyren-Abbaus aktiven Ansätzen 1 bis 8 fanden sich – trotz des einmaligen Nachdosierens der 3- und 4-Ring PAK nach 167 Tagen Inkubation – von diesen nur noch Restkonzentrationen, die in der Regel weniger als 1 % der Ausgangsmenge betragen. Sortiert man die PAK nach den noch im Kulturmedium vorliegenden Konzentrationen am Inkubationsende, so ergibt sich folgende Reihenfolge: Benzo[a]pyren » Pyren > Fluoranthen > Phenanthren > Anthracen. Ausnahmen bilden hierbei Ansatz 6a und Ansatz 7b, in deren Kulturmedien fand sich Anthracen in höherer Konzentration als Pyren.

Abweichungen von dieser Konzentrationsrangfolge zeigten die Ansätze 8a, 9a, 9b, 10a und 10b. In Ansatz 8a war während der Inkubation eine äußerst geringe  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung zu verzeichnen, die anderen Ansätze ließen keine Freisetzung von Radioaktivität nachweisen. Doch auch in den Ansätzen, in denen keine  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung nachgewiesen werden konnte, fand ein teilweiser Abbau der anderen PAK statt. Verglichen mit den Wiederfindungsanteilen der Sterilkontrollen ist dieser für Phenanthren deutlich, für die anderen PAK jedoch stark inhibiert. Phenanthren wurde fast vollständig metabolisiert, hier lagen z.B. mit 0,15 mg in Ansatz 8a nur noch 6 %

und mit 0,05 mg in Ansatz 9b nur noch 2 % der Ausgangsmenge vor. Die anderen PAK zeigten noch ähnliche Restkonzentrationen wie die Sterilkontrollen. Die Bakterien besaßen ganz offensichtlich ein PAK-Abbaupotential, dieses wurde jedoch durch den Plantacare-Gehalt des Kulturmediums verringert.

### 3.7.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer I

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer I ergibt folgende Punkte:

- ⇒ Die Mischkultur konnte  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren weder als einzige C- und Energiequelle verwerten noch durch einen Cometabolismus mit Plantacare einen signifikanten Abbau zeigen.
- ⇒ Ein cometabolischer Abbau von Benzo[a]pyren mit einem PAK-Spektrum an 3- und 4-Ring PAK konnte nachgewiesen werden. Kam der Benzo[a]pyren-Abbau zum Erliegen, so konnte durch die Zugabe von Mineralmedium und dem PAK-Spektrum eine erneute Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  erreicht werden.
- ⇒ Die Mischkultur besaß ein Abbaupotential für Phenanthren, Anthracen, Flouranthen, Pyren und Benzo[a]pyren. Die Reihenfolge des PAK-Abbaus erfolgte im allgemeinen in der Reihenfolge der Wasserlöslichkeiten.
- ⇒ Das Plantacare wurde von der eingesetzten Mischkultur abgebaut.
- ⇒ In den Ansätzen mit hoher Plantacare-Konzentration (deutlich oberhalb der CMC), ließ sich kein Benzo[a]pyren-Abbau nachweisen. Die hohe Menge an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium dieser Ansätze zeigte, daß Plantacare-Micellen bis zum Inkubationsende Benzo[a]pyren solubilisierten.
- ⇒ In den Ansätzen ohne nachweisbaren Benzo[a]pyren-Abbau wurde Phenanthren auf Gehalte unter 10 % abgebaut. Die Mischkultur zeigte daher auch unter hohem Tenseinfluß ein – allerdings verringertes – Abbaupotential für PAK, dieses war aber außer für Phenanthren nicht signifikant.
- ⇒ Die Lebendkeimzahlen der Ansätze zeigten: Plantacare wirkte in Konzentrationen bis zu 1 % nicht toxisch auf die Gesamtbakterienzahl, die Typenzusammensetzung zeigte jedoch eine Verringerung der Diversität.
- ⇒ Bei der Extraktion mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde in Micellen solubilisiertes Benzo[a]pyren ins Lösungsmittel überführt. Für die Ansätze mit hoher Benzo[a]pyren-Umsatzrate lagen erhöhte Werte an Radioaktivität in den wässrigen Extrakten vor, dieses deutet auf das Vorhandensein polarer Metaboliten von Benzo[a]pyren hin.

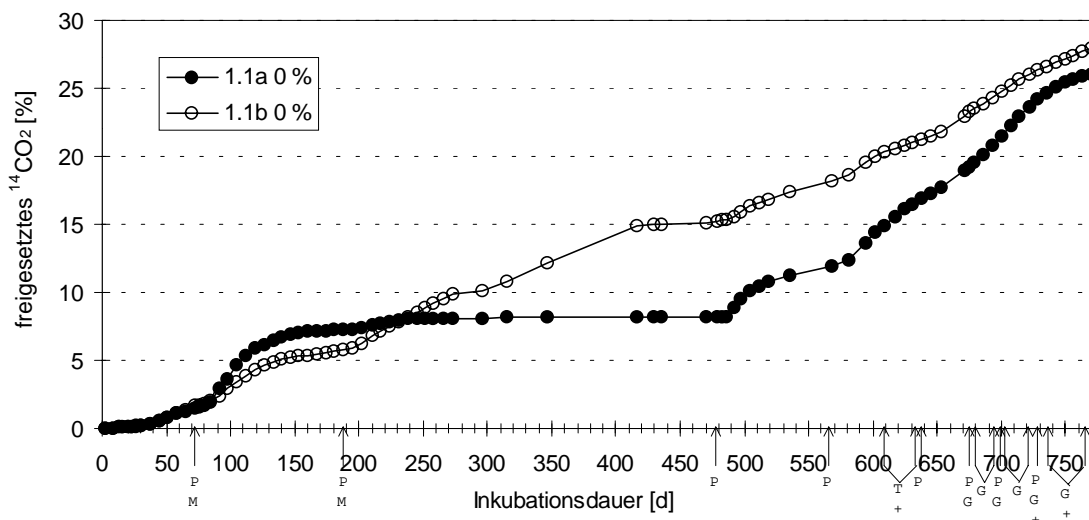
### 3.7.3 Versuchsreihe Biometer II

#### 3.7.3.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer II

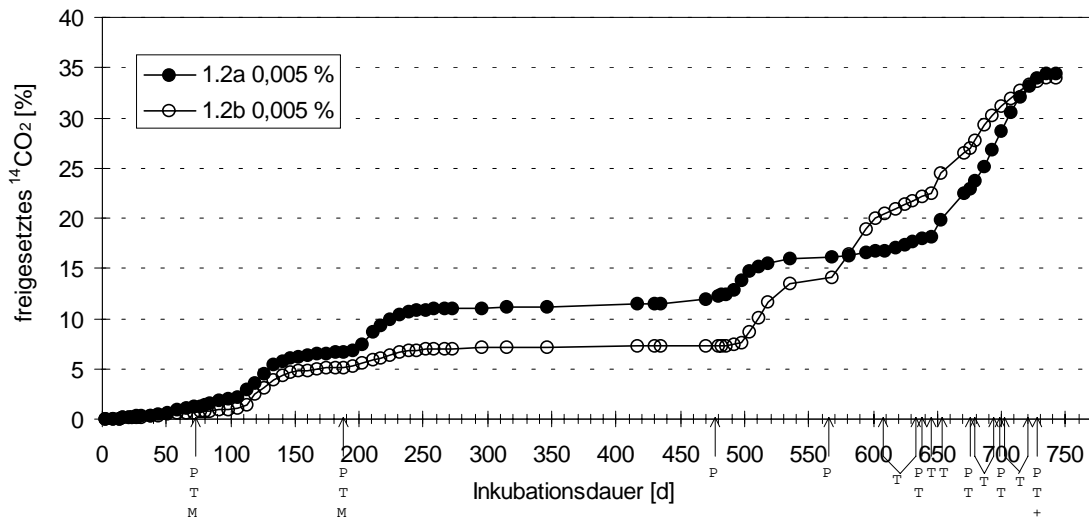
Da sich in der Versuchsreihe Biometer I gezeigt hat, daß hohe Plantacare-Konzentrationen den PAK-Abbau inhibierten, sollte mit der Versuchsreihe Biometer II die Bedeutung der CMC des Tensids für den PAK-Abbau herausgestellt werden. Daher wurden als einzusetzende Tensidkonzentrationen 0,005 % (< CMC) und 0,05 % (> CMC) gewählt. Die Bakterieninokula wurden Ansätzen der Versuchsreihe Biometer I entnommen. Die Auswahl richtete sich dabei zum einem nach dem Tensidgehalt der Ansätze, es sollte geprüft werden, ob eine mögliche Adaption an Plantacare einen Einfluß zeigt. Zum anderen wurden möglichst umsatzstarke Ansätze ausgewählt. Die Herkunft der 3 verschiedenen Inokula (Mischkultur MK Ia, MK Ib, MK Ic) kann der [Tabelle 2-14](#) entnommen werden.

#### 3.7.3.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren

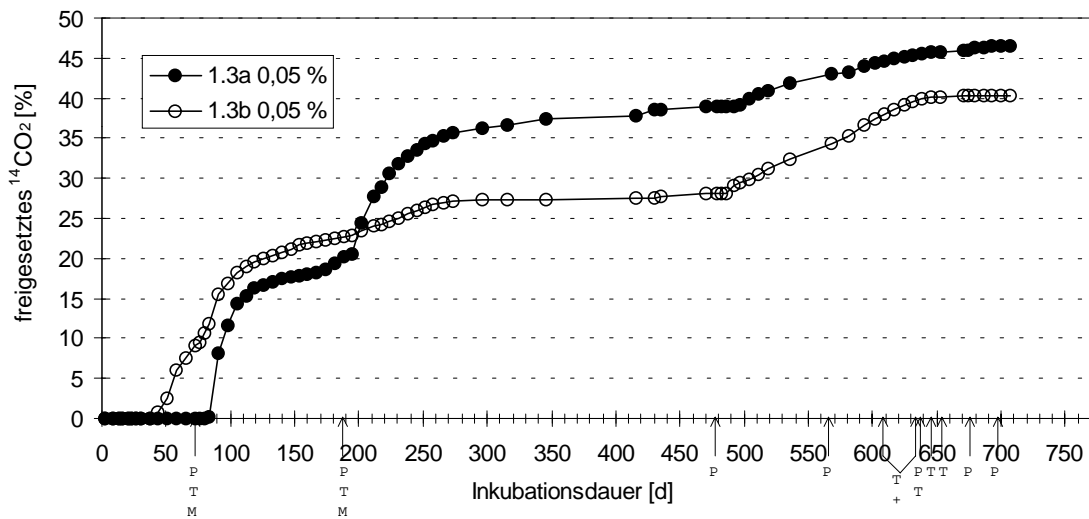
Die bei jeder Probenahme bestimmte Menge an entstandenem  $^{14}\text{CO}_2$  wurde als prozentualer Anteil der gesamten eingesetzten Radioaktivität je Biometer berechnet und als kumulative Mineralisation gegen die Inkubationszeit dargestellt (s. [Bild 3-26](#) bis [Bild 3-34](#)).



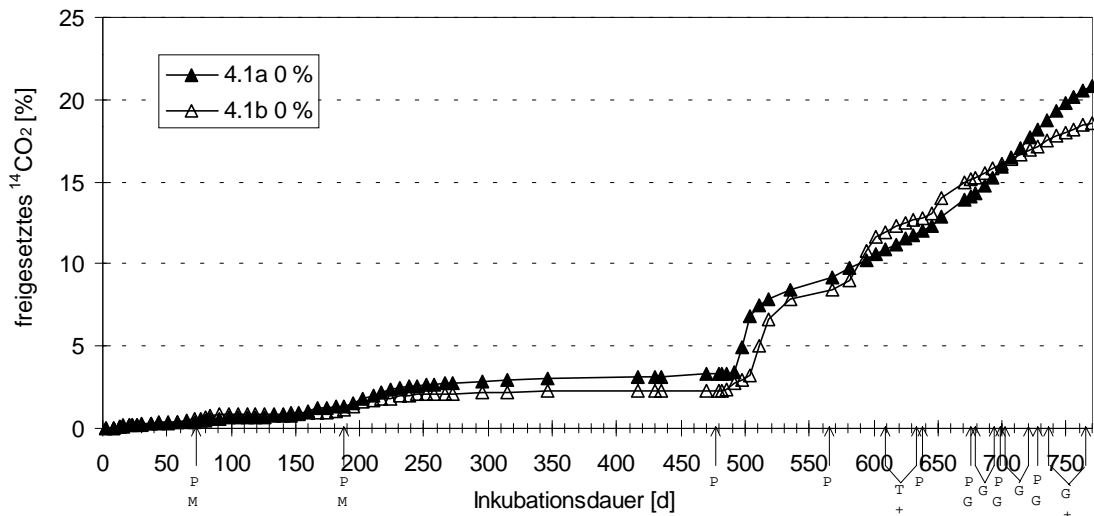
**Bild 3-26:** *Mischkultur MK Ia*: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T}+$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow\text{G}+$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow$   $\uparrow$  Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



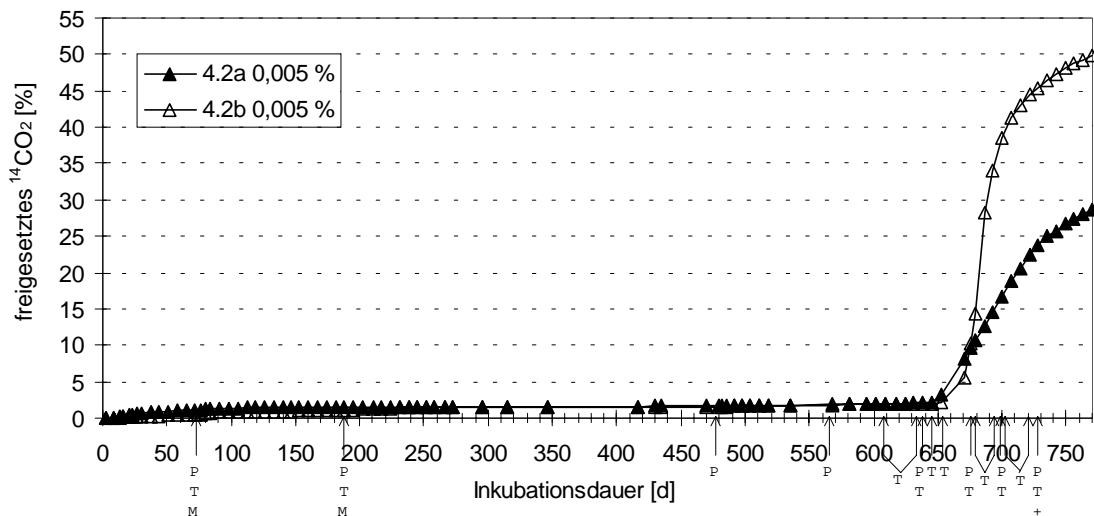
**Bild 3-27:** *Mischkultur MK IIa:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow$ T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow$ M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



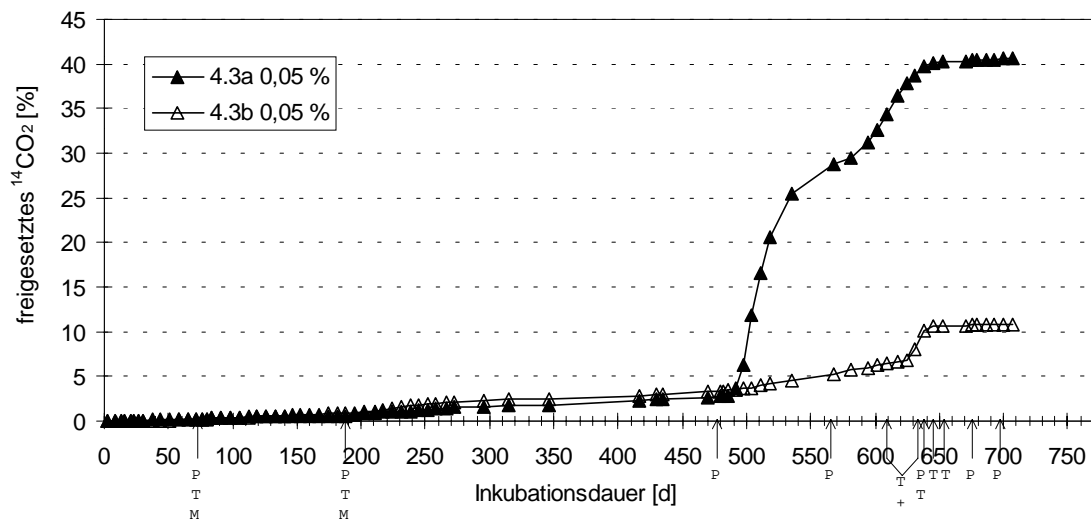
**Bild 3-28:** *Mischkultur MK IIa:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow$ T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow$ M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



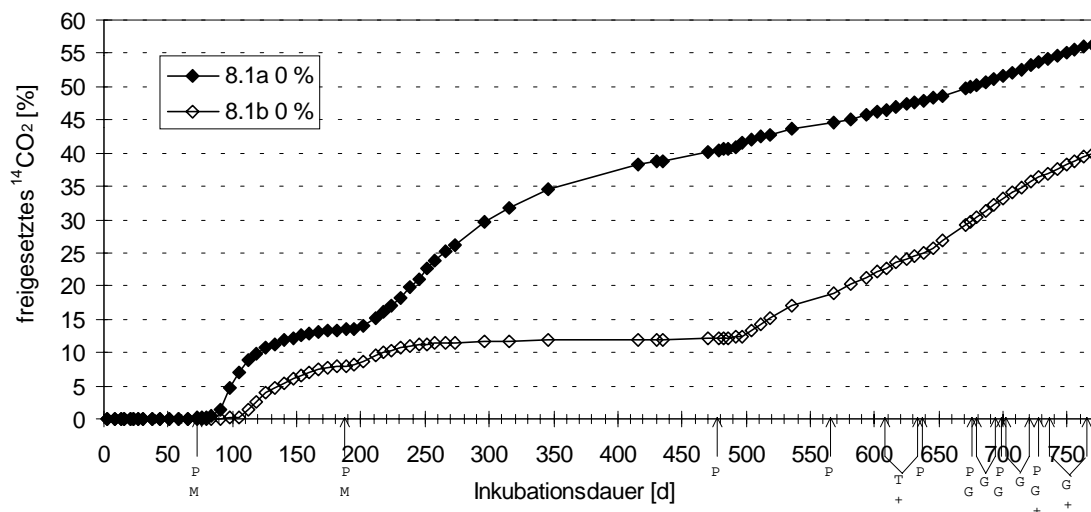
**Bild 3-29:** *Mischkultur MK IIb:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow$ M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow$ G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow$ G+: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow$   $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



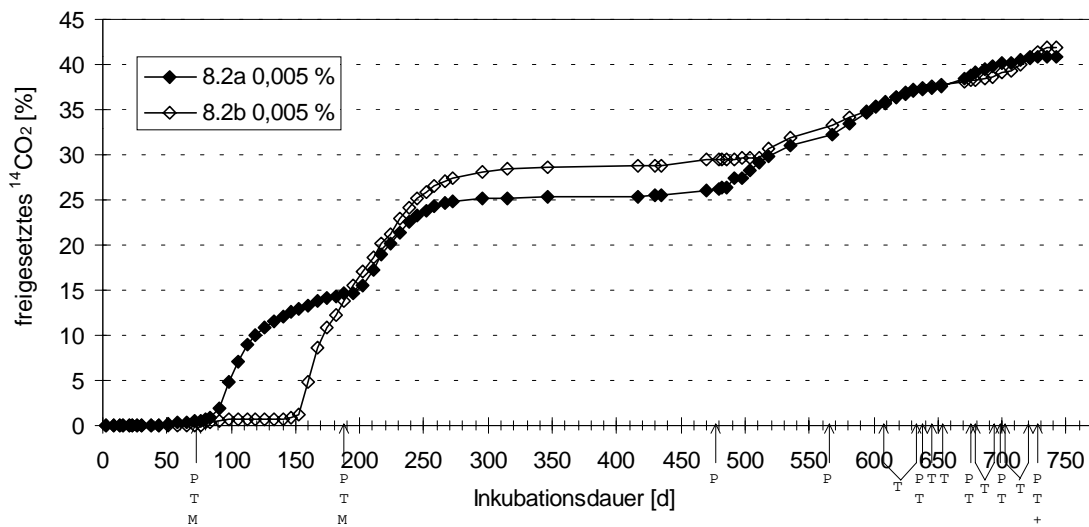
**Bild 3-30:** *Mischkultur MK IIb:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow$ T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow$ M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow$   $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



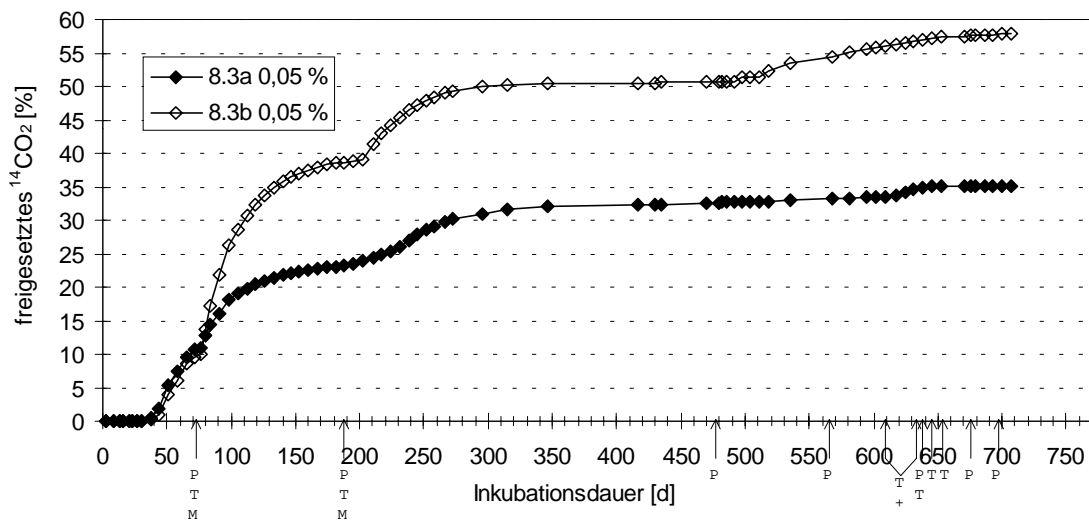
**Bild 3-31:** *Mischkultur MK IIb:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-32:** *Mischkultur MK IIc:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow\text{G+}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-33:** *Mischkultur MK IIc: Freigesetztes  $^{14}\text{C}$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow$ T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow$ M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*



**Bild 3-34:** *Mischkultur MK IIc: Freigesetztes  $^{14}\text{C}$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow$ T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow$ M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*

Auch in der Versuchsreihe Biometer II zeigten die beiden parallelen Systeme der einzelnen Ansätze nicht immer gleichrangige Absolutwerte bezüglich der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung, doch war die Entwicklung der Kurven über diesen langen Versuchszeitraum von mehr als 700 Tagen in den Tendenzen übereinstimmend.

Vergleicht man zunächst einmal die Abbaupotentiale für Benzo[a]pyren der einzelnen Mischkulturen MK IIa, MK IIb und MK IIc untereinander (s. [Tabelle 2-14](#)), so fällt auf, daß die Mischkultur MK IIb in allen sechs Biometern über einen sehr langen Zeitraum nur eine geringe Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  aufwies, die exponentielle Phase begann nach 480 bzw. im Ansatz 4.2 erst nach 650 Tagen Inkubation. Die Kulturen MK IIa und MK IIc zeigten hingegen eine lag-Phase von 40 bis etwa 150 Tagen, an diese schloß sich dann eine mehr oder weniger steile exponentielle Phase an.

Übereinstimmend wiesen alle Kurven Sprünge in der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung auf. Phasen mit geringen Freisetzungsraten wurden abrupt von Phasen mit nahezu exponentieller Benzo[a]pyren-Mineralisation abgelöst. Diese Sprünge folgten in der Regel immer einer Aufdotierung des Kulturmediums mit den PAK Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren. Die Zugabe von diesen PAK-Verbindungen in Kombination mit Mineralmedium bewirkte ebenfalls eine Steigerung des Benzo[a]pyren-Umsatzes. Die sprunghafte Steigerung der Umsätze, die der Supplementierung des Mediums mit dem PAK-Spektrum alleine folgten, beweisen, daß die gestiegene Konzentration an 3- und 4-Ring PAK im Kulturmedium entscheidend für die erhöhte  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung war.

Der Einfluß des Tensids Plantacare ließ sich nicht so deutlich einordnen. Zu Beginn der Inkubation zeigte sich in den Biometern 1.3 und 8.3 mit 0,05 % eine – im Vergleich zu den anderen Biometern – kürzere lag-Phase und eine darauf folgende sehr steile exponentielle Phase. Auch die gelegentlichen Zugaben höherer Tensidmengen mit längeren Zeitabständen zeigten keinen negativen Effekt auf die Benzo[a]pyren-Umsatzrate. Zum Ende der Inkubation wurde ständig Tensid in das Kulturmedium nachdosiert, um eine höhere Tensidkonzentration aufrecht zu halten. Dieses bewirkte zumindest bei der höheren Plantacare-Konzentration ein Abflachen der Kurven, die hohe Tensidkonzentration schien die Benzo[a]pyren-Mineralisation zu hemmen. Auch eine erneute PAK-Zugabe ließ die Mineralisation in diesen Ansätzen im restlichen Inkubationszeitraum von etwa 70 Tagen nicht mehr anspringen.

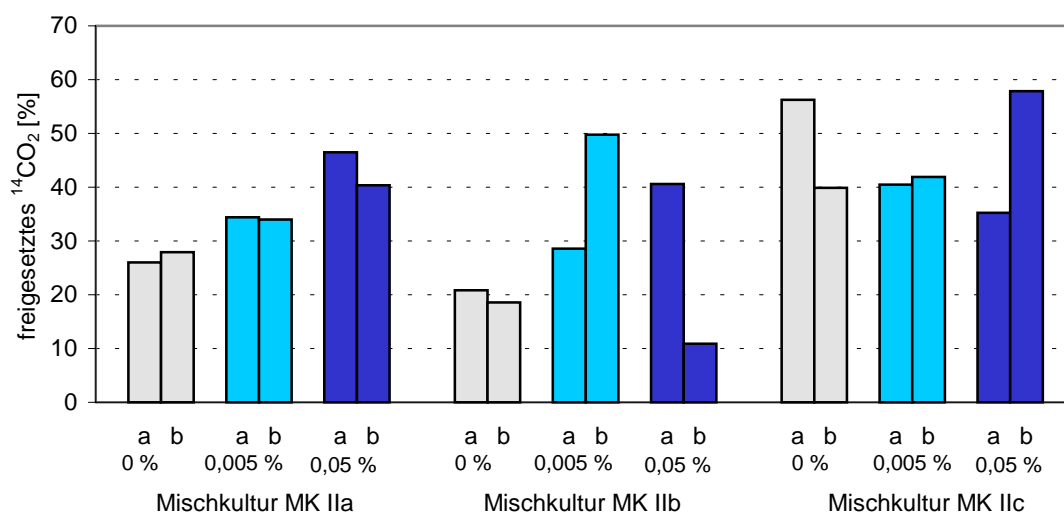
In den Biometern mit der geringeren Plantacare-Konzentration war dieser hemmende Effekt des Tensids nicht sichtbar. Die besonders in den Ansätzen 1.2 und 4.2 steile exponentielle Phase knickte zwar zum Ende hin leicht ab, doch dieses war auch ohne Tensideinfluß zu beobachten.

Die Zugabe von Glucose ins Kulturmedium der Ansätze 1.1, 4.1 und 8.1 schien keinen Effekt auf die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten zu haben. Die Glucose-Dosierung in das Medium wurde dabei so durchgeführt, daß sich, bezogen auf den ca. 50%igen AS-Gehalt von Plantacare, eine vergleichbare Konzentration zu den gewählten Plantacare-Konzentrationen einstellte. Die Kurven in den Ansätzen ohne Tensid zeigten – wie zuvor schon in

der Versuchsreihe Biometer I – einen linearen Verlauf, dieser Verlauf änderte sich auch durch die Glucose-Zugabe nicht.

Auch die wöchentliche Supplementierung des Kulturmediums mit der geringen Tensidkonzentration in die ansonsten tensidfreien Kulturmedien der Ansätze 1.1, 4.1 und 8.1 über einen Zeitraum von 4 Wochen, hatte keinen deutlichen Einfluß auf die Benzo[a]pyren-Umsatzraten.

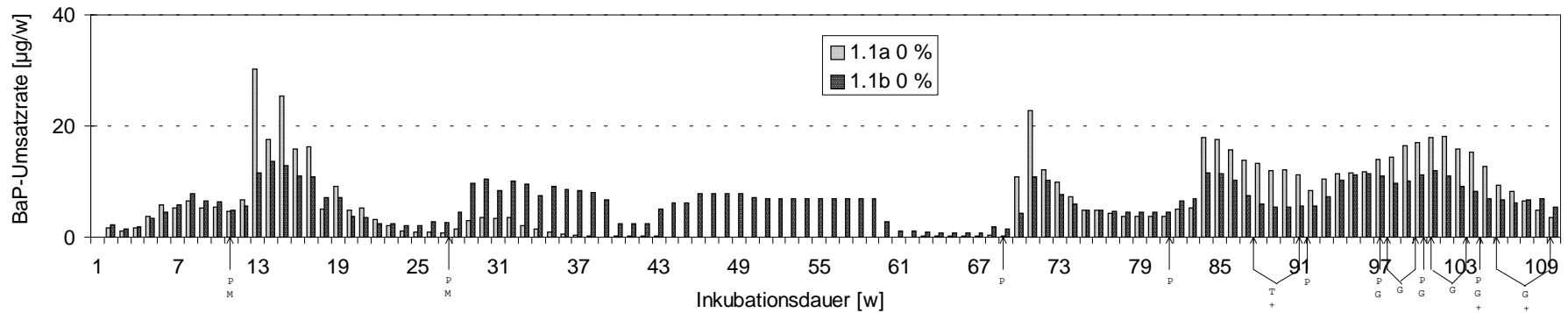
Bei dem Vergleich der Höhe des Benzo[a]pyren-Gesamtumsatzes in den einzelnen Ansätzen am Ende der gesamten Inkubationszeit ergab sich kein einheitliches Bild (s. [Bild 3-35](#)).



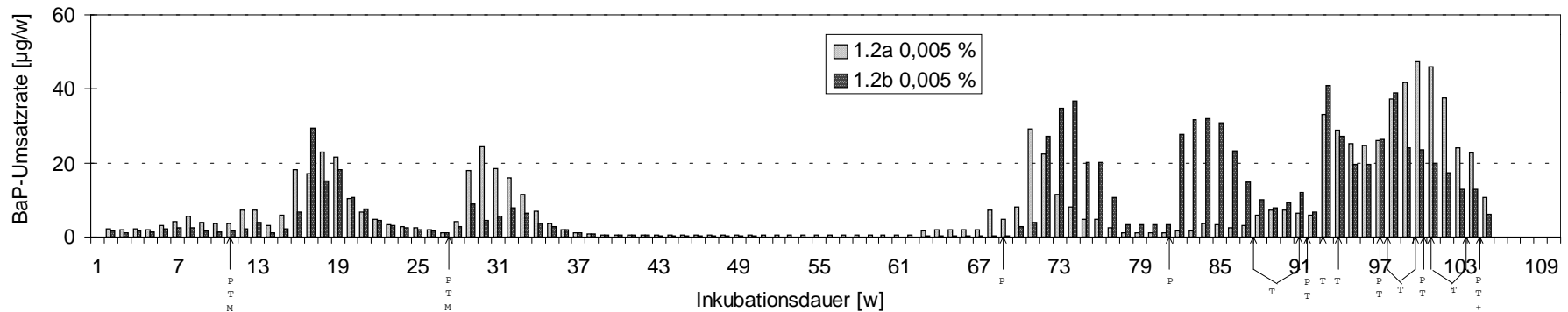
**Bild 3-35:** Vergleich des Gesamtumsatzes an Benzo[a]pyren in den einzelnen Ansätzen der Versuchsreihe Biometer II

Mit Ausnahme der Ansätze von Mischkultur MK IIa zeigten die Parallelen bei den anderen beiden Ansätzen zum Teil sehr starke Schwankungen in der Menge an insgesamt umgesetzten Benzo[a]pyren. Somit läßt sich eine Tendenz des Abbaupotentials für Benzo[a]pyren in Abhängigkeit vom Tensidgehalt des Kulturmediums über den gesamten Inkubationszeitraum nicht eindeutig erkennen. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß dieses über einen solchen langen Inkubationszeitraum mit wechselnden Inkubationsbedingungen auch nicht unbedingt zu erwarten war. Einflüsse von einzelnen Kultivierungsparametern wie PAK- oder Tensid-Zugabe könnten bei der Betrachtung der unmittelbar angrenzenden kürzeren Inkubationszeiträume deutlich werden.

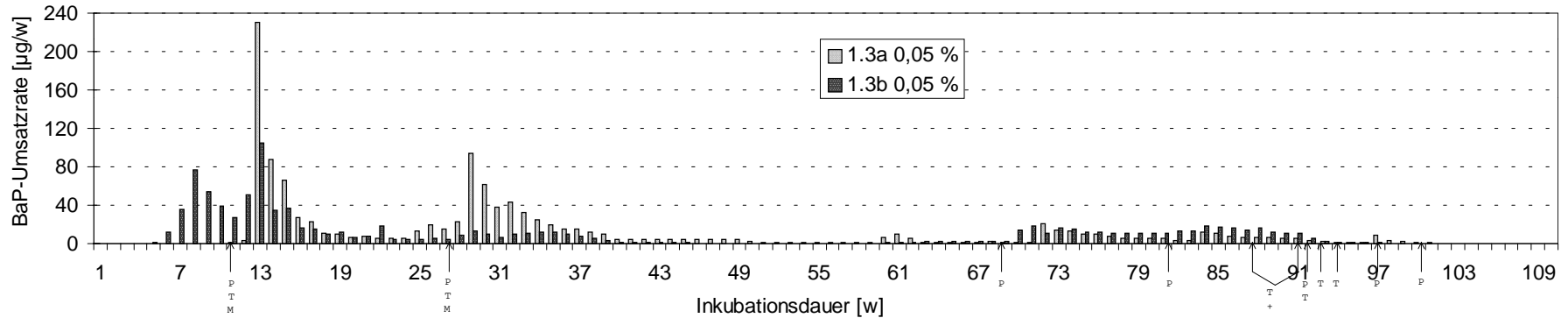
Berechnet man aus der bestimmten Radioaktivität jeder Probenahme den durchschnittlichen täglichen Umsatz an Benzo[a]pyren und bildet dann daraus den Benzo[a]pyren-Umsatz in einer Inkubationswoche, so werden die Entwicklung der einzelnen Biometer und der Einfluß der Zugaben besonders deutlich (s. [Bild 3-36](#) bis [Bild 3-44](#)).



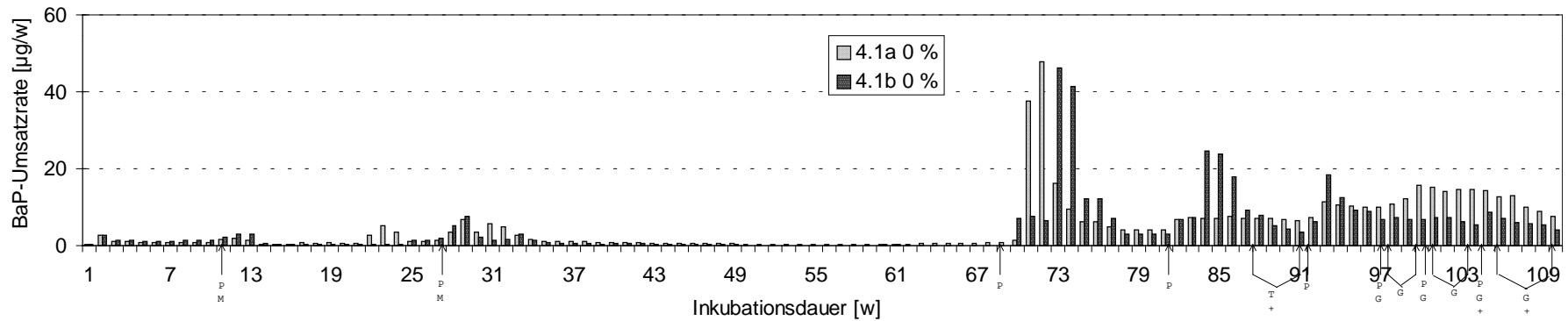
**Bild 3-36:** *Mischkultur MK IIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.* ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose, ↑G+: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose, ↗: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



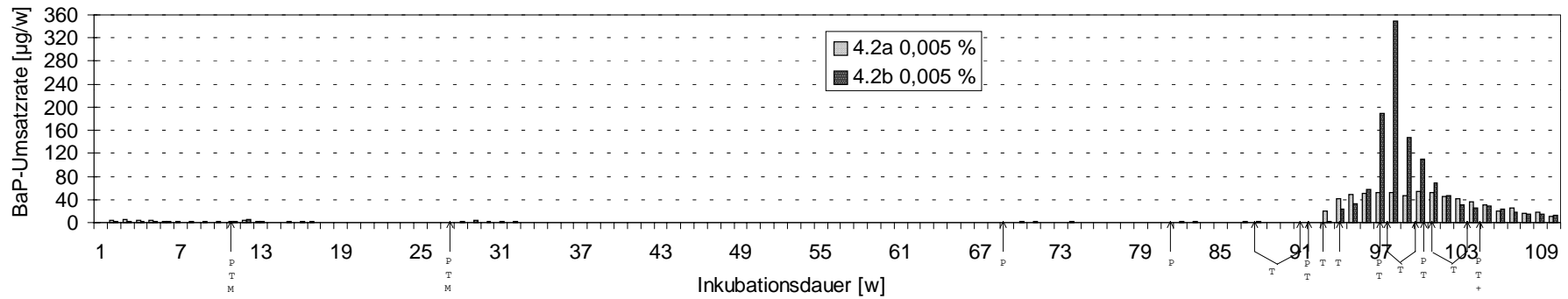
**Bild 3-37:** *Mischkultur MK IIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.* ↑P: Zugabe von 1,25 mg je Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare, ↗: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



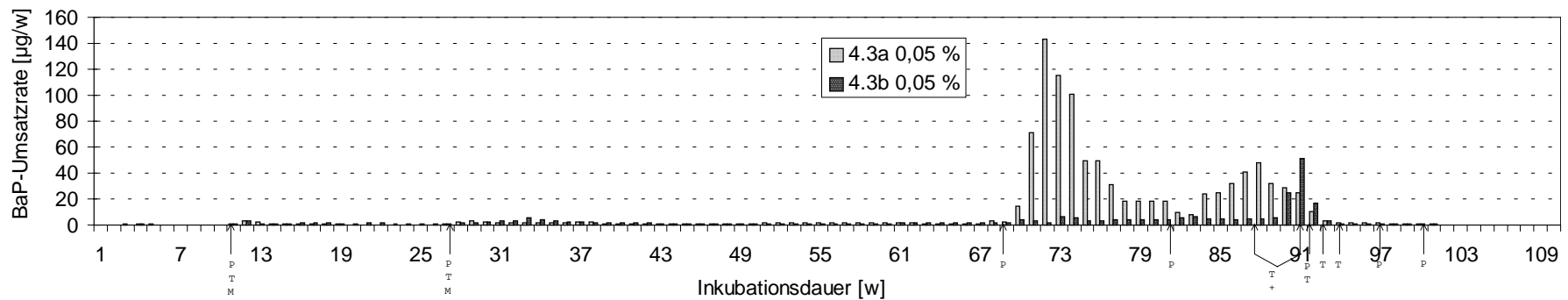
**Bild 3-38:** *Mischkultur MK IIa:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↕↕: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



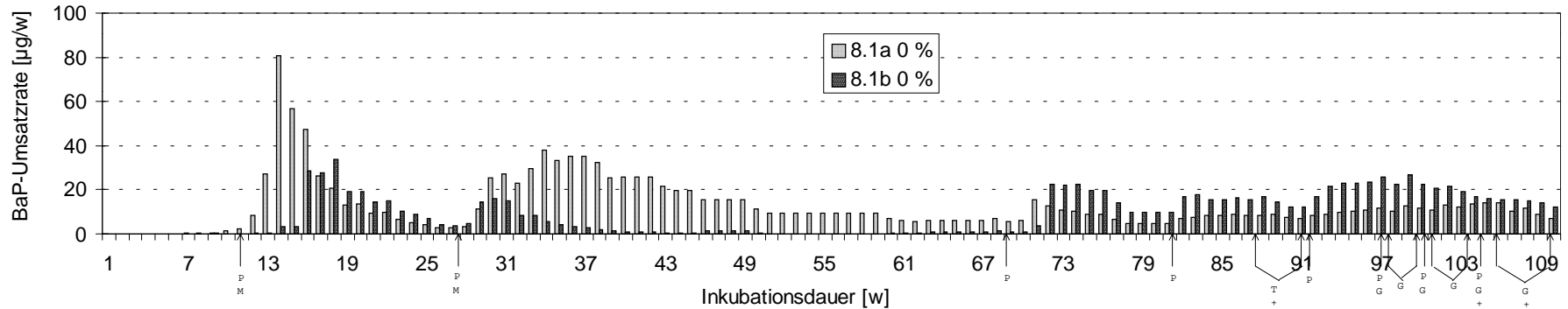
**Bild 3-39:** *Mischkultur MK IIb:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose, ↑G+: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose, ↕↕: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



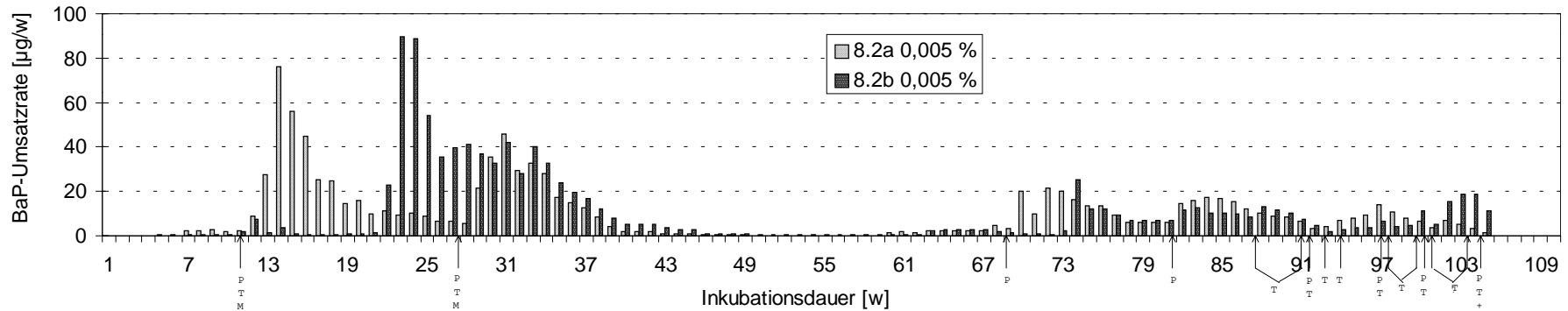
**Bild 3-40:** *Mischkultur MK IIb: Cometabolisch umgesetzt Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.* ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



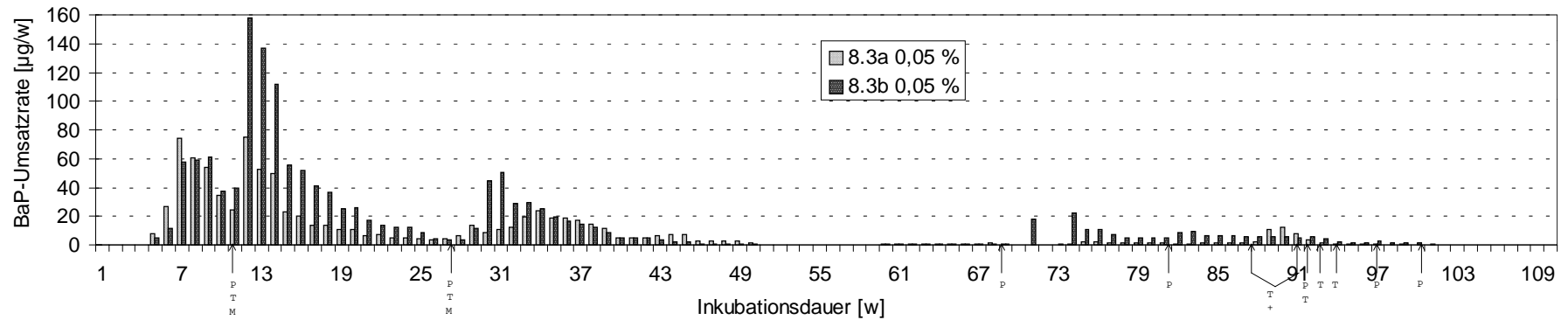
**Bild 3-41:** *Mischkultur MK IIb: Cometabolisch umgesetzt Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.* ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-42:** *Mischkultur MK Ilc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.* ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose, ↑G+: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-43:** *Mischkultur MK Ilc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.* ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen Phenanthren, Fluoranthren, und Pyren, ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-44:** *Mischkultur MK Ilc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↙↗: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*

Stellt man die drei Ansätze mit den jeweils 2 Parallelen für 0 %, 0,005 % und 0,05 % Plantacare-Gehalt der einzelnen Mischkulturen (s. [Tabelle 2-14](#)) zunächst vergleichend gegenüber, so wird deutlich, daß die höchsten Umsatzraten einer Inkubationswoche in den Ansätzen mit Tensid vorlagen. Bei den Ansätzen der Mischkultur IIa und IIc waren dieses die Ansätze mit 0,05 % Tensid. Hier fanden sich Benzo[a]pyren-Umsatzraten von mindestens 75 µg/Woche bis zu maximal 230 µg, im Vergleich dazu lagen die Umsätze in den Biometern ohne Tensid zwischen 14 und 80 µg Benzo[a]pyren/Woche. Die Ansätze mit 0,005 % Plantacare-Gehalt zeigten wöchentliche Umsatzraten zwischen 23 und 90 µg Benzo[a]pyren. Der Ansatz der Mischkultur IIb ist wegen der langen lag-Phase gesondert zu betrachten, hier wies der Ansatz mit 0,005 % Tensid die maximale Umsatzrate von 350 µg Benzo[a]pyren in der 98. Inkubationswoche auf.

Besonders deutlich wird der fördernde Effekt der Zugabe von den PAK Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren. Nach jedem Zudotieren dieser PAK-Mischung ließ sich in der Regel bereits in der folgenden Inkubationswoche eine erhöhte Umsatzrate für Benzo[a]pyren feststellen. In den nächsten 2 bis 6 Wochen steigerte sich diese Rate kontinuierlich bis zum Maximalwert und fiel dann in wenigen Wochen rasch wieder ab. Sogar in den Ansätzen der Mischkultur IIb ließ sich dieser fördernde Effekt der PAK-Zugabe selbst in der anfänglichen Phase der Inkubationszeit beobachten, obwohl der Umsatz an Benzo[a]pyren hier äußerst gering war.

Die Wirkung einer ständig hohen Plantacare-Konzentration auf den Benzo[a]pyren-Umsatz am Ende der Inkubation der Ansätze 1.3, 4.3 und 8.3 wird in [Bild 3-38](#), [Bild 3-41](#) und [Bild 3-44](#) sehr deutlich. In den Inkubationswochen 87 bis 90 wurde in diese Ansätze bei jeder Probenahme 5 mg Plantacare ins Kulturmedium gegeben. Die Umsatzrate von Benzo[a]pyren veränderte sich kaum oder stieg leicht an. In der 91. bis 93. Woche wurde dann die Plantacare-Dosis um den Faktor 10 auf 50 mg erhöht. Der Benzo[a]pyren-Umsatz ging daraufhin zurück und kam bis zum Inkubationsende völlig zum Erliegen.

Die Ansätze 1.1, 4.1 und 8.1 wurden zunächst ohne Tensidzugabe angesetzt. In den Inkubationswochen 87 bis 90 wurde jedoch auch in diese Ansätze bei jeder Probenahme 5 mg Plantacare ins Kulturmedium gegeben. Diese Tensidzugabe schien jedoch keinen hemmenden Effekt auf den Benzo[a]pyren-Umsatz zu haben, die Umsatzraten blieben konstant und bei Ansatz 1.1 wurde die fallende Tendenz der Abbauraten verringert. Das Aufdotieren mit Glucose in die Kulturmedien dieser Ansätze hatte einen der Tensidwirkung ähnlichen Effekt. Die mehrmalige Zugabe von 2,5 mg Glucose – vergleichbar zur Zugabe von 5 mg Plantacare – zeigte eine leicht fördernde Wirkung. Erhöhte sich die Glucosedosis auf das vierfache, so sank die Umsatzrate für Benzo[a]pyren – wenn auch nicht so drastisch wie bei der hohen Tensidgabe.

### 3.7.3.3 Keimzahlbestimmung

Die Biometer-Flaschen der Versuchsreihe Biometer II wurden zu Versuchsbeginn mit jeweils 2 ml Kulturmedium aus den Ansätzen 1a, 4b und 8b der Versuchsreihe Biometer I nach dem Schema der [Tabelle 2-14](#) beimpft.

Die Lebendkeimzahlen und die Zusammensetzung der Population im Inokulum können der [Tabelle 3-7](#) entnommen werden. Dabei fällt auf, daß die Keimzahlen von Ansatz 4b (MK IIb) sehr niedrige Werte aufwiesen. Ansatz 8b (MK IIc) besaß um den Faktor 10 höhere Keimzahlen und der KBE-Wert von Ansatz 1a (MK IIa) war um den Faktor 30 größer. Möglicherweise war diese geringe Keimzahl im Inokulum von MK IIb der Grund für die lang andauernde lag-Phase in den damit beimpften Ansätzen.

Nach 638 Tagen Inkubationszeit wurden in allen Ansätzen die Lebendkeimzahlen bestimmt. Die Kolonien wurden den Typen der [Tabelle 3-3](#) zugeordnet. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 3-11](#) aufgelistet.

**Tabelle 3-11:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer II nach 638 Inkubationstagen

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]						
			1	2	3	4	6	8	10
1.1a	0	2,99*10 <sup>8</sup>	80	5	8	2	5	n.n.	n.n.
1.1b	0	9,83*10 <sup>7</sup>	78	1	3	5	13	n.n.	n.n.
1.2a	0,005	1,26*10 <sup>8</sup>	64	n.n.	12	2	13	n.n.	9
1.2b	0,005	2,24*10 <sup>8</sup>	72	n.n.	4	1	22	n.n.	1
1.3a	0,05	1,28*10 <sup>8</sup>	74	2	4	n.n.	4	n.n.	15
1.3b	0,05	1,60*10 <sup>8</sup>	68	4	5	1	6	n.n.	17
4.1a	0	2,49*10 <sup>8</sup>	86	2	5	1	7	n.n.	n.n.
4.1b	0	4,50*10 <sup>8</sup>	67	10	12	n.n.	12	n.n.	n.n.
4.2a	0,005	8,80*10 <sup>7</sup>	26	8	31	3	14	17	n.n.
4.2b	0,005	1,10*10 <sup>8</sup>	30	n.n.	67	n.n.	n.n.	3	n.n.
4.3a	0,05	4,18*10 <sup>8</sup>	69	13	8	n.n.	1	n.n.	9
4.3b	0,05	1,68*10 <sup>8</sup>	5	31	44	n.n.	1	n.n.	19
8.1a	0	2,73*10 <sup>8</sup>	82	4	1	8	5	n.n.	n.n.
8.1b	0	2,61*10 <sup>8</sup>	81	3	3	5	8	n.n.	n.n.

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-11** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]						
			1	2	3	4	6	8	10
8.2a	0,005	2,14*10 <sup>8</sup>	82	8	n.n.	n.n.	10	n.n.	n.n.
8.2b	0,005	9,50*10 <sup>7</sup>	86	5	n.n.	n.n.	9	n.n.	n.n.
8.3a	0,05	7,68*10 <sup>7</sup>	33	14	n.n.	2	26	n.n.	25
8.3b	0,05	1,85*10 <sup>8</sup>	59	5	1	n.n.	34	n.n.	2

*n.n.: nicht nachweisbar*

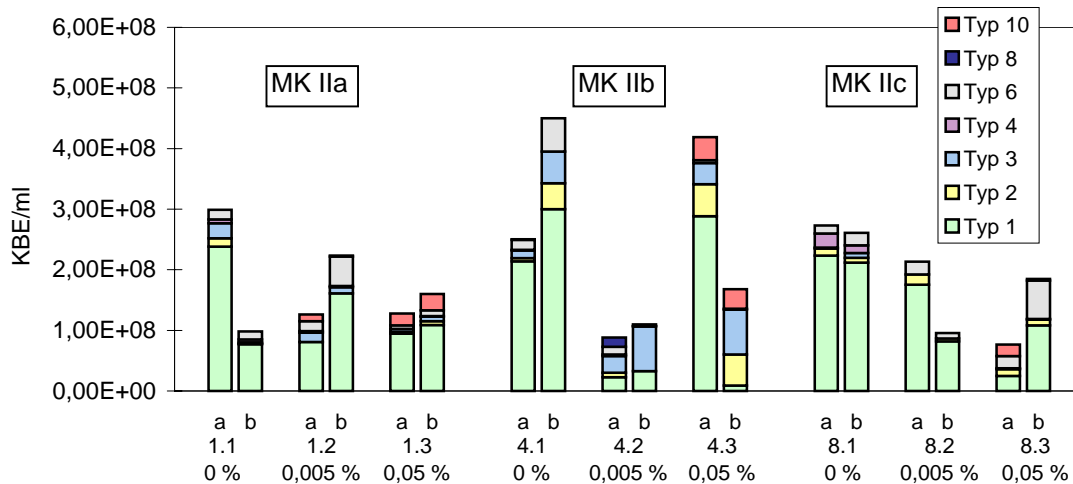
Die Lebendkeimzahlen der Ansätze liegen zwischen  $7,68 \cdot 10^7$  und  $4,5 \cdot 10^8$  Keimen/ml Medium. Sie korrelieren nicht mit der Höhe der Benzo[a]pyren-Umsatzrate zum Zeitpunkt der KBE-Bestimmung.

Die KBE-Bestimmung erfolgte nach 638 Tagen Inkubation und lag somit am Ende einer Phase von 29 Inkubationstagen, in der wöchentlich 5 mg Plantacare ins Kulturmedium eines jeden Ansatzes zugegeben wurde.

Trotz dieser Gleichbehandlung fallen Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakterientypen im Kulturmedium einzelner Ansätze auf. Stellt man diese Typenzusammensetzung der Ansätze vergleichend in einer Grafik dar (s. [Bild 3-45](#)), so fällt auf, daß Typ 10 nur in den Ansätzen, die zu Inkubationsbeginn mit Plantacare supplementiert waren, im Kulturmedium nachweisbar war.

Die Dominanz von Bakterientyp 1 im Kulturmedium fast aller Ansätze wird ebenfalls deutlich.

Ansatz 4.2 war zum Zeitpunkt der KBE-Bestimmung der einzige Ansatz, in dem bisher kaum eine <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung (2 %) nachweisbar war. Auffällig war bei diesem Ansatz die geringe Dominanz von Typ 1, der hohe Anteil von Typ 3 und das Vorkommen von Bakterientyp 8, der sich ausschließlich in diesem Ansatz nachweisen ließ. Das Verteilungsmuster von Typ 1 und Typ 3 fand sich ebenfalls in Ansatz 4.3b, und auch dieser Ansatz zeigte mit 8 % nur eine geringe Benzo[a]pyren-Abbaurrate.



**Bild 3-45:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze der Versuchsreihe Biometer II nach 638 Tagen Inkubation

Nach weiteren 65 Tagen Inkubation wurde in den Ansätzen der Versuchsreihe Biometer II eine weitere Bestimmung der Lebendkeimzahl und der Typenzusammensetzung durchgeführt (Tabelle 3-12).

**Tabelle 3-12:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer II nach 703 Inkubationstagen

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]					
			1	2	3	4	6	10
1.1a	0	$3,45 \cdot 10^8$	52	27	n.n.	3	15	3
1.1b	0	$1,72 \cdot 10^8$	60	29	5	2	2	2
1.2a	0,005	$4,90 \cdot 10^8$	60	4	5	1	21	9
1.2b	0,005	$5,65 \cdot 10^8$	48	4	3	2	35	8
1.3a	0,05	$1,43 \cdot 10^7$	65	30	4	n.n.	n.n.	n.n.
1.3b	0,05	$1,58 \cdot 10^7$	77	15	6	n.n.	2	n.n.
4.1a	0	$7,55 \cdot 10^8$	73	8	2	n.n.	18	n.n.
4.1b	0	$4,40 \cdot 10^8$	66	10	1	8	14	1
4.2a	0,005	$5,70 \cdot 10^8$	65	5	1	4	22	2
4.2b	0,005	$6,30 \cdot 10^8$	62	3	1	2	2	31

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-12** (Fortsetzung)

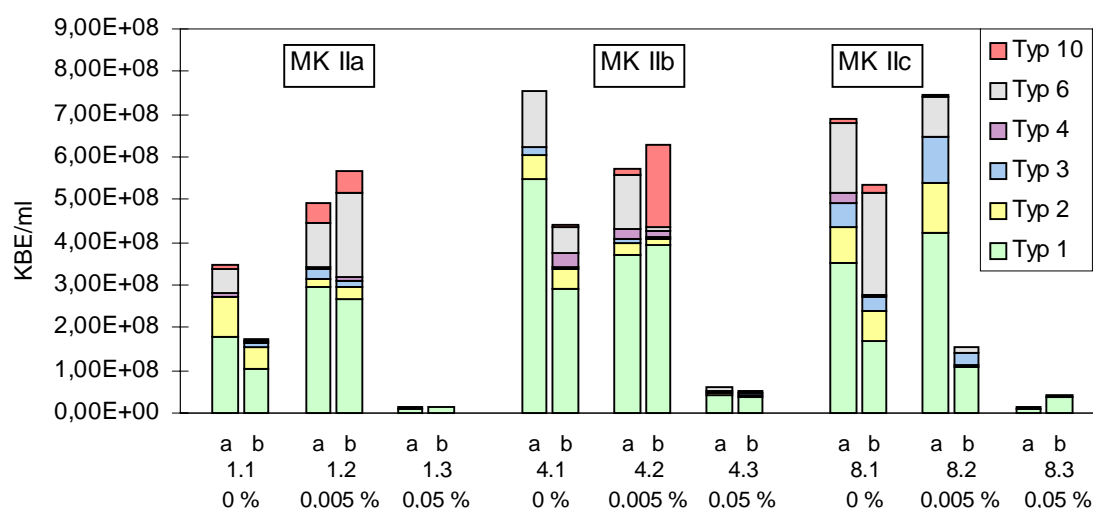
Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]					
			1	2	3	4	6	10
4.3a	0,05	$6,18 \cdot 10^7$	71	7	8	n.n.	14	n.n.
4.3b	0,05	$5,05 \cdot 10^7$	74	11	11	1	2	n.n.
8.1a	0	$6,88 \cdot 10^8$	51	12	8	3	24	1
8.1b	0	$5,35 \cdot 10^8$	32	13	6	1	44	4
8.2a	0,005	$7,45 \cdot 10^8$	57	16	14	n.n.	13	1
8.2b	0,005	$1,53 \cdot 10^8$	72	3	16	n.n.	9	n.n.
8.3a	0,05	$1,32 \cdot 10^7$	81	15	4	n.n.	1	n.n.
8.3b	0,05	$4,45 \cdot 10^7$	84	4	3	n.n.	9	1

*n.n.: nicht nachweisbar*

Zum Zeitpunkt dieser Lebendkeimzahlbestimmung wurden die Ansätze 1.1, 4.1 und 8.1 zuvor über eine Zeitdauer von vier Wochen zweimal wöchentlich mit 2,5 mg Glucose supplementiert. In die Kulturmedien der Ansätze 1.2, 4.2 und 8.2 wurde entsprechend 5 mg Plantacare gegeben und in die Ansätze 1.3, 4.3 und 8.3 wurde das gleiche Volumen an Aqua dest. zupipettiert.

Betrachtet man die Werte der Lebendkeimzahlbestimmung, so fällt auf, daß die Keimzahlen der Ansätze 1.3, 4.3 und 8.3 im Mittel um das 11- bis 26-fache niedriger lagen als die der anderen Ansätze. Dieses korreliert mit den äußerst niedrigen Abbauraten dieser 3 Ansätze für Benzo[a]pyren im gleichen Zeitraum. Nach der dreimaligen Zugabe von jeweils 50 mg Plantacare in das Kulturmedium dieser Ansätze in den Inkubationswochen 92 bis 94 ging die Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  drastisch zurück und blieb bis zum Inkubationsende auf einem geringen Niveau. Die Keimzahlen in diesen Ansätzen waren jedoch nicht so niedrig, das sie diesen massiven Rückgang des Benzo[a]pyren-Umsatzes zur Folge gehabt haben könnten. Die höheren Lebendzellzahlen der anderen Ansätze resultierten aus der Zugabe der C-Quellen Glucose oder Plantacare.

Vergleicht man auch hier wieder die Anteile der einzelnen Bakterientypen an der Mischpopulation (s. Bild 3-46), so bewies sich erneut die Dominanz des Typs 1 in allen Ansätzen.



**Bild 3-46:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer II nach 703 Tagen Inkubation

### 3.7.3.4 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium

Vor Beginn der Extraktion wurde die Oberflächenspannung des Kulturmediums gemessen und die gelöste Menge an Radioaktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in [Tabelle 3-13](#) aufgeführt.

**Tabelle 3-13:** Oberflächenspannung des Kulturmediums und gelöste Radioaktivität am Ende der Inkubation, Versuchsreihe Biometer II

Ansatz	Plantacare [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	gelöstes $^{14}\text{C}$ [%]	gelöstes $^{14}\text{C}^a$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1.1a	0	65,5	6,16	1,08
1.1b	0	67,4	6,09	1,02
1.2a	0,005	61,1	11,79	1,87
1.2b	0,005	55,6	9,23	1,43
1.3a	0,05	52,2	10,47	1,30
1.3b	0,05	52,5	8,46	1,26
4.1a	0	54,4	4,36	0,81
4.1b	0	60,9	4,18	0,80
4.2a	0,005	62,9	7,96	1,40
4.2b	0,005	58,4	16,42	1,86

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-13** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	Oberflächen- spannung [mN/m]	gelöstes <sup>14</sup> C [%]	gelöstes <sup>14</sup> C <sup>a</sup> [µg/ml]
4.3a	0,05	58,6	6,65	0,93
4.3b	0,05	56,6	2,28	0,53
8.1a	0	57,4	13,85	1,30
8.1b	0	60,7	7,25	1,04
8.2a	0,005	56,8	9,93	1,46
8.2b	0,005	57,9	11,65	1,61
8.3a	0,05	56,11	6,91	1,11
8.3b	0,05	49,82	12,43	1,20
K1 <sup>b</sup>	0	69,8	0,28	0,08
K2 <sup>b</sup>	0,005	49,5	3,06	1,19

<sup>a</sup>berechnet als <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren<sup>b</sup>Sterilkontrollen

Die gemessenen Oberflächenspannungen in den einzelnen Kulturmedien wiesen keine großen Unterschiede auf. Mit steigendem Tensidgehalt ergab sich zwar in der Regel eine geringere Oberflächenspannung, Werte, wie sie für das Erreichen der CMC charakteristisch sind, gab es jedoch auch in den Ansätzen, welche häufig mit 0,05 % Plantacare supplementiert wurden, nicht. Das Tensid wurde in all diesen Ansätzen abgebaut. Schließt man von den dort gemessenen Werten der Oberflächenspannung auf den noch vorhandenen Tensidgehalt, so ergeben sich Konzentrationen von 0,005 % Plantacare. Da in den Inkubationswochen 87 bis 90 allen Biometern – mit Ausnahme der beiden Kontrollansätze, jedoch einschließlich der zuvor ohne Tensid inkubierten Ansätze – viermalig jeweils 5 mg Plantacare zugesetzt wurden, konnte das am Inkubationsende noch vorhandene Plantacare in allen Ansätzen zu einer Verringerung der Oberflächenspannung führen. Die ermittelten Werte entsprachen dabei denen von Plantacare-Lösungen zwischen 0,001 und 0,005 % Plantacare-Gehalt. Es ist jedoch zu bedenken, daß sicherlich auch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte der Bakterien zu einem Absinken der Oberflächenspannung des Kulturmediums geführt haben, so daß der Tensidgehalt auch unterhalb dieser berechneten Konzentrationen liegen kann.

Die Ansätze 1.3, 4.3 und 8.3 wurden in den Inkubationswochen 91 bis 93 wöchentlich mit 50 mg Plantacare und die Ansätze 1.2, 4.2 und 8.2 in den Inkubationswochen 91 bis 103 mit 5 mg Plantacare sowie in der Woche 104 mit 25 mg des Tensids supplementiert.

Diese intensive Plantacare-Zugabe ins Kulturmedium der Ansätze 1.2, 4.2 und 8.2 zum Inkubationsende kann eine Erklärung dafür sein, daß sich im Schnitt in diesen Ansätzen auch die höchsten Werte für die Menge an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium fanden. Auch im Ansatz 8.3b lag überdurchschnittlich viel gelöste  $^{14}\text{C}$ -markierte Substanz im Kulturmedium vor und obwohl die letzte Tensidzugabe in diesem Ansatz bereits mehr als 8 Wochen zurücklag, besaß die Oberflächenspannung den geringsten Wert von allen Ansätzen. Mit einer  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung von nahezu 60 % der eingesetzten Radioaktivität war dieser Ansatz, bezogen auf den Benzo[a]pyren-Abbau, der leistungsfähigste. Die hohe Metabolisierungsaktivität der Bakterien in diesem Ansatz kann daher zu hohen Menge an gelöster Radioaktivität in Form polarer Metaboliten geführt haben. Die Verteilung der gelösten Radioaktivität nach der  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktion in die organische oder wässrige Phase kann mehr Aufschluß darüber geben, ob es sich hierbei um gelöstes Benzo[a]pyren oder um polare Metaboliten handelte.

### 3.7.3.5 pH-Wert im Kulturmedium

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die pH-Werte im Kulturmedium bestimmt. Diese lagen in allen Ansätzen zwischen pH 7 und 8.

### 3.7.3.6 Bilanzierung der Radioaktivität

Am Ende der Extraktion der Kulturmedien konnte aus den Anteilen der Radioaktivität in den organischen und wässrigen Extrakten und dem Anteil, welcher als  $^{14}\text{CO}_2$  aufgefangen wurde, für jeden Ansatz eine Bilanz erstellt werden (s. [Tabelle 3-14](#)).

**Tabelle 3-14:** Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren durch die Mischkulturen MK IIa, MK IIb und MK IIc; Versuchsreihe Biometer II

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamtwiederfindung [%]
		als $\text{CO}_2$	im $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt	im $\text{H}_2\text{O}$ -Extrakt	
1.1a	0	26,01	63,88	6,31	96,21
1.1b	0	27,91	59,99	6,12	94,03
1.2a	0,005	34,42	53,03	8,62	96,17
1.2b	0,005	33,97	55,02	9,17	98,19
1.3a	0,05	46,49	38,52	11,55	96,58
1.3b	0,05	40,34	48,21	8,85	97,43

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-14** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamtwiederfindung [%]
		als CO <sub>2</sub>	im CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt	im H <sub>2</sub> O-Extrakt	
4.1a	0	20,86	73,67	5,83	100,37
4.1b	0	18,60	74,36	6,13	99,09
4.2a	0,005	28,60	53,36	14,11	96,08
4.2b	0,005	49,78	34,57	10,98	95,36
4.3a	0,05	40,59	46,25	9,96	96,81
4.3b	0,05	10,87	85,89	7,36	104,13
8.1a	0	56,27	31,33	8,76	96,38
8.1b	0	39,88	52,67	7,41	99,99
8.2a	0,005	40,94	48,79	12,37	102,11
8.2b	0,005	41,93	46,61	13,27	101,83
8.3a	0,05	35,22	55,93	10,78	101,94
8.3b	0,05	57,87	25,61	10,94	94,43
K1 <sup>a</sup>	0	0	75,05	0,31	75,77
K2 <sup>a</sup>	0,005	0	89,16	4,26	93,96

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Mit Ausnahme des Kontrollansatzes K1 lagen die Gesamtwiederfindungsanteile für die eingesetzte Radioaktivität zwischen 94 und 104 %.

Die Anteile, die sich davon nach der Extraktion jeweils in der wässrigen Phase fanden, korrelierten mit den vor der Extraktion bestimmten Mengen an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium. Die höchsten Werte für die Menge an Radioaktivität im H<sub>2</sub>O-Extrakt besaßen auch hier die Ansätze 1.2, 4.2 und 8.2, gefolgt von den Ansätzen 1.3, 4.3 und 8.3. Dieser Zusammenhang bestätigt die Annahme, daß es sich bei der gelösten radioaktiven Substanz im Kulturmedium nicht um Benzo[a]pyren, sondern um polare Metaboliten oder in Biomasse eingebautes <sup>14</sup>C handelt. Beim Vergleich der Menge an freigesetztem <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> zu der Menge an Radioaktivität im wässrigen Extrakt, ergeben sich für das <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in nahezu allen Ansätzen im Schnitt 4fach höhere Werte. Ausnahmen hiervon sind zum einen die Ansätze 4.2a und 4.3b, diese besaßen relativ hohe Mengen an Radioaktivität im H<sub>2</sub>O-Extrakt, diese deutet auf einen hohen Anteil an primärer Metaboli-

ten hin. Zum anderen wiesen die Ansätze 8.1a, 8.1b sowie 8.3b relativ geringe Anteile an  $^{14}\text{C}$ -Substanz in der wässrigen Phase auf, dieses spricht für eine vollständigere Metabolisierung des Benzo[a]pyrens in diesen Ansätzen.

Die Parallelen der Ansätze, die mit der Mischkultur IIa beimpft wurden (s. [Tabelle 2-14](#)), zeigten – wie auch schon zuvor bei den Mineralisationskurven – eine jeweils sehr übereinstimmende Entwicklung und Bilanz. Dabei lagen – betrachtet man die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung – die Ansätze mit 0,05 % Tensid an der Spitze, gefolgt von den Ansätzen mit 0,005 % Tensidgehalt.

Leider war bei den Ansätzen, die mit den Mischkulturen MK IIb und MK IIc beimpft wurden, die Übereinstimmung zwischen den Parallelen nicht in allen Ansätzen eindeutig gegeben, so daß sich die oben gemachte Beobachtung für die anderen Ansatzreihen nicht bestätigen läßt.

### 3.7.3.7 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

Die Charakterisierung der Radioaktivität in den  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakten der Kulturmedien zeigte, daß diese zu nahezu 100 % aus der Ausgangsverbindung  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren stammte.

### 3.7.3.8 Gaschromatographische Untersuchung der $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte

Die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakte der Kulturmedien wurden gaschromatographisch auf ihren PAK-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sind der [Tabelle 3-15](#) zu entnehmen, in der letzten Spalte sind die ermittelten Wiederfindungsmengen des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren aufgeführt.

**Tabelle 3-15:** Wiederfindung der PAK im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer II

Ansatz	GC-Analytik [%]					Radio- analytik [%]
	Anthr.	Phen.	Fluora.	Pyren	BaP	$^{14}\text{C}$ -BaP
1.1a	3,67	0,33	0,38	0,84	63,08	63,88
1.1b	2,81	0,17	0,11	0,74	59,85	59,99
1.2a	12,91	10,37	11,56	14,31	47,34	53,03
1.2b	19,50	16,20	17,86	20,06	50,16	55,02
1.3a	33,78	28,40	37,34	37,71	39,5	38,52
1.3b	24,97	25,07	45,21	39,17	46,37	48,21

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-15** (Fortsetzung)

Ansatz	GC-Analytik [%]					Radio- analytik [%]
	Anthr.	Phen.	Fluora.	Pyren	BaP	<sup>14</sup> C-BaP
4.1a	4,29	0,16	0,10	0,13	72,46	73,67
4.1b	0,94	0,08	0,10	0,19	72,65	74,36
4.2a	15,62	3,84	4,94	7,08	48,91	53,36
4.2b	8,24	2,59	3,06	4,28	36,52	34,57
4.3a	14,24	8,06	9,36	33,34	43,6	46,25
4.3b	22,08	14,28	18,40	42,23	84,46	85,89
8.1a	10,40	2,10	2,50	2,89	36,68	31,33
8.1b	2,67	0,13	0,13	0,14	58,38	52,67
8.2a	18,26	13,43	16,74	20,26	52,48	48,79
8.2b	20,97	17,65	21,22	25,88	44,69	46,61
8.3a	24,56	30,19	38,42	41,56	51,05	55,93
8.3b	22,67	13,29	16,29	23,91	24,47	25,61
K1 <sup>a</sup>	44,23	35,19	61,83	60,43	79,62	75,05
K2 <sup>a</sup>	44,63	37,26	55,04	50,21	85,49	89,16

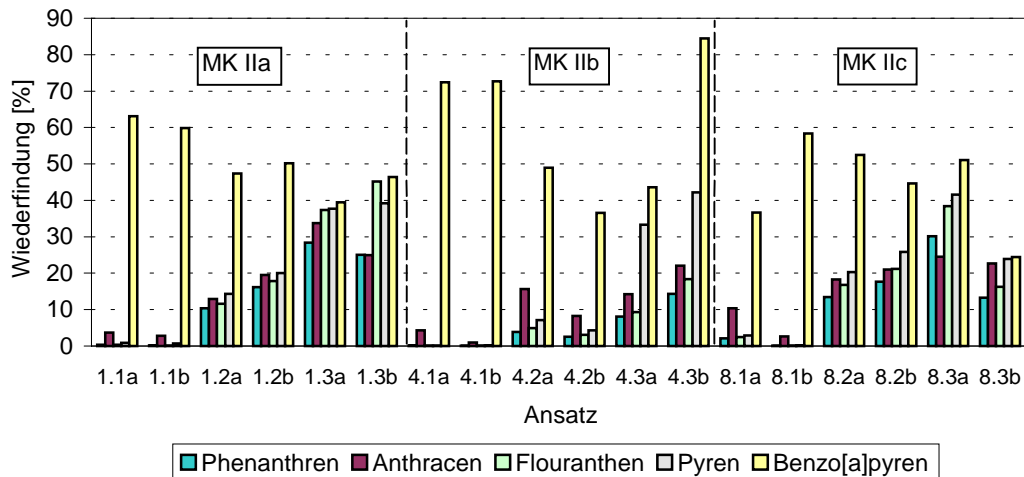
<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Beim Vergleich der Wiederfindungsmengen des Benzo[a]pyren, die mit der Methode der Gaschromatographie ermittelt wurden, mit der jeweiligen Wiederfindung des <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, ergab sich im Mittel eine Abweichung von 1,64 %, wobei die höchste Differenz im Ansatz 8.1b 5,71 % betrug, die niedrigste im Ansatz 1.1b 0,14 %.

Im Kulturmedium waren zu Beginn der Versuchsreihe je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren sowie 2,5 mg Benzo[a]pyren enthalten. Nach 72 und 188 Tagen Inkubation wurde in alle Ansätze, mit Ausnahme der Kontrollen, 10 ml Medium mit je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren gegeben. Am 479., 568., 638., 675. und 696. Inkubationstag wurde das Kulturmedium jeden Ansatzes mit je 2,5 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren supplementiert und nach 728 Tagen nochmals je 2,5 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren in die Ansätze 1.1, 1.2, 4.1, 4.2, 8.1 und 8.2.

Am Inkubationsende konnten somit in den Ansätzen 1.1, 1.2, 4.1, 4.2, 8.1 und 8.2 maximal je 18,75 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren und 2,5 mg Benzo[a]pyren vorliegen. In den Ansätzen 1.3, 4.3 und 8.3 hätten je 16,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren und 2,5 mg Benzo[a]pyren vorliegen können. Wie die Ergebnisse der Wiederfindung in den Sterilkontrollen zeigen, sind auch hier die Effekte der Ausstrippung der 3- und 4-Ring PAK zu berücksichtigen.

Die Wiederfindungsmengen der einzelnen PAK in den Kulturmedien der Ansätze 1.1 bis 8.3 sind im [Bild 3-47](#) vergleichend dargestellt.



**Bild 3-47:** Wiederfindung der PAK im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums, Versuchsreihe Biometer II

Für den Vergleich der PAK-Gehalte in den Kulturmedien zum Zeitpunkt der Extraktion ist es erforderlich, die Inkubationsdauer der einzelnen Ansätze und dabei insbesondere die Länge des Zeitraums zwischen der letzten PAK-Zugabe und dem Inkubationsende zu berücksichtigen. Diese Angaben sind in [Tabelle 3-16](#) aufgelistet.

**Tabelle 3-16:** Zeitraum der letzten PAK-Zugabe ins Kulturmedium der Versuchsreihe Biometer II vor Inkubationsende

Ansatz	Inkubations- ende [Tag]	letzte PAK- Zugabe [Tag]	Zeitraum [Tage]
1.1, 4.1, 8.1, 4.2	770	728	42
1.2, 8.2	736	728	8
1.3, 4.3, 8.3	710	696	14

Betrachtet man [Bild 3-47](#), so fällt zunächst auf, daß bei allen 3 Mischkulturen die 3er Ansätze, also die unter verstärktem Einfluß von Plantacare, die höchsten PAK-Gehalte aufwiesen. Der PAK-Gehalt dieser Kulturmedien entsprachen immer mindestens der PAK-Menge der letzten Zugabe, welche bei diesen Ansätzen 2 Wochen zurücklag. Bei

den Biometern 1.3a, 1.3b und 8.3a entsprach der noch verbliebene PAK-Gehalt sogar der PAK-Konzentration von etwa 2 Zugaben mit je 2,5 mg Substanzmenge. Dies legt die Vermutung nahe, daß der PAK-Abbau während dieser Zeit stagnierte oder insgesamt stark verlangsamt war.

Die Ansätze 1.2 und 8.2 wurden 8 Tage nach der letzten Zugabe extrahiert, die PAK-Gehalte der Medien entsprechen in etwa der PAK-Konzentration in den Zugabemenge.

Bei den Biometern, die zuletzt extrahiert wurden (s. [Tabelle 3-16](#)), lag ein Zeitraum von 6 Wochen zwischen der letzten PAK-Zugabe und dem Inkubationsende. In diesen Ansätzen fanden sich nur noch PAK-Restkonzentrationen. Interessant ist der Vergleich des Ansatzes 4.1 mit Ansatz 4.2, da diesen die gleiche Zeitdauer zum PAK-Abbau zur Verfügung standen, Ansatz 4.2 jedoch bis zum Inkubationsende mit Tensid supplementiert wurde. Im Biometer 4.2 fanden sich im Mittel die PAK Phenanthren, Fluoranthren und Pyren in mehr als 30fach höherer Konzentration als im Ansatz 4.1.

Beim Vergleich des Abbaupotentials der Mischkulturen für die einzelnen PAK-Verbindungen fällt auf, daß in den Biometern, die mit 0 % Plantacare angesetzt wurden, sich nur noch geringe PAK-Gehalte fanden, aber immer eine auffallend hohe Restkonzentration von Anthracen verblieben war. Phenanthren und Fluoranthren waren am stärksten abgebaut worden, gefolgt vom Pyren. Diese Rangfolge entspricht der Reihenfolge der PAK geordnet nach der Wasserlöslichkeit. Anthracen ist mit 48 µg/l äußerst schlecht wasserlöslich, Pyren löst sich mit 150 µg/l in Wasser, Fluoranthren besitzt eine Wasserlöslichkeit von 260 µg/l und Phenanthren von 950 µg/l. Diese Tendenz zeigte sich auch in den Ansätzen, in denen zwar ein deutlicher, doch noch kein so vollständiger Abbau erfolgt war, wie z.B. in Ansatz 4.2 oder 8.1a.

Die Biometer mit der Mischkultur MK IIb besaßen durchweg geringere Rest-PAK-Gehalte als die vergleichbaren Kulturmedien der Ansätze mit den Mischkulturen MK IIa und MK IIc. Diese erhöhte Abbauaktivität der Mischkultur MK IIb bestätigt sich auch, wenn man die wöchentlichen Umsatzraten für Benzo[a]pyren betrachtet (s. [Bild 3-40](#) und [Bild 3-41](#)). Die Ansätze mit der Mischkultur IIb zeigten alle erst sehr spät höhere Abbauraten für Benzo[a]pyren, sie waren daher in den letzten Monaten der Inkubation weitaus aktiver als die anderen Ansätze. Dieses gesteigerte Abbaupotential für Benzo[a]pyren schien gleichzeitig auch für die anderen PAK zu gelten.

#### 3.7.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer II

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer II ergibt folgende Punkte:

⇒ Zu geringe Lebendkeimzahlen im Inokulum könnten möglicherweise ein Grund für lang andauernde lag-Phasen zu Beginn des Benzo[a]pyren-Umsatzes in einigen Ansätzen gewesen sein.

- ⇒ Die Zugaben der PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren ins Kulturmedium bewirkten einen erneuten bzw. verstärkten Umsatz von Benzo[a]pyren. Supplementierung von Mineralmedium war dafür nicht erforderlich.
- ⇒ Gelegentlich hohe Tensidgaben mit längeren Zeitabständen oder zu Inkubationsbeginn führten zu kurzfristig hohen Umsatzraten von Benzo[a]pyren.
- ⇒ Eine ständig hohe Tensidkonzentration im Kulturmedium hemmte den Benzo[a]pyren-Abbau.
- ⇒ Das Tensid wurde in den hier eingesetzten Konzentrationen von den Bakterien abgebaut. Tensidmicellen konnten höchstens kurzfristig auftreten.
- ⇒ Der ständige Einfluß von niedrigen Tensidkonzentrationen hatte – ebenso wie die Zugabe entsprechender Glucosekonzentrationen – keinen hemmenden Effekt auf die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung.

### 3.7.4 Versuchsreihe Biometer III

#### 3.7.4.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer III

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, durch selektive Anreicherung spezialisierte Mischkulturen zu etablieren, die Benzo[a]pyren mit möglichst hohen Mineralisierungsraten abbauen konnten. Aus diesem Grund wurde aus den drei leistungsfähigsten Ansätzen der Versuchsreihe Biometer II (Ansätze 8.1a, 8.2a und 8.3b) nach 149 Tagen Inkubation jeweils 2 ml Kulturmedium entnommen und damit – unter den üblichen Versuchsbedingungen – neue Kulturen angeimpft (s. 2.12.5). Der Plantacare-Gehalt der neuen Stammkulturen wurde auf die jeweilige Anfangskonzentration der entsprechenden Biometer II Kultur eingestellt. Somit waren wieder die drei Konzentrationsstufen 0 %, 0,005 % und 0,05 % Plantacare-Gehalt vertreten. Mögliche Anpassungseffekte der Mischkulturen an das Plantacare konnten so berücksichtigt werden. Die Medien der neu beimpften Kulturen enthielten kein <sup>14</sup>C-markiertes Benzo[a]pyren, diese Ansätze sollten als Stammkulturen dazu eingesetzt werden, genügend Animpfmaterial für weitere Versuche zur Verfügung zu stellen. Nach 181 Tagen Inkubation wurde aus diesen Stammkulturen durch Zentrifugation jeweils eine Bakteriensuspension gewonnen, welche dann zum Beimpfen der Biometerflaschen der Versuchsreihe Biometer III diente.

#### 3.7.4.2 Oberflächenspannung in den Stammkulturen

Die Oberflächenspannungen der Stammkulturen, aus denen durch Zentrifugation ein Bakterieninokulum gewonnen wurde, wurde gemessen. Stammkultur 8.1a (0 % Plantacare) besaß eine Oberflächenspannung von 69,6 mN/m, Stammkultur 8.2a (0,005 % Plantacare) von 68,0 mN/m und 8.3b (0,05 % Plantacare) von 64,7 mN/m. Mit zunehmendem Tensidgehalt der Kulturen waren die Werte der Oberflächenspannung am Inkubationsende zwar tiefer, doch zeigten sie, daß offensichtlich in den Tensidansätzen allenfalls geringe Restkonzentrationen von Plantacare im Medium verblieben waren.

### 3.7.4.3 Keimzahlbestimmung der Stammkulturen

Die Lebendkeimzahlbestimmung und die optische Differenzierung der Bakterientypen in 1 ml der Animpfsuspension gibt Aufschluß über die Bakterienkulturen in den Biometern zu Beginn der Inkubation. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind der [Tabelle 3-17](#) zu entnehmen.

**Tabelle 3-17:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III zu Inkubationsbeginn

Ansatz	Mischkultur	KBE/ml	Typen [%]			
			1	2	3	6
1.1, 1.2, 1.3	MK IIIa	$1,42 \cdot 10^6$	50	39	11	n.n.
2.1, 2.2, 2.3	MK IIIb	$1,8 \cdot 10^6$	62	19	5	14
3.1, 3.2, 3.3	MK IIIc	$1,18 \cdot 10^7$	66	31	8	n.n.
8.3	MK IIId	$1,2 \cdot 10^6$	53	47	n.n.	n.n.

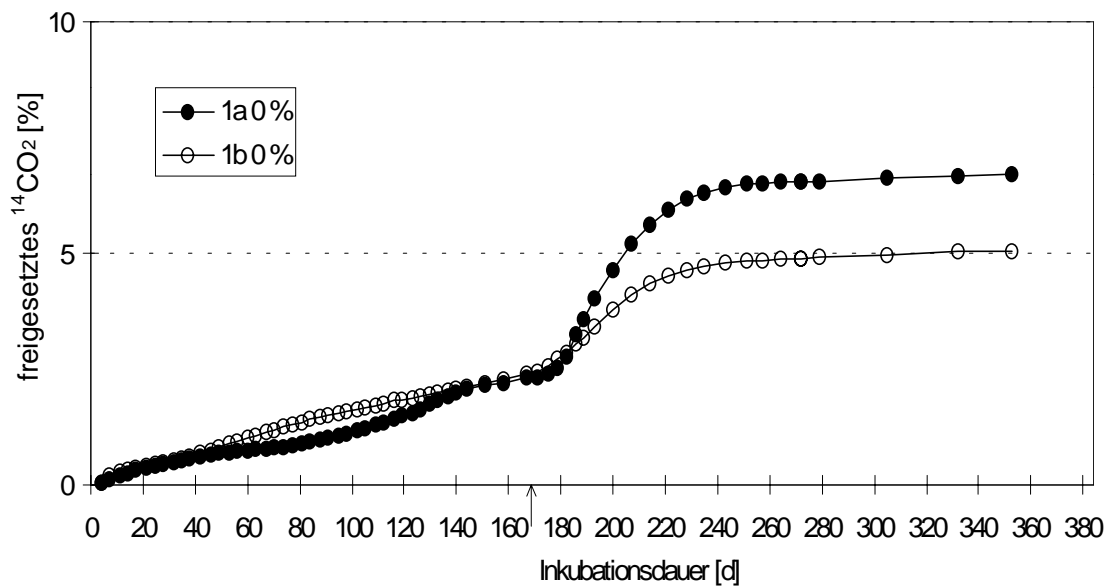
*n.n.: nicht nachweisbar*

Die Mischkultur MK III d, die nicht durch Zentrifugation einer Stammkultur aufkonzentriert wurde, wies nur einen geringfügig niedrigeren Wert der Lebendkeimzahl im Vergleich zu den drei anderen Mischkulturen auf.

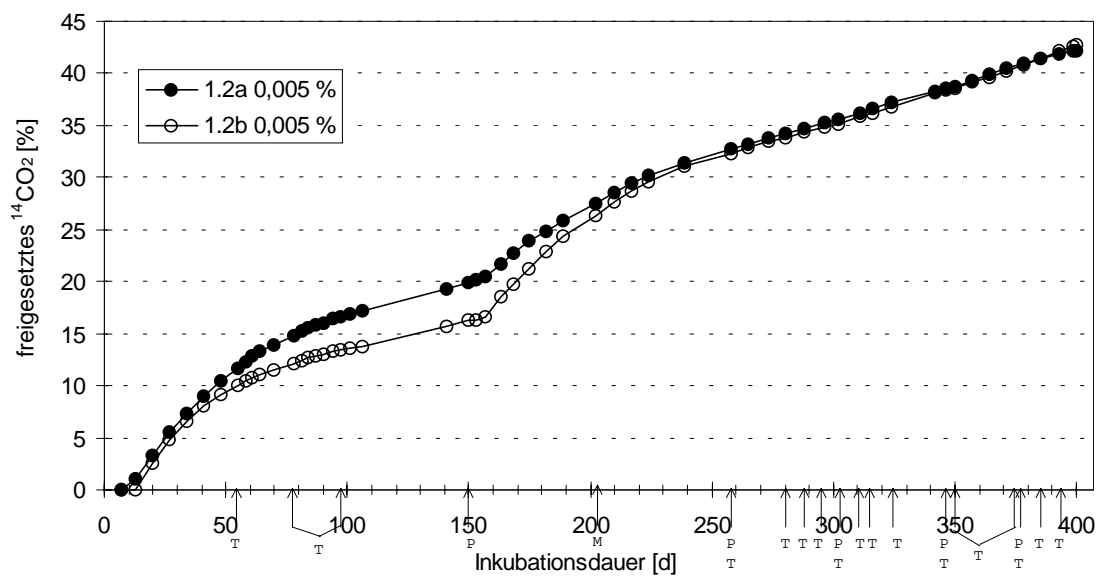
In allen Biometern bildeten die Bakterientypen 1 und 2 den Hauptanteil der auf R2A-Agar kultivierbaren Typen der Mischpopulationen.

### 3.7.4.4 Mineralisation von $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren

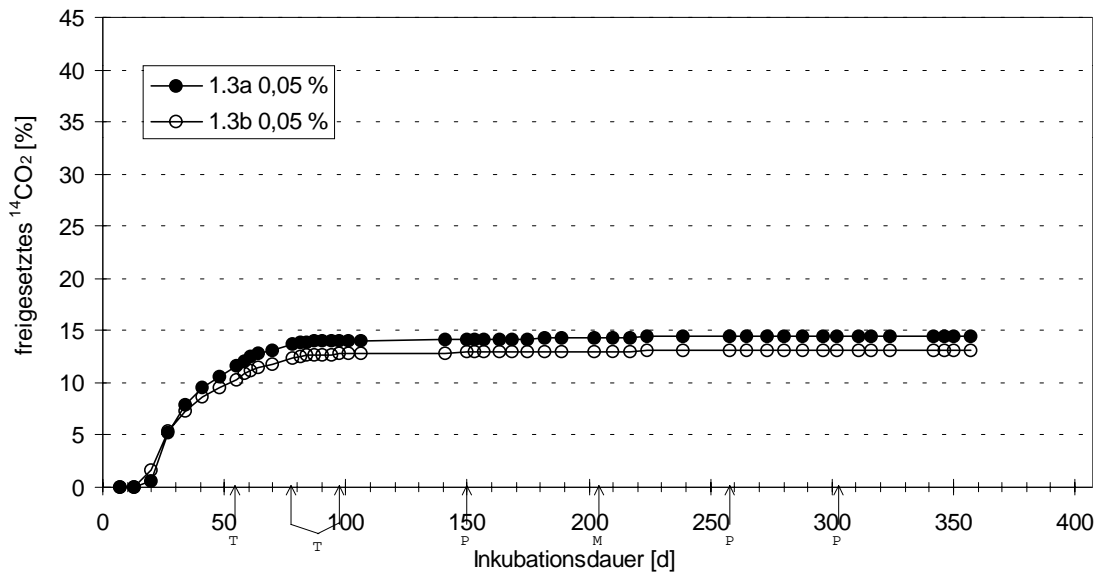
Wie zuvor bei den Versuchsreihen Biometer I und II wurde das freigesetzte  $^{14}\text{CO}_2$  als prozentualer Anteil der gesamten eingesetzten Radioaktivität je Biometer berechnet und als kumulative Mineralisation in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (s. [Bild 3-48](#) bis [Bild 3-57](#)).



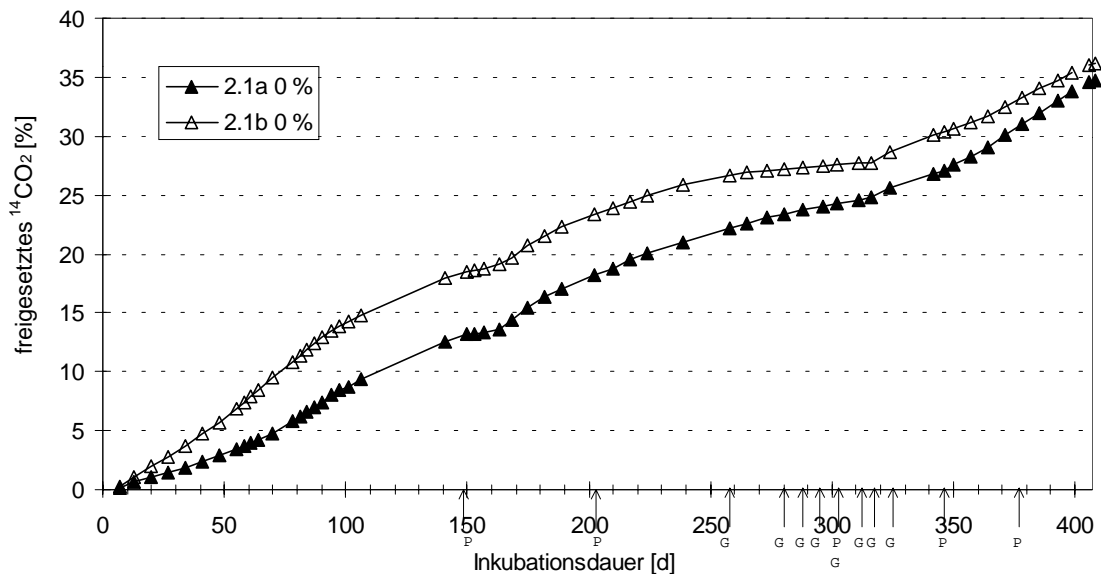
**Bild 3-48:** *Mischkultur MK IIIa:* Freigesetztes  $^{14}\text{C}$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose



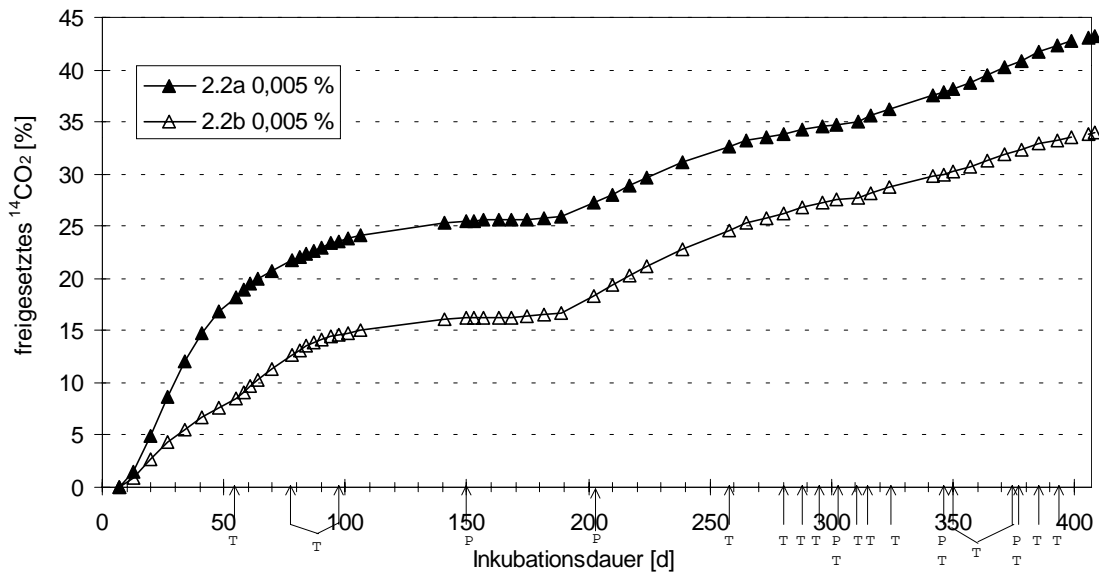
**Bild 3-49:** *Mischkultur MK IIIa:* Freigesetztes  $^{14}\text{C}$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ M: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



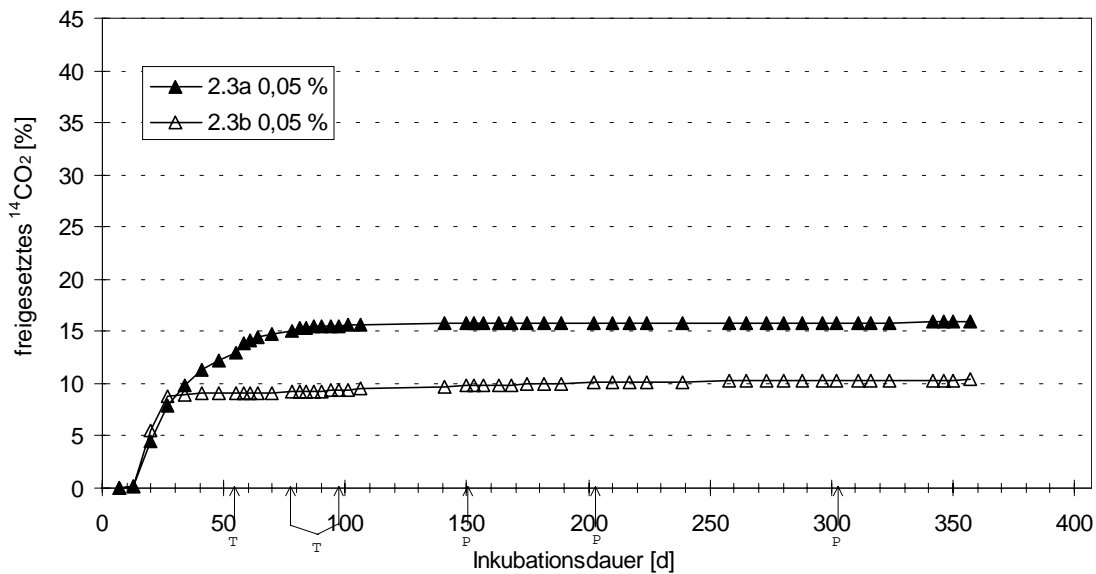
**Bild 3-50:** *Mischkultur MK IIIa:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow$   $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



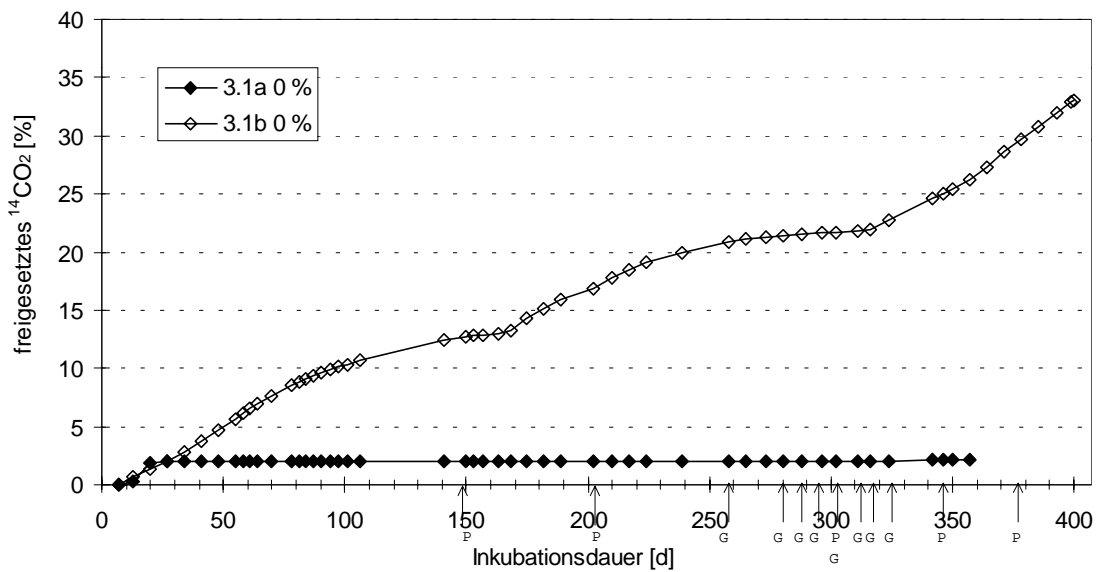
**Bild 3-51:** *Mischkultur MK IIIb:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose



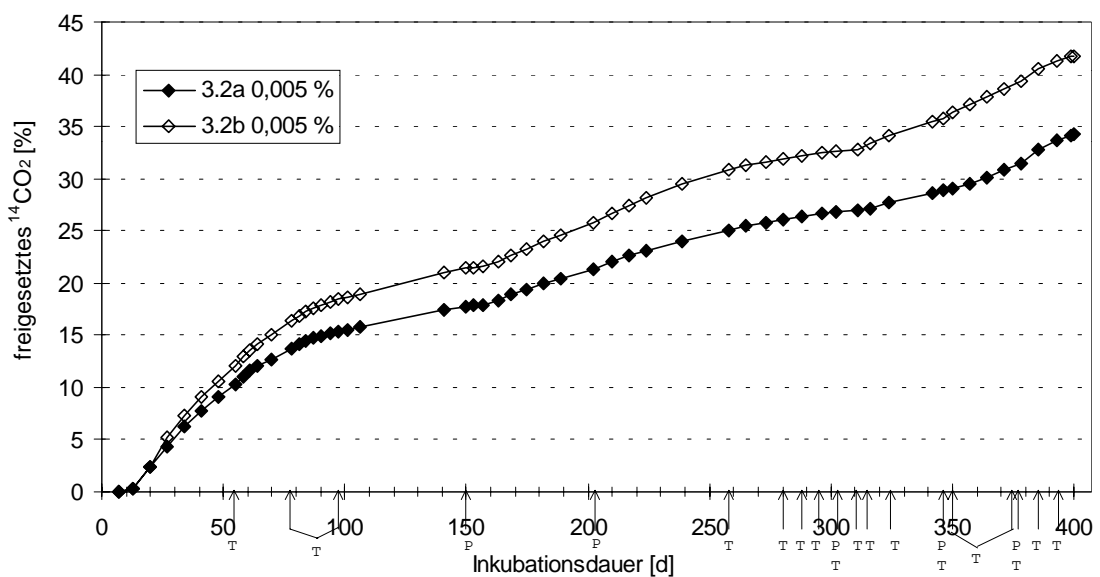
**Bild 3-52:** *Mischkultur MK IIIb:* Freigesetztes  $^{14}\text{C}$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



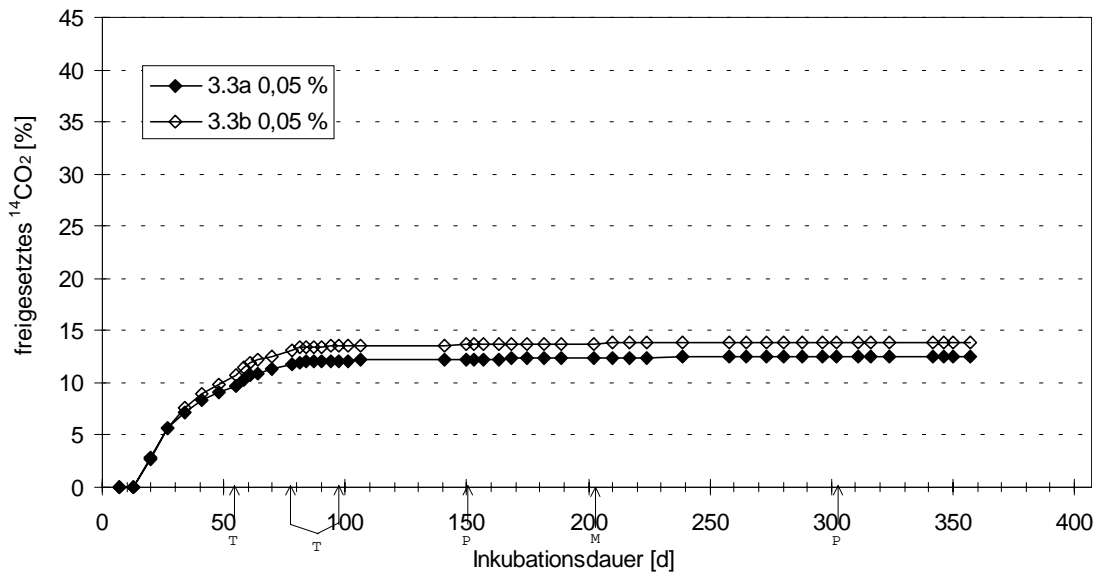
**Bild 3-53:** *Mischkultur MK IIIb:* Freigesetztes  $^{14}\text{C}$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



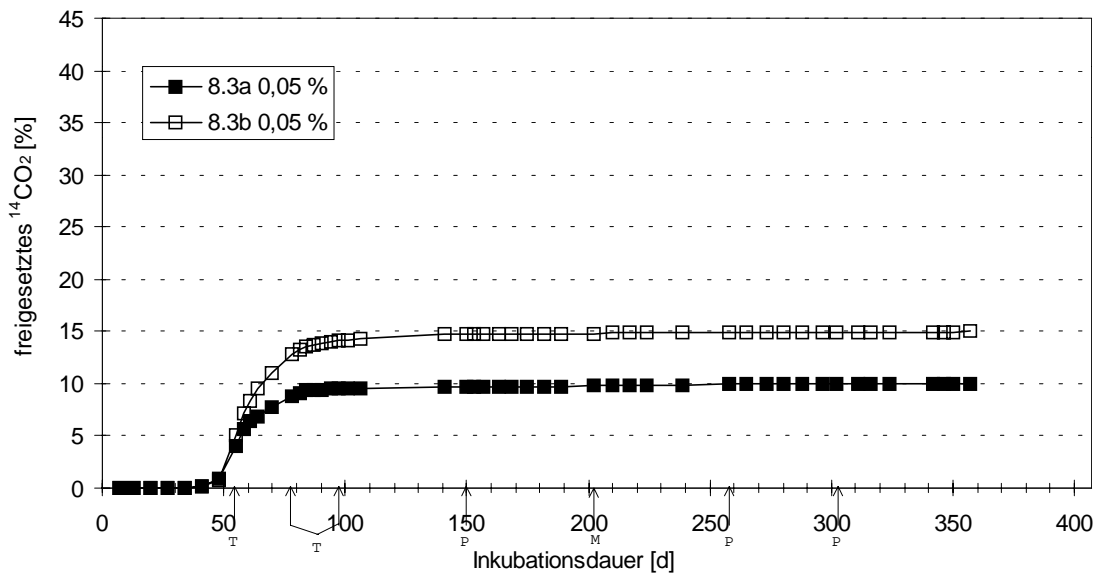
**Bild 3-54:** *Mischkultur MK IIIc:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose



**Bild 3-55:** *Mischkultur MK IIIc:* Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$   $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-56:** *Mischkultur MK IIIc: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow$   $\uparrow$  Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*



**Bild 3-57:** *Mischkultur MK IIIId: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow$ P: Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow$ M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow$   $\uparrow$  Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*

In der Versuchsreihe Biometer III zeigten jeweils die Parallelansätze eine vergleichbare Entwicklung bezüglich der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung, wenn auch die Absolutwerte z.T. voneinander abwichen. Eine Ausnahme hiervon machten Biometer 2.3b und 3.1a: bei diesen Ansätzen brach abrupt nach etwa 30 Inkubationstagen die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung nahezu völlig zusammen und war während der restlichen Inkubationszeit kaum noch nachweisbar.

Vergleicht man die Abbaupotentiale für Benzo[a]pyren der einzelnen Mischkulturen MK IIIa, MK IIIb und MK IIIc untereinander, so zeigen sich keine auffälligen Unterschiede in den jeweils gleich behandelten, aber anders beimpften Systemen. Bei den beiden Biometern, die mit der Mischkultur MK IIIc beimpft wurden, fällt jedoch eine mit etwa 40 Tagen ausgesprochen lang andauernde lag-Phase zu Inkubationsbeginn auf. Das Inokulum dieser Mischkultur wies zwar nur wenig geringere Keimzahlen als die der anderen Mischkulturen auf, es stammte jedoch aus einem wesentlich älteren Ansatz.

Der Tensidgehalt im Kulturmedium zu Beginn der Inkubation schien einen Einfluß auf die Länge der lag-Phase zu haben. Vergleicht man die Ansätze der Kulturen MK IIIa, MK IIIb und MK IIIc mit den unterschiedlichen Tensidgehalten untereinander, so findet sich in den Ansätzen mit 0,05 % Tensid erst nach etwa 2 oder 3 Wochen eine meßbare  $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung. In den Ansätzen mit weniger oder keinem Tensid im Medium ließ sich diese jedoch in der Regel bereits nach einer Woche feststellen. Wenn bei den Biometern mit hohem Tensidgehalt jedoch der Benzo[a]pyren-Umsatz eingesetzt hatte, so setzte sich dieser mit einer schnell steigenden Umsatzrate fort, so daß sich auf die lag-Phase zu Inkubationsbeginn eine steile exponentielle Phase anschloß. In den Ansätzen ohne Plantacare im Medium überwog jedoch – mit Ausnahme von Ansatz 1.1a – ein linearer Kurvenverlauf mit einer konstanten und stetigen Umsatzrate von Benzo[a]pyren. Die Biometerkolben mit 0,005 % Tensidgehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn könnte man vom Kurvenverlauf zwischen diesen beiden Typen einordnen.

Die einmalige Zugabe von Plantacare in die Kulturmedium der Biometer nach 55 Inkubationstagen bewirkte in den Ansätze mit 0,5 % Tensid eine leichte Steigerung der Benzo[a]pyren-Umsatzrate.

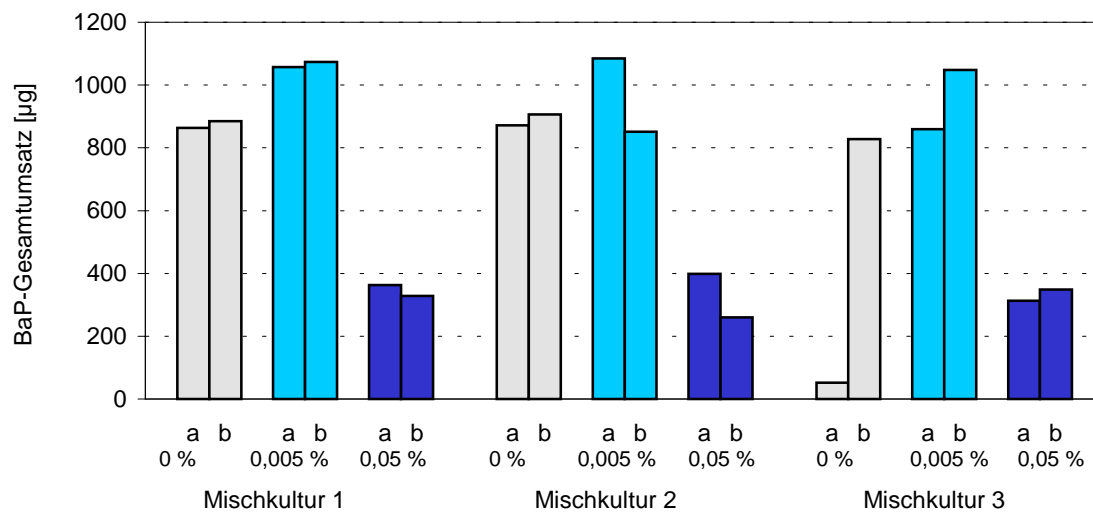
Vom 78. bis zum 97. Inkubationstag erfolgte insgesamt 7mal eine Zudosierung von Plantacare in die Ansätze mit 0,005 % und 0,05 % Tensidgehalt. In allen Ansätzen mit 0,05 % Tensidgehalt brach der Benzo[a]pyren-Umsatz während dieser Zeit völlig zusammen und war auch durch mehrmalige Zugabe des PAK-Gemischs oder von Mineralmedium während der restlichen Inkubationsdauer nicht mehr zu aktivieren.

In den Ansätzen mit 0,005 %igem Tensidgehalt wurde eine solche Phase der Dauertensidzugabe noch mehrmals wiederholt, in dieser Konzentrationsstufe ließ sich jedoch kein hemmender Effekt auf den Benzo[a]pyren-Abbau erkennen.

Das Zudotieren des PAK-Gemischs in die Kulturmedien der Ansätze ohne Tensid und mit 0,005 % Tensid bewirkte im allgemeinen immer einen Anstieg der Umsatzrate von Benzo[a]pyren.

Die Zugabe von Glucose ins Kulturmedium der Ansätze ohne Tensid beeinflusste die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung nicht. Erst bei ergänzender Supplementierung mit dem PAK-Spektrum ließ sich eine Erhöhung der Benzo[a]pyren-Umsatzes feststellen.

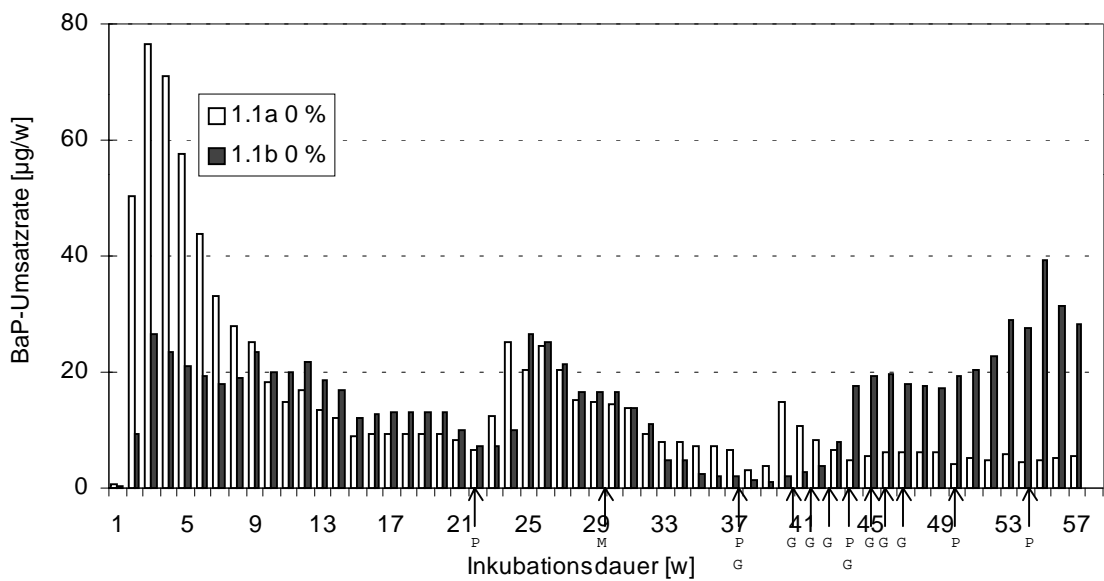
Vergleicht man die Höhe des Gesamtumsatzes an Benzo[a]pyren in den einzelnen Ansätzen am Ende der gesamten Inkubationszeit, so ergibt sich [Bild 3-58](#).



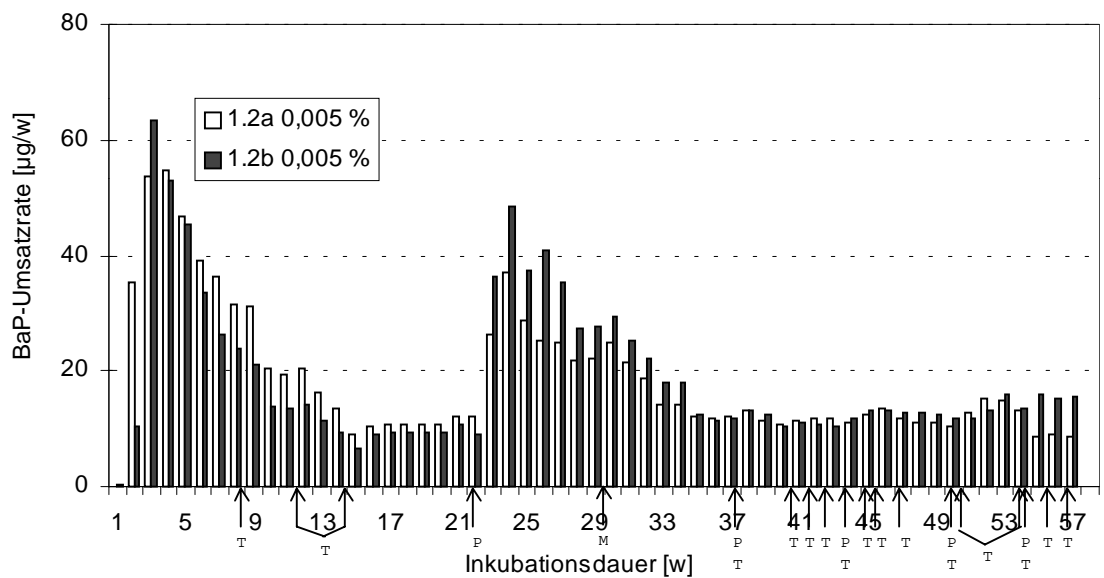
**Bild 3-58:** Vergleich des Gesamtumsatzes an Benzo[a]pyren in den einzelnen Ansätzen der Versuchsreihe Biometer III

Da in den Ansätzen mit 0,05 % Plantacare-Gehalt der Benzo[a]pyren-Umsatz nach etwa 80 Inkubationstagen zum Erliegen kam, beträgt dieser insgesamt weniger als die Hälfte des Umsatzes der anderen Ansätze. Vergleicht man die Ansätze ohne Plantacare und mit 0,005 % Plantacare, so findet sich kein signifikanter Unterschied, in der Tendenz waren jedoch die Umsatzraten der Ansätze mit Tensid höher.

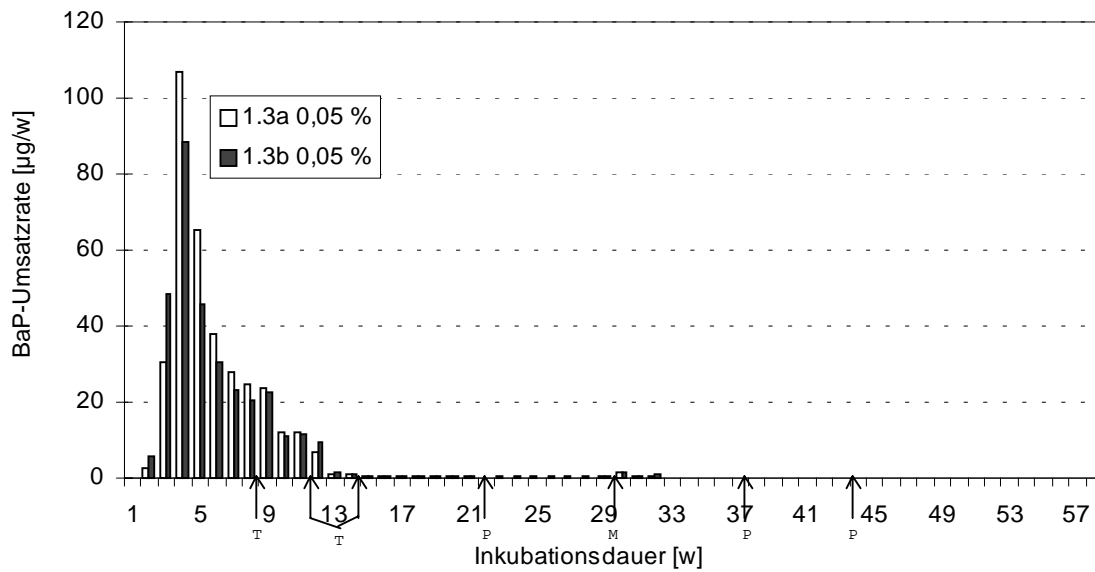
Berechnet man aus dem freigesetzten  $^{14}\text{CO}_2$  den durchschnittlichen täglichen Umsatz an Benzo[a]pyren und bildet dann daraus den Benzo[a]pyren-Umsatz in einer Inkubationswoche, so werden die Entwicklungsphasen der einzelnen Biometer und die Einflüsse der Zugaben besonders deutlich (s. [Bild 3-59](#) bis [Bild 3-68](#)).



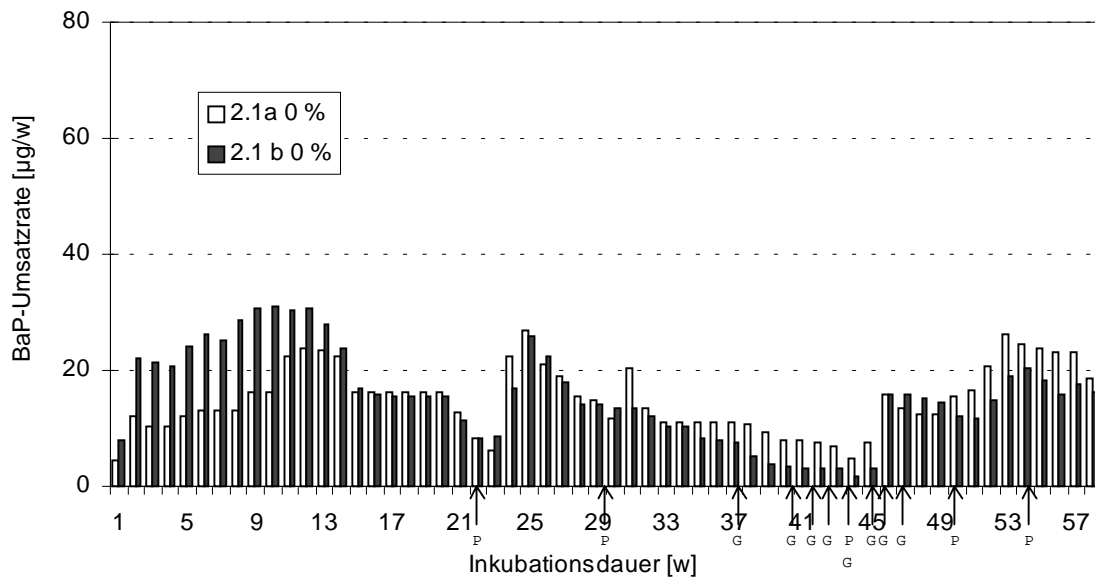
**Bild 3-59:** *Mischkultur MK IIIa:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↑M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose



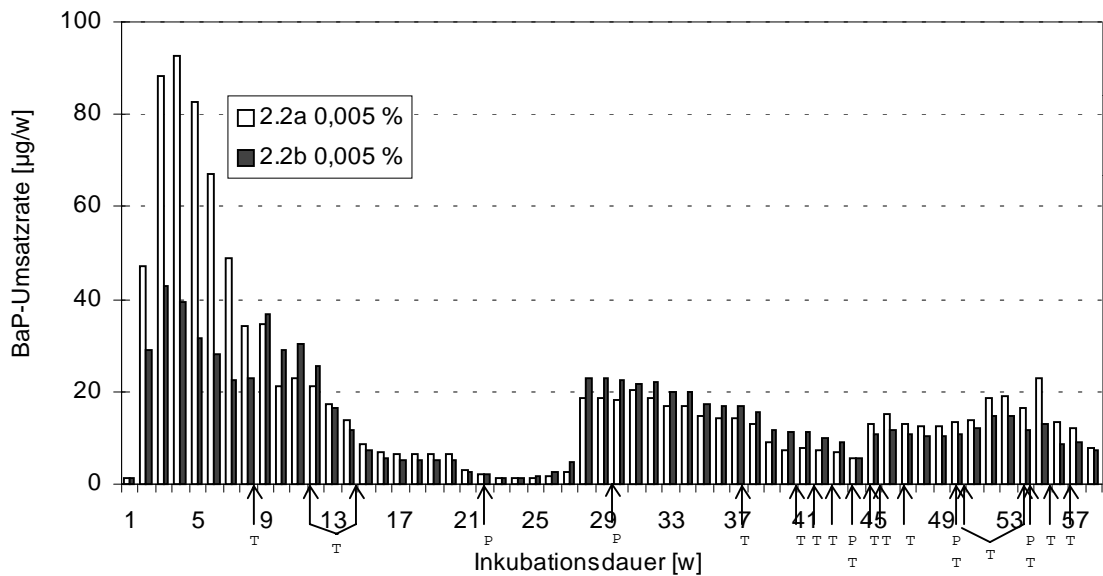
**Bild 3-60:** *Mischkultur MK IIIa:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



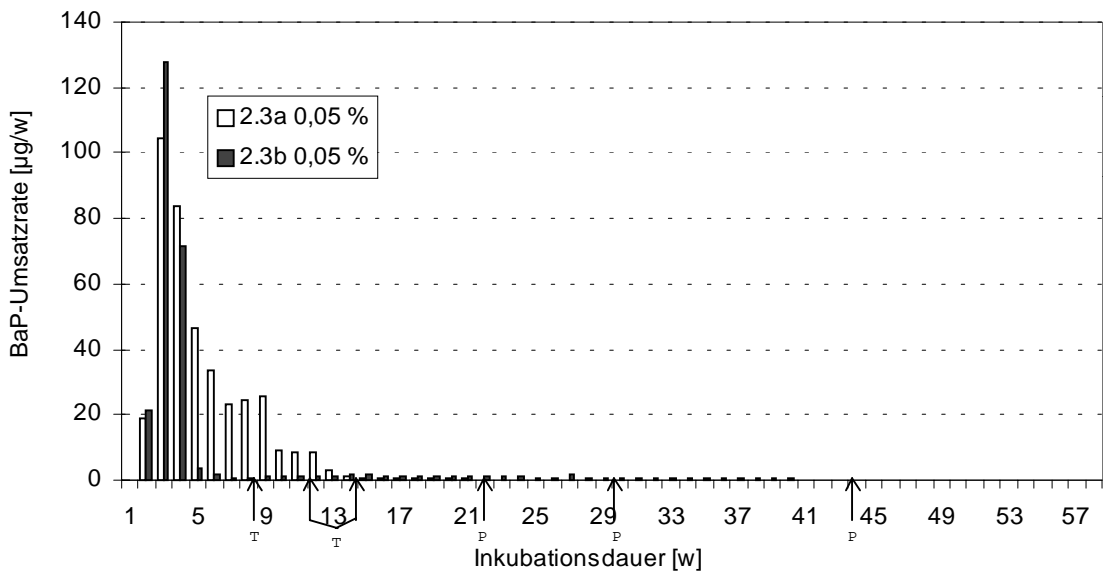
**Bild 3-61:** *Mischkultur MK IIIa:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



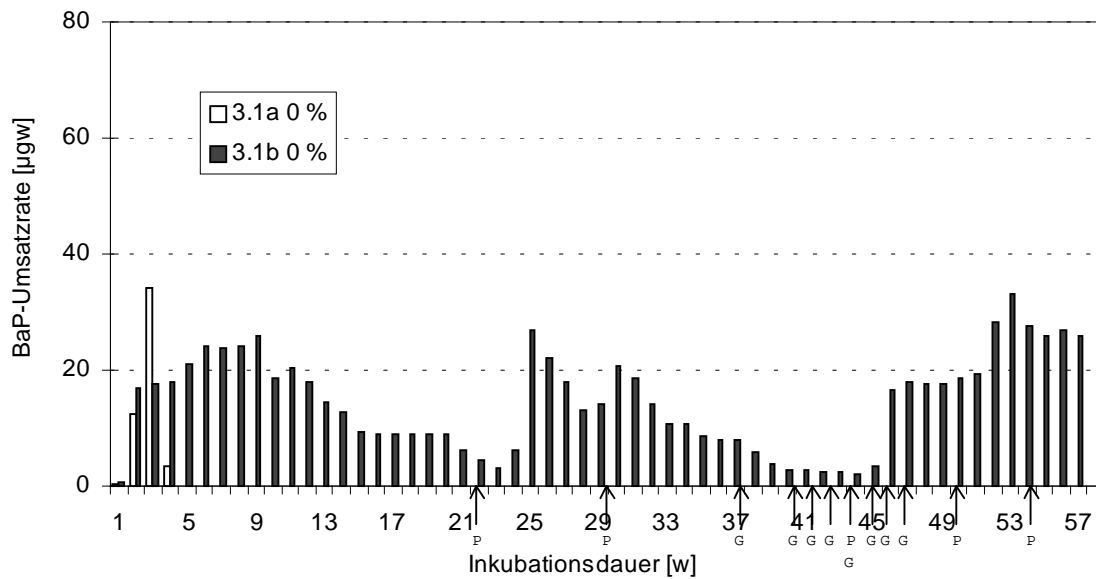
**Bild 3-62:** *Mischkultur MK IIIb:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose



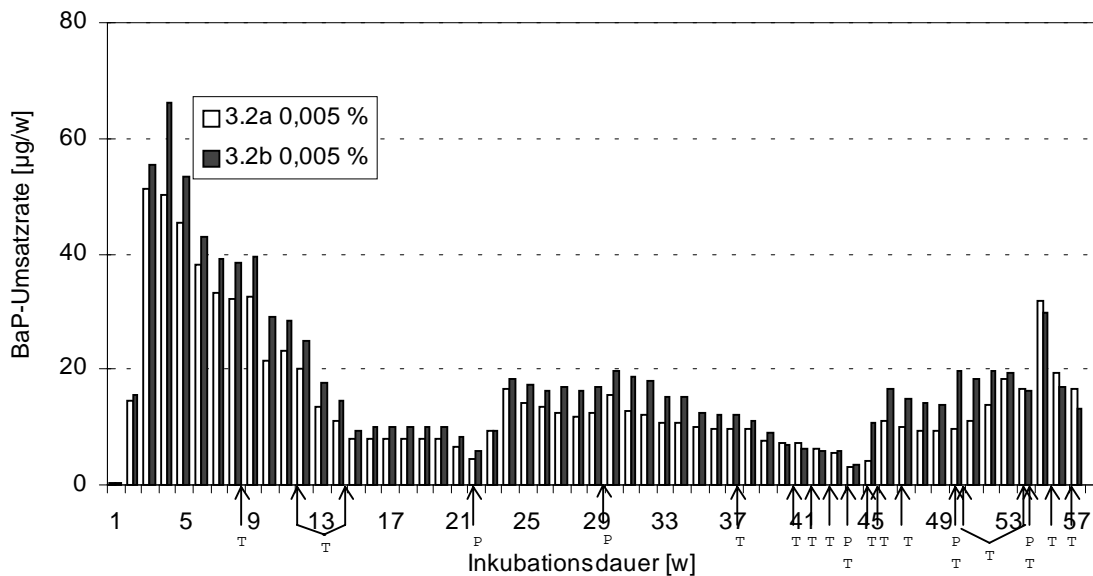
**Bild 3-63:** *Mischkultur MK IIIb:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



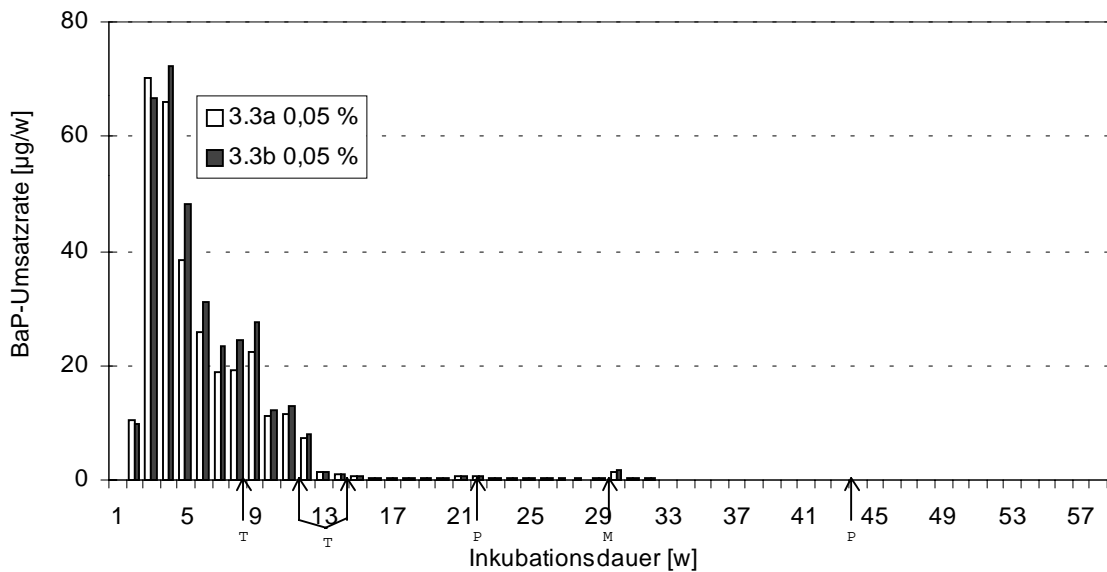
**Bild 3-64:** *Mischkultur MK IIIb:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen, und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



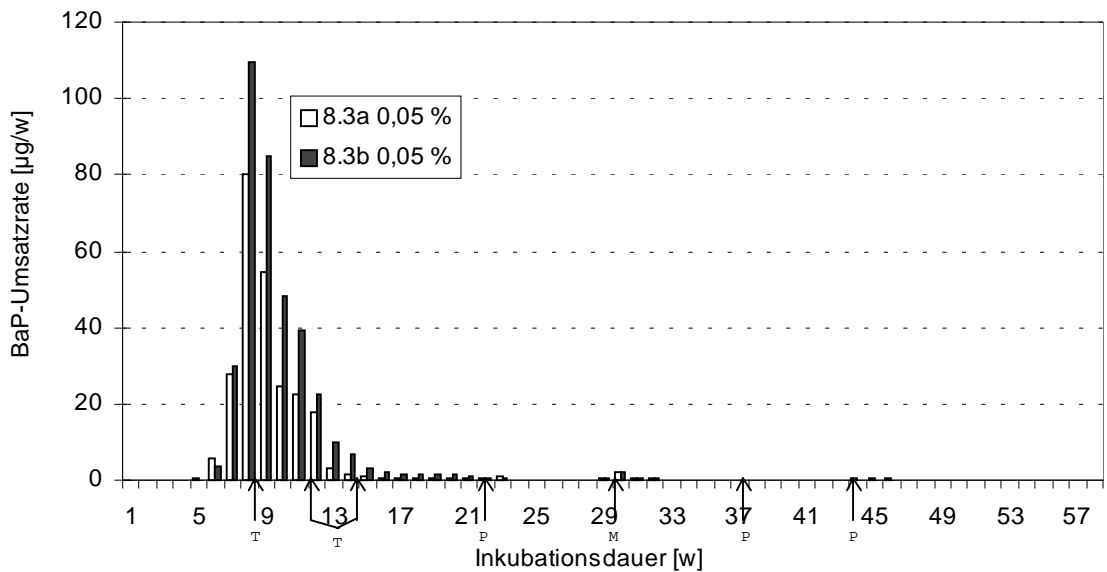
**Bild 3-65:** *Mischkultur MK IIIc:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose



**Bild 3-66:** *Mischkultur MK IIIc:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-67:** *Mischkultur MK IIIc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↑M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium, ↗ ↗: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*



**ild 3-68:** *Mischkultur MK IIIId: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↑M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium, ↗ ↗: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*

Vergleicht man die Ansätze der verschiedenen Mischkulturen mit dem jeweils gleichen Plantacare-Gehalt untereinander, so ergibt sich ein recht einheitliches Bild, aus dem sich einige Grundsätzlichkeiten ableiten lassen.

Je höher der Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn war, desto steiler war die folgende exponentielle Phase des Benzo[a]pyren-Umsatzes. Bei den drei Ansätzen einer Mischkultur zeigte immer der Ansatz mit 0,05 % Plantacare den maximalen wöchentlichen Benzo[a]pyren-Umsatz in dieser Anfangsphase, dieser lag im Schnitt mit Werten von 70 bis 130 µg etwa doppelt so hoch wie das Umsatzmaximum der Ansätze ohne Tensid (24 bis 80 µg).

In der Höhe der Umsatzraten folgten darauf dicht die der Ansätze mit 0,005 % Plantacare, die geringsten Umsatzraten besaßen – mit Ausnahme von 1.1a – die Biometer ohne Tensid.

Die Wirkung der Dauerzugabe von Tensid in der höheren Konzentration auf die wöchentliche Umsatzrate von Benzo[a]pyren wird bei dieser Art der Darstellung gut erkennbar. In den Inkubationswochen 11 bis 14 erfolgte in 3 bzw. 4tägigem Abstand eine Zugabe von jeweils 27,5 mg Plantacare ins Kulturmedium der Biometer 1.3, 2.3, 3.3 und 8.3. Nach der zweiten Zugabe brach in all diesen Ansätzen die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung zusammen. Danach lag die Menge an aufgefangenem  $^{14}\text{CO}_2$  nur noch knapp oberhalb der Nachweisgrenze oder war nicht mehr nachweisbar.

Die Dauerzugabe von Plantacare in der zehnfach niedrigeren Konzentration in den Ansätzen 1.2, 2.2 und 3.2 hatte – im Vergleich zu den Ansätzen ohne Tensid – keine erkennbare Wirkung. Da die Tensidzugabe von vornherein in eine Phase sinkender Benzo[a]pyren-Umsatzraten fiel, schien das Tensid in dieser Konzentration keinen Effekt – auch keinen fördernden – auf den Benzo[a]pyren-Umsatz zu haben. Ein Grund für diese Beobachtung könnte ein Mangel an C-Quellen im Form der 3- und 4-Ring PAK gewesen sein. Da der Abbau von Benzo[a]pyren nur cometabolisch durchgeführt wurde und das Tensid kein geeignetes Cosubstrat dafür war, sanken die Benzo[a]pyren-Umsatzraten.

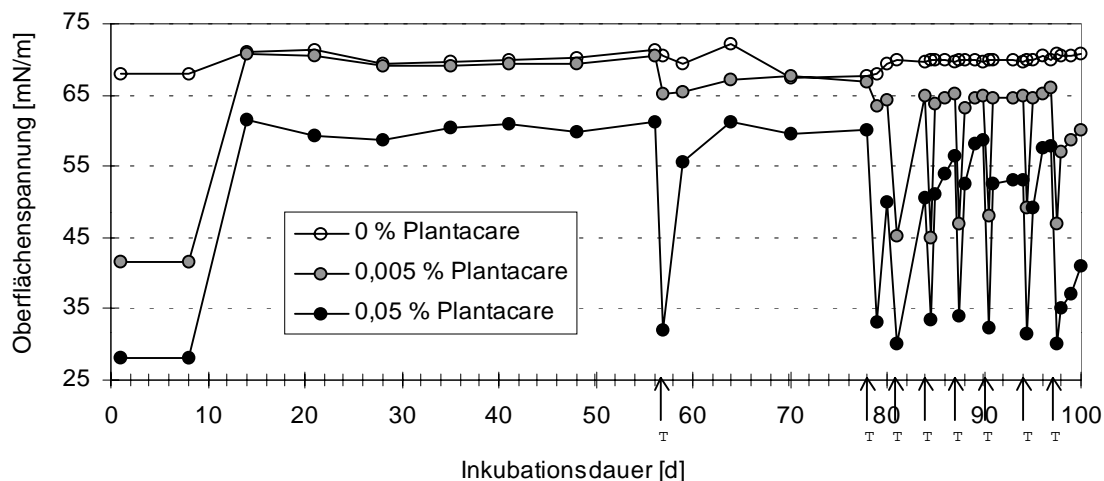
Vergleicht man den weiteren Kurvenverlauf der Ansätze ohne Tensid mit den Ansätzen mit geringer Tensidkonzentration, so zeigen sich in der Tendenz übereinstimmende wöchentliche Umsatzraten für Benzo[a]pyren.

Die Zugabe von Glucose in den Biometern der Ansätze 1.1, 2.1 und 3.1 während der Inkubationswochen 40 bis 47 bewirkte, ebenso wie die vergleichbare Zugabe von Tensid in die Biometer der Ansätze 1.2, 2.2 und 3.2, keine eindeutige Veränderung des Benzo[a]pyren-Umsatzes. Wahrscheinlich ist Glucose, ähnlich wie Plantacare, kein geeignetes Cosubstrat für den Benzo[a]pyren-Abbau.

Übereinstimmend läßt sich jedoch für alle Biometer der positive Effekt der Zugaben von PAK erkennen. Diese bewirkten fast immer einen mehr oder weniger intensiven Anstieg des Benzo[a]pyren-Umsatzes.

### 3.7.4.5 Entwicklung der Oberflächenspannung

In den ersten 100 Inkubationstagen wurde in den Erlenmeyerkolben, die als nicht radioaktive Parallelen zu den Biometerkolben mitgeführt wurden, regelmäßig die Oberflächenspannung des Kulturmediums bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen in den 6 Erlenmeyerkolben mit gleicher Plantacare-Konzentration wurden gemittelt und im [Bild 3-69](#) grafisch dargestellt.



**Bild 3-69:** Entwicklung der Oberflächenspannung in den Kulturmedien des Begleitversuchs zu der Versuchsreihe Biometer III,  $\uparrow$ T: Zugabe von Plantacare ins Kulturmedium: Einstellen der Plantacare-Gehalte vom Inkubationsbeginn

Es wird deutlich, daß das Tensid Plantacare im Kulturmedium rasch abgebaut wurde und daher immer nur eine kurze Zeit nach der Zugabe seine Funktion als Tensid erfüllen konnte. Zu Inkubationsbeginn setzte nach 8 Inkubationstagen ein zügiger Plantacare-Abbau ein, nach längerer Inkubation erfolgte dieser schneller. Die Oberflächenspannung in den Kolben mit Tensid erreichte zwar bei den Kolben mit 0,05 % Plantacare nicht mehr den Wert der Kolben ohne Tensid und auch die Ansätze mit 0,005 % Plantacare besaßen nach der zweiten Tensid-Zugabe eine verringerte Oberflächenspannung, doch die Absenkung der Oberflächenspannung auf das gewünschte Level, das dem prozentualen Gehalt des Tensids im Kulturmedium entspricht, wurde immer nur kurzfristig erreicht.

Mehrere Messungen der Oberflächenspannung in den Kulturmedien der radioaktiven Biometeransätze bestätigten die Werte, die in den Parallelen ermittelt wurden. Im Ansatz 2.3b, der nach 34 Tagen Inkubation kaum noch biologische Aktivität aufwies, blieb der Wert für die Oberflächenspannung nach der ersten Zugabe von Tensid auf einem Wert um 30 mN/m konstant.

### 3.7.4.6 Keimzahlbestimmung

Nach 54 Tagen Inkubationszeit wurden in allen Ansätzen die Lebendkeimzahlen bestimmt. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 3-18](#) aufgelistet.

**Tabelle 3-18:** Lebendkeimzahl im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 54 Tagen Inkubation

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml
1.1a	0	$6,4 \cdot 10^7$
1.1b	0	$1,24 \cdot 10^8$
1.2a	0,005	$1,54 \cdot 10^8$
1.2b	0,005	$1,48 \cdot 10^8$
1.3a	0,05	$3,3 \cdot 10^8$
1.3b	0,05	$3,4 \cdot 10^8$
2.1a	0	$1,44 \cdot 10^6$
2.1b	0	$1,84 \cdot 10^6$
2.2a	0,005	$1,56 \cdot 10^8$
2.2b	0,005	$2,7 \cdot 10^8$
2.3a	0,05	$3,4 \cdot 10^8$
2.3b	0,05	$< 10^5$
3.1a	0	$< 10^4$
3.1b	0	$1,8 \cdot 10^8$
3.2a	0,005	$3,2 \cdot 10^8$
3.2b	0,005	$1,6 \cdot 10^8$
3.3a	0,05	$4,0 \cdot 10^8$
3.3b	0,05	$3,8 \cdot 10^8$
8.3a	0,05	$6,9 \cdot 10^7$
8.3b	0,05	$1,0 \cdot 10^8$

In den Ansätzen 2.3b und 3.1a ließen sich in den niedrigsten Verdünnungsstufen von  $10^3$  bzw.  $10^4$ , die ausplattiert wurden, keine Keime nachweisen.

Mit steigendem Tensidgehalt im Kulturmedium stiegen in der Regel die Lebendkeimzahlen. Die Keimzahlen in den Ansätzen mit 0,05 % Plantacare waren immer mindestens doppelt so hoch wie die der entsprechenden Ansätze ohne Tensid. Eine Ausnahme hiervon bildete nur Ansatz 3.1b.

Nach 148 Inkubationstagen wurde erneut eine Lebendkeimzahlbestimmung in allen Ansätzen der Versuchsreihe Biometer III durchgeführt und die Kolonien den Typen der [Tabelle 3-3](#) zugeordnet. Die Ergebnisse können der [Tabelle 3-19](#) entnommen werden.

**Tabelle 3-19:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 148 Tagen Inkubation

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]			
			1	2	3	6
1.1a	0	9,5*10 <sup>7</sup>	85	10	5	n.n.
1.1b	0	5,7*10 <sup>7</sup>	65	30	5	n.n.
1.2a	0,005	1,12*10 <sup>8</sup>	63	30	7	n.n.
1.2b	0,005	8,8*10 <sup>7</sup>	18	74	8	n.n.
1.3a	0,05	8,8*10 <sup>6</sup>	93	7	n.n.	n.n.
1.3b	0,05	1,17*10 <sup>7</sup>	92	8	n.n.	n.n.
2.1a	0	3,4*10 <sup>7</sup>	18	4	2	76
2.1b	0	4,7*10 <sup>7</sup>	17	6	4	73
2.2a	0,005	1,46*10 <sup>8</sup>	7	39	5	49
2.2b	0,005	1,38*10 <sup>8</sup>	3	47	6	44
2.3a	0,05	9,6*10 <sup>6</sup>	59	30	11	n.n.
2.3b	0,05	< 10 <sup>2</sup>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3.1a	0	7,7*10 <sup>3</sup>	16	84	n.n.	n.n.
3.1b	0	4,8*10 <sup>7</sup>	15	82	3	n.n.
3.2a	0,005	1,09*10 <sup>8</sup>	34	66	n.n.	n.n.
3.2b	0,005	1,45*10 <sup>8</sup>	7	93	n.n.	n.n.
3.3a	0,05	3,3*10 <sup>8</sup>	15	84	1	n.n.
3.3b	0,05	2,9*10 <sup>8</sup>	24	73	3	n.n.
8.3a	0,05	6,0*10 <sup>6</sup>	35	65	n.n.	n.n.
8.3b	0,05	1,09*10 <sup>7</sup>	38	62	n.n.	n.n.

*n.n.: nicht nachweisbar*

Zum Zeitpunkt dieser Keimzahlbestimmung befanden sich alle Biometer in einer stagnierenden Phase des Benzo[a]pyren-Umsatzes. In den 94 Inkubationstagen, die zwischen dieser Keimzahlermittlung und der letzten Bestimmung am 54. Inkubationstag

lagen, wurde in die Ansätze mit Tensid mehrmals Plantacare nachdosiert. In die Ansätze ohne Tensid wurde nicht eingegriffen.

Im Vergleich der Keimzahlbestimmungen nach 54 und nach 148 Inkubationstagen waren die Keimzahlen in fast allen Biometern gesunken. Im Ansatz 1.1a hingegen waren sie leicht angestiegen, in den Ansätzen 2.1a und 2.1b fand sogar eine drastische Steigerung etwa um den Faktor 25 statt.

In allen Biometern – mit Ausnahme der Ansätze 3.3 – mit hohem Plantacare-Gehalt fand eine deutliche Reduzierung der Keimzahlen statt.

Besonders stark gesunken sind die Keimzahlen in den Ansätzen 1.3a, 1.3b und 2.3a. Die Bakterienzahl reduzierte sich hier im Mittel um den Faktor 34. In den Biometern 8.3a und 8.3b sank die Zahl der Keime etwa um das 12fache.

In den anderen Biometern fanden nur geringfügige Veränderungen der Keimzahlen statt.

Vergleicht man die Zusammensetzung der Bakterientypen in den einzelnen Ansätzen, so ergibt sich kein einheitliches Bild. Die Typen, die sich zu Inkubationsbeginn im Inokulum fanden (s. [Tabelle 3-17](#)), haben sich im allgemeinen in den Kulturen gehalten, es gab jedoch Verschiebungen bezüglich der prozentualen Anteile.

In den Biometern der Ansätze 2.1 und 2.2 konnte sich Art 6 durchsetzen und bildete nach 148 Tagen dort den größten Anteil der Mischpopulation.

Nach weiteren 51 Tagen wurde am Inkubationstag 199 eine weitere Lebendkeimzahlbestimmung in allen Ansätzen der Versuchsreihe Biometer III durchgeführt. Die Kolonien wurden den Typen der [Tabelle 3-3](#) zugeordnet. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 3-20](#) aufgeführt.

**Tabelle 3-20:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 199 Tagen Inkubation

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]			
			1	2	3	6
1.1a	0	$1,3 \cdot 10^8$	55	18	27	n.n.
1.1b	0	$6,9 \cdot 10^7$	41	18	41	n.n.
1.2a	0,005	$1,6 \cdot 10^8$	49	41	10	n.n.
1.2b	0,005	$1,1 \cdot 10^8$	48	30	22	n.n.
1.3a	0,05	$6,1 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.
1.3b	0,05	$3,2 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.

(wird fortgesetzt)

**Tabelle3-20** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	KBE/ml	Typen [%]			
			1	2	3	6
2.1a	0	$2,5 \cdot 10^8$	9	51	17	23
2.1b	0	$7,4 \cdot 10^7$	15	17	8	60
2.2a	0,005	$4,0 \cdot 10^7$	32	40	16	12
2.2b	0,005	$1,2 \cdot 10^8$	47	37	8	8
2.3a	0,05	$4,6 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.
2.3b	0,05	$< 10^2$	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3.1a	0	$7,0 \cdot 10^3$	100	n.n.	n.n.	n.n.
3.1b	0	$7,5 \cdot 10^7$	43	36	21	n.n.
3.2a	0,005	$1,6 \cdot 10^8$	50	45	n.n.	5
3.2b	0,005	$7,2 \cdot 10^7$	56	8	19	17
3.3a	0,05	$3,2 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.
3.3b	0,05	$3,8 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.
8.3a	0,05	$3,4 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.
8.3b	0,05	$4,5 \cdot 10^5$	100	n.n.	n.n.	n.n.

*n.n.: nicht nachweisbar*

Zwischen dieser Keimzahlbestimmung in der 28. und der vorherigen in der 21. Inkubationswoche lag eine Zugabe von PAK in das Kulturmedium aller Biometer in der Inkubationswoche 22.

Mit Ausnahme von Ansatz 3.1a und aller Biometer mit der höheren Plantacare-Konzentration im Medium ließ sich in allen Ansätzen ein Benzo[a]pyren-Umsatz nachweisen.

Im Vergleich der beiden Keimzahlbestimmungen blieben die Keimzahlen in fast allen Biometern in etwa der gleichen Größenordnung. Nur in den Ansätzen mit Tensid sanken sie erneut etwa im Mittel um den Faktor 20.

Bei der Zusammensetzung der Bakterientypen in den Mischpopulationen haben sich Verschiebungen ergeben. In fast allen Biometern dominierten die Typen 1,2 und 3, in Ansatz 2.1 und 2.2 kam noch Typ 6 dazu. In den Ansätzen mit dem hohem Tensidgehalt bestand die kultivierbare Population anscheinend nur noch aus Typ 1.

Nach 258 Tagen (etwa 40 Wochen) Gesamtinkubationszeit wurden erneut in allen Ansätzen die Lebendkeimzahlen bestimmt. Die Ergebnisse sind der [Tabelle 3-21](#) zu entnehmen.

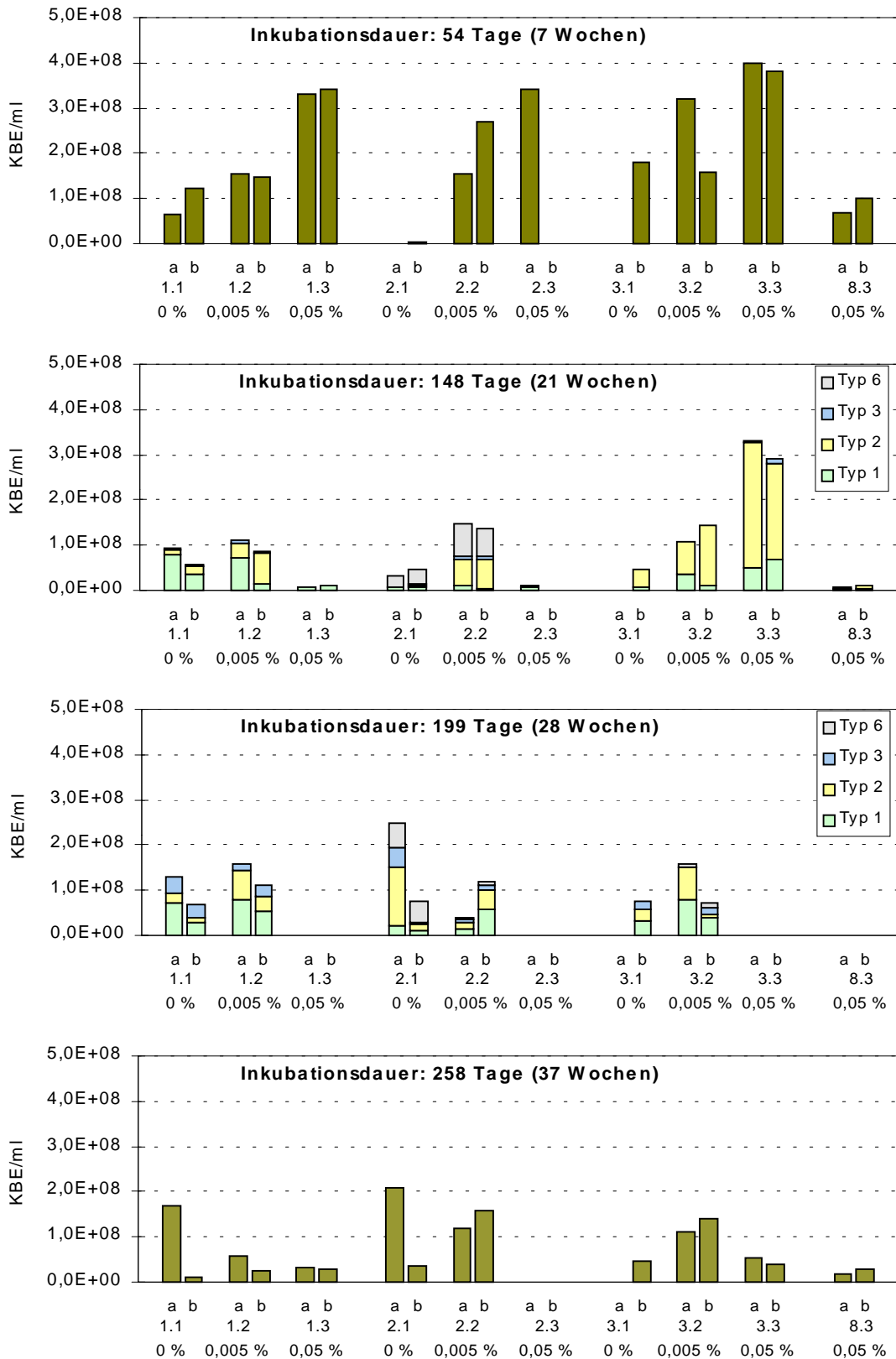
**Tabelle 3-21:** Lebendkeimzahl im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 258 Tagen Inkubation

Ansatz	Plantacare-Gehalt [%]	KBE/ml
1.1a	0	$1,7 \cdot 10^8$
1.1b	0	$9,5 \cdot 10^6$
1.2a	0,005	$5,7 \cdot 10^7$
1.2b	0,005	$2,6 \cdot 10^7$
1.3a	0,05	$3,2 \cdot 10^7$
1.3b	0,05	$2,7 \cdot 10^7$
2.1a	0	$2,1 \cdot 10^8$
2.1b	0	$3,6 \cdot 10^7$
2.2a	0,005	$1,2 \cdot 10^8$
2.2b	0,005	$1,6 \cdot 10^8$
2.3a	0,05	$1,3 \cdot 10^4$
2.3b	0,05	$< 10^2$
3.1a	0	$4,7 \cdot 10^3$
3.1b	0	$4,8 \cdot 10^7$
3.2a	0,005	$1,1 \cdot 10^8$
3.2b	0,005	$1,4 \cdot 10^8$
3.3a	0,05	$5,4 \cdot 10^7$
3.3b	0,05	$3,8 \cdot 10^7$
8.3a	0,05	$1,97 \cdot 10^7$
8.3b	0,05	$2,9 \cdot 10^7$

Die Lebendkeimzahlbestimmung in der 37. Inkubationswoche fiel bei allen noch aktiven Ansätzen in eine Phase mit sinkendem Benzo[a]pyren-Umsatz. Im Vergleich zur vorhergehenden KBE-Bestimmung in der 29. Inkubationswoche sind die Lebendkeimzahlen im etwa gleichen Bereich geblieben.

Auffällig hingegen waren die Veränderungen der Keimzahlen in den Biometern mit 0,05 % Plantacare im Medium, die schon seit etwa 23 Wochen nur noch eine kaum meßbare  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aufwiesen. Bei den Ansätzen 1.3, 3.3 und 8.3 waren die Keimzahlen erheblich angestiegen, sie hatten sich um mehr als den Faktor 50 vervielfacht. Bei dem Ansatz 2.3a hingegen hatte sich die Keimzahl um den Faktor 35 reduziert. Im Unterschied zu den anderen Ansätzen mit 0,05 % Plantacare wurde im Ansatz 2.3 in der 29 Inkubationswoche kein frisches Nährmedium hinzugegeben, sondern statt dessen PAK.

Der Anstieg der Keimzahlen in den Ansätzen 1.3, 3.3 und 8.3 kann daher auf den positiven Einfluß der Zugabe von Mineralmedium zurückgeführt werden.



**Bild 3-70:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der prozentualen Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation

Das [Bild 3-70](#) faßt die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen und der Zusammensetzung der Bakterientypen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation zusammen.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Supplementierung der Biometer mit PAK, Tensid oder Mineralmedium lassen sich durch den Vergleich der Keimzahlentwicklungen einige grundsätzliche Beobachtungen ableiten.

In den Ansätzen mit 0,05 % Tensid waren die Keimzahlen zu Inkubationsbeginn am höchsten. Dies spricht für eine Verwertung des Plantacare als C- und Energiequelle, wodurch dann zwar der Benzo[a]pyren-Abbau verspätet einsetzt, doch dafür mit hohen Umsatzraten.

Das häufige Dotieren höherer Tensidmengen führte zu einem Zusammenbrechen der Keimzahlen. Verdünnte man die Tensidkonzentration des Kulturmediums mit Mineralmedium, so erholten sich die Mischkulturen, die Keimzahlen stiegen wieder an. Diese Reaktion läßt entweder toxische Effekte des Plantacares vermuten, die durch eine Verdünnung aufgehoben werden oder aber einen Mangel an Mineralsalzen, Spurenelementen oder Vitaminen, welcher durch die Zugabe von frischem Mineralmedium ausgeglichen wurde.

Obwohl sich die Keimzahlen wieder erholten, setzte keine erneute Verwertung von Benzo[a]pyren ein. Dieses spricht dafür, daß die Mikroorganismen zwar das Tensid verwerteten, aber nicht das Benzo[a]pyren. Die Mikroorganismenpopulation hatte möglicherweise die Fähigkeit zum Abbau von Benzo[a]pyren verloren.

Die mehrmalige Zugabe geringerer Tensidkonzentrationen hatte keinen erkennbaren Effekt auf die Keimzahlen der Mischkulturen.

Vergleicht man die Keimzahlen mit dem Benzo[a]pyren-Umsatz zum Zeitpunkt der KBE-Bestimmung, so findet sich keine Korrelation. Die höchsten Umsatzraten der gesamten Versuchsreihe fanden sich im Ansatz 8.3 in der 7. Inkubationswoche, die Keimzahlen waren jedoch im Vergleich zu den anderen Ansätzen eher gering.

#### 3.7.4.7 Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium

Vor Beginn der Extraktion wurde die Oberflächenspannung des Kulturmediums gemessen und die gelöste Menge an Radioaktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in [Tabelle 3-22](#) aufgeführt.

**Tabelle 3-22:** Oberflächenspannung des Kulturmediums und gelöste Radioaktivität am Ende der Inkubation, Versuchsreihe Biometer III

Ansatz	Plantacare [%]	Oberflächenspannung [mN/m]	gelöstes <sup>14</sup> C [%]	gelöstes <sup>14</sup> C <sup>a</sup> [µg/ml]
1.1a	0	72,0	4,80	0,77
1.1b	0	69,8	5,46	0,81
1.2a	0,005	55,9	7,69	1,00
1.2b	0,005	55,7	7,71	1,02
1.3a	0,05	52,5	2,95	0,63
1.3b	0,05	52,7	2,47	0,50
2.1a	0	70,8	5,46	1,21
2.1b	0	69,8	5,25	1,12
2.2a	0,005	57,8	8,00	1,55
2.2b	0,005	56,7	6,01	1,31
2.3a	0,05	51,0	2,71	0,88
2.3b	0,05	34,3	11,27	3,92
3.1a	0	65,5	1,59	0,57
3.1b	0	68,8	5,07	1,14
3.2a	0,005	55,4	5,50	1,19
3.2b	0,005	56,0	8,29	1,58
3.3a	0,05	55,7	2,43	0,51
3.3b	0,05	55,3	4,25	0,77
8.3a	0,05	52,6	5,91	1,89
8.3b	0,05	50,2	3,78	0,49
K1 <sup>b</sup>	0	71,3	0,49	0,27
K2 <sup>b</sup>	0,05	34,33	5,22	3,55

<sup>a</sup>berechnet als <sup>14</sup>C-Benz[a]pyren<sup>b</sup>Sterilkontrollen

Bei dem Vergleich der gemessenen Oberflächenspannungen und den Mengen an gelöster Radioaktivität in den einzelnen Kulturmedien sind die Biometer 2.3b und 3.1a besonders zu betrachten, da bei diesen beiden Biometern nach etwa 30 Inkubationstagen

die bakterielle Aktivität zusammengebrochen war und sich während des gesamten Inkubationszeitraums nicht mehr erholt hatte.

Dieses erklärt den niedrigen Wert der Oberflächenspannung von 34,4 mN/m im Ansatz 2.3b. Das Fehlen der mikrobiellen Aktivität im Kulturmedium hatte die Plantacare-Konzentration hoch gehalten, daher fand sich in diesem Ansatz auch über 10 % der noch im Medium vorhandenen Radioaktivität im Kulturmedium gelöst. Die niedrige Oberflächenspannung dieses Ansatzes entspricht dem Wert in der Sterilkontrolle K2. Bei beiden Ansätzen liegt die Oberflächenspannung im Bereich der CMC.

Vergleicht man die aktiven Ansätze untereinander, so fällt auf, daß die Werte der Oberflächenspannungen mit steigendem Tensidgehalt abnahmen. Die Ansätze ohne Plantacare-Zugabe ins Medium besaßen im Mittel den Wert 70 mN/m, Ansätze mit 0,005 % einen Mittelwert von 56,3 mN/m und die Kulturmedien der Ansätze mit 0,05 % Plantacare ein Mittel von 52,6 mN/m.

Das Tensid unterlag in allen aktiven Ansätzen einem Abbau. Bei den Ansätzen mit 0,05 % Tensid erfolgten die letzten Tensidzugaben in den Wochen 11 bis 14, dort wurde das Medium im Abstand von 3 bis 4 Tagen mit jeweils 27,5 mg Plantacare beaufschlagt. In den Ansätzen mit 0,005 % Tensid wurde bis zum Ende der Inkubation immer wieder Plantacare ins Kulturmedium gegeben, bei den Ansätzen 1.2 und 3.2 zuletzt eine Woche vor Beginn der Aufarbeitung, beim Ansatz 2.2 zwei Wochen zuvor. Die etwas höheren Werte der Oberflächenspannung in Ansatz 2.2 beweisen den fortgeschritteneren Tensidabbau während der um eine Woche längeren Inkubationszeit.

Die gemessenen Werte der Oberflächenspannung und die gelöste Menge an  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanz im Kulturmedium eines Ansatzes korrelieren nicht miteinander. In den Ansätzen mit 0,005 % Plantacare waren im Mittel die höchsten Mengen an  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanz solubilisiert, gefolgt von den Ansätzen ohne Plantacare im Medium. Die geringsten Mengen an gelöster  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanz fanden sich in der Regel in den mit 0,05 % Plantacare behandelten Ansätzen.

Hingegen läßt sich eine deutliche Korrelation zwischen der gelösten Radioaktivität und der Umsatzaktivität für Benzo[a]pyren feststellen. In den Kulturmedien der Ansätze mit dem höchsten  $^{14}\text{CO}_2$ -Ausstoß fanden sich die höchsten Mengen an gelöster  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanz. Dieses ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß es sich bei der gelösten Radioaktivität um  $^{14}\text{C}$ -markierte Benzo[a]pyren-Metaboliten handelte.

#### 3.7.4.8 pH-Wert im Kulturmedium

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die pH-Werte im Kulturmedium bestimmt. Mit Ausnahme von Ansatz 2.3b und 3.1a lagen diese in allen Ansätzen zwischen pH 7 und 8. Bei den Ansätzen 2.3b und 3.1a ergaben sich pH-Werte von 9,5. Diese hohen pH-Werte lassen vermuten, daß aus dem Seitenarm der Biometer NaOH ins Kulturmedium gelangt ist. Dies kann auch der Grund für den Zusammenbruch der mikrobiellen Aktivität in diesen beiden Ansätzen gewesen sein.

### 3.7.4.9 Bilanzierung der Radioaktivität

Am Ende der Extraktion der Kulturmedien konnte aus den Anteilen der Radioaktivität in den organischen und wässrigen Extrakten und dem Anteil, welcher als  $^{14}\text{C}$  aufgefangan wurde, für jeden Ansatz eine Bilanz erstellt werden (s. [Tabelle 3-23](#)).

**Tabelle 3-23:** Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren durch die Mischkulturen MK IIIa, MK IIIb, MK IIIc und MK III d; Versuchsreihe Biometer III

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamtwiederfindung [%]
		als $\text{CO}_2$	im $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt	im $\text{H}_2\text{O}$ -Extrakt	
1.1a	0	34,44	54,13	6,87	95,50
1.1b	0	35,29	54,57	6,16	96,09
1.2a	0,005	42,14	46,92	8,14	97,21
1.2b	0,005	42,74	46,78	8,59	98,15
1.3a	0,05	14,45	70,14	4,31	88,93
1.3b	0,05	13,09	66,85	5,51	85,46
2.1a	0	34,78	59,14	6,26	100,25
2.1b	0	36,16	56,97	6,33	99,53
2.2a	0,005	43,24	46,20	11,00	100,47
2.2b	0,005	33,95	54,80	8,91	97,69
2.3a	0,05	15,88	74,85	5,61	96,35
2.3b	0,05	10,36	82,84	5,25	98,60
3.1a	0	2,08	89,99	2,58	94,70
3.1b	0	33,00	61,23	5,92	100,17
3.2a	0,005	34,26	56,58	7,62	98,47
3.2b	0,005	41,76	47,56	8,09	97,42
3.3a	0,05	12,47	70,30	4,70	87,48
3.3b	0,05	13,87	62,20	1,98	78,05
8.3a	0,05	9,98	82,27	19,79	112,04
8.3b	0,05	14,98	31,10	10,57	56,66

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-23** (Fortsetzung)

Ansatz	Plantacare [%]	Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität [%]			Gesamtwiederfindung [%]
		als CO <sub>2</sub>	im CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt	im H <sub>2</sub> O-Extrakt	
K1 <sup>a</sup>	0	0,00	96,26	0,47	97,23
K2 <sup>a</sup>	0,05	0,00	109,92	6,89	117,79

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Mit Ausnahme der Ansätze 1.3a, 1.3b, 3.3a, 3.3b und 8.3b lagen die Gesamtwiederfindungsmengen für die eingesetzte Radioaktivität zwischen 94,7 und 117,79 %. Die niedrigeren Wiederfindungsmengen der soeben aufgezählten Ansätze lassen sich durch Aufarbeitungsverluste während des ersten Extraktionsschrittes erklären.

Die Anteile der Radioaktivität, die sich nach der Extraktion jeweils im wässrigen Extrakt fanden, korrelieren mit den vor der Extraktion bestimmten Mengen an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium. Dieser Zusammenhang untermauert die Feststellung, daß es sich hierbei um <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren-Metaboliten handeln muß, da bei der Extraktion mit dem unpolaren Lösungsmittel Dichlormethan nur polare Substanzen in der Wasserphase verbleiben. Die höchsten Werte für die Menge an Radioaktivität im H<sub>2</sub>O-Extrakt wiesen die Ansätze mit 0,005 % Plantacare auf, im Mittel fanden sich 8,73 % der wiedergefundenen Radioaktivität darin. In den wässrigen Extrakten der Ansätze ohne Tensidzugabe waren 6,25 % der Radioaktivität vorhanden und der Mittelwert der Ansätze mit 0,05 % Plantacare betrug 4,62 %. Die Menge an <sup>14</sup>C in den wässrigen Extrakten korreliert – wie erwartet – mit den <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren-Umsatzraten in den Ansätzen.

Entsprechend umgekehrt gestalteten sich die Verhältnisse bei den Anteilen der wiedergefundenen Radioaktivität in den CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakten, welche, wie unten gezeigt, ausschließlich aus <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren bestanden.

Die Menge an freigesetztem CO<sub>2</sub> war im Mittel in den Ansätzen mit 0,005 % Tensidgehalt am höchsten, knapp gefolgt von den Ansätzen ohne Plantacare (s. auch [Bild 3-58](#)).

Die Ergebnisse der Bilanzierung und die Ergebnisse der Bestimmung der gelösten Radioaktivität lassen zusammen betrachtet die Schlußfolgerung zu, daß der Hauptanteil der gelösten Radioaktivität nicht aus gelöstem <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren besteht, sondern aus polaren Metaboliten.

#### 3.7.4.10 Dünnschichtchromatographische Untersuchung der CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakte

Die Charakterisierung der Radioaktivität in den CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakten der Kulturmedien zeigte, daß diese zu nahezu 100 % aus der Ausgangsverbindung <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren stammte.

### 3.7.4.11 Gaschromatographische Untersuchung der CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakte

Die CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakte der Kulturmedien wurden gaschromatographisch auf ihren PAK-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sind der [Tabelle 3-24](#) zu entnehmen, in der letzten Spalte sind die ermittelten Wiederfindungsmengen des <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren aufgeführt.

**Tabelle 3-24:** Wiederfindung der PAK im CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums, Versuchsreihe Biometer III

Ansatz	GC-Analytik [%]					Radio-analytik [%]
	Anthr.	Phen.	Fluora.	Pyren	BaP	<sup>14</sup> C-BaP
1.1a	11,33	0,94	1,20	1,86	53,70	54,13
1.1b	14,15	5,01	4,45	6,12	54,32	54,57
1.2a	26,66	13,46	15,77	16,86	46,52	46,92
1.2b	19,93	14,70	15,54	15,92	47,46	46,78
1.3a	12,22	37,54	54,69	49,84	71,84	70,14
1.3b	28,16	36,31	55,76	56,07	64,30	66,85
2.1a	4,41	0,40	0,52	0,77	54,67	59,14
2.1b	6,60	0,39	0,43	0,49	58,09	56,97
2.2a	9,11	0,98	0,97	1,04	43,02	46,20
2.2b	10,71	0,93	0,91	0,90	52,14	54,80
2.3a	24,73	26,49	61,34	62,18	67,83	74,85
2.3b	33,87	21,89	68,50	69,78	77,51	82,84
3.1a	22,28	54,92	67,44	68,50	89,97	89,99
3.1b	9,43	1,19	1,55	1,75	57,42	61,23
3.2a	9,58	0,87	0,79	0,80	56,16	56,58
3.2b	5,58	1,00	0,91	0,91	36,57	47,56
3.3a	35,22	31,41	51,47	52,26	71,68	70,30
3.3b	20,39	27,94	45,69	46,45	62,21	62,20
8.3a	37,52	42,53	65,47	66,67	80,48	82,27
8.3b	23,26	28,15	48,71	49,09	28,98	31,10

(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-24** (Fortsetzung)

Ansatz	GC-Analytik [%]					Radio-analytik [%]
	Anthr.	Phen.	Fluora.	Pyren	BaP	<sup>14</sup> C-BaP
K1 <sup>a</sup>	39,58	35,72	70,21	78,52	99,48	96,26
K2 <sup>a</sup>	45,01	39,21	65,43	76,21	98,57	109,92

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Vergleicht man die Wiederfindungsmengen des Benzo[a]pyren, die mit der Methode der Gaschromatographie ermittelt wurden, mit den jeweiligen Wiederfindung des <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, so ergab sich im Mittel eine Abweichung von 1,64 %, wobei die höchste Differenz im Ansatz 3.2b 10,99 % betrug, die niedrigste im Ansatz 3.3b 0,01 %.

Im Kulturmedium waren zu Beginn der Versuchsreihe je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren sowie 2,5 mg Benzo[a]pyren enthalten. Während der Inkubation wurden zu den einzelnen Ansätzen zu mehreren Zeitpunkten Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren gegeben, die Menge an PAK, die – vorausgesetzt es wäre kein Abbau erfolgt und die Extraktion war erschöpfend– maximal in jedem Ansatz hätte vorliegen können, ist der Tabelle zu entnehmen. Für die 3- und 4-Ring Aromaten müssen auch hier die abiotischen Verluste durch die Wasserdampflichkeit der Substanzen berücksichtigt werden.

**Tabelle 3-25:** Summen der PAK-Zugaben ins Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III

Ansatz	Phen., Anthr., Fluora., Pyr. [mg]	BaP [mg]
1.1a, 1.1b, 1.2a, 1.2b	11,49	2,5
1.3a, 1.3b	6,83	2,5
2.1a, 2.1b, 2.2a, 2.2b	8,85	2,5
2.3a, 2.3b	5,44	2,5
3.1a	7,15	2,5
3.1b, 3.2a, 3.2b	8,85	2,5
3.3a, 3.3b	4,75	2,5

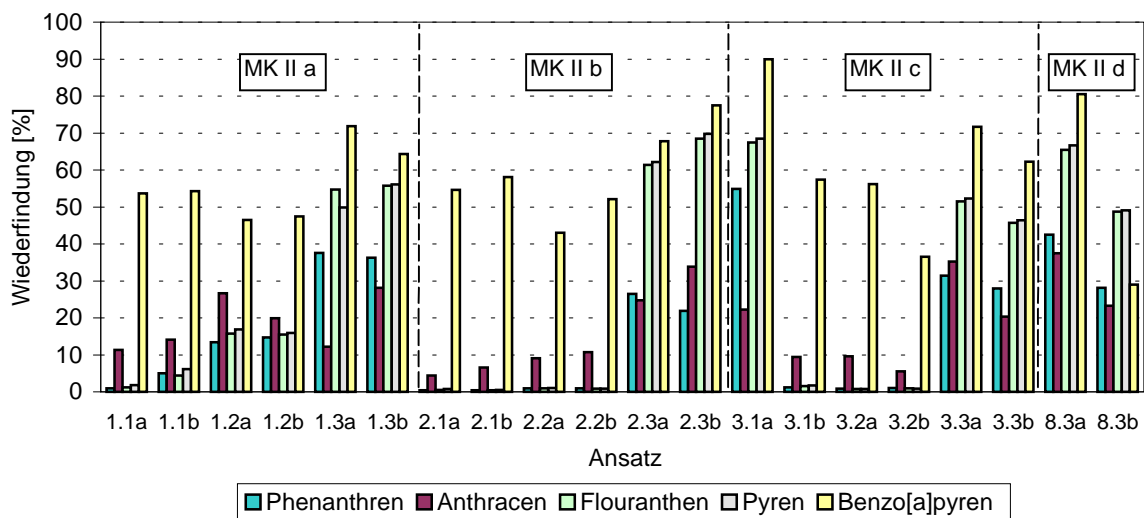
(wird fortgesetzt)

**Tabelle 3-25:** (Fortsetzung)

Ansatz	Phen., Anthr., Fluora., Pyr. [mg]	BaP [mg]
8.3a, 8.3b	6,83	2,5
K1 <sup>a</sup> , K2 <sup>a</sup>	2,5	2,5

<sup>a</sup>Sterilkontrollen

Die Wiederfindungsmengen der einzelnen PAK in den Kulturmedien der Ansätze 1.1 bis 8.3 sind im [Bild 3-71](#) vergleichend dargestellt.

**Bild 3-71:** Wiederfindung der PAK im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums, Versuchsreihe Biometer III

Betrachtet man [Bild 3-71](#), so fällt zunächst auf, daß bei allen 3 Mischkulturen die Ansätze, die unter verstärktem Einfluß von Plantacare inkubiert wurden, die höchsten PAK-Restgehalte aufwiesen, obwohl in diese Ansätze die niedrigsten Summen an PAK zugegeben wurden. Da bei den Ansätzen 1.3, 3.3 und 8.3b Verluste bei der Aufarbeitung auftraten, würden hier die Wiederfindungsanteile für die einzelnen PAK noch um einiges höher liegen. Das PAK-Abbaupotential war daher in diesen Ansätzen deutlich geringer als in den anders behandelten Biometern.

Die Ansätze ohne Tensideinfluß und mit 0,005 % Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zeigten einen weitgehend vollständigen Abbau der 3- und 4-Ring PAK. Ausnahmen bildeten hier die Ansätze 1.2a und 1.2 b, wo von diesen Verbindungen noch Restkonzentrationen oberhalb von 10 % vorlagen. Da aber Ansatz 1 bei der Zugabe von PAK aufgrund des größeren Volumens an Kulturflüssigkeit – durch die Zugabe von Mineralmedium in der 30. Inkubationswoche – etwa um 30 % höhere PAK-Zugaben erhalten hatte, ist dieses verständlich. Ansatz 3.1a muß hier wieder gesondert betrachtet werden,

da dieser Ansatz nach einer Inkubationszeit von 30 Tagen nur noch geringe biologische Aktivität aufwies.

Betrachtet man das Abbaupotential der Mischkulturen in den Ansätzen für die einzelnen PAK-Verbindungen, so fällt auf, daß in allen Ansätzen ohne Plantacare oder mit 0,005 % Plantacare-Gehalt im Kulturmedium die PAK Phenanthren, Fluoranthren und Pyren in der gleichen Größenordnung abgebaut wurden, die Verbindung Anthracen jedoch im Mittel um den Faktor 7,5 erhöht vorlag. Bei den Ansätzen mit 0,05 % Plantacare im Kulturmedium zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Hier wurde Phenanthren deutlich am stärksten abgebaut, gefolgt von Fluoranthren und Pyren, die etwa noch gleich stark im Medium vorhanden waren. Anthracen war jedoch – mit Ausnahme von Ansatz 2.3b und 3.3a – mit der geringsten Konzentration von allen PAK noch vertreten und auch in den Ansätzen 2.3b und 3.3a lag Anthracen deutlich unterhalb der Konzentration von Fluoranthren und Pyren.

#### 3.7.4.12 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer III

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer III ergibt folgende Punkte:

- ⇒ Höhere Tensidkonzentrationen im Kulturmedium führten zu längeren lag-Phasen des Benzo[a]pyren-Umsatzes zu Inkubationsbeginn, daran schlossen sich dann aber Phasen mit sehr hohen Umsatzraten für Benzo[a]pyren an.
- ⇒ Ansätze ohne Tensid zeigten eine lineare, konstante Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$ .
- ⇒ Eine ständig hohe Tensidkonzentration im Kulturmedium führte zum Zusammenbruch des Benzo[a]pyren-Umsatzes. In diesen Ansätzen gingen auch die Lebendkeimzahlen zurück. Verdünnung der Tensidkonzentration bzw. Ergänzung des Mediums mit Salzen, Vitaminen und Spurenelementen führte zur Erhöhung der Keimzahlen, die Abbaufähigkeit für PAK schien jedoch verloren, da auch nachfolgende PAK-Zugaben keine Reaktion hervorriefen (Hemmung des gesamten PAK-Abbaus).
- ⇒ Das Tensid wurde von allen Mischkulturen in jeder hier eingesetzten Konzentration abgebaut.
- ⇒ Gelöste Radioaktivität im wässrigen Extrakt deutet auf polare Metaboliten des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren hin.
- ⇒ Die Zugabe der PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren ins Kulturmedium bewirkte eine Steigerung des Benzo[a]pyren-Umsatzes.
- ⇒ Die Zugabe von Glucose zeigte keinen signifikanten Effekt oder nur in Kombination mit PAK-Gaben.
- ⇒ Die Zugaben geringerer Tensidkonzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf den Benzo[a]pyren-Abbau.

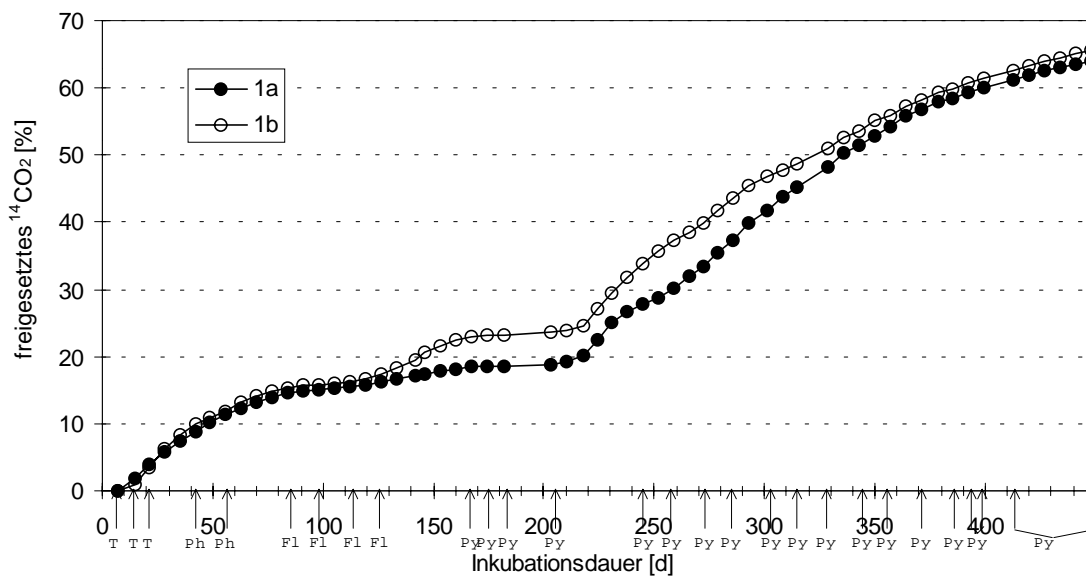
### 3.7.5 Versuchsreihe Biometer IV

#### 3.7.5.1 Ziel der Versuchsreihe Biometer IV

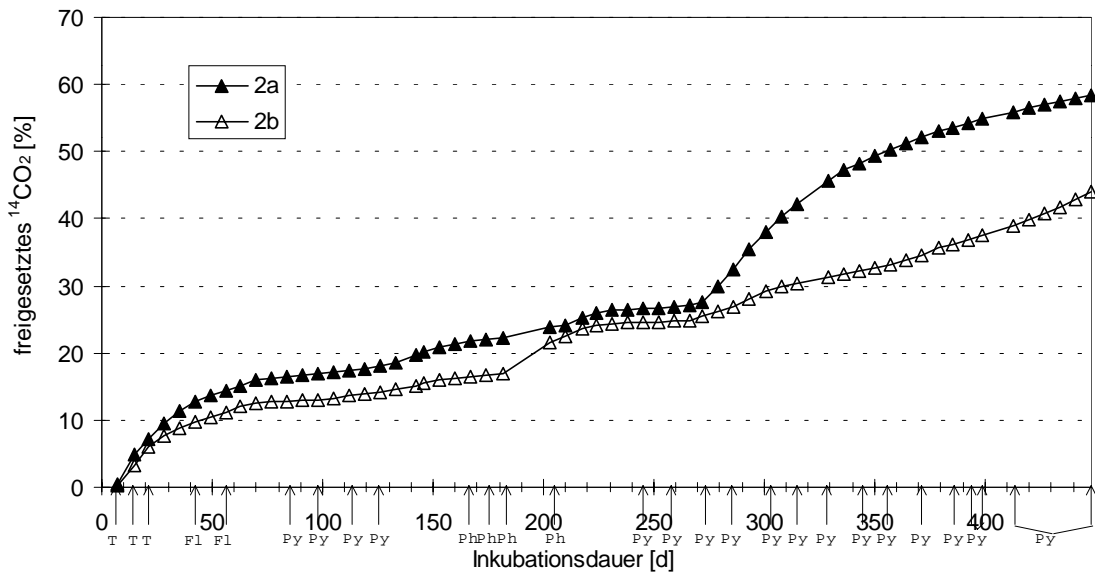
Einige Ansätze der Versuchsreihe Biometer II zeigten nach etwa 700tägiger Inkubation einen sprunghaften Anstieg der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsrates (Ansatz 1.2a, Ansatz 4.2a und Ansatz 4.2b (s. [Bild 3-37](#) und [Bild 3-40](#))). Die ungewöhnlich hohen  $^{14}\text{CO}_2$ -Mengen deuteten auf ein hohes Benzo[a]pyren-Abbaupotential in diesen Kulturen hin, so daß zur weiteren Selektionierung und Optimierung Benzo[a]pyren-abbauender Mischkulturen mit jeweils einem Aliquot dieser Kulturen diese neue Versuchsreihe angesetzt wurde (s. [2.12.6](#)). Ein Schwerpunkt der Versuchsreihe sollte weiterhin darin bestehen, die Bedeutung der einzelnen PAK in dem bisher als C-Quelle dienenden Spektrum an 3- und 4-Ring-PAK näher einzugrenzen. Um die nicht so aussagekräftige Methode der optischen Differenzierung von Bakterienkolonien zu ergänzen, sollten andere Methoden auf ihre Eignung zur Charakterisierung und Differenzierung der Mikroorganismen geprüft werden.

#### 3.7.5.2 Mineralisation von Benzo[a]pyren

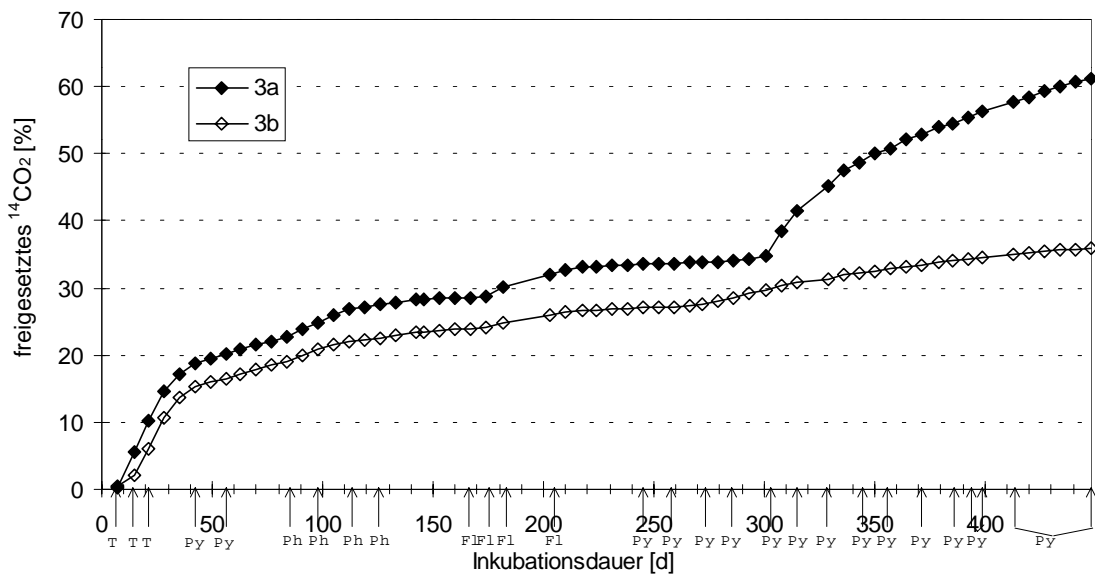
Die bei jeder Probenahme bestimmte Menge an entstandenem  $^{14}\text{CO}_2$  wurde als prozentualer Anteil der gesamten eingesetzten Radioaktivität je Biometer berechnet und als kumulative Mineralisation gegen die Inkubationszeit dargestellt (s. [Bild 3-72](#) bis [Bild 3-74](#)).



**Bild 3-72:** *Mischkultur MK IVa: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow$ T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare,  $\uparrow$ Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren,  $\uparrow$ Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren,  $\uparrow$ Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren,  $\uparrow$   $\uparrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*



**Bild 3-73:** *Mischkultur MK IVb:* Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthen, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-74:** *Mischkultur MK IVc:* Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthen, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme

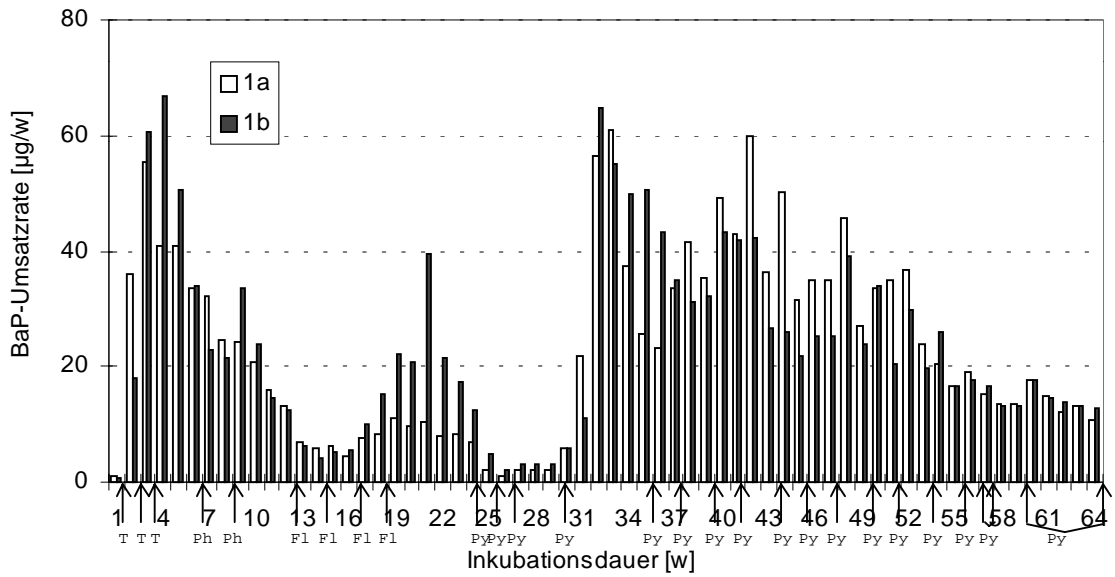
Alle Ansätze zeigten zu Inkubationsbeginn maximal eine einwöchige lag-Phase. Darauf folgte die exponentielle Phase, diese war in Ansatz 3 besonders ausgeprägt, so daß hier nach 28 Inkubationstagen im Mittel beider Parallelen bereits 13 % der eingesetzten Radioaktivität als  $^{14}\text{CO}_2$  freigesetzt war. Ansatz 2 wies zu diesem Zeitpunkt einen 9%igen Benzo[a]pyren-Umsatz auf und in Ansatz 1 waren 6 % des eingesetzten Benzo[a]pyren umgesetzt. Nach diesem Inkubationszeitraum von 4 Wochen gingen die Umsatzkurven aller Ansätze in eine stationäre Phase über.

Das daraufhin zweimalige Dosieren von jeweils 2,5 mg einer PAK-Verbindung in die Kulturmedien schien in allen Ansätzen einen positiven Effekt zu haben. Besonders in Ansatz 3 zeigte die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungskurve einen, wenn auch nicht sehr steilen, so doch linearen Anstieg. Hier bewirkte das folgende viermalige Dosieren von Phenanthren zunächst einen schnellen leichten Anstieg der Benzo[a]pyren-Umsatzraten, dieser Effekt war jedoch nicht länger anhaltend.

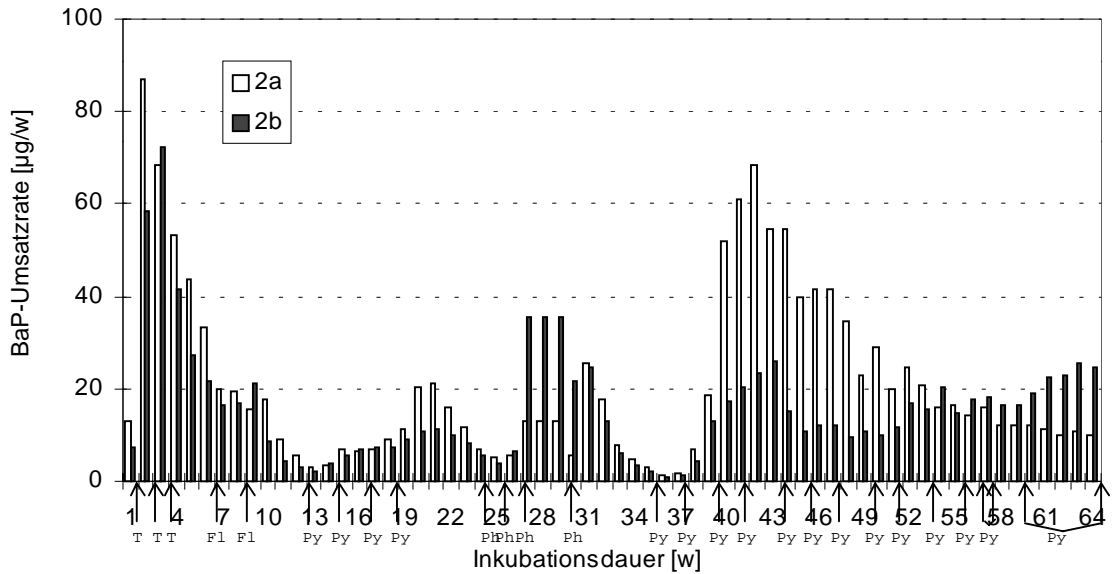
Die Zugabe von Fluoranthren bzw. Pyren in den anderen beiden Ansätzen zeigte hingegen zunächst keinen Effekt auf den Benzo[a]pyren-Umsatz, erst zum Ende der Dosierung oder danach kam es zu einem Anstieg.

In den Inkubationswochen 167 bis 203 wurde in alle Ansätze erneut eine bisher jeweils dort noch nicht zudosierte PAK-Verbindung gegeben. Ansatz 2 und 3 wurden mit Phenanthren bzw. Fluoranthren beaufschlagt, hier zeigt sich nach der 3. Zugabe ein deutlich positiver Effekt. Bei Ansatz 1 nahm die Pyren-Zugabe zunächst keinen Einfluß auf die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten, erst mit einiger Verzögerung begann in der 224. Woche ein steiler Anstieg der Werte. Weitere Pyren-Zugaben hielten diesen Anstieg konstant. Das Aufdosieren der anderen Ansätze mit Pyren zeigte ebenfalls zunächst keine Wirkung, führte bei Ansatz 2 jedoch ab dem Inkubationstag 272 und bei Ansatz 3 ab dem Tag 301 zu einem Anstieg der Umsatzraten.

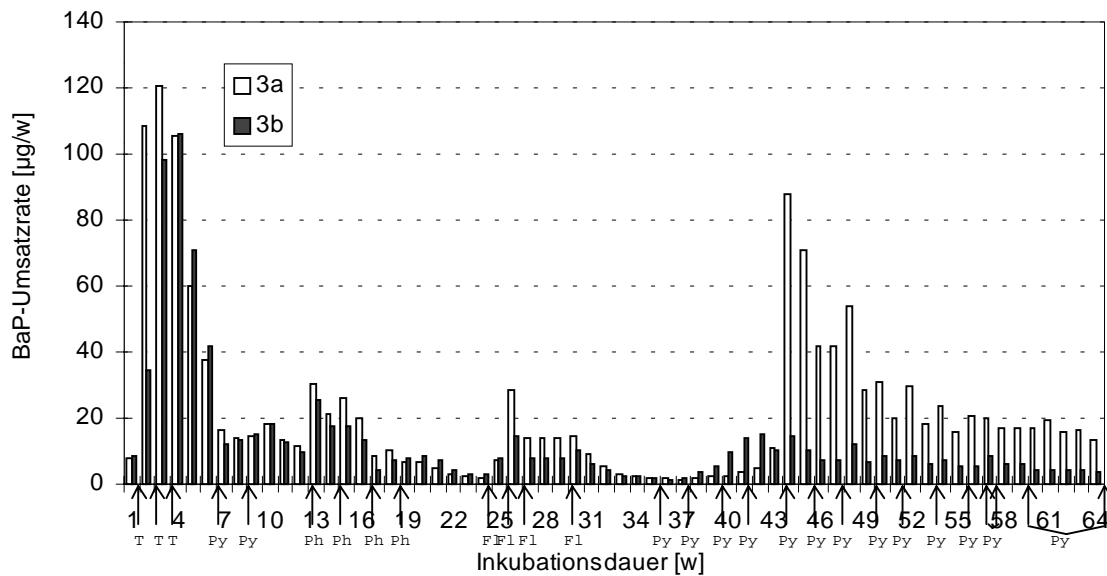
Berechnet man aus der Menge an  $^{14}\text{CO}_2$  jeder Probenahme den durchschnittlichen täglichen Umsatz an Benzo[a]pyren und bildet dann daraus den Benzo[a]pyren-Umsatz pro Inkubationswoche, so werden die Entwicklung der einzelnen Biometer und die Einflüsse der Zugaben besonders deutlich (s. [Bild 3-75](#) bis [Bild 3-77](#)).



**Bild 3-75:** *Mischkultur MK IVa:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-76:** *Mischkultur MK IVb:* Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme



**Bild 3-77:** *Mischkultur MK IVc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↗ ↘: Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme*

Bild 3-75 bis Bild 3-77 bestätigen noch anschaulicher die bereits zu Bild 3-72 bis Bild 3-74 beschriebenen Wirkungen der einzelnen PAK-Zugaben auf den Benzo[a]pyren-Umsatz.

In Ansatz 3 war die anfängliche Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  ausgesprochen hoch, in der dritten Inkubationswoche wurden in Ansatz 3 als Mittel aus den beiden Parallelen 0,11 mg Benzo[a]pyren umgesetzt. Bei Ansatz 1 fand sich ebenfalls in Woche 3 der maximale Umsatz mit 0,06 mg Benzo[a]pyren im Mittel und in Ansatz 2 fand sich das Maximum der beiden Parallelen in der 2. Inkubationswoche mit 0,73 mg Benzo[a]pyren-Umsatz.

Das zweimalige Nachdosieren einzelner PAK-Verbindungen in der 7. und 9. Inkubationswoche wirkte sich nur geringfügig auf die wöchentlichen Umsatzraten aus.

Im Unterschied dazu zeigte sich nach oder während des folgenden viermaligen Dosierens einer PAK-Verbindung in den Inkubationswochen 13 bis 18 bei den meisten Ansätzen eine leichte Erhöhung des Umsatzes. In Ansatz 1b wurde die Benzo[a]pyren-Umsatzrate nach Zugabe von Fluoranthren gesteigert, wobei diese Steigerung erst 5 Wochen nach der ersten Fluoranthren-Zugabe begann und in der 21. Woche ein Maximum zeigte, die Parallele 1a hingegen reagierte jedoch nur mit einer äußerst geringen Erhöhung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung. In Ansatz 2a steigerte sich der Umsatz von Benzo[a]pyren nach Pyren-Zugabe nur gering und ebenfalls mit einer gewissen Verzögerung. Die Phenanthren-Zugabe ins Kulturmedium der beiden Parallelen von Ansatz 3 führte zu einer raschen Reaktion, die Umsatzrate war bereits in der folgenden Woche erhöht, jedoch ließ sich dieser Effekt nicht über den gesamten Zeitraum der Zugabe halten.

Die Phenanthren-Zugabe in Ansatz 2 während der Inkubationswochen 24 bis 29 führte ebenfalls zu einer raschen Steigerung der Umsatzrate. In Ansatz 3 wurde durch das Dotieren von Fluoranthren die Umsatzrate zwar recht schnell, aber nur geringfügig gesteigert. Die Zugabe von Pyren ins Kulturmedium der beiden Parallelen von Ansatz 1 zeigte zunächst keine Wirkung, ein Benzo[a]pyren-Umsatz war kaum noch nachweisbar. Erst eine Woche nach der letzten Pyren-Zugabe erhöhte sich die  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung merklich und erreichte dann eine ebenso hohe Rate wie zu Inkubationsbeginn. Weitere Pyren-Zugaben ab der Woche 36, hielten den Benzo[a]pyren-Umsatz auf einem relativ konstanten hohen Niveau. Ansatz 2a reagierte in ähnlicher Weise auf die Pyren-Zugabe und Ansatz 3a zeigte zwar erst 7 Wochen nach der ersten Pyren-Zugabe eine deutliche Steigerung, doch diese war dann ebenfalls sehr hoch. Ansatz 2b und Ansatz 3b zeigten nur geringe Erhöhungen des Benzo[a]pyren-Umsatzes und wichen damit deutlich von ihren jeweiligen Parallelen ab.

Während der Inkubationswochen 36 bis 57 wurde alle zwei Wochen Pyren in die Kulturmedien der Biometer gegeben. Die Reaktion darauf war jeweils eine sprunghafte Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  in der ersten Woche nach der Zugabe, gefolgt von einer geringeren Rate in der zweiten Woche. Bei einer wöchentlichen Pyren-Zugabe, wie in den Inkubationswochen 60 bis 64, glätteten sich diese Sprünge.

### 3.7.5.3 Keimzahlbestimmung

Die Lebendkeimzahlbestimmung und die optische Differenzierung der Bakterientypen in den Biometern der Versuchsreihe Biometer II (s. [Tabelle 3-12](#)) zum Zeitpunkt der Entnahme der je 1,5 ml Inokulum zum Animpfen der Biometer von Versuchsreihe Biometer IV gab Aufschluß über die Bakterienkulturen in den Ansätzen zu Inkubationsbeginn. Die Ergebnisse sind der [Tabelle 3-26](#) zu entnehmen.

**Tabelle 3-26:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer IV zu Inkubationsbeginn

Ansatz	KBE/ml	Typen [%]					
		1	2	3	4	6	10
1a, 1b	$1,47 \cdot 10^7$	60	4	5	1	21	9
2a, 2b	$1,71 \cdot 10^7$	65	5	1	4	22	2
3a, 3b	$1,89 \cdot 10^7$	62	3	1	2	2	31

Nach 84 Tagen Inkubation wurde aus dem Kulturmedien der 6 Biometer jeweils 0,5 ml entnommen und damit eine Verdünnungsreihe angelegt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden 100  $\mu\text{l}$  auf R2A-Platten ausgestrichen und nach 10 Tagen Inkubation die Lebendkeimzahl und die Typenzusammensetzung ermittelt (s. [Tabelle 3-27](#)).

**Tabelle 3-27:** Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer IV nach 84 Tagen Inkubation

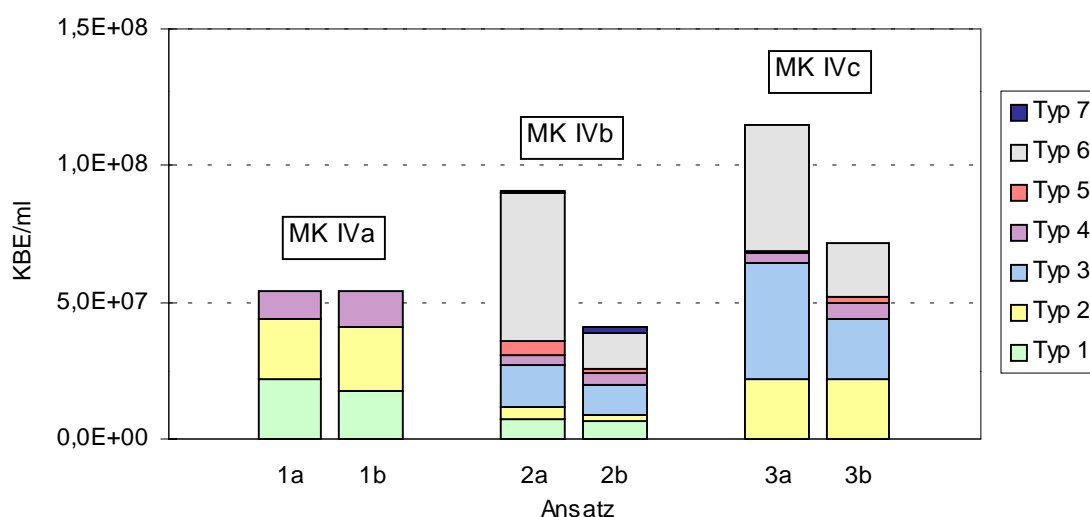
Ansatz	KBE/ml	Typen [%]						
		1	2	3	4	5	6	7
1a	5,40*10 <sup>7</sup>	41	40	n.n.	19	n.n.	n.n.	n.n.
1b	5,40*10 <sup>7</sup>	33	43	n.n.	24	n.n.	n.n.	n.n.
2a	9,10*10 <sup>7</sup>	8	5	17	4	5	60	1
2b	4,08*10 <sup>7</sup>	17	5	27	11	3	32	5
3a	1,15*10 <sup>8</sup>	n.n.	19	37	3	1	40	n.n.
3b	7,15*10 <sup>7</sup>	n.n.	31	30	9	3	27	n.n.

*n.n.: nicht nachweisbar*

Der Zeitpunkt der Lebendkeimzahlbestimmung fiel in eine Inkubationsphase, in der die Tendenz der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Freisetzung in allen Ansätzen fallend war. In die beiden Parallelen von Ansatz 1 war in den drei Wochen zuvor zweimal Phenanthren zugegeben worden, in die von Ansatz 2 Fluoranthren und in Ansatz 3 Pyren. Die Lebendkeimzahlen der Ansätze lagen in einem ähnlichen Bereich, doch in der Zusammensetzung der Bakterientypen zeigten sich Unterschiede.

In den beiden Parallelen der Ansätze 1 dominierten nur noch 3 Typen, wobei Typ 1 und Typ 2 in etwa gleichen Anteilen zu etwa je 40 % vertreten waren und Typ 4 zu etwa 20 % vorkam. Im Vergleich zur Zusammensetzung der Mischkultur zu Inkubationsbeginn, wo Typ 1 und Typ 6 dominierten, haben sich somit wesentliche Veränderungen in der Typenzusammensetzung ergeben.

Die Ansätze 2 und 3 wiesen eine größere Vielfalt an Typen auf. Es dominierten hier die Typen 3 und 6. Auffällig ist, daß in Ansatz 2 der Typ 1 den drittichtigsten Typ stellte, während dieser in Ansatz 3 völlig fehlte und dort Typ 2 diese Position übernahm. Auch in diesen beiden Ansätzen ergab sich im Vergleich zu Inkubationsbeginn ein jeweils neues Artenspektrum. Das [Bild 3-78](#) stellt die Anteile der einzelnen Bakterientypen an den Mischpopulationen der einzelnen Ansätze vergleichend dar.



**Bild 3-78:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer IV nach 84 Tagen Inkubation

Die Unterschiede in der Zusammensetzung der Mischpopulation in den einzelnen Biometern könnten ein Resultat der unterschiedlichen PAK-Zugaben gewesen sein. Es setzten sich jeweils die Bakterienarten durch, die die angebotene C-Quelle nutzen konnten. Demnach würden Typ 1, Typ 2 und Typ 4 zu den Phenanthren-Verwertern gehört haben, ihr Anteil war in den Ansätzen 2 und 3 stark zurückgegangen. Typ 3 und Typ 6 konnten Fluoranthren abbauen und Typ 2, Typ 3 und Typ 6 waren Pyren-Verwerter.

#### 3.7.5.4 Aufarbeitung der Kulturmedien von Versuchsreihe Biometer IV

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der hier vorliegenden Arbeit wurden die Biometer noch weiterhin inkubiert, so daß die Ergebnispunkte: Anteil der gelösten Radioaktivität im Kulturmedium, pH-Wert im Kulturmedium, Bilanzierung der Radioaktivität, DC- und GC- Untersuchungen für diese Versuchsreihe entfallen.

#### 3.7.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer IV

Eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse von Versuchsreihe Biometer IV ergibt folgende Punkte:

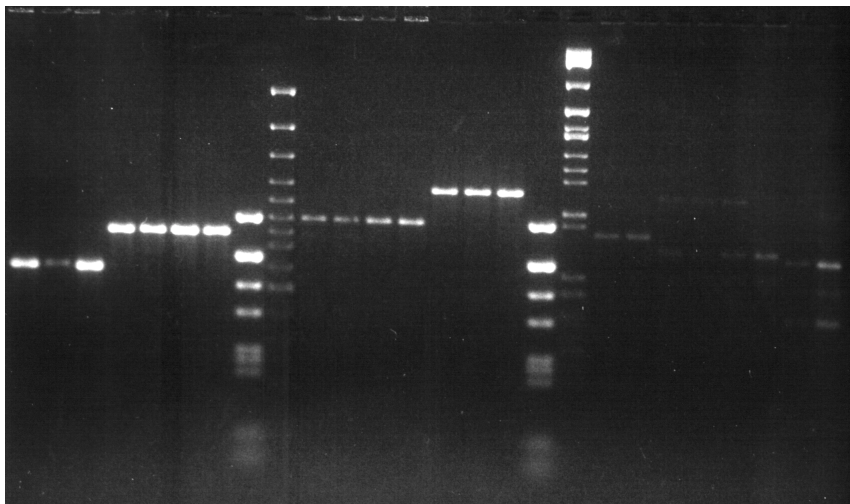
- ⇒ Die Keimzahlen der Ansätze zu Inkubationsbeginn waren alle etwa gleich hoch, es zeigten sich in allen Ansätzen zu Inkubationsbeginn überall nur kurze lag-Phasen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung.
- ⇒ Die Zugabe der PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren als PAK-Mix ins Kulturmedium bewirkte eine Steigerung des Benzo[a]pyren-Umsatzes.
- ⇒ Die Zugabe der PAK Phenanthren, Fluoranthren und Pyren als Einzelsubstanzen ins Kulturmedium bewirkte jeweils eine Steigerung des Benzo[a]pyren-Umsatzes.

- ⇒ Eine Zugabe von Pyren ins Kulturmedium konnte den Benzo[a]pyren-Metabolismus lange und mit z.T. hohen Umsatzraten aufrecht halten.
- ⇒ Die Kulturen reagierten auf Pyren-Mangel (2. Woche nach Zugabe) mit einem Absinken des Benzo[a]pyren-Umsatzes, eine Dauerzugabe von Pyren in jeder Inkubationswoche verhinderte dieses.
- ⇒ Die Zusammensetzung der Bakterientypen in den Mischpopulationen veränderte sich deutlich nach unterschiedlicher Zugabe der einzelnen PAK.

### 3.7.5.6 Versuche zur molekularbiologische Charakterisierung der Bakterientypen der Versuchsreihe Biometer IV mittels PCR

Die bisher nach rein optischen Gesichtspunkten unterschiedenen Bakterientypen sollten in ersten orientierende Untersuchungen mittels PCR näher klassifiziert werden. Von den einzelnen Typen wurden jeweils mehrere Kolonien ausgewählt und mit diesen nach der unter 2.8.2 beschriebenen Methode eine PCR-Analyse durchgeführt.

Das [Bild 3-79](#) zeigt die bei der PCR amplifizierten und im Anschluß elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente.



**Bild 3-79:** PCR-Amplifikationsprodukte der unterschiedenen Bakterientypen, Slots (von links nach rechts): 1 bis 3: Typ 1; 4 bis 7: Typ 2; 8: pBR322 DNA/AluI Marker, 20; 9: 100bp DNA Ladder Plus; 10 bis 13: Typ 3; 14 bis 16: Typ 4; 17: pBR322 DNA/AluI Marker; 18: Lambda DNA/Eco471(Avall) Marker, 13; 19 bis 20: Typ 5; 21 bis 24 Typ 6; 25 bis 26: Typ 7

Durch Vergleich der Laufstrecken der Marker-DNAs mit den Rf-Werten der PCR-Produkte wurden die Größe der Fragmente mit Hilfe des Programmes DNAsis ermittelt. Die Ergebnisse hierzu sind in [Tabelle 3-28](#) aufgelistet.

**Tabelle 3-28:** *Fragmentgrößen der Spaceramplifikationsprodukte der Bakterientypen 1 bis 7*

Typ	Fragmentgröße (bp)
1	600
2	825
3	900
4	1186
5	830
6	1125, <u>710</u>
7	<u>675</u> , 530, 415

*unterstrichene Werte: Primärfragment*

### 3.7.5.7 Gram-Färbung

Die einzelnen Bakterientypen wurden durch die Methode der Gram-Färbung auf ihr Gram-Verhalten untersucht. Alle sieben Bakterientypen waren gramnegativ.

### 3.7.5.8 Physiologische Charakterisierung der Bakterientypen mittels API-Testsystem

API 20 NE ist ein standardisiertes System mit 8 konventionellen und 12 Assimilationsreaktionen zur Identifizierung nicht anspruchsvoller, gramnegativer Stäbchen, die nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören (s. 2.8.5). Die nachfolgende [Tabelle 3-29](#) listet die durchgeführten Tests auf und gibt die Reaktion der 7 Bakterientypen darauf wieder.

**Tabelle 3-29:** Reaktionen der Bakterientypen auf die Tests des API 20 NE-Testsystems, -: keine Reaktion, +: positive Reaktion

Tests	Substrate	Reaktionen/ Enzyme	Reaktionen der Bakterientypen						
			1	2	3	4	5	6	7
NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	Nitratreduktion zu Nitrit (NO <sub>2</sub> )	-	+	+	+	-	-	-
		Nitratreduktion zu Stickstoff (N <sub>2</sub> )	-	-	-	-	-	-	-
TRP	Tryptophan	Indolnachweis	-	-	-	-	-	-	-
GLU	Glucose	Fermentation	-	-	-	-	-	-	-
ADH	Arginin	Arginindihydrolase	-	-	-	-	-	-	-
URE	Harnstoff	Urease	-	-	+	+	-	-	-
ESC	Äsculin	Hydrolyse (β-Glucosidase)	+	+	+	+	+	+	-
GEL	Gelatine + Tusche	Hydrolyse (Protease)	+	-	-	-	-	-	-
PNPG	p-Nitro-Phenyl-β-D-Galactopyranosid	β-Galactosidase	+	-	-	+	+	+	-
GLU	Glucose	Assimilation	+	-	+	+	-	+	-
ARA	Arabinose	Assimilation	-	-	+	+	-	+	-
MNE	Mannose	Assimilation	+	-	+	+	-	-	-
MAN	Mannit	Assimilation	-	+	+	+	-	-	-
NAG	N-Acetylglucosamin	Assimilation	+	-	+	+	-	-	-
MAL	Maltose	Assimilation	+	-	+	-	-	+	-
GNT	Gluconat	Assimilation	-	+	-	-	-	-	+
CAP	Caprat	Assimilation	-	-	-	-	-	-	-
ADI	Adipat	Assimilation	-	-	-	-	-	-	+
MLT	Malat	Assimilation	+	-	+	-	-	+	+
CIT	Citrat	Assimilation	-	-	-	-	-	-	+
PAC	Phenylacetat	Assimilation	-	-	-	-	-	-	+
OX	Tetramethyl-p-Phenylen-Diamin	Cytochromoxidase	+	+	-	-	+	-	+

Aus den Testresultaten ermittelte die Firma bioMérieux mit Hilfe eines Identifizierungsprogrammes Vorschläge zur Identifizierung der Bakterientypen (s. [Tabelle 3-30](#)).

**Tabelle 3-30:** Identifizierungsvorschläge durch das Identifizierungsprogramm API

Typ	Identifizierungsvorschlag nach API	Qualität der Identifizierung	% id	T
1	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	geringe Selektivität	76,3	0,52
2	<i>Aeromonas solmonocida</i> <i>masoucida/achromogenes</i>	sehr gute Identifizierung	99,5	0,67
3	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	sehr gute Identifizierung	99,9	0,59
4	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	zweifelhaftes Profil	99,6	0,36
5	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	geringe Selektivität	93,3	0,84
6	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	ausgezeichnete Identifizierung	99,9	0,83
7	<i>Alcaligenes xylosoxidans ssp</i> <i>denitrificans</i>	geringe Selektivität	53,9	0,75

% id: Prozentidentifizierung, relative Nähe des ermittelten Profils zu den verschiedenen Taxa der Datenbasis (s. 2.8.5), T: Index für die relative Nähe zu dem typischen Profil innerhalb des ermittelten Taxons (s. 2.8.5)

Das Identifizierungsprogramm API lieferte für alle 7 isolierten Bakterientypen der Mischkultur Identifizierungsvorschläge (s. [Tabelle 3-30](#)). Die Berücksichtigung der Aussagekraft der Identifizierung ist von großer Bedeutung, da in diesem standardisiertem Testsystem gezielt nach den 64 Mikroorganismen gesucht wird, deren Profil im Test aufgenommen wurde (s. [2.8.5](#)). Die Qualität der Identifizierung war bei Typ 2, Typ 3 und Typ 6 sehr gut bis ausgezeichnet.



## 4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Auswahl des Tensids

Geeignete Tenside zur Steigerung des mikrobiellen PAK-Abbaus sollten verschiedene Eigenschaften aufweisen (ODENSAB & SCHROERS 1997):

- \* gute PAK-Solubilisierungseigenschaften
- \* geringe Mikroorganismtoxizität
- \* gute biologische Abbaubarkeit

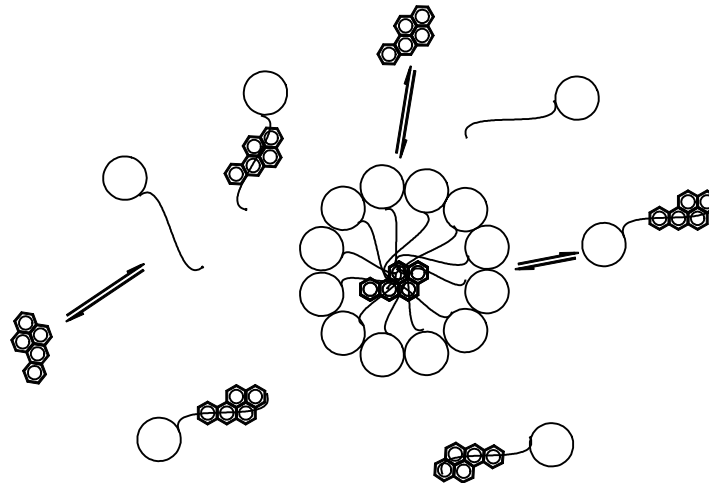
Aus einem Spektrum von 6 Tensiden, die sich in ihrer Struktur und ihren Eigenschaften unterscheiden, sollte nach den genannten Kriterien ein geeignetes Tensid zum Einsatz in die PAK-Abbauversuche ausgewählt werde.

Zunächst wurden die Tenside auf ihre Fähigkeit geprüft, die Wasserlöslichkeit von Benzo[a]pyren zu erhöhen.

Alle getesteten Tenside solubilisierten Benzo[a]pyren in der Wasserphase. Der Prozeß der Solubilisierung begann bereits bei allen 6 Tensiden im Konzentrationsbereich unterhalb der CMC (s. Bild 3-5). Oberhalb dieser Konzentration wurde dann rasch nahezu sämtlich eingesetztes Benzo[a]pyren von 100 ng/ml solubilisiert. Die Wasserlöslichkeit von Benzo[a]pyren wurde damit um den Faktor 18 erhöht.

In der Regel beginnt eine Solubilisierung hydrophober Substanzen erst bei Erreichen der CMC, bei extrem hydrophoben Substanzen kann diese jedoch auch bereits signifikant in einem Konzentrationsbereich unterhalb der Micellbildung eintreten. Eine solche Wirkung von Tensiden zeigten KILE & CHIOU (1989) auf die Solubilisierung von DDT, diese Verbindung besitzt mit einer Wasserlöslichkeit von 5,5 µg/l eine vergleichbar geringe Wasserlöslichkeit wie Benzo[a]pyren. Sie führten ihre Beobachtung auf eine Interaktion zwischen dem unpolaren Anteil des gelösten Tensids und der hydrophoben Substanz zurück, der Effekt ähnelt somit dem für gelöste Huminstoffe beschriebene (KILE & CHIOU 1989, SMITH et al. 1991, MAXIN 1992, ENGBRETSON & VON WANDRUSZKA 1994). Auch EDWARDS et al. (1991a) fanden für PAK-Verbindungen in Lösungen mit nichtionischen Tensiden unterhalb der CMC Vervielfachungen der Wasserlöslichkeiten um den Faktor 2,5.

Das Bild 4-1 soll eine Vorstellung davon vermitteln, wie sich die Tensidmoleküle und die Benzo[a]pyren-Moleküle in den durchgeführten Solubilisierungsversuchen (s. 3.2) verhalten.



**Bild 4-1:** Schematische Übersicht der Wechselwirkungen zwischen Benzo[a]pyren, Tensidmonomeren und Tensidmicellen in wässriger Lösung

Der Vergleich der Tenside, hinsichtlich ihrer Fähigkeiten Benzo[a]pyren zu solubilisieren, zeigte, daß eine unterschiedlich große Menge an Aktivsubstanz benötigt wurde, um gleiche Mengen an Benzo[a]pyren zu solubilisieren. Die Solubilisierungseffizienz eines Tensids für eine hydrophobe Substanz hängt dabei von mehreren Faktoren, wie z.B. Typ und Menge des Tensids und der Hydrophobizität der Substanz, ab (GUHA & JAFFÉ 1996b, ZHANG et al. 1997).

Bei einer Tensidkonzentration oberhalb der CMC ist die Steigerung der Löslichkeit hydrophober Substanzen über einen weiten Konzentrationsbereich linear. Trägt man die Tensidkonzentration gegen die Konzentration an solubilisierter Substanz auf, läßt sich über die Berechnung der Steigung der Geraden der molare oder gewichtsbezogene Solubilisierungskoeffizient berechnen (EDWARDS et al. 1991a und 1991b). Nach EDWARDS et. al. (1992b) soll es für manche PAK/Tensid-Systeme auch im Konzentrationsbereich unterhalb der CMC zu einem linearen Anstieg der Löslichkeit von PAK – wenn auch mit weit geringerer Geradensteigung – kommen können,

Bei den hier durchgeführten Solubilisierungsversuchen wurde in der Regel sämtlich eingesetztes Benzo[a]pyren in Lösung gebracht, so daß der Bereich der linearen Beziehung oberhalb der CMC nicht erfaßt werden konnte. Zum Vergleich der Solubilisierungsfähigkeit der Tenside wurden daher Konzentrationen unterhalb oder knapp oberhalb der CMC herangezogen. Wie die Berechnungen der Solubilisierungskoeffizienten bei 0,005 und 0,05 % Tensidgehalt zeigten, fanden sich in diesem Konzentrationsbereich keine linearen Zusammenhänge: die Solubilisierungskoeffizienten der einzelnen Tenside nahmen in der Regel ab, bei Dehyquart A allerdings zu, bei Plantacare 2000 UP war der Koeffizient in beiden Tensidlösungen in etwa gleich (s. Tabelle 3-2). Eine solche nicht-lineare Beziehung zwischen der Wasserlöslichkeit von extrem schlecht wasserlöslichen Verbindungen und der Tensidkonzentration wurde auch von KILE & CHIOU (1989) gefunden. Sie begründeten dieses mit einer sukzessiven Micellierung der heterogenen Monomere technischer Tenside. Die hier getesteten Tenside bestehen ebenfalls

aus Monomerenmischungen, so daß solche Prozesse hier ebenfalls denkbar wären. Die berechneten Koeffizienten können daher nur als Anhalt für eine Größenordnung betrachtet werden. Sie zeigen, daß eine Steigerung der Löslichkeit vorlag und daß sich die Tenside in ihrer Solubilisierungsfähigkeit nicht sehr gravierend voneinander unterscheiden.

Ein weiteres entscheidendes Auswahlkriterium für den Einsatz eines bestimmten Tensids in Abbaustudien mit Benzo[a]pyren war die möglichst wenig toxische Wirkung des Tensids auf Mikroorganismen.

Die offiziellen Angaben der Tensidhersteller zu den ökotoxikologischen Eigenschaften der Tenside sind der [Tabelle 2-2](#) zu entnehmen. Bei einigen der Tenside wurden die akute und die chronische Bakterientoxizität angegeben. Da diese Angaben unvollständig waren und die Tenside zudem auf unterschiedliche Bakterienarten sowie auf eine Mischkultur eine andere Wirkung haben können, wurden in Verdünnungsreihen der Einfluß des Tensids im DMSO-Test überprüft (s. [3.4](#)).

Die Reduktion von DMSO zu DMS wurde als Parameter für eine Beeinflussung der Aktivität der Mischkultur herangezogen. Ein Absinken der Aktivität wurde dabei als hemmender Effekt des Tensids gedeutet, eine Erhöhung als fördernder.

Die Tenside zeigten in diesem Test konzentrationsabhängige Wirkungen. Dehyquart A – als Vertreter der kationischen Tenside – hemmte bereits in stark verdünnten Lösungen die Reduktase-Aktivität. Diese Hemmung wird als toxischer Effekt gedeutet und ist typisch für viele kationische Tenside, die eine mikrobiozide Wirksamkeit ([BERTH et al. 1988](#)) besitzen können.

Die Hemmung der Aktivität durch die beiden anionischen Tenside Lutensit A-PS und Texapon N 70 war weniger stark, das amphotere Tensid Dehyton K und die beiden nichtionischen Tenside Lutensol ON 70 und Plantacare zeigten in verdünnter Konzentration fördernde Wirkungen auf die Reduktaseaktivität.

Auffällig war die Aktivitätssteigerung der Reduktase unter Einfluß von Plantacare. Dieses Tensid war bis zur Konzentration von 2,5 %, für die Mischkultur als Gesamtheit betrachtet, nicht toxisch.

Die Ergebnisse des DMSO-Tests werden durch die ökotoxikologischen Herstellerangaben – soweit vorhanden – bestätigt. Dehyquart A besitzt die höchste akute Bakterientoxizität und Plantacare zeigt mit einer  $EC_0$  über 100 mg/l keine toxischen Effekte. Die Tensidklasse der Alkylpolyglycoside ist zudem aus der Literatur für ihre günstigen Öko-Tox-Daten bekannt ([ANDREE & MIDDELHAUVE 1991](#)).

Die Ergebnisse des DMSO-Tests ergaben für das Tensid Plantacare eine besonders gute Verträglichkeit, bezogen auf die mikrobielle Biozönose als Gesamtheit. Die Steigerung der Reduktase-Aktivität als Summenparameter für die Aktivität einer Mischkultur muß jedoch mit gewissen Einschränkungen bewertet werden. Die einzelnen Mitglieder der Mischpopulation können eine unterschiedliche Verträglichkeit für das Tensid aufwei-

sen. Es ist bekannt, daß die Reaktionen von Mikroorganismen auf Tenside hochvariabel sind (ROBICHAUX et al. 1972). Beispielsweise kann der Zellwandaufbau von Bakterien für die Wirkung von Tensiden auf die Zelle eine Rolle spielen. Von Rhamno- und Sophorolipiden weiß man, daß sie toxisch auf grampositive Bakterien wirken können, als biologische Bedeutung von Biotensiden wird daher auch ihre teilweise antimikrobielle Eigenschaft diskutiert (LANG et al. 1989). Veränderungen der Zelloberfläche durch Tensideinfluß sind ebenfalls möglich: beim Abbau von Natriumdodecylsulfat durch *Pseudomonas*-Stämme wurde beobachtet, daß die Zelloberfläche dieser Bakterien hydrophober wurde (NEU 1996).

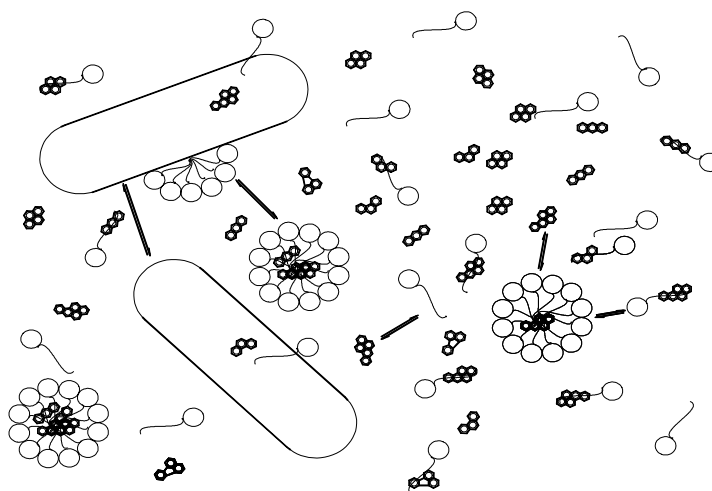
Die Aktivitätssteigerung unter Einfluß von Plantacare war zwar wesentlich geringer als unter dem Einfluß von Glucose, doch war sie wahrscheinlich auf eine Verwertung des Tensids als C-Quelle zurückzuführen. Es könnte dadurch möglicherweise zu Veränderungen in der Populationszusammensetzung und/oder zu Verschiebungen in der Dominanz der Arten gekommen sein. Ob und inwieweit dabei die PAK-Abbauer betroffen wurden, konnte erst durch die entsprechenden Abbaubersuche unter Tensideinfluß herausgefunden werden.

Auch die Verwandtschaft des Alkylpolyglycosids Plantacare zu der Klasse der Biotenside (BÖCKER & THIEM 1989) war ein weiteres Auswahlkriterium dafür, dieses Tensid in weiteren Versuchen einzusetzen. In Hinblick auf die Anwendung von Tensiden in Sanierungstechniken sollte ein Tensid nicht toxisch wirken und biologisch abbaubar sein (EDWARDS et al. 1991b, BUNZEL 1995, TSOMIDES et al. 1995). Die Ähnlichkeit von Plantacare und Biotensiden spricht für eine gute Abbaubarkeit, eine in der Regel geringe Toxizität und zudem für eine höhere Akzeptanz der Anwendung dieser Substanz in Saniertechniken. Die Synthese dieses Tensids aus weitgehend nativen Bausteinen nachwachsender Rohstoffe – insbesondere Stärke, Fett und deren Derivate (MATSUMURA et al. 1990, BALZER 1991, BAUMANN 1991) — ist unter ökologischen Gesichtspunkten ebenfalls ein Argument für die Verwendung dieses Tensidtyps.

Um die Solubilisierungsfähigkeit von Plantacare auf Benzo[a]pyren besser beurteilen zu können, wurden ergänzende Löslichkeitsversuche mit diesem Tensid im Kulturmedium der Abbaubersuche durchgeführt.

Im Kulturmedium der Abbaubersuch waren neben Benzo[a]pyren auch Salze, Spurenelemente, Vitamine und die PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren enthalten. All diese Komponenten können Einfluß auf das Verhalten des Tensids – z.B. auf die Micellbildung – haben (ROUSE et al. 1994), so daß der Löslichkeitsversuch mit Plantacare im Kulturmedium genau die Verhältnisse widerspiegelte, die zu Kultivierungsbeginn vor der Zugabe des Bakterieninokulums vorlagen. Die Löslichkeit von Benzo[a]pyren in diesem Medium betrug 27,32 µg/l und war somit gegenüber dem Literaturwert von 3,8 – 14 µg/l um den Faktor 2 bis 7 erhöht. Möglicherweise wirkte die Gegenwart der anderen PAK, die ja auch z.T. als gelöste organische Substanz in dem Medium vorlagen, löslichkeitssteigernd auf Benzo[a]pyren.

Plantacare erhöhte diese Löslichkeit besonders oberhalb der CMC um ein Vielfaches. In der 0,1%igen Lösung besaß Benzo[a]pyren eine scheinbare Löslichkeit von nahezu 1,9 mg/l, dieser Wert überschritt den der reinen Wasserlöslichkeit von Phenanthren. Das System der Abbauersuche war mit der Vielzahl seiner Komponenten sehr komplex und es ergaben sich vielfältige Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen, Tensidmonomeren, Tensidmicellen und PAK-Molekülen. Die Übersichtszeichnung im [Bild 4-2](#) soll einige dieser möglichen Interaktionen, die in den Abbauersuchen auftreten konnten, verdeutlichen. Die PAK-Moleküle konnten durch die Tensidmonomere und die Tensidmicellen solubilisiert werden, wobei die PAK-Verbindungen untereinander konkurrieren konnten. Tensidmonomere in der Lösung und in der Micelle standen im Austausch miteinander. Die Zellwände der Bakterien konnten in Kontakt mit Tensidmicellen und Tensidmonomere treten und diese z.B. in ihre Zellwand integrieren.



**Bild 4-2:** Schematische Übersicht der Wechselwirkungen zwischen den PAK-Molekülen, Tensidmonomeren, Tensidmicellen und Mikroorganismen im Kulturmedium der Abbauersuche

Neben dem Benzo[a]pyren wurden auch die anderen PAK durch das Plantacare solubilisiert. Dabei hatten die stärker hydrophoben PAK kleinere Molfraktionen in der micellaren Pseudophase, d.h. Benzo[a]pyren wurde bezogen auf die Molmenge am wenigsten von allen PAK solubilisiert und Phenanthren und Anthracen wurden als kleinere PAK-Moleküle von den Tensidmicellen mit der höchsten Kapazität solubilisiert ([EDWARDS et al. 1991a und 1991b](#), [TIEHM et al. 1997](#)). Andererseits besteht aber eine lineare Beziehung zwischen dem n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten einer Substanz und ihrem Verteilungskoeffizienten zwischen micellarer und wässriger Pseudophase ([EDWARDS et al. 1991a und 1991b](#)). Dieses bedeutet, daß das Verhältnis von Benzo[a]pyren in der micellaren Pseudophase zu Benzo[a]pyren in der wässrigen Pseudophase am höchsten von allen eingesetzten PAK war.

Für den Einsatz in die PAK-Abbauversuche wurde das nichtionische Tensid Plantacare 2000 UP ausgewählt. Die Gründe für diese Entscheidung waren zusammengefaßt folgende:

- \* Plantacare besitzt die Fähigkeit, Benzo[a]pyren in deutlicher Menge in die Wasserphase bzw. in das Kulturmedium zu solubilisieren.
- \* Plantacare erfordert nur eine geringe Menge an Aktivsubstanz, um seine solubilisierende Wirkung zu entfalten.
- \* Plantacare zeigte – für die Mischkultur als Gesamtheit gesehen – in einem Konzentrationsbereich bis 1 % keinen toxischen Effekt.
- \* Plantacare wurde von der Mischkultur abgebaut.
- \* Plantacare wird aus weitgehend nativen Bausteinen nachwachsender Rohstoffe hergestellt.
- \* Die Substanzklasse der Alkylpolyglycoside, zu denen Plantacare gehört, zeigt eine gute Umweltverträglichkeit und besitzt in Struktur und Eigenschaften Ähnlichkeiten mit Biotensiden.

## 4.2 Abbau von $^{14}\text{C}$ -markiertem Benzo[a]pyren

Die Mischkultur, die aus einem hoch mit PAK kontaminierten Boden isoliert wurde, konnte mit einem Gemisch von 3- und 4-Ring PAK als einzige C- und Energiequelle wachsen und besaß die Fähigkeit, Benzo[a]pyren cometabolisch zu verwerten.

Ein Abbau von Benzo[a]pyren als alleinige C-Quelle unter Plantacare-Einfluß wurde in der Versuchsreihe Biometer I getestet, es ließ sich jedoch keine signifikante  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung messen (s. Bild 3-11). Der geringe Nachweis von markiertem  $\text{CO}_2$  zu Versuchsbeginn deutet darauf hin, daß die auf einem PAK-Spektrum vorgezogene Mischkultur die Fähigkeit zum Benzo[a]pyrenabbau besaß, diese jedoch mit Benzo[a]pyren als Wachstumssubstrat nicht aufrecht erhalten werden konnte. Die mangelnde Fähigkeit, Benzo[a]pyren als einzige C- und Energiequelle zu nutzen, wurde auch in den anderen Biometer-Versuchen deutlich: waren die 3- und 4-Ring PAK als Wachstumssubstrat im Medium verbraucht, so stagnierte der Benzo[a]pyren-Umsatz. Auch das Tensid diente nicht als geeignetes Cosubstrat für einen Benzo[a]pyrenabbau.

Ein cometabolischer Benzo[a]pyren-Abbau von etwa 50 % mit anderen PAK-Vertretern als Wachstumssubstrat konnte in mehreren Ansätzen nachgewiesen werden, dazu waren jedoch Inkubationszeiten von etwa 300 Tagen notwendig.

Die Abbaubilanzen wurden über die Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  aus der  $^{14}\text{C}$ -markierten Benzo[a]pyren-Verbindung erstellt. Inwieweit man hierbei von einer vollständigen Mineralisierung dieser Verbindung ausgehen kann, muß kritisch hinterfragt werden.

Werden organische Verbindungen zur Deckung des Energiebedarfs der Zelle und zum Aufbau von Zellsubstanz verwendet, so führt dieses unter günstigen Bedingungen letzt-

endlich zum Abbau dieser Verbindungen in deren Mineralisierungsprodukte – Kohlendioxid, Wasser und anorganische Salze. Durch die spezifische Markierung des Benzo[a]pyrenmoleküls an der 7er und 10er Position (s. Bild 2-1) wurde mit dem Nachweis von  $^{14}\text{CO}_2$  beim Abbau des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren nur der erste Abbauschritt – der Primärabbau – nachgewiesen.

Die 7-8 oder die 9-10 Positionen gehören zu den energetisch bevorzugten im Benzo[a]pyrenmolekül (LOEW et al. 1978) und ein enzymatischer Angriff ist daher an diesen Positionen besonders günstig. Identifizierte Metaboliten des Benzo[a]pyrenabbaus von Bakterien und Pilzen bestätigen dieses (GIBSON et al. 1975, CERNIGLIA et al. 1992, SCHNEIDER et al. 1996). Folgt auf die enzymatische Oxidation an diesen Positionen die Ringspaltung, wird  $^{14}\text{CO}_2$  frei und zumindest eine Markierung des Moleküls ist verschwunden.

SCHNEIDER et al. (1996) wiesen beim Benzo[a]pyrenabbau durch ein *Mycobacterium* sp. als Metaboliten 7,8-Dihydropyren-carbonsäuren nach. Bei der hier vorliegenden Markierung fände sich dann jeweils noch ein markiertes Kohlenstoffatom in der Carbonsäure, so daß ein Nachweis dieses Metaboliten durch radioanalytische Methoden möglich sein könnte.

Andererseits wird die anfängliche Oxidation von Benzo[a]pyren durch mikrobielle Enzymsysteme als limitierender Schritt für die Umsatzrate betrachtet (CARMICHAEL & PFAENDER 1997a). Durch die erfolgte Oxidation und die Ringöffnung werden PAK besser verfügbar und leichter abbaubar. Eine hohe Akkumulation von Metaboliten war daher nicht zu erwarten, besonders wenn man die langen Inkubationsdauern berücksichtigt und außerdem bedenkt, daß durch den Einsatz einer an PAK adaptierten Mischkultur die Abbaukapazitäten der einzelnen Mitglieder dieser Biozönose sich ergänzten.

Da durch die Analysen am Gaschromatographen bestätigt wurde, daß die Mischkultur Pyren zügig abbaute, war eine Ansammlung von 4-Ring Metaboliten des Benzo[a]pyrens nicht wahrscheinlich, zudem, wie der Biometer-Versuch IV zeigte, die 4-Ring Verbindung Pyren den Cometabolismus von Benzo[a]pyren in besonderem Maße aufrecht erhalten konnte und den Mikroorganismen dabei als einziges Wachstumssubstrat diente.

In den wässrigen Extrakten aller Biometer wurde ein – wenn auch in der Regel geringer – Anteil an Radioaktivität gefunden. Da dieser nicht mit dem unpolaren Lösungsmittel Dichlormethan extrahiert werden konnte, muß es sich bei der  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz im Wasserextrakt um polare Stoffe handeln. Es wird vermutet, daß diese Verbindungen polare Primärmetaboliten des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyrens waren. Zum anderen könnte auch über Metabolisierungsvorgänge ein Einbau der markierten C-Atome in Biomasse erfolgt sein. In allen Biometer-Versuchen war zu beobachten, daß in den Ansätzen, die hohe  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten aufwiesen, höhere Anteile an Radioaktivität in den  $\text{H}_2\text{O}$ -Extrakten vorlagen. Dieser Zusammenhang bestätigt die Annahme, daß es sich bei der Radioaktivität im Wasserextrakt um polare Metaboliten des  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyrens handelte.

Die Identifizierung von Metaboliten war nicht Ziel dieser Arbeit und wurde – auch aus den oben genannten Gründen – nicht weiter verfolgt. Als bewiesen galt daher in den hier durchgeführten Abbaustudien über den Nachweis von  $^{14}\text{CO}_2$  zumindest die initiale Oxidation der Benzo[a]pyrenmoleküle und die Ringspaltung.

### 4.3 Einfluß des Plantacare

Die isolierte Mischkultur war in der Lage, auf PAK als einzige C- und Energiequelle zu wachsen und dabei auch Benzo[a]pyren zu verwerten. Das nichtionische Alkylpolyglycosid Plantacare 2000 UP war für die Mischkultur als Gesamtheit gesehen gut verträglich, es solubilisierete Benzo[a]pyren im Kulturmedium und es war abbaubar.

Wenn nun die geringe Lösungsrate von Benzo[a]pyren ins Medium ein entscheidender Faktor für den schlechten Abbau dieser Verbindung wäre, so sollte eine Solubilisierung dieser Substanz durch ein Tensid einen positiven Effekt auf die Bioverfügbarkeit von Benzo[a]pyren haben und damit steigernd auf die Abbaurate wirken.

Bei der Diskussion der Plantacare-Effekte in den hier vorliegenden Abbaustudien ist zu bedenken, daß die Mischkulturen, mit denen die Biometer angesetzt wurden, aus Vorkulturen stammten, in denen den Bakterien als einzige C- und Energiequelle ein definiertes PAK-Gemisch zur Verfügung stand. Das bedeutet, daß sich zwischen den einzelnen Mitgliedern der Population ein gewisses Zusammenspiel eingestellt hatte. Es wird Organismen gegeben haben, welche vom Abbau bestimmter PAK lebten, andere verwerteten Metaboliten und stellten vielleicht ihrerseits C-Quellen für weitere Abbauvorgänge bereit. In einem solchen komplexen System konnte die Wirkung des Tensids neben einer Solubilisierung der PAK, z.B. darin bestehen, auf eine oder mehrere Bakterienarten toxisch zu wirken oder aber einer oder mehrerer Bakterienarten als C-Quelle zu dienen. Das gesamte Konzert der einzelnen Bakterienarten könnte dadurch verändert worden sein. Für den Abbau von Benzo[a]pyren könnte dieses bedeutungslos gewesen sein, es könnten aber auch positive oder negative Effekte aufgetreten sein, die zudem konzentrationsabhängig gewesen sein könnten. Der Einfluß von Plantacare auf den Abbau von Benzo[a]pyren durch die isolierte Mischkultur wurde in mehreren Biometer-Versuchen getestet, und es ergeben sich einige grundsätzliche Ergebnisse:

Im Biometer-Versuch I war in den Biometern mit mehr als 0,1 % Plantacare-Gehalt kein Benzo[a]pyren-Umsatz nachweisbar. Die Menge an gelöster Radioaktivität im Kulturmedium zu Inkubationsende zeigte, daß in diesen Ansätzen Tensidmicellen, während der gesamten Inkubationsdauer von 384 Tagen Benzo[a]pyren, solubilisierten. In den Ansätzen mit 0,5 bzw. 1 % Plantacare wurde — im Vergleich zu dem Ansatz ohne Tensid — so eine 25 bzw. 60fach erhöhte Menge an Benzo[a]pyren gelöst (s. [Tabelle 3-8](#)). Trotzdem wurde keine Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  ermittelt, und auch der Abbau der anderen PAK-Vertreter war deutlich verringert (s. [Tabelle 3-10](#)). In Konzentrationen oberhalb der CMC wirkte das Tensid offensichtlich hemmend auf die PAK-Verwertung und dabei besonders auf die Mineralisation höherkerniger PAK. Dieser Effekt wird in

der Literatur auch für anderen PAK-Abbauversuchen beschrieben. Eine Inhibierung des PAK-Abbaus unter Tensideinfluß kann auf viele verschiedene Gründe zurückgeführt werden.

Einige Autoren vermuteten, daß in Micellen eingeschlossene PAK nicht bioverfügbar sind (LAHA & LUTHY 1991, JIMINEZ & BARTHA 1996). GUHA & JAFFÉ (1996a) und auch GRIMBERG et al. (1996) postulierten, daß ein Überdosieren von Tensiden die PAK quasi aus der freien Wasserphase entzöge und auf diese Weise die Bioverfügbarkeit der PAK verringere. Andere Autoren widersprechen dieser Theorie damit, daß die PAK nur geringe Verweilzeiten in den Micellen aufwiesen und somit eine hohe Austauschrate mit den im Medium gelösten Molekülen besäßen (LIU et al. 1995).

Doch nicht nur in den Ansätzen, in denen bis zum Inkubationsende Tensidmicellen vorlagen, wurde der PAK-Abbau inhibiert. Die Mineralisation von PAK wurde auch dann gehemmt, wenn die Tensidkonzentration durch den Tensidabbau den Wert für die CMC unterschritt. In der Versuchsreihe Biometer II (s. 3.7.3) wurde durch Zugabe von Mineralmedium die Plantacare-Konzentration des Kulturmediums verdünnt, Messungen der Oberflächenspannung zeigten, daß keine Tensidmicellen mehr vorlagen, trotzdem ließ sich der PAK-Abbau nicht mehr reaktivieren.

Ein anderer Grund für eine Inhibierung kann eine Toxizität des Tensids oder eines seiner Abbauprodukte auf den oder die PAK-Abbauer sein (TIEHM 1994, ROCH & ALEXANDER 1995, TSOMIDES et al. 1995). Dieser toxische Effekt kann z.B. aus Interaktionen zwischen Tensid(micelle) und Bakterienzellwand bestehen (LAHA & LUTHY 1991, CHURCHILL et al. 1995). Je nach Aufbau und Hydrophobizität der Zellwand können sich Bakterienarten dabei unterscheiden.

Der DMSO-Test (s. 3.4) hat gezeigt, daß Plantacare – für die Mischpopulation als Gesamtheit gesehen – erst in höheren Konzentrationsstufen (> 1 %) eine toxische Wirkung besaß. In der Versuchsreihe Biometer I wurden Plantacare-Konzentrationen bis 1 % eingesetzt, in dieser Konzentrationsstufe ließen sich nach 167 Tagen Inkubation keine Mikroorganismen mehr nachweisen (s. Tabelle 3-7), der erfolgte PAK-Abbau (s. Tabelle 3-10) zeigt aber, daß kein massiv toxischer Effekt des Plantacares von Inkubationsbeginn an vorliegen konnte. Möglicherweise waren es die Abbauprodukte des Plantacare, die toxisch wirkten, dagegen spricht, daß sich in den 0,5 %igen Ansätzen keine verringerten Keimzahlen fanden. Auch in den Ansätzen der Biometer II und III, die z.T. unter Einfluß einer lang andauernden Tensidzugabe mit 0,005 % Tensid standen, traten keine signifikant verringerten Keimzahlen auf, obwohl es auch in diesen Ansätzen zur verstärkten Ansammlung von Tensidabbauprodukten gekommen sein mußte. In der Mischkultur könnten die einzelnen Mitglieder natürlich trotzdem unterschiedlich sensitiv auf das Plantacare oder seine Abbauprodukte reagiert haben. Dieses erklärt auch die Abnahme der Diversität in der Population bei höheren Tensidkonzentrationen. Dieser Effekt zeigte sich auch in den Biometern der Versuchsreihe Biometer I, in denen Benzo[a]pyren als einziges PAK im Medium vorlag. Auch hier sank mit steigender Tensidkonzentration der Benzo[a]pyren-Umsatz, die Keimzahlen stiegen,

aber die Artenvielfalt wurde geringer (s. [Tabelle 3-4](#)). In der Mischkultur könnten einige Bakterienarten auf bestimmte Plantacare-Konzentrationen empfindlich reagiert haben und so aus der Biozönose ausgeschieden sein. Wenn diese Bakterienarten betraf, die für den PAK-Abbau von Bedeutung waren, so resultierten daraus verringerte Abbauraten einzelner oder auch mehrerer PAK-Verbindungen. Dieses würde auch erklären, warum in den Ansätzen mit hoher Plantacare-Konzentration Phenanthren, im Vergleich zu den anderen PAK-Vertretern, weitgehend abgebaut wurde (s. [Tabelle 3-10](#)). Möglicherweise war der oder waren die Phenanthren-Verwerter weniger empfindlich gegenüber hohen Tensidkonzentrationen.

[THIBAUT](#) et al. (1996) nannte als eine mögliche Ursache für eine von ihnen gemessene Inhibierung des Pyrenabbaus, daß hohe Konzentrationen an solubilisiertem Pyren toxisch auf Bakterien wirken können, indem die PAK-Verbindung selbst Schäden in der Zellwand verursacht. Untersuchungen von [CALDER & LADER](#) (1976) belegen, daß bereits Konzentrationen von 5 µg/l Benzo[a]pyren auf einige marine *Pseudomonaden* toxisch wirken können. Die Toxizität ist abhängig von der in Lösung vorliegenden Konzentration ([BARTHA & ATLAS](#) 1977, [SIKKEMA](#) et al. 1995), nicht bioverfügbare Substanzen – z.B. an Bodenpartikel absorbierte PAK – zeigen keine toxischen Effekte ([WEISSENFELS](#) et al. 1992).

Eine solche toxische Wirkung der PAK-Vertreter in den hier vorliegenden Abbaustudien wäre für die Ansätze mit höherer Tensidkonzentration denkbar, da es sich bei den Bakterien jedoch um PAK-Verwerter handelte, die an hohe PAK-Konzentrationen adaptiert waren, war eine solche sensitive Reaktion unwahrscheinlich.

Ein Tensid kann außerdem von den PAK verwertenden Mikroorganismen bevorzugt als C-Quelle genutzt werden ([TIEHM](#) 1994, [TSOMIDES](#) et al. 1995, [TIEHM](#) et al. 1997). In einer Mischkultur müssen die PAK-Abbauer und die Tensidverwerter nicht dieselben Organismen sein, so daß sich die Tensidabbauer gegenüber den PAK-Abbauern durchsetzen können ([DESCHÊNES](#) et al. 1996).

Bei einigen Biometer-Ansätzen fällt eine lag-Phase der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung zu Inkubationsbeginn auf. Diese war zum einem durch die nötige Anpassung des Stoffwechsels der Mikroorganismen an das neue Nährmedium nach Beimpfung durch die Impfkultur (Induktionsphase) bedingt, zum anderen erfolgte hier zunächst die Vermehrung der Biomasse. Die lag-Phase war daher auch bei den Biometer-Versuchen, die mit Kulturen aus sehr alten und inaktiven Biometer-Ansätzen inokuliert wurden, sehr lang. Ein weiterer Grund dafür war auch die relativ niedrige Lebendkeimzahlen in diesen Inokula (z.B. Biometer-Versuch II, MK Iib). Die Vorgänge in der lag-Phase erklären aber auch, warum mit steigendem Tensidgehalt die Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  immer später begann als in den Ansätzen ohne Tensid. Die Vermehrung der Biomasse erfolgte hier zunächst durch die Tensidverwertung. Erst danach begann die Verwertung der PAK. Da diese Population durch die leichter erschließbare C-Quelle im Vergleich zu den Kulturen, die als C-Quelle nur die PAK oder PAK und weniger Tensid nutzen konnten, wesentlich gestärkt wurde, wendete sich dann eine größere Population dem PAK-Abbau zu, so daß

sich daher in den Ansätzen mit Tensid direkt nach der lag-Phase ausgesprochen hohe Benzo[a]pyren-Umsatzraten fanden (bis zu 240 µg/Woche im Ansatz 1.3a, Biometer II). In den Ansätzen ohne Plantacare zeigten sich hingegen in der Regel von Inkubationsbeginn an eine relativ geringe, aber stetige lineare Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  (maximale Umsatzrate 80 µg Benzo[a]pyren/Inkubationswoche). Die Stärkung der Population durch die Tensidverwertung wurde durch die erhöhten Keimzahlen der Ansätze mit 0,05 % Plantacare zu Inkubationsbeginn gezeigt (s. Bild 3-70).

Daß Plantacare einigen Mitgliedern der Mischkultur als C-Quelle diene, ist als gesichert anzusehen, die Abnahme der Oberflächenspannung beweist dieses ebenso wie die Verringerung der Artendiversität.

Das Tensid, als leicht erschließbare C-Quelle, kann für den PAK-Abbau von Vorteil sein, wenn nämlich die PAK-Abbauer das Tensid verwerten können, die Fähigkeit zum PAK-Abbau aber dabei nicht verlieren und zu ausschließlichen Tensidverwertern werden bzw. sich von den reinen Tensidverwertern nicht verdrängen lassen. Der Verlust der Abbaufähigkeit für PAK trat erst bei andauernden hohen Tensidgaben bzw. -konzentrationen auf. Hohe Tensidkonzentrationen zu Beginn oder auch mit gewissen Abständen während der Inkubation waren, ebenso wie andauernde mäßige Tensidgaben, nicht von Nachteil oder sorgten sogar für steigende Umsatzraten. Glucosezugaben in die Kulturmedien während der Inkubation zeigten einen zu Plantacare vergleichbaren Effekt, so daß diese Theorie bestätigt wird.

Auch in der Literatur finden sich Hinweise zum Einfluß leichter verwertbarer C-Quellen auf den PAK-Abbau von Mikroorganismen. BAUER & CAPONE (1988) stellten fest, daß Glucosegaben von 0,0001 % keinen Effekt auf die Mineralisation von Anthracen oder Naphthalin zeigten. Beim Abbau von Phenanthren in Gegenwart von Glucose als bevorzugtes Substrat zeigte sich in einer Studie von LAHA & LUTHY (1991) bis zu einer Konzentration von 0,013 % kein hemmender Effekt. Bei einer Konzentration von 0,13 % fand sich ebenfalls keine signifikante Inhibierung, doch zeigt sich — ähnlich wie in den hier vorliegenden Abbaustudien — eine lag-Phase der Phenanthrenmineralisation, der eine sehr intensive  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung folgte. KEUTH & REHM (1991) untersuchten den Effekt von Glucosegaben auf den Phenanthrenabbau von *Arthrobacter polychromogenes* und fanden einen simultanen Abbau der beiden Verbindungen. Geringe Zugaben von Glucose (0,045 %) stimulierten den Phenanthrenabbau, bei einer Konzentration von 0,1 % verlängerte sich die lag-Phase und die Abbaurate sank, bei 0,3 % Glucose im Kulturmedium wurde der Phenanthrenabbau deutlich inhibiert. Auch diese Ergebnisse bestätigen die Interpretation der Resultate in den hier durchgeführten Abbauersuchen. In einer Studie von WEIR et al. (1995) steigerte eine Zugabe von Magermilchpulver zu Bodenslurries den Phenanthrenabbau durch *Pseudomonas* sp. und autochthonen Mikroorganismen. Begründet wurde dieses mit der gesteigerten Aktivität der Bakterien und einer um den Faktor 10 erhöhten Keimzahl.

Die Effekte, die das Plantacare in den hier vorgestellten Abbaustudien bewirkte, lassen sich nicht nur auf die bloße Funktion dieses Tensids als C-Quelle reduzieren. Die vor-

liegenden Versuchsergebnisse machen es durchaus plausibel, daß das Tensid im Kulturmedium zumindest vorübergehend solubilisierende Funktionen erfüllte, wie sie [Bild 4-1](#) und [Bild 4-2](#) darstellen. Denn daß Plantacare die PAK im Medium solubilisieren konnte, war eindeutig, und daß es selbst in geringen Konzentrationen auch als Monomere noch eine Steigerung der Wasserlöslichkeit von Benzo[a]pyren erreichte, wurde ebenfalls gezeigt. Ob daher die in den Abbaustudien beobachteten positiven Effekte von Plantacare auf den Benzo[a]pyrenabbau möglicherweise auf die solubilisierenden Eigenschaften des Tensids oder auf seine Verwertung zurückzuführen sind, läßt sich nicht eindeutig klären. In dem komplexen System der verschiedenen Versuchsvarianten mit den Mischkulturen hat sich die Kombination beider Funktionen als am wahrscheinlichsten herausgestellt.

[LIU](#) et al. (1995) untersuchten die Bedeutung eines Tensid als kompetitives Substrat zu Naphthalin und fanden einen simultanen Abbau der beiden Verbindungen, jedoch keine Inhibierung des Naphthalin-Abbaus. Naphthalin ist aber im Unterschied zu Benzo[a]pyren eine leicht abbaubare Substanz mit hoher Wasserlöslichkeit und der Effekt eines leicht abbaubaren Tensids auf den Abbau dieser Verbindung ist sicherlich nicht auf den Abbau von Benzo[a]pyren zu übertragen.

[SOEDER](#) et al. (1996) benutzte in Abbaustudien mit Phenanthren und Fluoranthren durch Reinkulturen abbaubare Tenside. Mit Lecithin als Tensid wurde die PAK-Abbauraten etwa verdoppelt, obwohl das Lecithin parallel zu den PAK abgebaut wurde. Beim Einsatz von Saponin als Tensid steigerte sich die Bioverfügbarkeit der PAK nicht und bei einer Reinkultur stellten sich lange lag-Phasen ein. Inkubationszeiten von weniger als einer Woche und im Vergleich zu Benzo[a]pyren leicht abbaubare PAK machen auch hier eine Übertragung auf die hier vorliegenden Abbaustudien mit Benzo[a]pyren nicht möglich.

[CHURCHILL](#) et al. (1995) diskutierten ebenfalls den Effekt leicht verfügbarer C-Quellen für einen PAK-Abbau. Ein Tensid aus Ölsäuren angereichert mit Nährstoffen diene als C-Quelle für die PAK-Abbauer, erfüllte jedoch gleichzeitig seine Funktion als Lösungsvermittler und steigerte so den Abbau von Phenanthren. Der Einsatz der gleichen Tensidklasse in einer Studie von [CARMICHAEL & PFAENDER](#) (1997b) führte jedoch zu einer Hemmung des Phenanthren-Abbaus.

Im allgemeinen wird die Verwendung abbaubarer Tenside als Hemmnis für einen PAK-Abbau betrachtet. [TIEHM](#) et al. (1995 und 1997) verglichen den Einfluß eines schnell und eines langsam abbaubaren Tensids auf den PAK-Abbau im Boden. Nach einem anfänglich beschleunigten PAK-Abbau durch die gesteigerte mikrobielle Aktivität hatte das leicht abbaubare Tensid – mit Ausnahme für die Verwertung von niederkernigen PAK wie Phenanthren – keinen positiven Effekt auf die Abbauraten. Das schwerer abbaubare Tensid hingegen bewirkte einen gesteigerten Abbau aller betrachteten PAK. Die Autoren führten die Inhibierung des PAK-Abbaus auf den Sauerstoffmangel zurück, der durch den schnellen Tensidabbau auftrat.

Auch in den hier durchgeführten Abbaustudien finden sich vergleichbare Ergebnisse. In den Ansätzen unter hohem Tensideinfluß (z.B. 0,5 und 1 % Plantacare-Gehalt im Biometer I) wurden die 3- und 4-Ring PAK metabolisiert. Die Mischkultur zeigte auch unter hohem Tensideinfluß ein – allerdings verringertes – Abbaupotential für PAK, aber keines für Benzo[a]pyren. Besonders Phenanthren wurde in diesen Ansätzen auf Gehalte unter 10 % abgebaut (s. [Tabelle 3-10](#)).

Ein Mangel an O<sub>2</sub> oder wahrscheinlicher ein Mangel an Nährstoffen, die Ansätze wurden in der Regel wöchentlich belüftet, könnte auch ein Grund dafür sein, daß in den Biometer-Versuchen bei Dauerzugabe höherer Tensidkonzentrationen, wie in der Versuchsreihe Biometer III, die Keimzahlen im Medium zusammenbrachen (s. [Tabelle 3-20](#)). Verdünnungen der Tensidkonzentrationen durch Mineralmedium führten dazu, daß sich die Mischpopulation wieder erholte und die Keimzahlen stiegen. Allerdings setzte in so behandelten Kulturen kein erneuter Benzo[a]pyrenabbau ein, die Fähigkeit dazu schien verloren gegangen zu sein.

[DESCHÊNES](#) et al. (1996) untersuchten den Effekt von zwei abbaubaren Tensiden auf 13 PAK-Verbindungen. Alle 2 Wochen wurden die Versuchsmikrokosmen mit frischen Tensiden beaufschlagt, der PAK-Abbau über eine Inkubationsdauer von 45 Wochen verfolgt. Der Abbau der 3- und 4-Ring PAK wurde durch die Tenside nicht beeinflusst, höhere Tensidgaben hatten jedoch einen negativen Effekt auf die Verwertung der 4-Ring PAK. Die Autoren begründen diesen Effekt damit, daß die Tenside in diesen Konzentrationen als kompetitive Substrate genutzt wurden und daher die Abbauraten der schlechter abbaubaren PAK verringerten. Außerdem könnte auch ein verstärktes Wachstum von Tensidverwertern eine Erklärung sein.

In den hier vorliegenden Abbaustudien wurde der Phenanthrenabbau durch hohe Tensidkonzentrationen ebenfalls kaum beeinflusst (s. [Tabelle 3-10](#)). Möglicherweise spielte Plantacare als kompetitives Substrat für Phenanthren keine Rolle, jedoch für die schlechter wasserlöslichen anderen PAK-Verbindungen.

Andererseits besteht, wie bereits unter [4.1](#) geschildert, eine lineare Beziehung zwischen dem n-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten einer Substanz und ihrem Verteilungskoeffizienten zwischen micellarer und wässriger Pseudophase ([EDWARDS](#) et al. 1991a und 1991b). Dieses bedeutet, daß das Verhältnis von Phenanthren und Anthracen in der micellaren Pseudophase zu Phenanthren und Anthracen in der wässrigen Pseudophase am niedrigsten von allen eingesetzten PAK war. Wenn nun — so wie es einige Autoren vermuteten — in Micellen eingeschlossene PAK nicht bioverfügbar wären ([LAHA & LUTHY](#) 1991, [JIMINEZ & BARTHA](#) 1996), so wären davon die schlechter wasserlöslichen PAK mit höherem K<sub>OW</sub> stärker betroffen als das Phenanthren mit seiner relativ hohen Wasserlöslichkeit.

[MADSEN & KRISTENSEN](#) (1997) testeten mehrere abbaubare, nichtionische Tenside, darunter auch ein Alkylpolyglycosid, auf ihren Einfluß bezüglich des PAK-Abbaus im Boden. Sie fanden eine Steigerung der Mineralisierungsrate für 2- und 3-Ring PAK nach 14 Tagen, der Abbau von 4- und 5-Ring PAK setzte erst nach 4 wöchiger Inkuba-

tion ein und war unter Tensideinfluß höher als in der Kontrolle. Benzo[a]pyren, Pyren und Benzo[b,j,k]fluoranthren wurden nur unter Tensideinfluß signifikant abgebaut. Den nur mäßigen Effekt eines der Tenside begründen sie mit einem zu schnellen Abbau dieses Tensidtyps und der dadurch weniger effektiven Solubilisierung der PAK.

In der Versuchsreihe Biometer I war in den hohen Tensidkonzentrationen eine effektive Solubilisierung von Benzo[a]pyren mit 20–40 % des vorliegenden Benzo[a]pyren gegeben, es ließ sich jedoch kein Abbau nachweisen, so daß eine solche Begründung hier nicht gelten kann. Auch der Abbau aller anderen PAK-Verbindungen war unter Tensideinfluß, im Vergleich zu den Ansätzen ohne Tensid im Kulturmedium, verringert.

In den hier durchgeführten Abbaustudien wurde bei Vorliegen von Tensidkonzentrationen knapp oberhalb der CMC eine verlängerte lag-Phase des PAK-Abbaus zu Inkubationsbeginn beobachtet. Eine Verringerung des bioverfügbaren Anteils der PAK durch Einschluß in Micellen wäre eine Erklärung für diese Beobachtung. Durch den Tensidabbau würden die Micellen zerfallen und die PAK wieder frei geben, so daß dann ein PAK-Abbau einsetzen könnte. Dabei könnte der Effekt auftreten, daß die einzelnen Benzo[a]pyren-Kristalle zahlreicher und kleiner wären, als vor der Solubilisierung. Durch diese Vergrößerung der Oberfläche würde das Benzo[a]pyren schneller ins Medium nachgelöst werden, dieses könnte zu einer erhöhten Abbaurate führen und wäre eine Erklärung für die hohen Umsatzraten in den Ansätzen mit Tensidkonzentrationen von 0,05 % nach der anfänglichen lag-Phase. Ein solcher Einfluß von vergrößerten Kristalloberflächen wurde von mehreren Autoren beschrieben (KEUTH & REHM 1991, KÖHLER 1992, TIEHM 1994).

#### 4.4 Einfluß der anderen PAK

Bedingt durch die Art ihrer Entstehung und ihrer Verbreitung treten PAK in der Umwelt immer als verschieden zusammengesetzte chemische Gemische auf. Die einzelnen PAK-Vertreter dieser Gemische unterscheiden sich u.a. in ihrer Molekülmasse und ihrer Ringzahl. Die Effekte der einzelnen Verbindungen können sich kombinieren und somit z.B. zu höheren Toxizitäten führen. Die Kombinationseffekte können auch positiv auf den Abbau wirken, indem sie mehr Substrat für mikrobielles Wachstum zur Verfügung stellen und möglicherweise die Induktion von Enzymen für den Abbau bewirken. Zwischen den einzelnen PAK-Verbindungen sind hierbei – bedingt durch die homologen Strukturen – viele Interaktionen auf mehreren Ebenen denkbar, diese können synergistische, inhibierende oder keine Effekte besitzen.

Der Abbau von Benzo[a]pyren in den hier vorliegenden Abbaustudien erfolgte ausschließlich im Cometabolismus mit anderen PAK. In der Versuchsreihe Biometer I wurde <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren ohne weitere PAK-Verbindungen zusammen mit Plantacare in einigen Biometern eingesetzt, hier ergab sich jedoch kein signifikanter Abbau.

Wie die gaschromatographische Analyse der Extrakte zeigte, konnte die Mischkultur die (nicht <sup>14</sup>C-markierten) PAK Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren verwerten.

Mit steigendem Tensidgehalt bzw. unter Dauerzugabe von Tensid oberhalb der CMC nahm die Verwertung ab. Der Abbau der einzelnen PAK-Vertreter erfolgte in der Regel in der Reihenfolge ihrer Wasserlöslichkeit.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die einzelnen PAK-Verwerter ein multiples PAK-Abbauspektrum aufweisen, dieses wurde in anderen Untersuchungen vielfach nachgewiesen (KÄSTNER et al. 1991, KIYOHARA et al. 1992, KÄSTNER et al. 1994). Dabei fanden sich Mikroorganismen, die höherkernige PAK abbauten, nur an Standorten mit PAK-Kontaminationen, während sich Naphthalin oder Phenanthren-Abbauer ubiquitär nachweisen ließen.

Auch der Abbau der PAK in Reihenfolge ihrer Wasserlöslichkeit ist typisch für den Abbau von PAK-Gemischen (WALTER et al. 1990, WEIBENFELS et al. 1990b, TIEHM 1994, TRZESICKA-MLYNARZ & WARD 1995, KELLEY & CERNIGLIA 1995). Die Anzahl der Ringe scheint in Bezug auf die Abbaubarkeit weniger relevant zu sein, der 3-Ring Aromat Anthracen wird in der Regel langsamer abgebaut, als der 4-Ring Aromat Pyren mit der im Vergleich höheren Wasserlöslichkeit. BANARJEE et al. (1995) hingegen fand beim Vergleich der Abbauraten von Anthracen und Pyren einen deutlich langsameren Abbau des 4-Ring PAK Pyren. In einigen Biometern der hier durchgeführten Versuchsreihen ergab sich ebenfalls dieses Reihenfolge. In der Versuchsreihe Biometer I wurde in nahezu allen Ansätzen Pyren langsamer abgebaut als Anthracen, gleiches galt für die Ansätze unter Tensideinfluß in Biometer II und die Ansätze unter hohem Tensideinfluß in Biometer III. Anthracen wies oft bei einem nahezu vollständigem Abbau der 3- und 4-Ring PAK die höchsten Restkonzentrationen auf, im Biometer-Versuch I wurde Anthracen jedoch in vielen Ansätzen vollständiger als Phenanthren abgebaut. Diese Auffälligkeiten bei der Wiederfindung von Anthracen können ihren Grund in Sukzessionsvorgängen in der Mischkultur haben. Für den enzymatischen Abbau sind aber neben der Löslichkeit und der Ringzahl auch noch andere substratspezifische Eigenschaften, wie z.B. die Verteilung der Elektronendichte im PAK-Molekül (ROGOFF 1961) oder auch die clusterförmige Anordnung der Ringe (YE et al. 1996), von Bedeutung.

Wenn der  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyrenabbau in den Biometern zum Erliegen kam, so konnte dieser durch das Zudotieren des PAK-Gemischs von 3- und 4-Ring-Verbindungen wieder angeregt werden. Diese Reaktion der Mikroorganismen ist ebenfalls ein Hinweis auf ihre mangelnde Fähigkeit, Benzo[a]pyren als einzige C- und Energiequelle zu nutzen.

In der Versuchsreihe Biometer IV wurde versucht, durch die Zugabe von nur einer PAK-Verbindung aus diesem Spektrum das geeignete Substrat für den cometabolischen Abbau von Benzo[a]pyren einzugrenzen.

Das Supplementieren des Kulturmediums mit Phenanthren, Fluoranthen und Pyren konnte den Cometabolismus von Benzo[a]pyren steigern. Der cometabolische Abbau von Benzo[a]pyren schien also mit mehreren PAK-Verbindungen möglich zu sein. Dabei traten z.T. lange lag-Phasen auf, diese deuten auf induzierbare Enzyme hin. Diese Ergebnisse werden durch vergleichbare Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt:

Ein cometabolischer Abbau von Benzo[a]pyren durch *Sphingomonas paucimobilis* in Gegenwart von Fluoranthen als Wachstumssubstrat wurde von YE et al. (1996) nachgewiesen. GROSSER et al. (1991) fanden in seinen Abbaustudien eine cometabolische Verwertung von Benzo[a]pyren mit Pyren als Substrat. Die limitierte Substratspezifität des Abbaus begründete die Forschergruppe mit der Ähnlichkeit der Molekülstrukturen dieser beiden PAK, sie schlossen daraus einen ähnlichen enzymatischen Abbau. Auch BAUER & CAPONE (1988) vermuteten, daß aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von PAK und ihren Abbauprodukten ein großes Spektrum an Mikroorganismen über funktionell ähnliche Oxygenasen und Abbauwege verfügt, um ein oder mehrere PAK abzubauen.

Andererseits ist es nicht bekannt, ob immer dieselben Enzymsysteme beim Abbau von Mischungen ähnlicher Substrate eingebunden sind. Physiologische, biochemische und genetische Studien zeigten, daß unterschiedliche Arten verschiedene Abbauwege für PAK nutzen (CERNIGLIA 1992, GRUND et al. 1992). Es ist auch denkbar, daß ein PAK-Abbauer mehr als einen Abbaupfad für verschiedene PAK besitzt. STRINGFELLOW & AITKEN (1995) fanden eine kompetitive Hemmung des Phenanthrenabbaus durch mehrere andere PAK. Sie schlossen daraus, daß ein sehr unspezifisches Enzym den PAK-Abbau einleitet.

Diese Hypothese findet sich auch hier bestätigt: wie die Versuchsreihe Biometer IV zeigte, wurde der Benzo[a]pyrenabbau zumindest durch die Verwertung von drei strukturell unterschiedlichen PAK cometabolisch gesteigert. Es ist jedoch sehr bemerkenswert, daß hierbei anscheinend keine kompetitive Hemmung aufgetreten ist.

Die wiederholte Zugabe von Pyren ins Kulturmedium erzielte bei fast allen Biometern lang anhaltende Phasen der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung aus dem  $^{14}\text{C}$ -markierten Benzo[a]pyren mit hohen Raten. Dabei wurde das Pyren innerhalb von einer Inkubationswoche durch die Mikroorganismen verbraucht, dieses war dadurch zu erkennen, daß die Pyren-Kristalle, die nach der Zugabe auf der Oberfläche des Mediums schwammen, von der Zugabe bis zur nächsten Probenahme verschwunden waren. Dieser schnelle Abbau des Wachstumssubstrats innerhalb einer Woche bewirkte dann sinkende  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzungsraten in der zweiten Inkubationswoche nach der Zugabe. Wöchentliche Zugaben von Pyren führten zu gleichmäßigen Abbauraten von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren. Im Vergleich mit Phenanthren, Fluoranthen und Anthracen bewirkte Pyren als Cosubstrat in der Biometerserie IV die höchsten und stabilsten  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyrenumsätze. Eine mögliche Erklärung hierfür wären die ähnlichen Molekülstrukturen des 5- und 4-Ring PAK.

JUHASZ et al. (1996) isolierten drei Stämme von *Pseudomonas cepacia*: diese konnten Benzo[a]pyren als alleinige C- und Energiequelle nutzen (s. Tabelle 1-2). Im Cometabolismus mit anderen PAK erfolgte der Abbau der höherkernigen Verbindungen parallel zu dem der niederkernigen. Die bis zu 21 Tage dauernde lag-Phase für den Abbau der 5- und 7-Ring Verbindungen wurde – im Vergleich zum Abbau dieser Substanzen als einzigem Substrat – in Anwesenheit der anderen PAK auf 7 bis 10 Tage reduziert. Auch die ermittelte Abbaurate war höher als die in den Ein-Substrat-Experimenten. Die

Forschergruppe führt den beobachteten Effekt darauf zurück, daß möglicherweise die Gegenwart der leichter abbaubaren PAK in einer erhöhten metabolische Aktivität resultierte.

Die Zugabe von Nährsalzen und Vitaminen während der Inkubation (Biometer III) zeigte keinen Effekt auf die Abbaurrate des Benzo[a]pyren. Von diesen Komponenten des Nährmediums schien daher zu diesem Zeitpunkt keine für den PAK-Abbau notwendige ins Minimum geraten zu sein.

In allen aktiven Ansätzen der Biometer-Versuche I bis IV wechselte die Farbe des Kulturmediums während der Inkubation von klar über gelb bis zu dunklem Braun. Es wurde nicht versucht, die Verbindungen, die für den Farbwechsel verantwortlich waren, zu identifizieren, doch werden solche Farbveränderung beim mikrobiellen PAK-Abbau oft beschrieben und auf die Entstehung Catechol-ähnlicher Verbindungen zurückgeführt (DAGHER et al. 1997, JUHASZ et al. 1997). Die Vergrößerung des Kulturvolumens in den Biometerkolben durch die Zugabe von Mineralmedium sollte daher eine Verdünnung der Konzentration möglicherweise vorhandener toxischer oder inhibierender Metaboliten zur Folge haben, doch es wurde keine Veränderung der Benzo[a]pyren-Abbaurrate nach Zugabe des Mediums beobachtet. Daraus wurde geschlossen, daß keine toxischen oder inhibierenden Intermediate den Abbau von Benzo[a]pyren hemmten.

## 4.5 Die Mischkultur

Die Mischkultur, die aus dem hoch mit PAK kontaminierten Standort isoliert wurde, besaß ein großes Abbaupotential für PAK. Da die Stammhaltung der Mischkultur nach der Isolation über mehrere Jahre auf PAK als einziger C- und Energiequelle erfolgte, wurde die Adaptation an dieses Substrat durch den konstanten Selektionsdruck immer ausgeprägter. Dieses belegen auch die Ergebnisse der Abbauprobungen. Die lag-Phasen zu Inkubationsbeginn wurden in der Reihenfolge der Versuche immer kürzer und die wöchentlichen Umsatzraten höher. Außerdem schienen die Kulturen in ihrer Zusammensetzung stabiler zu werden, da die jeweiligen Parallelen der Ansätze in den letzten Biometer-Versuchen nicht so starke Abweichungen voneinander aufwiesen wie zu Beginn der Versuchsreihen.

In dem Isolat aus der Bodenprobe ließen sich optisch 11 verschiedene Kolonietypen unterscheiden, von denen jedoch einige nur in geringer Keimzahl vorkamen. Die Isolierung der Bakterien erfolgte immer auf R2A-Agar, auf diesem Nährbodentyp nicht kultivierbare Bakterien wurden nicht erfaßt. Der R2A-Agar lieferte im Vergleich zum Standard I-Agar höhere Keim- und Typenzahlen (s. 3.5). Er eignete sich offenbar besser für die Nährstoffansprüche der PAK-Abbauer. Bei der nachfolgenden Diskussion der Ergebnisse ist trotzdem zu bedenken, daß möglicherweise auf diesem Nährboden nicht isolierbare Bakterien ebenfalls eine Rolle in der Biozönose der Mischkultur gespielt haben könnten. Methoden zur Quantifizierung der lebensfähigen Zellen, wie die der Lebendkeimzahlbestimmung, können nur mehr oder weniger selektiv einen Teil der

tatsächlich vorhandenen lebensfähigen Organismen erfassen. Der Wechsel der physiologischen Bedingungen während der Isolation kann zum Absterben von Arten führen, dieses würde dann in eine Unterbewertung der Bakterienzahlen resultieren. Außerdem ist eine optische Klassifizierung der Kolonien nach Form und Farbe eine nicht sehr aussagekräftige und subjektive Differenzierung von Bakterien, so daß hier einschränkend von Bakterientypen und nicht von Arten die Rede sein wird.

Die Gesamtkeimzahlen in den Biometern lagen allgemein in dem Bereich zwischen  $10^7$  und  $10^8$  koloniebildenden Einheiten/ml Kulturflüssigkeit. Nach Dauerzugabe von Plantacare in einer Konzentration oberhalb der CMC fanden sich stark verringerte Keimzahlen von  $10^5$  koloniebildende Einheiten/ml Kulturflüssigkeit (s. Bild 3-70). Die Zahl, der durch optische Differenzierung in einem Biometer jeweils isolierten Typen, schwankte zwischen 1 und 6. Die Zusammensetzung der Population aus nur einem oder zwei Typen fand sich in den Ansätzen, in denen über längere Zeit viel Plantacare zudosiert wurde. Allgemein dominierten in den Ansätzen die Typen 1, 2, 3 und z. T. auch 6.

In der Versuchsreihe Biometer I wurden die Ansätze M5 bis M9 nur mit Benzo[a]pyren und Plantacare als mögliche C- und Energiequellen angesetzt. Nach 120 Tagen Inkubation fanden sich hier noch die Typen 1, 2, 3 und 6, wobei mit zunehmender Tensidkonzentration Typ 6 und Typ 3 verschwanden. Die Empfindlichkeit dieser beiden Typen gegenüber länger andauernden hohen Tensidkonzentrationen bestätigte sich auch in anderen Versuchsreihen.

Typ 1 war in nahezu allen Biometern der dominante Bakterientyp. Er war anscheinend in der Lage, PAK und Tensid verwerten zu können. Bei steigenden Tensidkonzentrationen verwertete er nur noch das Plantacare, denn trotz ausreichend hoher Keimzahlen war keine oder nur geringe Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  meßbar. Denkbar wäre aber auch, daß er bei den Abbauvorgängen, die die PAK betrafen, seine Funktion nur im Konzert mit einem oder mehreren Partnern erfüllen konnte. Fielen diese aus, brach der PAK-Abbau zusammen.

Wenn ein Bakterientyp bei der Bestimmung der Lebendkeimzahl nicht nachgewiesen werden konnte, so bedeutete dieses nicht zwingend, daß dieser in der Mischkultur nicht vorhanden war. In Mischkulturen können sich die Bakterien in unterschiedlichen Stadien ihrer Aktivität befinden: von aktivem Stoffwechsel bis hin zu Ruhezuständen. Diese erklärt auch, daß sich bei aufeinanderfolgenden Lebendkeimzahlbestimmungen plötzlich Bakterientypen nachweisen ließen, die zuvor in dieser Mischkultur nicht identifiziert werden konnten.

Die Interaktionen der Mikroorganismen können so vielfältig und komplex sein, daß aus der bloßen Präsenz oder dem Fehlen eines Typs nicht auf seine Funktion in der Mischkultur geschlossen werden kann. Die Dominanz einer Bakterienart in einer Biozönose sagt nicht unbedingt etwas über ihre Abbauleistungen aus. Erschwert werden solche Rückschlüsse zusätzlich dadurch, daß cometabolische Vorgänge im wesentlichen versteckt ablaufen, da das Wachstum und damit auch die Dominanz von Bakterien in einer Mischpopulation auf Kosten der Cosubstrate erfolgt und daher für die einzelnen Arten

die Verwertung einer oder mehrerer der 3- und 4-Ring PAK entscheidend war. Hier müssen weiterführende Untersuchungen über die genaue Zusammensetzung der Biozönose und die Abbauleistungen ihrer Mitglieder allein und in Kombinationen abgeschlossen werden.

Die molekularbiologische Charakterisierung der einzelnen Bakterientypen mittels PCR und die physiologische Charakterisierung mittels API-Testsystem kann die Differenzierung nach optischen Gesichtspunkten ergänzen. Die Eignung dieser Methoden, mehr Transparenz in die Zusammensetzung und Entwicklung einer Mischkultur zu bringen, sollte ebenfalls geprüft werden.

Durch die Untersuchung mehrerer Isolate der Bakterientypen mit der Methode der PCR hat sich bestätigt, daß die nach optischen Kriterien unterschiedenen Typen verschiedene Bakterienarten waren. Die zu gleichen Typen zusammengeschlossene Kolonien schießen auch weitgehend einer Bakterienart anzugehören, obwohl natürlich nicht auszuschließen ist, daß weitere Bakterienarten durch die optische Differenzierung nicht erfaßt wurden.

Die physiologische Charakterisierung der Bakterientypen mittels API 20 NE-Testsystem führte aufgrund der im Test ermittelten Reaktionen zu Identifizierungsvorschlägen. Die standardisierten Testsysteme von API können dabei nur Bakterien identifizieren, die in das Profil aufgenommen wurden. Dieses umfaßt beim hier verwendeten Test 64 Mikroorganismen verschiedener Gattungen, die alle zu den nicht anspruchsvollen, gramnegativen Stäbchen und nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Andere Mikroorganismen können weder identifiziert noch ausgeschlossen werden.

Die Gram-Färbung und die mikroskopische Betrachtung der 7 isolierten Bakterientypen ordnete alle den gramnegativen Stäbchen zu, so daß der API-Test geeignete Ergebnisse versprach.

Das Vorkommen von ausschließlich gramnegativen Bakterien in der Mischkultur könnte auch ein Resultat des Tensideinflusses gewesen sein. Bekanntermaßen sind gramnegative Arten weniger sensitiv gegenüber Tensiden als grampositive Bakterien (SWISHER 1987). MATSUMURA et al. (1990) testeten Alkylpolyglycoside auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften und stellten fest, daß grampositive Bakterienstämme empfindlicher auf den Tensideinfluß reagierten. Die Tensidkonzentrationen, die solche toxische Effekte verursachten, lagen jedoch höher, als die in den hier durchgeführten Abbaustudien eingesetzten Mengen.

In den vergangenen Jahren sind eine Reihe von PAK-Abbauern unter den Bakterien identifiziert worden. Im wesentlichen gehören sie zu den gramnegativen Bodenbakterien der Gattungen *Pseudomonas* (FOGHT & WESTLAKE 1988, MUELLER et al. 1990, WEIßENFELS et al. 1990a, MENN et al. 1993, MAUE et al. 1994, STRINGFELLOW & AITKEN 1994, BOUCHEZ et al. 1995a, TRZESICKA-MLYNARZ & WARD 1995, BURD & WARD 1996), *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Beijerinckia* (SCHOCKEN & GIBSON 1984, STUCKI & ALEXANDER 1987, MAHAFFEY et al. 1988) und *Flavobacterium* (STUCKI &

ALEXANDER 1987, MAUE et. al 1994, TRZESICKA-MLYNARZ & WARD 1995), aber die Oxidation aromatischer Verbindungen ist auch für grampositive Gattungen wie *Arthrobacter* (KEUTH & REHM 1991), *Nocardia*, *Rhodococcus* (WALTER et al. 1991, MAUE et. al 1994, BOUCHEZ et al. 1995a, TONGPIM & PICKARD 1996), *Gordona* (KÄSTNER et al. 1994, MAHRO et al. 1995) und *Corynebacterium* bekannt. In den letzten Jahren belegen außerdem zunehmend Veröffentlichungen einen PAK-Abbau durch *Mycobacterium* (GUERIN & JONES 1988b, HEITKAMP et al. 1988a und 1988b, CERNIGLIA 1991, GROSSER et al. 1991 und 1995, BOLDRIN et al. 1993, KÄSTNER et al. 1994, MAUE et. al 1994, KELLEY et al. 1995, MAHRO et al. 1995).

KIYOHARA et al. (1992) isolierte PAK-Abbauer aus 700 Umweltproben. Alle isolierten Stämme gehörten zu den aeroben, gramnegativen stäbchenförmigen Bakterien. Die Gruppen, zu denen die Isolate gehörten, waren *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* und *Aeromonas*.

Die Dominanz gramnegativer Bakterien unter den PAK-Abbauern mag an der Zusammensetzung ihrer Membran liegen (SIKKEMA et al. 1995). Gramnegative Bakterien besitzen eine äußere Membran aus Phospholipiden, Lipopolysacchariden und anderen Lipiden, die der Mureinschicht in erheblicher Menge aufliegen. Der Aufbau der Zelloberfläche scheint für den PAK-Abbau von Bedeutung zu sein. Bakterien, die eine hydrophobe Zellhülle besitzen, haben möglicherweise eine höhere Kapazität PAK aufzunehmen (BOUCHEZ et al. 1997b). STRINGFELLOW & AITKEN (1994) beobachteten, daß Bakterien mit hydrophoben Zelloberflächen Biofilme auf Phenanthrenkristallen bilden konnten, Bakterien mit hydrophilen Zelloberflächen zeigten diese Fähigkeit nicht.

Das API-Testsystem umfaßt eine Vielzahl der aufgezählten gramnegativen PAK-Abbauer und ist daher gut zu deren Identifizierung geeignet. Es wird zur Isolierung und Charakterisierung von PAK-Verwertern häufig eingesetzt (WEIBENFELS et al. 1990a, KÄSTNER et al. 1991 und 1994, DAGHER et al. 1997).

Für die Bakterientypen 1 bis 7 ergaben sich nach der Testdurchführung und Auswertung durch das Identifizierungsprogramm 6 verschiedene Bakterienarten, von denen Typ 2, Typ 3 und Typ 6 mit sehr guter bis ausgezeichneter Identifizierung ermittelt wurden.

Die ermittelten Mikroorganismen gehören vorwiegend zu den oben aufgezählten PAK-Abbauern. Durchsucht man die Literatur gezielt nach diesen Bakterien, so finden sich einige Hinweise zu dem PAK-Abbaupotential dieser Arten (s. [Tabelle 4-1](#)).

**Tabelle 4-1:** Literaturübersicht über das PAK-Abbaupotential der nach API identifizierten Mikroorganismen

Typ	Bakterien	nachgewiesener PAK-Abbau	Quelle
2	<i>Aeromonas</i> sp.	Phen.	KIYOHARA et al. 1976
2	<i>Aeromonas</i> sp. (4 Isolate)	Phen.	KIYOHARA et al. 1992
7	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Fluora., Phen., Anthr., Fluoren, Pyr., Benzo[a]anthr.	WEISSENFELS et al. 1990b und 1991
7	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Fluora., Phen., Anthr., Fluoren, Pyr., Benzo[a]anthr.	WEISSENFELS et al. 1991
7	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Fluora.	WEIBENFELS et al. 1990a
7	<i>Alcaligenes</i> sp.	Phen.	ASHOK et al. 1995
7	<i>Alcaligenes</i> sp. (15 Isolate)	Phen., Pyr.	KIYOHARA et al. 1992
5	<i>Pseudomonas</i> sp. (49 Isolate)	Phen., Pyr., Anthr.	KIYOHARA et al. 1992
5	<i>Pseudomonas vesicularis</i>	Fluoren	WEIBENFELS et al. 1990a
6	<i>Sphingomonas</i> sp.	Acenaphthen, Anthr., Phen.	MAUE et al. 1994
6	<i>Sphingomonas</i> sp.	Anthr., Phen., Fluora.	MAHRO et al. 1995
6	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Anthr., Phen.	KÄSTNER et al. 1994
6	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Fluora., Pyren, Benz[a]Anthr., Chrysen, BaP, Benzo[b]fluora., Dibenz[a,h]anthr.	YE et al. 1996
6	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Phen., Fluora., 4- u. 5-Ring PAK	MUELLER et al. 1997
6	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (ehem. <i>Pseudomonas paucimobilis</i> )	Fluora., Phen., Anthr., Fluoren, Pyr., Chrysen, Benzo[b]fluoren	MUELLER et al. 1990, WEIBENFELS et al. 1990a
6	<i>Sphingomonas</i> sp.	Fluoren, Phen., Anthr., Fluora., Benz[a]anthracen, Pyr.	DAGHER et al. 1997
1	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Fluora.	MUELLER et al. 1997

Die 6 Identifizierungsvorschläge des API-Testsystems beinhalteten 5 Bakterienarten, die aus der Literatur als PAK-Abbauer bekannt sind. Dieses erhärtet die Aussagekraft des Testsystems. Da die Bakterien auf ein PAK-Spektrum als einziger C- und Energiequelle dauerkultiviert wurden – die Verwertung von Plantacare als zusätzliche C-Quelle war ja nur als Variante in einigen Biometern möglich – müssen alle Bakterien in PAK-Abbauprozesse eingebunden sein.

In den Mittelpunkt der identifizierten PAK-Abbauer sind in den letzten Jahren neben den bereits erwähnten Mycobacterien die *Sphingomonas*-Arten gerückt (eine Bakteriengattung, die früher den *Pseudomonaden* zugeordnet wurde). Der Bakterientyp 6 wurde durch das API-System als *Sphingomonas paucimobilis* identifiziert.

Der Bakterienstamm *Beijerinckia* sp., der mit Hilfe von Succinat und Biphenyl Benz[a]anthracen und Benzo[a]pyren cometabolisch umsetzen kann und mit dem es GIBSON et al. (1975) gelang, zwei Metaboliten des Benzo[a]pyrenabbaus zu identifizieren, wurde durch neue Erkenntnisse mit Hilfe biochemischer und phylogenetischer Techniken bei den *Sphingomonaden* eingeordnet und zu *Sphingomonas yanoikuyae* umbenannt (KHAN et al. 1996).

MUELLER et al. (1997) untersucht die Diversität von PAK-Abbauern bezüglich ihrer Phylogenie und Physiologie und wies den *Sphingomonaden* eine zentrale Stellung unter PAK-Verwertern zu. Er vermutet, daß diese Bakterien auf ihrer Zelloberfläche spezifische Eigenschaften besitzen, die speziell die höhermolekularen PAK zu den abbauenden Enzymen in der Zellmembran vermitteln. In vergleichenden Abbaustudien besaßen aber nicht alle *Sphingomonas*-Arten die Kapazitäten, PAK abzubauen. Die Forschergruppe schloß daraus, daß manche Arten in PAK kontaminierten Standorten effektiver die notwendigen Gene für den PAK-Abbau einschalten können.

Aufgrund seines hohen Abbaupotentials für PAK wurde ein *Sphingomonas* sp. zur Entwicklung eines mikrobiellen Biosensors ausgewählt, mit dem ein rasches Screening auf PAK möglich ist (KÖNIG et al. 1996).

In den hier durchgeführten Versuchsreihen war der Bakterientyp 6 jedoch nicht in allen aktiven Mischkulturen nachzuweisen, so daß es fraglich ist, ob diese *Sphingomonas*-Art hier wirklich eine Schlüsselfunktion für den Benzo[a]pyrenabbau hatte, aus den oben genannten Gründen ist dieses jedoch auch nicht auszuschließen.

Die Bakterientypen 1 und 2 waren die dominanten Typen in nahezu allen aktiven Biometern.

In Biometer-Versuch IV zeigten sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Mischpopulationen in den einzelnen Biometern, nachdem diese mit unterschiedlichen PAK-Verbindungen supplementiert wurden. Hier setzten sich die Bakterien in der Mischpopulation durch, die das angebotene Wachstumssubstrat nutzen konnten. Typ 1, Typ 2 und würden damit zu den Phenanthren-Verwertern gehört haben; Typ 1, Typ 3, und Typ 6 konnten Flouranthen abbauen und Typ 2, Typ 3 und Typ 6 waren Pyren-Verwerter.

Anscheinend besaßen einige Bakterien ein sehr breites PAK-Abbauspektrum und konnten mehrere der PAK-Verbindungen verwerten. Die Bedeutung der einzelnen Isolate für den PAK-Abbau – und dabei insbesondere für den Abbau von Benzo[a]pyren — müssen weiterführende Versuche mit definierten Mischkulturen zeigen. Auf diese Art wird sich dann auch klären lassen, ob möglicherweise bisher nicht auf R2A-Agar kultivierte Organismen entscheidende Abbauleistungen liefern. Solche Identifizierungsuntersuchungen sind aufgrund der langwierigen Abbauprobe mit Benzo[a]pyren sehr zeitaufwendig und waren nicht primäres Ziel dieser Arbeit.

Die Methode der PCR und der Identifizierungstest mit dem API-System erwiesen sich als gut handhabbare und aussagekräftige Untersuchungsverfahren, nähere Informationen über die Zusammensetzung einer Mischkultur zu erhalten. Ihr Einsatz zur Kontrolle der Entwicklung definierter Mischkulturen in Abbaustudien könnte es ermöglichen, Sukzessionsvorgänge innerhalb der mikrobiellen Biozönosen aufzuklären.



## 5 Zusammenfassung

Der mikrobielle Abbau von PAK wurde besonders unter dem Aspekt der biologischen Altlastensanierung in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Über den Abbau von fünf- und mehrkernigen Verbindungen ist jedoch immer noch verhältnismäßig wenig bekannt, obwohl gerade dieser Gruppe aufgrund ihrer mutagenen und cancerogenen Eigenschaften und ihrer hohen Persistenz eine Schlüsselstellung für den Erfolg biologischer Sanierungsmaßnahmen zukommt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit sollte daher der mikrobiologische Abbau der Verbindung Benzo[a]pyren als Leitsubstanz der höherkernigen PAK stehen. Dieser Abbau konnte über den Einsatz von radioaktiv markiertem Benzo[a]pyren verlässlich quantifiziert werden.

Die geringe Wasserlöslichkeit und Lösungsrate dieser Verbindung wird oftmals als Grund für einen limitierten Abbau dieser Substanz genannt. Die Eignung eines biologisch abbaubaren Tensids zur Verbesserung dieser Eigenschaft von Benzo[a]pyren und damit zur Steigerung des Benzo[a]pyren-Abbaus wurde untersucht.

Die aus einer mit PAK hoch belasteten Bodenprobe isolierte Mischkultur besaß ein hohes Abbaupotential für PAK und konnte mit diesen Verbindungen als einzige C- und Energiequelle wachsen. Neben dem Abbau von Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren konnte die Mischkultur auch Benzo[a]pyren abbauen. Dieser Abbau erfolgte cometabolisch, wobei die anderen PAK als Wachstumssubstrate dienten. Der erzielte Umsatz für Benzo[a]pyren betrug bis zu 65 %, dafür wurden jedoch Inkubationszeiträume von mehr als einem Jahr benötigt. Eine Metabolisierung von Benzo[a]pyren als einzige C- und Energiequelle konnte nicht nachgewiesen werden.

Alle getesteten Tenside konnten Benzo[a]pyren in hohem Maße solubilisieren. Eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Benzo[a]pyren trat dabei bereits bei Tensidkonzentrationen unterhalb der CMC auf. Das Alkylpolyglycosid Plantacare 2000 UP wurde für den Einsatz in die mikrobiellen Abbaustudien mit <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren ausgewählt. Es war für die Gesamtheit der Mischkultur gut verträglich, biologisch abbaubar und von seinem Aufbau und seiner Struktur mit mikrobiell synthetisierten Biotensiden vergleichbar.

Im Kulturmedium mit einer Plantacare-Konzentration deutlich oberhalb der CMC wurde Benzo[a]pyren durch die Tensidmicellen bis zum Inkubationsende um das 60fache – verglichen mit den Ansätzen ohne Tensid – solubilisiert. In diesen Ansätzen fand sich kein Benzo[a]pyren-Abbau und die Mineralisation der anderen PAK-Verbindungen war deutlich verringert. Bei Vorliegen von Plantacare-Konzentrationen im Bereich der CMC und darunter baute die Mischpopulation das Tensid zügig ab. Wiederholte Zugaben von Tensidmengen in Höhe der CMC resultierten in einer Inhibierung

des PAK-Abbaus. Die Keimzahlen der Mischpopulation verringerten sich und die Diversität sank. Geringere Tensidkonzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf den Gesamt-PAK-Abbau, es ergaben sich jedoch im Mittel erhöhte Umsatzraten an Benzo[a]pyren. Ein zu Inkubationsbeginn vorliegender Tensidgehalt im Kulturmedium verzögerte den Beginn der Freisetzung von  $^{14}\text{CO}_2$  aus dem  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, führte jedoch dann kurzfristig zu äußerst hohen Benzo[a]pyren-Abbauraten. Diese beobachteten Effekte werden vorrangig auf die Nutzung des Plantacare als C-Quelle zurückgeführt. Zu Inkubationsbeginn konnte sich so in den Ansätzen mit Tensid eine gestärkte Mischpopulation dem PAK-Abbau zuwenden, bei intensiverem Tensideinfluß wurden die PAK-Abbauer verdrängt oder sie verloren ihre Abbaufähigkeit.

Aber auch die guten PAK-Solubilisierungseigenschaften des Plantacare könnten, zumindest kurzfristig und bei Vermeidung von Überdosierung, für den  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren-Abbau von positiver Bedeutung sein. Möglicherweise wird das Benzo[a]pyren durch Einschluß in die Tensidmicellen der mikrobiellen Verfügbarkeit zunächst entzogen – so daß es zu einer verlängerten lag-Phase der  $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung kommt –, beim Zerfall der Micellen durch den mikrobiellen Plantacareabbau jedoch wieder freigegeben. Dieses hätte den Effekt, daß die einzelnen Benzo[a]pyren-Kristalle dann zahlreicher und kleiner sind als ohne Solubilisierung. Durch die so erfolgte Vergrößerung der Kristalloberfläche würde das Nachlösen des Benzo[a]pyrens ins Medium beschleunigt.

Der Abbau von Benzo[a]pyren konnte durch eine regelmäßige Versorgung mit den niederkernigeren PAK über längere Zeiträume aufrecht erhalten werden oder wieder induziert werden. Eine stabile Phase des Benzo[a]pyren-Abbaus über einen langen Inkubationszeitraum ließ sich dabei mit Pyren als Wachstumssubstrat erreichen.

Die Zusammensetzung und Entwicklung der Mischkultur wurde durch optische Differenzierung der Kolonietypen kontrolliert. Durch den Einsatz der molekularbiologischen Methode der PCR ließen sich die dabei gewonnenen Ergebnisse festigen und durch das API-Testsystem ergaben sich Identifizierungsvorschläge zu einigen der isolierten Bakterientypen. Diese sind zu einem großen Teil als PAK-Abbauer aus der Literatur bekannt.

## 6 Ausblick

Die vorliegenden Studien zum Benzo[a]pyren-Abbau haben gezeigt, daß adaptierte Mikroorganismenmischkulturen die Fähigkeit zum Abbau dieser Verbindung besitzen können. Sie bringen Voraussetzungen mit, die sie für weitere wissenschaftliche Untersuchungen, besonders auch im Hinblick auf eine eventuelle praktische Anwendung bei der Sanierung kontaminierter Standorte interessant werden lassen. Es ist sicherlich von Bedeutung Bakterien zu isolieren, die imstande sind, höher molekulare PAK zu mineralisieren. Diese Isolate können bei der biologischen Altlastensanierung zur Steigerung des PAK-Abbaus eingesetzt werden und insbesondere die höherkernigen PAK abbauen, welche oft von der autochthonen Mikroorganismenpopulation nicht verwertet werden.

Künftige Untersuchungen sollten sich aber nicht nur auf die Suche nach weiteren Abbauspezialisten beschränken, die höherkondensierte aromatische Verbindungen effektiv metabolisieren können, sondern sie sollten sich verstärkt auf das Zusammenspiel der Mitglieder solcher Populationen beim Schadstoffabbau richten. Dabei sollte sich das Augenmerk, neben der Bestimmung von Abbaufähigkeiten einzelner Mitglieder, auf die Wechselwirkungen und Interaktionen in der mikrobiellen Gemeinschaft richten.

Für eine Klärung der Zusammenhänge bei der Metabolisierung von Xenobiotica sind aber auch Untersuchungen zur Identifizierung und Charakterisierung der beim Abbau von Schadstoffen beteiligten Enzyme und zur Aufklärung der Mechanismen der Stoffaufnahmen durch die Mikroorganismen unumgänglich. Gerade auf dem letztgenannten Gebiet ist bis heute wenig bekannt und besteht ein großer Forschungsbedarf.

Ein erfolgreicher Tensideinsatz zur Steigerung der Bioverfügbarkeit schlecht wasserlöslicher Verbindungen muß besonders für die höherkernigen PAK in Frage gestellt werden. Die Forderung nach der Verwendung von abbaubaren Tensiden auf der einen Seite und das Vorhandensein von extrem schwer und möglicherweise nur im Cometabolismus abbaubaren Substanzen auf der anderen Seite erschweren das Auffinden eines geeigneten Systems. Hier sind weitere Forschungsansätze nötig, die ihr Augenmerk speziell auf die gering wasserlöslichen, schwer abbaubaren PAK richten.



## 7 Literaturverzeichnis<sup>2</sup>

- ALEF, K. (1990): Bestimmung mikrobieller Aktivität und Biomasse in Boden und Kompost mit der Dimethylsulfoxid-Reduktion. In: *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* **2**, S. 76–78
- ALEF, K.; KLEINER, D. (1989): Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxid reduction. In: *Biol. Fertil. Soils* **8**, S. 349–355
- ANDREE, H.; MIDDELHAUVE, B. (1991): Möglichkeiten des Einsatzes von Alkylpolyglucosiden in Wasch- und Spülmitteln. In: *Tenside Surf. Det.* **28**, S. 413–418
- ARONSTEIN, B. N.; CALVILLO, Y. M.; ALEXANDER, M. (1991): Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. In: *Environ. Sci. Technol.* **25**, S. 1728–1731
- ARONSTEIN, B. N.; ALEXANDER, M. (1992): Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **11**, S. 1227–1233
- ASHOK, B. T.; SAXENA, S. (1995): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. In: *J. Sci. Ind. Res.* **54**, S. 443–451
- ASHOK, B. T.; SAXENA, S.; MUSARRAT, J. (1995): Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery. In: *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, S. 246–248
- ATLAS, R. M. (1988): *Microbiology: fundamentals and applications*. New York : Macmillan Publishing Company
- BADER, M. S. H.; CLARKSON, W. W. (1995): An overview of the oil lakes in Kuwait: the problem and remedial methods. In: *J. Environ. Sci. Health* **A30**, S. 1039–1057
- BALZER, D. (1991): Alkylpolyglucosides, their physico-chemical properties and their uses. In: *Tenside Surf. Det.* **28**, S. 419–427
- BANARJEE, D. K.; FEDORAK, P. M.; HASHIMOTO, A.; MASLIYAH, J. H.; PICKARD, M. A.; GRAY, M. R. (1995): Monitoring the biological treatment of anthracene-contaminated soil in a rotating-drum bioreactor. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, S. 521–528

---

<sup>2</sup>Die Anordnung der Literaturangaben in diesem Literaturverzeichnis erfolgte in Anlehnung an die Norm DIN 1505, Teil 2 Januar 1984: *Titelangaben von Dokumenten*

- BANAT, I. M. (1995): Biosurfactants production and possible uses in microbial enhancement oil recovery and oil pollution remediation: a review. In: *Bioresource Technology* **51**, S. 1–12
- BARNESLEY, E. A. (1975): The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene. In: *Can. J. Microbiol.* **21**, S. 1004–1008
- BARTHA, R.; PRAMER, D. (1965): Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. In: *Soil Sci.* **100**, S. 68–70
- BARTHA, R.; ATLAS, R. M. (1977): The microbiology of aquatic oil spills. In: *Adv. Appl. Microbiol.* **22**, S. 225–261
- BAUER, J. E.; CAPONE, D. G. (1985): Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, S. 81–90
- BAUER, J. E.; CAPONE, D. G. (1988): Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 1649–1655
- BAUMANN, H. (1991): Neuere Entwicklungen auf dem Gebiet fettchemischer Tenside. In: *Henkel-Referate* **27**, S. 5–9
- BERTH, P.; GERIKE, P.; GODE, P.; STEBER, J. (1988): Zur ökologischen Bewertung technisch wichtiger Tenside. In: *Tenside Surfactants Detergents* **25**, S. 108–115
- BHATNAGAR, L.; FATHEPURE, B. (1991): Mixed cultures in detoxification of hazardous waste. In: ZEIKUS, J. G.; JOHNSON, E. A. (Hrsg.): *Mixed cultures in biotechnology*. New York : McGraw-Hill, Inc., S. 293–340
- BIRMAN, I; ALEXANDER, M. (1996): Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, S. 267–272
- BLANKENHORN, I. (1990): Ein Methodenvergleich zur Analytik der PAK in Feststoffproben. In: ARENDT, F.; HINSEVELD, M.; VAN DEN BRINK, W. J. (Hrsg.): *Altlastensanierung '90*. Bonn: TNO/BMFT, S. 915–919
- BLUME, H.-P. (Hrsg.) (1992): *Handbuch des Bodenschutzes: Bodenökologie und -belastung; vorbeugende und abwehrende Schutzmaßnahmen*. Landsberg/Lech : ecomed
- BLUMER, M. (1976): Polycyclic aromatic compounds in nature. In: *Sci. American* **234**, S. 35–45
- BÖCKER, T.; THIEM, J. (1989): Synthese und Eigenschaften von Kohlenhydrattensiden. In: *Tenside Surf. Det.* **26**, S. 318–324
- BOETHLING, R. S. (1984): Biodegradation testing of insoluble chemicals. In: *Environ. Toxikol. Chem.* **3**, S. 5–7

- BOLDRIN, B. (1992): *Der Abbau von polyzyklischen aromatische Kohlenwasserstoffen (PAK) durch Bodenbakterien: Selektionierung, Isolierung und Charakterisierung PAK-verwertender Misch- und Reinkulturen aus dem Untergrund eines kontaminierten Standortes*. Diss. Uni Karlsruhe
- BOLDRIN, B.; TIEHM, A.; FRITZSCHE, C. (1993): Degradation of phenanthrene, fluorene fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, S. 1927–1930
- BOLLAG, W. B.; BOLLAG, J.-M. (1992): Biodegradation. In: LEDERBERG, J. (Hrsg.): *Encyclopedia of Microbiology*. Vol. 1, Orlando : Academic Press, S. 269–276
- BOSSERT, I.; KACHEL, W. M.; BARTHA, R. (1984): Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, S. 763–767
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J.-P. (1995a): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, S. 156–164
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J.-P. (1995b): Substrate availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, S. 952–960
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; BESNAINOU, B.; LEVEAU, J.-V.; VANDECASTEELE, J.-P. (1997a): Kinetic studies of biodegradation of insoluble compounds by continuous determination of oxygen consumption. In: *J. Appl. Microbiol.* **82**, S. 310–316
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J.-P. (1997b): An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. In: *Microbiol.* **143**, S. 1087–1093
- BRAGG, J. R.; PRINCE, R. C.; HARNER, E. J.; ATLAS, R. M. (1994): Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. In: *Nature* **368**, S. 413–418
- BREURE, A. M.; VOLKERING, F.; MULDER, H.; RULKENS, W. H.; VAN ANDEL, J. G. (1995): Enhancement of bioavailability by surfactants. In: VAN DEN BRINK, W. J.; BOSMAN R.; ARENDT F. (Hrsg.): *Contaminated Soil '95*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, S. 939–948
- BRYNIOK, D. (1993): Practical aspects of PAH degradation. In: *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, **58/4a**, S. 1733–1740
- BRYNIOK, D. (1997): PAK-Abbau und Freisetzung von Metaboliten. In: KNORR, C.; VON SCHELL, T. (Hrsg.): *Mikrobieller Schadstoffabbau: Ein interdisziplinärer Ansatz*. Braunschweig : Vieweg
- BUMPUS, J. A. (1989): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, S. 154–158

- BUNZEL, S.; NIEBELSCHÜTZ, H.; VOLLENBROICH, D.; VATER, J. (1995): Verwendung von Biotensiden bei der Sanierung von Hydraulikölschäden. In: *TerraTech* **4**, S. 62–64
- BURD, G.; WARD, O. P. (1996): Involvement of a surface-active high molecular weight factor in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas marginalis*. In: *Can. J. Microbiol.* **42**, S. 791–797
- BURY, S. J.; MILLER, C. A. (1993): Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. In: *Environ. Sci. Technol.* **27**, S. 104–110
- CALDER, J. A.; LADER, J. H. (1976): Effect of dissolved aromatic hydrocarbons on the growth of marine bacteria in batch culture. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, S. 95–101
- CARMICHAEL, L. M.; PFAENDER, F. K. (1997a): Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: relationship to soil characteristics and preexposure. In: *Environ. Toxikol. Chem.* **16**, S. 666–675
- CARMICHAEL, L. M.; PFAENDER, F. K. (1997b): The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. In: *Biodegradation* **8**, S. 1–13
- CERNIGLIA, C. E. (1984a): Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae. In: *Rev. Biochem. Toxicol.* **3**, S. 321–361
- CERNIGLIA, C. E. (1984b): Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Adv. Appl. Microbiol.* **30**, S. 31–71
- CERNIGLIA, C. E. (1991): Biodegradation of organic contaminants in sediments: overview and examples with polycyclic aromatic hydrocarbons. In: BAKER, R. A. (Hrsg.): *Organic substances and sediments in water*. Vol. 2, Boca Raton : Lewis Publishers, S. 267–281
- CERNIGLIA, C. E. (1992): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Biodegradation* **3**, S. 351–368
- CERNIGLIA, C. E. (1993): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Current Opinion in Biotechnology* **4**, S. 331–338
- CERNIGLIA, C. E.; HEITKAMP, M. A. (1989): Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. In: VARANASI, U. (Hrsg.): *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. Boca Raton : CRC Press, S. 41–68
- CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B.; CROW, S. A. (1992): Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. In: WINKELMANN, G. (Hrsg.): *Microbial Degradation of Natural Products*. Weinheim : VCH, S. 193–217
- CHURCHILL, P. F.; DUDLEY, R. J.; CHURCHILL, S. A. (1995): Surfactant-enhanced bioremediation. In: *Waste Management* **15**, S. 371–377

- COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. (1989): Surface-active compounds from microorganisms. In: *Adv. Appl. Microbiol.* **26**, S. 229–253
- DAGHER, F.; DÉZIEL, E.; LIRETTE, P.; PAQUETTE, G.; BISAILLON, J.-G.; VILLEMUR, R. (1997): Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. In: *Can. J. Microbiol.* **43**, S. 368–377
- DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H. JR.; CASSELMAN, M. E. (1981): Effects of sediment pH and redox conditions on degradation of benzo(a)pyrene. In: *Marine Pollution Bulletin* **12**, S. 251–253
- DESCHÊNES, L.; LAFRANCE, P.; VILLENEUVE, J.-P.; SAMSON, R. (1996): Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, S. 638–646
- DÉZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINE, F.; BISAILLON, J.-G. (1996): Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, S. 1908–1912
- EDWARDS, N. T. (1983): Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment – a review. In: *J. Environ. Qual.* **12**, S. 427–441
- EDWARDS, D. A.; LIU, Z.; LUTHY, R. G. (1991a): Surfactant-enhanced solubility of hydrophobic organic compounds in water and in soil-water systems. In: BAKER, R. A. (Hrsg.): *Organic substances and sediments in water*. Vol. 2, Boca Raton : Lewis Publishers, S. 383–404
- EDWARDS, D. A.; LUTHY, R. G. ; LIU, Z. (1991b): Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. In: *Environ. Sci. Technol.* **25**, S. 127–133
- EDWARDS, D. A.; LAHA, S.; LIU, Z.; LUTHY, R. G. (1992a): Solubilization and biodegradation of hydrophobic organic compounds in soil-aqueous systems with nonionic surfactants. In: SABATINI, D. A.; KNOX, R. C. (Hrsg.): *Transport and Remediation of Subsurface Contaminants: colloidal, interfacial, and surfactant phenomena*. Washington D. C. : ACS Symposium Series, S. 159–168
- EDWARDS, D. A.; LIU, Z.; LUTHY, R. G. (1992b): Interactions between nonionic surfactant monomers, hydrophobic organic compounds and soil. In: *Wat. Sci. Tech.* **26**, S. 147–158
- EFROYMSON, R. A.; ALEXANDER, M. (1991): Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, S. 1441–1447

- EICHLER, B.; BRYNIOK, D.; VORBECK, C.; LUTZ, M.; ACKERMANN, B.; FREIERSCHRÖDER, D., KNACKMUSS, H.-J. (1991): Mikrobieller Abbau polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) I, Isolierung und Charakterisierung PAK-abbauender Bakterien. In: BEHRENS, D.; WIESNER, J. (Hrsg.): *Mikrobiologische Reinigung von Böden*. Frankfurt am Main : DECHEMA, S. 274–278
- ELLIS, B.; BALBA, M. T.; THEILE, P. (1990): Bioremediation of oil contaminated land. In: *Environ. Technol.* **11**, S. 443–455
- ENGBRETSON, R. R.; VON WANDRUSZKA, R. (1994): Microorganization in dissolved humic acids. In: *Environ. Sci. Technol.* **28**, S. 1934–1941
- 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. In: *Chemosphere* **28**, S. 683–692
- FOGHT, J. M.; WESTLAKE, D. W. S. (1988): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. In: *Can. J. Microbiol.* **34**, S. 1135–1141
- 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. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, S. 36–42
- FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. (1991): Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. In: *J. Ind. Microbiol.* **8**, S. 237–246
- FU, P. P.; BELAND, F. A.; YANG, S. K. (1981): Effect of dihydrodiol conformation on the metabolic formation of vicinal dihydrodiol epoxides. In: COOKE, M.; DENNIS, A. J. (Hrsg.): *Chemical Analysis and Biological Fate: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Columbus, Ohio : Battelle Press, S. 655–666
- FÜHR, F.; SCHEELE, B.; KLOSTER, G. (1986): Schadstoffeinträge in den Boden durch Industrie, Besiedlung, Verkehr und Landbewirtschaftung (organische Stoffe). In: VDLUFA (Hrsg.): *Bodenbewirtschaftung, Bodenfruchtbarkeit, Bodenschutz*. VDLUFA-Schriftenreihe, Bd. 16, Darmstadt : VDLUFA, S. 73–84
- GIBSON, D. T.; MAHADEVAN, V.; JERINA, D. M.; YAGI, H.; YEH, H. J. C. (1975): Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. In: *Science* **189**, S. 295–297
- GIBSON, D. T.; SUBRAMANIAN, V. (1984): Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: GIBSON, D. T. (Hrsg.): *Microbial degradation of organic compounds*. New York : Marcel Dekker, S. 181–252
- GRIMBERG, S. J.; STRINGFELLOW, W. T.; AITKEN, M. D. (1996): Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, S. 2387–2392

- GRIMMER, G.; BRUNE, H.; DETTBARN, G.; JACOB, J.; MISFELD, J.; MOHR, U.; NAUJACK, K.-W.; TIMM, J.; WENTZEL-HARTUNG, R. (1991): Relevance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. In: *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, S. 792–795
- GROSSER, R. J.; WARSHAWSKY, D.; VESTAL, J. R. (1991): Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, S. 3462–3469
- GROSSER, R. J.; WARSHAWSKY, D.; VESTAL, J. R. (1995): Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, S. 375–382
- GRUND, E.; DENECKE, B.; EICHENLAUB, R. (1992): Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, S. 1874–1877
- GUERIN, W. F.; JONES, G. E. (1988a): Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 929–936
- GUERIN, W. F.; JONES, G. E. (1988b): Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 937–944
- GUHA, S.; JAFFÉ, P. R. (1996a): Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. In: *Environ. Sci. Technol.* **30**, S. 605–611
- GUHA, S.; JAFFÉ, P. R. (1996b): Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. In: *Environ. Sci. Technol.* **30**, S. 1382–1391
- HEITKAMP, M. A.; CERNIGLIA, C. E. (1987): Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **6**, S. 535–546
- HEITKAMP, M. A.; CERNIGLIA, C. E. (1988): Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 1612–1614
- HEITKAMP, M. A.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C. E. (1988a): Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 2549–2555
- HEITKAMP, M. A.; FREEMAN, J. P.; MILLER, D. W.; CERNIGLIA, C. E. (1988b): Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of ring oxidation and ring fission products. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 2556–2565
- HEITKAMP, M. A.; CERNIGLIA, C. E. (1989): Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, S. 1968–1973

- HERBES, S. E.; SCHWALL, L. R. (1978): Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, S. 306–316
- HOMMEL, R. K. (1990): Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. In: *Biodegradation* **1**, S. 107–119
- HOSLER, K. R.; BULMAN, T. L.; FOWLER, P. J. A. (1988): Der Verbleib von Naphthalin, Anthracen und Benzpyren im Boden bei einem für die Behandlung von Raffinerieabfällen genutzten Gelände. In: WOLF, K.; VAN DEN BRINK, W. J.; COLON, F. J. (Hrsg.): *Altlastensanierung* '88. Band I, Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, S. 111–113
- JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. (1993): Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, S. 945–952
- JIMINEZ, I. Y.; BARTHA, R. (1996): Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, S. 2311–2316
- JUHASZ, A. L.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. (1996): Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. In: *Biotechnol. Lett.* **18**, S. 577–582
- JUHASZ, A. L.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. (1997): Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. In: *J. Appl. Microbiol.* **83**, S. 189–198
- KÄSTNER, M.; BREUER, M.; MAHRO, B. (1991): Bakterien-Isolate aus unterschiedlichen Altlast-Standorten zeigen ein vergleichbares Abbau-Profil für PAK und Ölkomponten. In: *Wasser, Abwasser* **132**, S. 253–255
- KÄSTNER, M.; MAHRO, B.; WIENBERG, R. (1993): *Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe* / STEGMANN, R. (Hrsg.). Hamburger Berichte 5, Bonn : Economica
- KÄSTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. (1994): Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, S. 267–273
- KÄSTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. (1998): Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, S. 359–362

- KECK, J. SIMS, R. C.; COOVER, M.; PARK, K.; SYMONS, B. (1989): Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. In: *Wat. Res.* **23**, S. 1467–1476
- KELLEY, I.; FREEMAN, J. P.; EVANS, F. E.; CERNIGLIA, C. E. (1993): Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, S. 800–806
- KELLEY, I.; CERNIGLIA, C. E. (1995): Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. In: *J. Soil Contam.* **41**, S. 77–91
- KEUTH, S.; REHM, H.-J. (1991): Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, S. 804–808
- 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 acids analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, S. 466–490
- KHESINA, A. Y.; SHCHERBAK, N. P.; SHABAD, L. M.; VOSTROV, I. S. (1969): Benzpyrene breakdown by the soil microflora. In: *Bull. Exp. Biol. Med.* **68**, S. 1139–1141
- KILE, D. E.; CHIOU, C. T. (1989): Water solubility enhancement of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration. In: *Environ. Sci. Technol.* **23**, S. 832–838
- KIRK, T. K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W. J.; LORENZ, F. L.; ZEIKUS, J. G. (1978): Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Arch. Microbiol.* **117**, S. 277–285
- KIYOHARA, H.; NAGAO, K.; NOMI, R. (1976): Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by an *Aeromonas* sp. In: *Agr. Biol. Chem.* **40**, S. 1075–1082
- KIYOHARA, H.; TAKIZAWA, N.; NAGAO, K. (1992): Natural distribution of bacteria metabolizing many kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *J. Ferm. Bioeng.* **74**, S. 49–51
- KOCH, A. K.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. (1991): Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. In: *J. Bacteriol.* **173**, S. 4212–4219
- KOCH, R. (1989): *Umweltchemikalien: Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverfahren*. Weinheim : VCH

- KÖHLER, A. (1992): *Zur Problematik der biologischen Verfügbarkeit von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen untersucht am Beispiel des Phenanthrenabbaus*. Diss. Uni. Stuttgart
- KOMATSU, T.; OMORI, T.; KODAMA, T. (1992): Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. In: *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, S. 864–865
- KÖNIG, A.; ZABOROSCH, C.; SPENER, F. (1996): Microbial sensors for naphthalene using *Sphingomonas* sp. B1 oder *Pseudomonas fluorescens* WW4. Poster-Beitrag, DECHEMA-Jahrestagung 1996
- KOSARIC, N. (1993): *Biosurfactants: Production – Properties – Applications*. New York : Marcel Dekker
- KOSSWIG, K.; STACHE, H. (Hrsg.) (1993): *Die Tenside*. München : Carl Hanser
- LAHA, S.; LUTHY, R. G. (1991): Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. In: *Environ. Sci. Technol.* **25**, S. 1920–1930
- LAHA, S.; LUTHY, R. G. (1992): Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. In: *Biotechnol. Bioeng.* **40**, S. 1367–1380
- LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. (1989): Antimicrobial effects of biosurfactants. In: *Fat Sci. Technol.* **9**, S. 363–366
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. In: *Microbiol. Rev.* **54**, S. 305–315
- LEISCHNER, A.; PÜTTMANN, W.; LANGGUTH, H.-R.; LIESER, U.; SCHIERWAGEN, U. (1993): Quellen und Ausbreitung von Kohlenwasserstoffen im Bereich eines ehemaligen Zechengeländes im Nördlichen Ruhrgebiet. In: ARENDT, F.; ANNOKKÉE, G. J.; BOSMAN, R.; VAN DEN BRINK, W. J. (Hrsg.): *Altlastensanierung '93*. Dordrecht : Kluwer Academic Press, S. 235–243
- LI, X.-F.; CULLEN, W. R.; REIMER, K. J.; LE, X.-C. (1996): Microbial degradation of pyrene and characterization of a metabolite. In: *Sci. Total Environ.* **177**, S. 17–29
- LIU, Z.; LAHA, S.; LUTHY, R. G. (1991): Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. In: *Wat. Sci. Tech.* **23**, S. 475–485
- LIU, Z.; JACOBSON, A. M.; LUTHY, R. (1995): Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, S. 145–151
- LOEW, G. H.; WONG, J.; PHILIPS, J.; HJELMELAND, L., PACK, G. (1978): Quantum chemical studies of the metabolism of benzo(a)pyrene. In: *Cancer Biochem. Biophys.* **2**, S. 123–130

- MADSEN, T.; KRISTENSEN, P. (1997): Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, S. 631–637
- MAHAFFEY, W. R.; GIBSON, D. T.; CERNIGLIA, C. E. (1988): Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 2415–2423
- MAHRO, B.; KÄSTNER, M. (1993): PAK-Altlasten – Bewertung der mikrobiellen Sanierung. In: *Spektrum der Wissenschaft* 10, S. 97–100
- MAHRO, B.; RODE, K.; KASCHE, V. (1995): Non-selective precultivation of bacteria able to degrade different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In: *Acta Biotechnol.* **15**, S. 337–345
- MANILAL, V. B.; ALEXANDER, M. (1991): Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, S. 401–405
- MARKS, R. E.; FIELD, S. D.; WOJTANOWICZ, A. K.; BRITENBECK, G. A. (1992): Biological treatment of petrochemical wastes for removal of hazardous polynuclear aromatic hydrocarbon constituents. In: *Wat. Sci. Tech.* **25**, S. 213–220
- MATSUMURA, S.; IMAI, K.; YOSHIKAWA, S.; KAWADA, K.; UCHIBORI, T. (1990): Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of n-alkyl-glucosides, mannosides and galactosides. In: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67**, S. 996–1001
- MAUE, G.; DOTT, W.; KÄMPFER, P. (1994): Diversity of PAH-degrading bacteria in an airlift-suspension reactor system for waste-water cleaning. In: *Acta Biotechnol.* **14**, S. 337–345
- MAXIN, C. (1992): *Sorption Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) an die wasserlösliche organische Substanz in Böden (WOBS)*. Bayreuther Bodenkundliche Bericht 25, Bayreuth : Universität Bayreuth; Lehrstuhl für Bodenkunde und Bodengeographie
- MCCARTHY, J. F.; LANDRUM, P. F.; PALUMBO, A. V. (1991): Organic contaminants in sediments: biological processes. In: BAKER, R. A. (Hrsg.): *Organic substances and sediments in water*. Vol. 3, Boca Raton : Lewis Publishers, S. 3–21
- MENN, F.-M.; APPLGATE, B. M.; SAYLER, G. S. (1993): NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, S. 1938–1942
- MIHELICIC, J. R.; LUTHY, R. (1988): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, S. 1182–1187
- MORGAN, P.; WATKINSON, R. J. (1989): Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. In: *Crit. Rev. Biotechnol.* **8**, S. 305–333

- MUELLER, J. G.; CHAPMAN, P. J.; PRITCHARD, P. H. (1989): Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, S. 3085–3090
- MUELLER J. G.; CHAPMAN, B. O.; BLATTMAN, B. O.; PRITCHARD, P. H. (1990): Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, S. 1079–1086
- MUELLER, J. G.; DEVEREUX, R.; SANTAVY, D. L.; LANTZ, S. E.; WILLIS, S. G.; PRITCHARD, P. H. (1997): Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. In: *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, S. 329–343
- NEFF, J. M. (1979): *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. London : Applied Science Publishers LTD
- NEU, T. R. (1996): Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. In: *Microbiol. Rev.* **60**, S. 151–166
- ODENSAB, M.; SCHROERS, S. (1997): *Gefäßversuche zum mikrobiellen Abbau von PAK (polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen) in belasteten Böden*. LANDESUMWELTAMT NORDRHEIN-WESTFALEN (LUA NRW) (Hrsg.): Materialien zur Altlastensanierung und zum Bodenschutz, Bd. 4, Essen : LUA NRW
- PARK, K. S.; SIMS, R. C.; DUPONT, R. R.; DOUCETTE, W. J.; MATTHEWS, J. E. (1990a): Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, S. 187–195
- PARK, K. S.; SIMS, R. C.; DUPONT, R. R. (1990b): Transformation of PAHs in soil systems. In: *J. Environ. Engineering* **116**, S. 632–640
- PFENNIG, N.; LIPPERT, K. D. (1966): Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archiv für Mikrobiologie* **55**, S. 245–256
- POGLAZOVA, M. N.; FEDOSEEVA, G. E.; KHESINA, A. J.; MEISSEL, M. N.; SHABAD, L. M. (1967): Destruction of benzo(a)pyrene by soil bacteria. In: *Life Science* **6**, S. 1053–1062
- PREUSSMANN, R. (1975): *Chemische Carcinogene in der menschlichen Umwelt*. In: ALTMANN, H.-W.; BÜCHNER, F.; COTTIER, H.; GRUNDMANN, E.; HOLLE, G.; LETTERER, E.; MASSHOFF, W.; MEESEN, H.; ROULET, F.; SEIFERT, G.; SIEBERT, G. (Hrsg.): *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. 6, Teil 6, Berlin : Springer-Verlag
- QIU, X.; MCFARLAND, M. J. (1991): Bound residue formation in PAH contaminated soil composting using *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Haz. Waste Haz. Mat.* **8**, S. 115–126
- RIPPEN, G. (1997): *Handbuch Umwelchemikalien: Stoffdaten – Prüfverfahren – Vorschriften*. Loseblattsammlung: 41. Erg. Lfg., Landsberg/Lech : ecomed

- ROBICHAUX, T. J.; MYRICK, H. N. (1972): Chemical enhancement of the biodegradation of crude-oil pollutants. In: *J. Petr. Technol.* **24**, S. 16–20
- ROCH, F.; ALEXANDER, M. (1995): Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, S. 1151–1158
- ROGOFF, M. H. (1961): Chemistry of oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil pseudomonads. In: *J. Bacteriol.* **83**, S. 998–1004
- ROUSE, J. D.; SABATINI, D. A.; SUFLITA, J. M.; HARWELL, J. H. (1994): Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. In: *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **24**, S. 325–370
- SANSEVERINO, J.; WERNER, C.; FLEMING, J.; APPLGATE, B.; KING, J. M. H.; SAYLER, G. S. (1993): Molecular diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in manufactured gas plant soils. In: *Biodegradation* **4**, S. 303–321
- SCHEIBENBOGEN, K.; ZYTNER, R. G.; LEE, H.; TREVORS, J. T. (1994): Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. In: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**, S. 53–59
- SCHNEIDER, J.; GROSSER, R.; JAYASIMHULU, K.; XUE, W.; WARSHAWSKY, D. (1996): Degradation of pyrene, benz[a]anthracen, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, S. 13–19
- SCHOCKEN, M. J.; GIBSON, D. T. (1984): Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, S. 10–16
- SHABAD, L. M. (1967): Studies in the U.S.S.R. on the distribution, circulation, and fate of carcinogenic hydrocarbons in the human environment and the role of their deposition in tissues in carcinogenesis: a review. In: *Cancer Res.* **27**, S. 1132–1137
- SHIARIS, M. P. (1989): Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo[a]pyrene in surficial estuarine sediments. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, S. 1391–1399
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. (1995): Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. In: *Microbiol. Rev.* **59**, S. 201–222
- SIMS, R. C.; OVERCASH, M. R. (1983): Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. In: *Residue Reviews* **88**, S. 1–68
- SINGLETON, I. (1994): Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. In: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**, S. 9–23

- SMITH, J. A.; TUCK, D. M.; JAFFÉ, P. R.; MUELLER, R. T. (1991): Effects of surfactants on the mobility of nonpolar organic contaminants in porous media. In: BAKER, R. A. (Hrsg.): *Organic substances and sediments in water*. Vol. 1, Boca Raton : Lewis Publishers, S. 201–230
- 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. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, S. 654–659
- STREIT, B. (1994): *Lexikon Ökotoxikologie*. 2., aktual. und erw. Aufl., Weinheim : VCH
- STRINGFELLOW, W. T.; AITKEN, M. D. (1994): Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonads isolated from a creosote-contaminated soil. In: *Can. J. Microbiol.* **40**, S. 432–438
- STRINGFELLOW, W. T.; AITKEN, M. D. (1995): Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, S. 357–362
- STUCKI, G.; ALEXANDER, M. (1987): Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, S. 292–297
- SWISHER, R. D. (1987): *Surfactant biodegradation*. Surfactant Science Series 18, New York : Marcel Dekker, Inc.
- TEBAAY, R. H.; WELP, G.; BRÜMMER, G. W. (1991): Gehalte an Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen in Böden unterschiedlicher Belastung. In: *Mitteilungen d. Dt. Bodenkundlichen Gesellschaft* 63, S. 157–160
- THIBAUT, S.; ANDERSON, M.; FRANKENBERGER, W. T. JR. (1996): Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, S. 283–287
- TIEHM, A. (1994): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, S. 258–263
- TIEHM, A.; STIEBER, M.; WERNER, P.; FRIMMEL, F. H. (1995): Application of surfactants to accelerate the bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. In: VAN DEN BRINK, W. J.; BOSMAN, R.; ARENDT, F. (Hrsg.): *Contaminated Soil '95*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, S. 1371–1372
- TIEHM, A.; STIEBER, M.; WERNER, P.; FRIMMEL, F. H. (1997): Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. In: *Environ. Sci. Technol.* **31**, S. 2570–2576
- TONGPIM, S.; PICKARD, M. A. (1996): Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. In: *Can. J. Microbiol.* **42**, S. 289–294

- TRENZ, S. P. (1992): *Der mikrobielle Abbau von Fluoren als Modell für Verbindungen vom Diphenylmethan-Typ*. Diss. Uni Stuttgart
- TRZESICKA-MLYNARZ, D.; WARD, O. P. (1995): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. In: *Can. J. Microbiol.* **41**, S. 470–476
- TSOMIDES, H. J.; HUGHES, J. B.; THOMAS, J. M.; WARD, C. H. (1995): Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. In: *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, S. 953–959
- VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. (1991): Applications of microbial surfactants. In: *Biotech. Adv.* **9**, S. 241–252
- VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; STERKENBURG, A.; VAN ANDEL, J. G. (1992): Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, S. 548–552
- VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G. (1993): Effect of microorganisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, S. 535–540
- VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G.; RULKENS, W. H. (1995): Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, S. 1699–1705
- WALTER, U.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM H.-J. (1990): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial mixed culture. In: BEHRENS, D. (Hrsg.): DEHEMA Biotechnology Conferences, Bd. 4, Weinheim : Wiley-VCH, S. 489–492
- WALTER, U.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM, H.-J. (1991): Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW 1. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, S. 671–676
- WEIR, S. C.; DUPUIS, S. P.; PROVIDENTI, M. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. (1995): Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UG214Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, S. 946–951
- WEIBENFELS, W. D. (1990): *Mikrobieller Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in definierten Submerskulturen und kontaminierten Böden*. Diss. Univ. Münster
- WEIBENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. (1990a): Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, S. 479–484
- WEIBENFELS, W. D.; WALTER, U.; BEYER, M.; KLEIN, J. (1990b): PAK-Abbau durch Bakterien – Bewertungsverfahren zur mikrobiellen Bodendekontaminierung. In:

- ARENDE, F.; HINSEVELD, M.; VAN DEN BRINK, W. J. (Hrsg.): *Altlastensanierung '90.*, Bonn : TNO/BMFT, S. 561–562
- WEISSENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM, H.-J. (1991): Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, S. 528–535
- WEISSENFELS, W. D.; KLEWER, H.-J.; LANGHOFF, J. (1992): Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, S. 689–696
- WEST, C. C.; HARWELL, J. H. (1992): Surfactants and subsurface remediation. In: *Environ. Sci. Technol.* **26**, S. 2324–2330
- WISCHMANN, H.; STEINHART, H. (1997): The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures. In: *Chemosphere* **35**, S. 1681–1698
- WIESEL, I.; WÜBKER, S. M.; REHM, H. J. (1993): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, S. 110–116
- WODZINSKI, R. S.; COYLE, J. E. (1974): Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. In: *Appl. Microbiol.* **27**, S. 1081–1084
- YE, D.; SIDDIQI, M. A.; MACCUBBIN, A. E.; KUMAR, S.; SIKKA, H. C. (1996): Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. In: *Environ. Sci. Technol.* **30**, S. 136–142
- YEOM, I. T.; GHOSH, M. M.; COX, C. D. (1996): Kinetic aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Environ. Sci. Technol.* **30**, S. 1589–1595
- ZANDER, M. (1995): *Polycyclische Aromaten: Kohlenwasserstoffe und Fullerene /* ELSCHENBROICH, C.; HENSEL, F.; HOPF, H. (Hrsg.). Stuttgart : B. G. Teubner (Teubner-Studienbücher Chemie)
- ZHANG, Y.; MILLER R. M. (1995): Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, S. 2247–2251
- ZHANG, Y.; MAIER W. J.; MILLER, R. M. (1997): Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. In: *Environ. Sci. Technol.* **31**, S. 2211–2217
- ZÜRCHER, F.; THUER, M.; DAVIS, J. A. (1980): Importance of particulate matter on the load of hydrocarbons of motorway runoff and secondary effluence. In: *Environ. Sci. Res.* **8**, S. 373–385

## 8 Bilderverzeichnis

<b>Bild 1-1:</b> Chemische Struktur der 16 EPA-PAK, mit * gekennzeichnet sind die 6 PAK der deutschen Trinkwasserverordnung (aus BLANKENHORN 1990) .....	2
<b>Bild 2-1:</b> Chemische Struktur des [7,10- <sup>14</sup> C]Benzo[a]pyren.....	23
<b>Bild 2-2:</b> Aufbau der Biometer-Flaschen.....	38
<b>Bild 3-1:</b> Bestimmung der CMC von Dehyquart A, Plantacare 2000 UP und Texapon N 70 durch Auftragen der Oberflächenspannung gegen die Tensidkonzentration (x-Achse: logarithmische Skalierung), Schnittpunkt der verlängerten Geraden = CMC des Tensids .....	49
<b>Bild 3-2:</b> Bestimmung der CMC von Dehyton K, Lutensit A-PS und Lutensol ON 70 durch Auftragen der Oberflächenspannung gegen die (x-Achse: logarithmische Skalierung), Schnittpunkt der verlängerten Geraden = CMC des Tensids .....	49
<b>Bild 3-3:</b> Solubilisierung von Benzo[a]pyren (BaP) in Abhängigkeit von der Konzentration an Dehyquart A, Plantacare 2000 UP und Texapon N 70 .....	51
<b>Bild 3-4:</b> Solubilisierung von Benzo[a]pyren (BaP) in Abhängigkeit von der Konzentration an Dehyton K, Lutensit A-PS und Lutensol ON 70 .....	51
<b>Bild 3-5:</b> Menge des solubilisierten Benzo[a]pyrens in % des eingesetzten Benzo[a]pyrens (primäre Größenachse) und in µg/l (sekundäre Größenachse) in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration, 100 % = 100 µg/l .....	52
<b>Bild 3-6:</b> Menge des solubilisierten Benzo[a]pyrens in % des eingesetzten Benzo[a]pyrens (primäre Größenachse) und in µg/l (sekundäre Größenachse) in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration, 100 % = 200 µg/l .....	53
<b>Bild 3-7:</b> Menge des solubilisierten <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyrens im Kulturmedium in % des eingesetzten Benzo[a]pyrens und in µg/l in Abhängigkeit von der Plantacarekonzentration, 100 % = 50 mg/l .....	55
<b>Bild 3-8:</b> Vervielfachung der Löslichkeit von Benzo[a]pyren im Kulturmedium in Abhängigkeit von der Plantacarekonzentration, ↑ CMC: kritische Micellbildungskonzentration des Tensids: 0,03 % technisches Gemisch.....	56
<b>Bild 3-9:</b> Veränderung der DMSO-Aktivität einer Mischkultur unter dem Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen.....	57
<b>Bild 3-10:</b> Veränderung der DMSO-Aktivität einer Mischkultur unter dem Einfluß der Tenside nach 7 Tagen Inkubation .....	57

- Bild 3-11:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren in Abhängigkeit vom Plantacare-Gehalt des Kulturmediums, Prozentangabe in der Legende: Tensidgehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn (die Kurven der Ansätze M8b und M9b werden durch die Kurve von Ansatz M9a verdeckt) .....60
- Bild 3-12:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren ohne Plantacare-Einfluß, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....64
- Bild 3-13:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,0001 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,0001 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....65
- Bild 3-14:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,0005 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,0005 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....65
- Bild 3-15:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,001 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,001 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....66
- Bild 3-16:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,005 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,005 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....66
- Bild 3-17:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,01 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,01 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....67
- Bild 3-18:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,05 % Plantacare, ↑: nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,05 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen und Pyren .....67

- Bild 3-19:** Mischkultur MK I: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren unter Einfluß von 0,1 % Plantacare,  $\uparrow$ : nach 167 Tagen Inkubation erneute Zugabe von 20 ml Mineralmedium mit 0,1 % Plantacare und je 1,25 mg Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren..... 68
- Bild 3-20:** Menge der gelösten  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität berechnet als Benzo[a]pyren im Kulturmedium der für Benzo[a]pyren abbauaktiven Ansätze 1 bis 8; Versuchsreihe Biometer I..... 74
- Bild 3-21:** Dünnschichtchromatogramm der Radioaktivitätsverteilung eines Aliquots des aus dem Kulturmedium von Ansatz 1a gewonnenen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes, (Fließmittel Ethylacetat : Petrolether 1 : 2, v/v), Start der Laufstrecke bei 3 cm, Laufmittelfront bei 19 cm ..... 77
- Bild 3-22:** Gaschromatogramm des PAK-Standards, Konzentrationen an Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren je 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und Benzo[a]pyren 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ..... 78
- Bild 3-23:** Gaschromatogramm des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes von Ansatz 8a..... 78
- Bild 3-24:** Gaschromatogramm des  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extraktes von Ansatz 8b ..... 79
- Bild 3-25:** Durch GC-Analyse ermittelter Anteil an wiedergefundener PAK im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11 ..... 81
- Bild 3-26:** Mischkultur MK IIa: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T}+$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow\text{G}+$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 83
- Bild 3-27:** Mischkultur MK IIa: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T}+$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme..... 84

**Bild 3-28: Mischkultur MK IIa:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme<sup>84</sup>

**Bild 3-29: Mischkultur MK IIb:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow\text{G+}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....<sup>85</sup>

**Bild 3-30: Mischkultur MK IIb:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme<sup>85</sup>

**Bild 3-31: Mischkultur MK IIb:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme<sup>86</sup>

**Bild 3-32: Mischkultur MK IIc:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow\text{G+}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....<sup>86</sup>

- Bild 3-33:** Mischkultur MK IIc: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme **87**
- Bild 3-34:** Mischkultur MK IIc: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme **87**
- Bild 3-35:** Vergleich des Gesamtumsatzes an Benzo[a]pyren in den einzelnen Ansätzen der Versuchsreihe Biometer II..... **89**
- Bild 3-36:** Mischkultur MK IIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr.,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose,  $\uparrow\text{G+}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... **90**
- Bild 3-37:** Mischkultur MK IIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von 1,25 mg je Anthr., Phen., Fluora. und Pyr.,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... **90**
- Bild 3-38:** Mischkultur MK IIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr.,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 10 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{T+}$ : Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... **91**

- Bild 3-39: Mischkultur MK IIb:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose, ↑G+: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose, ↗ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....91
- Bild 3-40: Mischkultur MK IIb:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare, ↗ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....92
- Bild 3-41: Mischkultur MK IIb:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↗ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....92
- Bild 3-42: Mischkultur MK IIc:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2,5 mg Glucose, ↑G+: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 12,5 mg Glucose, ↗ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....93
- Bild 3-43: Mischkultur MK IIc:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthracen Phenanthren, Fluoranthren, und Pyren, ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 25 mg Plantacare, ↗ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .93
- Bild 3-44: Mischkultur MK IIc:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑P: Zugabe von je 1,25 mg Anthr., Phen., Fluora. und Pyr., ↑T: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 50 mg Plantacare, ↑M: Zugabe von 10 ml Mineralmedium, ↑T+: Zugabe von 1 ml Plantacare-Lsg. mit 5 mg Plantacare, ↗ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....94

- Bild 3-45:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze der Versuchsreihe Biometer II nach 638 Tagen Inkubation..... 98
- Bild 3-46:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer II nach 703 Tagen Inkubation..... 100
- Bild 3-47:** Wiederfindung der PAK im CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums, Versuchsreihe Biometer II ..... 106
- Bild 3-48:** Mischkultur MK IIIa: Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↑M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose ..... 110
- Bild 3-49:** Mischkultur MK IIIa: Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 110
- Bild 3-50:** Mischkultur MK IIIa: Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↑M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 111
- Bild 3-51:** Mischkultur MK IIIb: Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose..... 111
- Bild 3-52:** Mischkultur MK IIIb: Freigesetztes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von <sup>14</sup>C-Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 112

- Bild 3-53: Mischkultur MK IIIb:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....112
- Bild 3-54: Mischkultur MK IIIc:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose .....113
- Bild 3-55: Mischkultur MK IIIc:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....113
- Bild 3-56: Mischkultur MK IIIc:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....114
- Bild 3-57: Mischkultur MK IIId:** Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....114
- Bild 3-58: Vergleich des Gesamtumsatzes an Benzo[a]pyren in den einzelnen Ansätzen der Versuchsreihe Biometer III.....116**
- Bild 3-59: Mischkultur MK IIIa:** Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %.  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthen und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow\text{G}$ : Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose .....117

- Bild 3-60:** Mischkultur MK IIIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 117
- Bild 3-61:** Mischkultur MK IIIa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↑M: Zugabe von 25 ml Mineralmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 118
- Bild 3-62:** Mischkultur MK IIIb: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose..... 118
- Bild 3-63:** Mischkultur MK IIIb: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 119
- Bild 3-64:** Mischkultur MK IIIb: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren, und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 119
- Bild 3-65:** Mischkultur MK IIIc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0 %. ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↑G: Zugabe von 1 ml Glucose-Lsg. mit 2 mg Glucose..... 120
- Bild 3-66:** Mischkultur MK IIIc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,005 % Plantacare-Gehalt, ↑P: Zugabe von je 25 µg Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium, ↗ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 120

- Bild 3-67:** Mischkultur MK IIIc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....121
- Bild 3-68:** Mischkultur MK IIIId: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in  $\mu\text{g}$  pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,05 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare-Lsg., Einstellen von 0,05 % Plantacare-Gehalt,  $\uparrow\text{P}$ : Zugabe von je 25  $\mu\text{g}$  Anthracen, Phenanthren, Fluoranthren und Pyren/ml Kulturmedium,  $\uparrow\text{M}$ : Zugabe von 25 ml Mineralmedium,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme .....121
- Bild 3-69:** Entwicklung der Oberflächenspannung in den Kulturmedien des Begleitversuchs zu der Versuchsreihe Biometer III,  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von Plantacare ins Kulturmedium: Einstellen der Plantacare-Gehalte vom Inkubationsbeginn .....123
- Bild 3-70:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der prozentualen Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation.....130
- Bild 3-71:** Wiederfindung der PAK im  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums, Versuchsreihe Biometer III .....138
- Bild 3-72:** Mischkultur MK IVa: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 2,5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{Ph}$ : Zugabe von 2,5 mg Phenanthren,  $\uparrow\text{Fl}$ : Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren,  $\uparrow\text{Py}$ : Zugabe von 2,5 mg Pyren,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme.....140
- Bild 3-73:** Mischkultur MK IVb: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 2,5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{Ph}$ : Zugabe von 2,5 mg Phenanthren,  $\uparrow\text{Fl}$ : Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren,  $\uparrow\text{Py}$ : Zugabe von 2,5 mg Pyren,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme.....141
- Bild 3-74:** Mischkultur MK IVc: Freigesetztes  $^{14}\text{CO}_2$  in % der eingesetzten Radioaktivität als kumulative Mineralisation beim cometabolischen Umsatz von  $^{14}\text{C}$ -Benzo[a]pyren, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %.  $\uparrow\text{T}$ : Zugabe von 2,5 mg Plantacare,  $\uparrow\text{Ph}$ : Zugabe von 2,5 mg Phenanthren,  $\uparrow\text{Fl}$ : Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren,  $\uparrow\text{Py}$ : Zugabe von 2,5 mg Pyren,  $\uparrow\downarrow$ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme.....141

- Bild 3-75:** Mischkultur MK IVa: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↙ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 143
- Bild 3-76:** Mischkultur MK IVb: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↙ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 143
- Bild 3-77:** Mischkultur MK IVc: Cometabolisch umgesetztes Benzo[a]pyren in µg pro Inkubationswoche, Plantacare-Gehalt im Kulturmedium zu Inkubationsbeginn: 0,005 %. ↑T: Zugabe von 2,5 mg Plantacare, ↑Ph: Zugabe von 2,5 mg Phenanthren, ↑Fl: Zugabe von 2,5 mg Fluoranthren, ↑Py: Zugabe von 2,5 mg Pyren, ↙ ↘ : Zugabe der entsprechenden Komponente bei jeder Probenahme ..... 144
- Bild 3-78:** Vergleich der Lebendkeimzahlen und der Anteile der einzelnen Bakterientypen im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer IV nach 84 Tagen Inkubation ..... 147
- Bild 3-79:** PCR-Amplifikationsprodukte der unterschiedenen Bakterientypen, Slots (von links nach rechts): 1 bis 3: Typ 1; 4 bis 7: Typ 2; 8: pBR322 DNA/AluI Marker, 20; 9: 100bp DNA Ladder Plus; 10 bis 13: Typ 3; 14 bis 16: Typ 4; 17: pBR322 DNA/AluI Marker; 18: Lambda DNA/Eco471(AvaII) Marker, 13; 19 bis 20: Typ 5; 21 bis 24 Typ 6; 25 bis 26: Typ 7 ..... 148
- Bild 4-1:** Schematische Übersicht der Wechselwirkungen zwischen Benzo[a]pyren, Tensidmonomeren und Tensidmicellen in wässriger Lösung ..... 154
- Bild 4-2:** Schematische Übersicht der Wechselwirkungen zwischen den PAK-Molekülen, Tensidmonomeren, Tensidmicellen und Mikroorganismen im Kulturmedium der Abbauprobversuche ..... 157



## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1-1:</b> Chemisch-physikalische Eigenschaften von PAK (zusammengestellt aus SIMS & OVERCASH 1983, KOCH 1989, BLUME 1990, STREIT 1991, KÄSTNER et al. 1993, RIPPEN 1997) .....	3
<b>Tabelle 1-2:</b> Beispiele für den Abbau von Benzo[a]pyren durch Bakterien (-: kein Einsatz von markiertem Benzo[a]pyren, +: Einsatz von <sup>14</sup> C-markiertem Benzo[a]pyren).....	8
<b>Tabelle 1-3:</b> Beispiele für mikrobiellen PAK-Abbau unter Tensideinfluß (+: Steigerung des PAK-Abbaus, - Inhibierung des PAK-Abbaus, 0: kein Effekt auf den PAK-Abbau).....	15
<b>Tabelle 2-1:</b> Chemische Daten der eingesetzten Tenside.....	21
<b>Tabelle 2-2:</b> Ökotoxikologische Daten der eingesetzten Tenside .....	22
<b>Tabelle 2-3:</b> Technische Daten der verwendeten [7,10- <sup>14</sup> C]Benzo[a]pyren-Chargen ...	23
<b>Tabelle 2-4:</b> Als Substrate in den Abbaustudien eingesetzte PAK .....	24
<b>Tabelle 2-5:</b> Verwendete Szintillationscocktails.....	24
<b>Tabelle 2-6:</b> Zusammensetzung des Mineralmediums.....	27
<b>Tabelle 2-7:</b> Zusammensetzung der Spurenelementlösung (nach PFENNIG & LIPPERT 1966) .....	28
<b>Tabelle 2-8:</b> Zusammensetzung der Vitaminlösung (nach KIRK et al. 1978).....	28
<b>Tabelle 2-9:</b> Zusammensetzung des PCR Pre-Mix für einen Ansatz.....	31
<b>Tabelle 2-10:</b> PCR-Programm.....	31
<b>Tabelle 2-11:</b> Eingesetzte Benzo[a]pyren-Konzentrationen mit entsprechenden Radioaktivitätsmengen zur Bestimmung des Solubilisierungsvermögens von Tensiden .....	36
<b>Tabelle 2-12:</b> Versuchsgestaltung in der Versuchsreihe Biometer I.....	40
<b>Tabelle 2-13:</b> Versuchsgestaltung in der Versuchsreihe Biometer II.....	41
<b>Tabelle 2-14:</b> Animpfschema der Versuchsreihe Biometer II.....	42
<b>Tabelle 2-15:</b> Animpfschema der Versuchsreihe Biometer III.....	43
<b>Tabelle 2-16:</b> Versuchsgestaltung in der Versuchsreihe Biometer III.....	43
<b>Tabelle 2-17:</b> Animpfschema der Versuchsreihe Biometer IV .....	45
<b>Tabelle 3-1:</b> Kritische Micellbildungskonzentrationen (CMC) der 6 verwendeten Tenside .....	50

<b>Tabelle 3-2:</b> Solubilisierende Eigenschaften der Tenside für Benzo[a]pyren in einer 0,005%igen und einer 0,05%igen Tensidlösung bezogen auf die jeweils durchschnittliche Menge an Aktivsubstanz in den technischen Produkten (s. <a href="#">Tabelle 2-1</a> ).....	54
<b>Tabelle 3-3:</b> Kolonietypen der isolierten Mikroorganismen aus der Bodenprobe (R2A-Agar).....	59
<b>Tabelle 3-4:</b> OD <sub>564</sub> -Wert, Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze M5 bis M9, Versuchsreihe Biometer I nach 120 Tagen Inkubation.....	61
<b>Tabelle 3-5:</b> Im Kulturmedium gelöste Radioaktivität nach 120 Tagen Inkubation; Versuchsreihe Biometer I, Ansätze M5 bis M9.....	62
<b>Tabelle 3-6:</b> Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren durch die Mischkultur MK I in Abhängigkeit vom Plantacare-Gehalt des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz M5 bis M9, Inkubationsdauer: 120 Tage .....	63
<b>Tabelle 3-7:</b> OD <sub>564</sub> -Wert, Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Versuchsreihe Biometer I, Ansätze 1 bis 11 nach 167 Tagen Inkubation.....	70
<b>Tabelle 3-8:</b> Im Kulturmedium gelöste Radioaktivität am Ende der Inkubation; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11 .....	72
<b>Tabelle 3-9:</b> Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren durch die Mischkultur MK I in Abhängigkeit vom Plantacare-Gehalt des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11 .....	75
<b>Tabelle 3-10:</b> Wiederfindung der PAK im CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt am Inkubationsende nach Extraktion des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer I, Ansatz 1 bis 11 .....	80
<b>Tabelle 3-11:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer II nach 638 Inkubationstagen .....	96
<b>Tabelle 3-12:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer II nach 703 Inkubationstagen .....	98
<b>Tabelle 3-13:</b> Oberflächenspannung des Kulturmediums und gelöste Radioaktivität am Ende der Inkubation, Versuchsreihe Biometer II.....	100
<b>Tabelle 3-14:</b> Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren durch die Mischkulturen MK IIa, MK IIb und MK IIc; Versuchsreihe Biometer II .....	102
<b>Tabelle 3-15:</b> Wiederfindung der PAK im CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums; Versuchsreihe Biometer II.....	104

<b>Tabelle 3-16:</b> Zeitraum der letzten PAK-Zugabe ins Kulturmedium der Versuchsreihe Biometer II vor Inkubationsende.....	106
<b>Tabelle 3-17:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III zu Inkubationsbeginn .....	109
<b>Tabelle 3-18:</b> Lebendkeimzahl im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 54 Tagen Inkubation .....	124
<b>Tabelle 3-19:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 148 Tagen Inkubation.....	125
<b>Tabelle 3-20:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 199 Tagen Inkubation.....	126
<b>Tabelle 3-21:</b> Lebendkeimzahl im Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III nach 258 Tagen Inkubation .....	128
<b>Tabelle 3-22:</b> Oberflächenspannung des Kulturmediums und gelöste Radioaktivität am Ende der Inkubation, Versuchsreihe Biometer III.....	132
<b>Tabelle 3-23:</b> Verteilung der Radioaktivität nach Extraktion des Kulturmediums in % der applizierten Menge beim Umsatz von <sup>14</sup> C-Benzo[a]pyren durch die Mischkulturen MK IIIa, MK IIIb, MK IIIc und MK IIId; Versuchsreihe Biometer III .....	134
<b>Tabelle 3-24:</b> Wiederfindung der PAK im CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -Extrakt am Ende der Inkubation nach Extraktion des Kulturmediums, Versuchsreihe Biometer III .....	136
<b>Tabelle 3-25:</b> Summen der PAK-Zugaben ins Kulturmedium der Ansätze von Versuchsreihe Biometer III .....	138
<b>Tabelle 3-26:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer IV zu Inkubationsbeginn.....	145
<b>Tabelle 3-27:</b> Lebendkeimzahl und Typenzusammensetzung des Kulturmediums der Ansätze von Versuchsreihe Biometer IV nach 84 Tagen Inkubation .....	146
<b>Tabelle 3-28:</b> Fragmentgrößen der Spaceramplifikationsprodukte der Bakterientypen 1 bis 7 .....	149
<b>Tabelle 3-29:</b> Reaktionen der Bakterientypen auf die Tests des API 20 NE-Testsystems, -: keine Reaktion, +: positive Reaktion.....	150
<b>Tabelle 3-30:</b> Identifizierungsvorschläge durch das Identifizierungsprogramm API ..	151
<b>Tabelle 4-1:</b> Literaturübersicht über das PAK-Abbaupotential der nach API identifizierten Mikroorganismen.....	173



# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten:

Name: Susanne Schwiening  
Geburtsdatum: 07. Januar 1965  
Geburtsort: Bocholt

## Schul- und Hochschulausbildung:

08/1971–07/1975 Pestalozzi-Grundschule in Bocholt  
08/1975–05/1984 Euregio-Gymnasium in Bocholt, Abschluß Abitur  
10/1984–03/1987 Studium der Biologie an der Universität Münster, Vordiplom  
04/1987–08/1991 Studium der Biologie an der Technischen Hochschule Aachen, Abschluß Diplom-Biologin

## Wissenschaftliche Tätigkeiten:

09/1991–08/1993 beschäftigt als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biologie V (Institut für Ökologie, Ökotoxikologie und Ökochemie) der RWTH Aachen  
seit 09/1993 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. I. Schuphan  
09/1993–12/1996 beschäftigt als wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Biologie V der RWTH Aachen  
04/1997–07/1997,  
02/1998–04/1998,  
09/1998–10/1998 beschäftigt als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biologie V der RWTH Aachen