

# **Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt dem

Fachbereich 2 Biologie / Chemie

der Universität Bremen

von

**Dipl.-Biol. Axel Kappler**

Bremen, 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Nehr Korn
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Norbert Rübiger

# **Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt dem

Fachbereich 2 Biologie / Chemie

der Universität Bremen

von

**Dipl.-Biol. Axel Kappler**

Bremen, 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Nehr Korn

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Norbert Rübiger

Mündliche Prüfung am 23. Januar 2002

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Bremen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Nehr Korn, Abteilung für Mikrobiologie im Fachbereich 2, erstellt.

Zuerst danke ich Prof. Dr. A. Nehr Korn für die Überlassung des Themas, seine Hilfestellung und seinen Anregungen sowie für die gewährten Freiheiten bei der Gestaltung der Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Nehr Korn für ihre Unterstützung und Hilfeleistung bei der Charakterisierung der Bakterien, insbesondere Thomas Koch für die Einarbeitung in die Mikrotiter-Methode.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe Rübiger, die es mir durch die Kooperation von Mikrobiologie und Umweltverfahrenstechnik ermöglicht hat, ein äußerst interessantes interdisziplinäres Thema zu bearbeiten. Ganz herzlich danke ich dabei Anne Schierenbeck für die gute Zusammenarbeit in allen Fragen des Schadstoffabbaus.

Ebenfalls danke ich Hendrik Schabacker und Jens Engelken aus der AG Hildebrandt für die Aufarbeitung der von mir isolierten Bakterien für die Sequenzierung.

Den Arbeitsgruppen Rübiger, Fischer, Leibfritz und Jastorff danke ich für die großzügige Nutzung der Analysengeräte, ohne die ich meine Arbeit nicht hätte durchführen können. Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern Marcus Kienzler und Jörn Engelmann für ihr unermüdliches Engagement bei der Identifizierung der Metabolite.

Nicht vergessen möchte ich die FNK-Kommission für Forschungsplanung und wissenschaftlichen Nachwuchs der Universität Bremen, die diese Arbeit finanziert hat und mit der Einrichtung des Forschungsschwerpunktes die Grundlage für die interessante interdisziplinäre Zusammenarbeit geschaffen hat.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere Kristina, für ihre Unterstützung und Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.



---

# I Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Produktionsintegrierter Umweltschutz .....	1
1.2 Produktionsintegrierbare Abwassertechniken .....	5
1.3 Zielsetzung .....	5
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1 Die Modellschadstoffe .....	7
2.2 Versuchsanlagen .....	8
2.2.1 Der Suspensions-Membranreaktor .....	8
2.2.2 Der Airlift-Schlaufenreaktor .....	11
2.2.3 Rührkolben zur Bakterienkultivierung .....	13
2.2.4 Fermenter .....	14
2.2.5 Blasensäule .....	15
2.3 Biochemische und mikrobiologische Methoden zur Beschreibung der Biozönose .....	15
2.3.1 Proteinbestimmung nach Pierce .....	16
2.3.2 Bestimmung des Trockensubstanz-Gehalts .....	17
2.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl .....	17
2.3.4 Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Zellen .....	18
2.3.5 Bestimmung der Lebendzellzahl .....	19
2.3.6 Zell- und koloniemorphologische Beschreibung der Bakterienisolate .....	20
2.3.7 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Bakterienisolate .....	21
2.3.8 Taxonomie der Bakterienisolate .....	22
2.4 Chemisch-analytische Methoden zur Beschreibung des Chloraromatenabbaus .....	22
2.4.1 Gehalt gelöster organischer Kohlenstoffe .....	23
2.4.2 UV-Spektroskopie .....	23
2.4.3 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) .....	23
2.4.4 Kopplung HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS) .....	24
2.4.5 Ionenchromatographie .....	26
2.5 Versuche zur Beschreibung des Chloraromatenabbaus .....	26
2.5.1 Einfluss der Sauerstoff-Konzentration .....	27
2.5.2 Nachweis der Aromatenringspaltung .....	28
2.5.3 Nachweis von Metaboliten .....	30
2.5.4 Versuche zur 3-Chlorbenzoesäure-Abbaukinetik .....	31
2.5.5 Versuche zur 4-Chlorphenol-Abbaukinetik .....	31
2.5.6 Ertragskoeffizient für 4-Chlorphenol .....	32

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Beschreibung der Biozönosen von SMR und AIR .....	33
3.1.1	Gesamt- und Lebendzellzahlen der Biozönosen .....	33
3.1.2	Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Zellen .....	37
3.1.3	Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Bakterienisolate .....	40
3.1.4	Taxonomie der Bakterienisolate .....	44
3.2	Beschreibung des Chloraromatenabbaus .....	47
3.2.1	Einfluss der Sauerstoff-Konzentration .....	48
3.2.2	Nachweis der Aromatenringspaltung .....	50
3.2.3	Nachweis der Metaboliten des Chloraromatenabbaus .....	51
3.2.3.1	Nachweis von Metaboliten des 3-Chlorbenzoesäure-Abbaus .....	51
3.2.3.2	Nachweis von Metaboliten des 4-Chlorphenol-Abbaus .....	60
3.2.4	Abbaukinetik des Chloraromatenabbaus .....	62
3.2.4.1	3-Chlorbenzoesäure-Abbaukinetik .....	62
3.2.4.2	4-Chlorphenol-Abbaukinetik .....	68
3.2.4.2.1	Ertragskoeffizient für 4-Chlorphenol .....	73
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	Beschreibung der Biozönosen von SMR und AIR .....	75
4.1.1	Gesamt- und Lebendzellzahlen der Biozönosen .....	75
4.1.2	Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Zellen .....	76
4.1.3	Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Bakterienisolate .....	78
4.1.4	Taxonomie der Bakterienisolate .....	81
4.2	Beschreibung des Chloraromatenabbaus .....	84
4.2.1	Einfluss der Sauerstoff-Konzentration .....	84
4.2.2	Nachweis der Aromatenringspaltung .....	84
4.2.3	Nachweis von Metaboliten des Chloraromatenabbaus .....	85
4.2.3.1	Nachweis der Metaboliten von 3-Chlorbenzoesäure .....	86
4.2.3.2	Nachweis der Metaboliten von 4-Chlorphenol .....	89
4.2.4	Abbaukinetiken der Chloraromaten .....	90
4.2.4.1	3-Chlorbenzoesäure-Abbaukinetik .....	90
4.2.4.2	4-Chlorphenol-Abbaukinetik .....	93
4.2.5	Zusammenfassende Bewertung des Chloraromatenabbaus .....	96
4.3	Bewertung des Suspensions-Membranreaktors .....	99
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>

---

<b>6. Literatur .....</b>	<b>104</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>113</b>
A.1 Rezepte für Nährböden.....	113
A.2 Mikrotiter-Methode zur stoffwechselfysiologischen Charakterisierung der Bakterienisolate .....	113
A.2.1 Arbeitsgang zum Ansetzen der Mikrotiterkulturen.....	114
A.2.2 Durchgeführte Tests .....	114
A.3 Arbeitsschritte zur Sequenzierung der isolierten Bakterien .....	117
A.3.1 Polymerasekettenreaktion .....	117
A.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese .....	118
A.3.3 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel .....	119
A.3.4 Sequenzierung .....	119
A.4 Ergebnisse des Metabolitennachweises.....	120

## II Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
3-CBA	3-Chlorbenzoesäure
4-CP	4-Chlorphenol
4-HBA	4-Hydroxybenzoesäure
A	Adenin
AIR	Airlift-Schlaufenreaktor
AO	Acridinorange
AOX	Adsorbierbare organisch gebundene Halogene
amu	atom mass units
BA	Benzoesäure
BP	Band Pass = Anregungsfilter
bp	Basenpaare
BTS	Schlammbelastung (kg DOC/kg TS·d)
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
Cat	Catechol
CTC	5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid
D	Verdünnungsfaktor
d	Tag bzw. Durchmesser
d <sub>i</sub>	Innendurchmesser
Da	Dalton
DAD	Dioden Array Detektor des HPLC
DAPI-lac	4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid-dilactat
DEV	Deutsche Einheitsverfahren
DIN	Deutsche Industrie Norm
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
F	Mikroskopfaktor
FNK	Kommission für Forschungsplanung und wissenschaftlichen Nachwuchs
FT	Farbteiler
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GZZ	Gesamtzellzahl
h	Stunde bzw. Höhe
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HPLC-MS	Kopplung Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit Massenspektrometrie
IC	Ionenchromatographie
Isolate AIR/3-CBA	Bakterien aus dem AIR isoliert vom 3-CBA-Agar
Isolate AIR/R2A	Bakterien aus dem AIR isoliert vom R2A-Agar
Isolate SMR/3-CBA	Bakterien aus dem SMR isoliert vom 3-CBA-Agar
Isolate SMR/R2A	Bakterien aus dem SMR isoliert vom R2A-Agar
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	Kilodalton



kg	Kilogramm
$K_I$	Hemmkonstante der Substratüberschusshemmung
$K_S$	Halbwerts-Konstante
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Molekülmasse
mAU	milli absorbance units
m/z	Massenzahl = Ionenmasse/Ionenladung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mol	Mol
MPa	Megapascal
M-Salz	Mineralsalz
MSD	Detektor des Massenspektrometers
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
N	Normalität = Äquivalentkonzentration bzw. Newton
nm	Nanometer
PCat	Protocatechuat
PCR	Polymerase Chain Reaction
psi	pounds per square inch (1 psi = 0,0689 bar)
RK	Rührkolben
rRNA	Ribosomale RNA
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute (kg DOC/m <sup>3</sup> ·d)
s	Sekunde
S	Substratkonzentration
SMR	Suspensions-Membranreaktor
SP	Sperrfilter
T	Thymin
TS	Trockensubstanz
UFT	Zentrum für Umweltforschung und -technologie
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Stoffumsatzgeschwindigkeit
$v_{\text{max}}$	maximale Stoffumsatzgeschwindigkeit
V	Volumen bzw. Volt
VIS	Visuelles Licht
WHG	Wasserhaushaltsgesetz
Y	molarer Ertragskoeffizient

### III Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Aufbau des Suspensions-Membranreaktors (aus: Schierenbeck 1997) 1) Niveausonde zur Steuerung der Abwasserzusammensetzung im Vorratsbehälter, 2) Niveausonde zur Füllstandsregelung, 3) pH-Messsonde, 4) Temperaturmessgerät, 5) Durchflussmessgerät, 6) Sauerstoffmessgerät, 7) Durchflussmessgerät, 8) Manometer 9) Manometer zur Druckregelung des Gasvolumenstroms, 10) Überdruckventil, 11) Schwebekörperdurchflussmessgerät zur Gasvolumenbestimmung, 12, 13) Manometer.....	8
Abb. 2.2:	Aufbau des Airlift-Schlaufenreaktor (aus: Schierenbeck 1997) 1) Niveausonde zur Steuerung der Abwasserzusammensetzung im Vorratsbehälter, 3) pH-Messsonde, 4) Temperaturmessgerät, 9) Manometer zur Druckregelung des Gasvolumenstroms, 11) Schwebekörperdurchflussmessgerät zur Gasvolumenbestimmung.....	12
Abb. 2.3:	Rührkolben zur Kultivierung von 3-CBA- bzw. 4-CP-abbauenden Bakterien.....	14
Abb. 2.4:	Laborfermenter BIOSTAT <sup>®</sup> MD der Fa. B. Braun Diessel Biotech GmbH.....	14
Abb. 2.5:	Skizze einer Blasensäule.....	15
Abb. 2.6:	Übersicht über die Arbeitsabläufe zur biochemischen und mikrobiologischen Beschreibung der Biozönose .....	16
Abb. 2.7:	Ringspaltung von Catechol über die <i>meta</i> - und die <i>ortho</i> -Spaltung.....	29
Abb. 2.8:	Ringspaltung von Protocatechuat über die <i>meta</i> - und die <i>ortho</i> -Spaltung .....	29
Abb. 3.1:	Gesamtzellzahl und KBE des Suspensions-Membranreaktors GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz.....	33
Abb. 3.2:	Gesamtzellzahl und KBE des Airlift-Schlaufenreaktors GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz.....	34
Abb. 3.3:	a) oben CTC-positive Bakterienzellen aus dem Rührkolben, in den stoffwechselaktiven Zellen fluoreszieren die Formazan-Kristalle rot, b) unten im selben mikroskopischen Gesichtsfeld fluoreszieren DAPI-lac gefärbte Bakterienzellen blau; bei 1000-facher Vergrößerung im Epifluoreszenzmikroskop fotografiert.....	39
Abb. 3.4:	Verwertungsspektrum der Isolate aus dem SMR und AIR unterteilt nach dem Anreicherungsmedium AIR/R2A = vom R2A-Agar stammende Isolate aus dem AIR, AIR/3-CBA = vom 3-CBA-Agar stammende Isolate aus dem AIR, SMR/R2A = vom R2A-Agar stammende Isolate aus dem SMR, SMR/3-CBA = vom 3-CBA-Agar stammende Isolate aus dem SMR.....	40

Abb. 3.5:	Verwertungsspektrum der Biozöosen aus dem SMR und AIR .....	41
Abb. 3.6a:	<i>in vitro</i> -Aktivitäten der Isolate AIR/3-CBA .....	43
Abb. 3.6b:	<i>in vitro</i> -Aktivitäten der Isolate SMR/3-CBA.....	43
Abb. 3.6c:	<i>in vitro</i> -Aktivitäten der Isolate AIR/R2A .....	43
Abb. 3.6d:	<i>in vitro</i> -Aktivitäten der Isolate SMR/R2A.....	43
Abb. 3.6e:	<i>in vitro</i> -Aktivitäten sämtlicher AIR-Isolate .....	44
Abb. 3.6f:	<i>in vitro</i> -Aktivitäten sämtlicher SMR-Isolate .....	44
Abb. 3.7:	Gelbe Kolonien von <i>Variovorax (Alcaligenes) paradoxus</i> auf R2A-Agarplatte .....	47
Abb. 3.8:	Batch-Versuche zum Abbau von 3-Chlorbenzoesäure bei zwei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen in der Blasensäule.....	48
Abb. 3.9:	Raum-Zeit-Ausbeute im SMR in Abhängigkeit der Schlamm- belastung bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen (mod. nach Schierenbeck 1997).....	49
Abb. 3.10:	Umsatzgrad in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration im SMR (aus: Schierenbeck 1997) .....	50
Abb. 3.11:	UV-Absorptionsspektren von 3-CBA und Metaboliten beim Abbau durch SMR-Kultur .....	52
Abb. 3.12a:	9. 3-CBA-Abbau nach 100 Minuten, .....	53
	Peak von Metabolit nach 1,761 und 3-CBA nach 4,525 Minuten .....	53
Abb. 3.12b:	9. 3-CBA-Abbau nach 100 Minuten, UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 1,761 Minuten.....	53
Abb. 3.13a:	9. 3-CBA-Abbau+EDTA 100', Peak von EDTA, Metabolit und 3-CBA.....	54
Abb. 3.13b:	9. 3-CBA-Abbau+EDTA 100', UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 1,686 Minuten.....	54
Abb. 3.14a:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, DAD-Signale der Metaboliten und von 3-CBA (14,24 Minuten) .....	54
Abb. 3.14b:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, MSD-Signale der Metaboliten.....	54
Abb. 3.14c:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 1,629 Minuten.....	55
Abb. 3.14d:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 1,842 Minuten.....	55
Abb. 3.14e:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, Massenspektrum des Metabolitenpeaks nach 1,603 Minuten .....	55
Abb. 3.14f:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, Massenspektrum des Metabolitenpeaks nach 1,791 Minuten .....	55
Abb. 3.14g:	UV-Spektrum von 3-CBA .....	56
Abb. 3.14h:	Massenspektrum von 3-CBA .....	56
Abb. 3.15a:	RK 23.01.98 (3-CBA), DAD-Signale der Metaboliten .....	56

---

Abb. 3.15b:	RK 23.01.98 (3-CBA), MSD-Signale der Metaboliten .....	56
Abb. 3.15c:	RK 23.01.98 (3-CBA), UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 1,935 Minuten.....	57
Abb. 3.15d:	RK 23.01.98 (3-CBA), Massenspektrum des Metabolitenpeaks nach 1,983 Minuten .....	57
Abb. 3.15e:	RK 23.01.98 (3-CBA), UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 2,015 Minuten.....	57
Abb. 3.15f:	RK 23.01.98 (3-CBA), UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 2,162 Minuten.....	57
Abb. 3.15g:	RK 23.01.98 (3-CBA), Massenspektrum des Metabolitenpeaks nach 2,219 Minuten .....	57
Abb. 3.16a:	<i>Variovorax paradoxus</i> (3-CBA), DAD-Signal des Metaboliten .....	58
Abb. 3.16b:	<i>Variovorax paradoxus</i> (3-CBA), MSD-Signale des Metaboliten .....	58
Abb. 3.16c:	<i>Variovorax paradoxus</i> (3-CBA), UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 1,996 Minuten.....	58
Abb. 3.16d:	<i>Variovorax paradoxus</i> (3-CBA), Massenspektrum des Metabolitenpeaks nach 2,061 Minuten. ....	58
Abb. 3.17a:	DAD-Spektrum von <i>cis,cis</i> -Muconat .....	59
Abb. 3.17b:	MSD-Spektrum von <i>cis,cis</i> -Muconat .....	59
Abb. 3.17c:	UV-Spektrum des ersten <i>cis,cis</i> -Muconat-Peaks nach 2,022 Minuten.....	59
Abb. 3.17d:	Massenspektrum des ersten <i>cis,cis</i> -Muconat-Peaks nach 2,076 Minuten.....	59
Abb. 3.17e:	UV-Spektrum des zweiten <i>cis,cis</i> -Muconat-Peaks nach 2,195 Minuten.....	60
Abb. 3.17f:	Massenspektrum des zweiten <i>cis,cis</i> -Muconat-Peaks nach 2,249 Minuten .....	60
Abb. 3.18a:	RK 07.08.98 (4-CP), DAD-Signale der Metaboliten.....	61
Abb. 3.18b:	RK 07.08.98 (4-CP), MSD-Signale der Metaboliten.....	61
Abb. 3.18c:	RK 07.08.98, UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 2,369 Minuten .....	61
Abb. 3.18d:	RK 07.08.98, Massenspektrum des Metabolitenpeaks nach 2,439 Minuten....	61
Abb. 3.18e:	RK 07.08.98, UV-Spektrum von 4-CP nach 30,809 Minuten.....	62
Abb. 3.18f:	RK 07.08.98, Massenspektrum von 4-CP nach 31,013 Minuten .....	62
Abb. 3.19:	3-CBA-Abbau nach Stoßbelastungen im Fermenter .....	63
Abb. 3.20:	3-CBA-Abbau durch Rührkolben-Kulturen (RK) im Röhrenansatz, in den grau unterlegten Versuchsreihen wurde Na-EDTA zur Hemmung der Muconat-Cycloisomerase eingesetzt .....	63
Abb. 3.21:	3-CBA-Abbau und Chlorid-Zunahme von Rührkolben-Kulturen im Röhrenansatz (1).....	64
Abb. 3.22:	3-CBA-Abbau und Chlorid-Zunahme von Rührkolben-Kulturen im Röhrenansatz (2).....	65
Abb. 3.23:	3-CBA-Abbau durch Rührkolben-Kultur und Chlorid-Zunahme im Röhrenansatz (1 mM) .....	65

Abb. 3.24:	Auftragung der Substratkonzentration 3-CBA gegen die 3-CBA-Abbaugeschwindigkeit $v$ der Rührkolben- und Fermenter-Kulturen RK = Rührkolben, Ferm = Fermenter.....	66
Abb. 3.25:	4-CP-Abbau durch Rührkolben- und SMR-Kulturen sowie Chlorid-Zunahme im Röhrenansatz RK = Rührkolben, Ferm = Fermenter, in den grau unterlegten Versuchsreihen wurde Na-EDTA zur Hemmung der Muconat-Cycloisomerase eingesetzt.....	68
Abb. 3.26:	4-Chlorphenol-Abbau durch SMR-Kultur und Chlorid-Freisetzung im Schüttelkolben (1).....	69
Abb. 3.27:	4-Chlorphenol-Abbau durch SMR-Kultur und Chlorid-Freisetzung im Schüttelkolben (2).....	70
Abb. 3.28:	Auftragung der Substratkonzentration 4-CP gegen die 4-CP-Abbaugeschwindigkeit $v$ von drei Rührkolben- und einer SMR-Kultur im Röhrenansatz.....	71
Abb. 3.29:	Auftragung der Substratkonzentration 4-CP gegen die 4-CP-Abbaurrate $v$ der SMR-Kultur (1) im Schüttelkolbenansatz .....	71
Abb. 3.30:	Korrelation zwischen 4-Chlorphenol-Zugabe und Biomassezuwachs im Rührkolben Der Biomassegehalt wurde als Protein- und TS-Gehalt gemessen. Für jeden Versuchsabschnitt sind die Trendlinien des Biomassezuwachses mit ihren Geradengleichungen angegeben.....	73
Abb. A.4.1a:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, Peaks von Metabolit und 3-CBA.....	120
Abb. A.4.1b:	3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, UV-Spektrum des Metabolitenpeaks .....	120
Abb. A.4.2a:	Mineralsalz-Medium, DAD-Spektrum.....	121
Abb. A.4.2b:	Mineralsalz-Medium, MSD-Spektrum.....	121
Abb. A.4.2c:	Mineralsalz-Medium, UV-Spektrum des Peaks nach 1,569 Minuten .....	121
Abb. A.4.2d:	Mineralsalz-Medium, Massenspektrum des Peaks nach 1,589 Minuten.....	121
Abb. A.4.2e:	Mineralsalz-Medium, UV-Spektrum des Peaks nach 1,929 Minuten .....	121
Abb. A.4.2f:	Mineralsalz-Medium, Massenspektrum des Peaks nach 1,951 Minuten.....	121
Abb. A.4.2g:	Mineralsalz-Medium, Massenspektrum des Peaks nach 2,548 Minuten.....	122
Abb. A.4.3a:	UV-Spektrum von Catechol.....	122
Abb. A.4.3b:	Massenspektrum von Catechol .....	122

## IV Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Kenn- und Betriebsdaten Suspensions-Membranreaktor konstante Einstellungen sind unterstrichen .....	11
Tab. 2.2:	Kenn- und Betriebsdaten Airlift-Schlaufenreaktor konstante Einstellungen sind unterstrichen .....	13
Tab. 2.3:	Übersicht über das Untersuchungsprogramm zur Beschreibung des Chlor- aromatenabbaus in den verschiedenen Versuchsanlagen .....	27
Tab. 3.1:	Biomasseparameter der Biozönose des Suspensions-Membranreaktors GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, DEV = DEV-(N)-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz .....	35
Tab. 3.2:	Biomasseparameter der Biozönose des Airlift-Schlaufenreaktors GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, DEV = DEV-(N)-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz .....	36
Tab. 3.3:	Ergebnisse der CTC und DAPI-lac-Färbung RK = Rührkolben, vor/nach = vor bzw. nach der 4-CP-Zugabe .....	37
Tab. 3.4:	Taxonomische Einordnung der isolierten Bakterien. In Klammern: alter Name bzw. Häufigkeit der Spezies; fett gedruckt: Stämme mit großer Bedeutung für den 3-CBA-Abbau.....	45
Tab. 3.5:	Kinetische Parameter des 3-CBA-Abbaus .....	67
Tab. 3.6:	Kinetische Parameter des 4-CP-Abbaus .....	72
Tab. A.3.1:	Auflistung der PCR-Primer mit ihren jeweils spezifischen Bindungsstellen.....	117

# 1. Einleitung

## 1.1 Produktionsintegrierter Umweltschutz

Die zunehmenden Erkenntnisse über Schadstoffemissionen und deren Auswirkungen auf die Umwelt haben in der Bundesrepublik Deutschland zu einem ansteigenden Bedarf an produktionsintegriert einsetzbaren Umweltschutztechniken geführt. Durch die Umsetzung des Wasserhaushaltsgesetzes (WHG 1986), insbesondere des § 7a, der für gefährliche Abwasserinhaltsstoffe eine innerbetriebliche Teilstrombehandlung vorschreibt, werden die Verursacher dazu verpflichtet, eine innerbetriebliche Rückhaltung dieser Stoffe vorzunehmen. Als gefährliche Stoffe werden die Stoffe und Stoffgruppen angesehen, die durch ihre Toxizität, Persistenz, Akkumulation, Mutagenität oder Kanzerogenität ein Gefährdungspotential darstellen. Diese Substanzen gelangen als Nebenprodukte innerhalb chemischer Produktionsprozesse, z.B. bei der Gewinnung von Biphenylen, Pestiziden, chlorierten Kohlenwasserstoffen oder auch durch Oberflächenbehandlungsprozesse in vielfältigen stofflichen Kombinationen (Römpf 1989) in die innerbetrieblich zu behandelnden Prozessabwässer.

Die betriebliche Reinigungsaufgabe konzentriert sich für Indirekteinleiter auf die Rückhaltung, die Abtrennung und die Eliminierung des zusätzlichen Gefährdungspotentials, also der gefährlichen Stoffe, für die je nach Toxizität maximale Einleiterwerte im Konzentrationsbereich oft weniger  $\mu\text{g/l}$  gesetzlich festgelegt sind. Die im Ablauf der Reinigungsanlage zu erreichenden geringen Konzentrationen stellen an die verfahrenstechnischen Prozesse größte Anforderungen. Die Hauptprobleme bei der biologischen Umsetzung der gefährlichen und oftmals auch schwer abbaubaren Stoffe liegen darin begründet, dass

- bei Mischabwässern zuerst die leicht abbaubaren und anschließend in einer zweiten Stufe die schwer abbaubaren Stoffe mit einer adaptierten Biozönose umgesetzt werden müssen (Hartmann 1992),
- zum Erreichen nennenswerter Abbauraten in der zweiten Stufe lange Verweilzeiten und große Anlagenvolumina benötigt werden (Räbiger 1995) und
- zum biologischen Abbau eine Mindestkonzentration des Schadstoffes erforderlich ist, um das physiologische Potential relativ langsam wachsender Bakterien mit spezifischen Nährstoffansprüchen und langen Generationszeiten überhaupt erst zu induzieren und die Sterberaten in der spezialisierten Biozönose auszugleichen (Pagga 1987). Diese minimale Schadstoffkonzentration liegt oft über den vom Gesetzgeber festgelegten Einleiterwerten (Räbiger 1995).

Der "Produktionsintegrierte Umweltschutz" zielt daher darauf, durch Änderungen der Produktion Umweltbelastungen zu vermeiden oder zu minimieren, indem Emissionen nicht erst am Ende eines Produktionsprozesses abgefangen oder gereinigt werden. Dieses Konzept hat neben dem ökologischen auch einen ökonomischen Vorteil gegenüber den additiven "End of

Pipe"-Technologien, da relevante Kosten für z.B. Energie, Wasser und Entsorgung reduziert und die Wettbewerbsfähigkeit der Betriebe verbessert werden (Spieker & Haasis 1999). Bisher mangelt es aber an den zum produktionsintegrierten Umweltschutz notwendigen kompakten und modular aufgebauten Verfahrenstechniken, die schädliche Emissionen schon am Ort des Entstehens wirksam und selbstregelnd verhindern (Räbiger 1995).

An der Universität Bremen wurde daher der interdisziplinär angelegte FNK-Forschungsschwerpunkt "Produktionsintegrierter Umweltschutz" unter der Federführung des Instituts für Umweltverfahrenstechnik von Prof. Räbiger eingerichtet. Das Ziel war die Entwicklung eines biologischen Abwasserreinigungsreaktors, der eine selektive biologische Eliminierung gefährlicher Abwasserinhaltsstoffe aus industriellen Mischabwässern ermöglicht (Projektteil A). Gleichzeitig sollten Bewertungskriterien erarbeitet und die gesetzlichen und innerbetrieblichen Handlungsstrategien aufgeklärt werden, die bei der zukünftigen betrieblichen Anwendung von umwelttechnischen Verfahren nach einem neuen Stand der Technik zu berücksichtigen sind (Projektteil B). Beide Bereiche wurden von Wissenschaftlern aus den Fachgebieten Arbeit und Technik, Betriebswirtschaftslehre, Mathematik, Mikrobiologie, Mikrosystemtechnik, Informatik, Öffentliches Recht, Organische Chemie, Physiologische Pflanzenanatomie und Umweltverfahrenstechnik interdisziplinär bearbeitet. Das Gesamtprojekt "**Produktionsintegrierter Umweltschutz**" gliederte sich folgendermaßen:

**Projektbereich A:** Produktionsintegriert einsetzbare biologische Verfahren zur selektiven Eliminierung gefährlicher Stoffe aus Abwassergemischen

**A1: Entwicklung eines Verfahrens zur selektiven biologischen Eliminierung schwer abbaubarer Stoffe aus Abwassergemischen mittels Suspensions-Membranreaktor**

Prof. Dr.-Ing. N. Räbiger

Dipl.-Ing. A. Schierenbeck

(IUV, Inst. für Umweltverfahrenstechnik, FB 4, Produktionstechnik)

**A2: Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor**

Prof. Dr. rer. nat. A. Nehr Korn

Dipl.-Biol. A. Kappler

(Abt. Mikrobiologie, FB 2, Biologie/Chemie)

**A3: Transport- und Metabolismusstudien beim mikrobiellen Abbau von gefährlichen Stoffen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie**

Prof. Dr. rer. nat. D. Leibfritz

Dipl.-Chem. U. Lanzerath

(Organische Chemie/Instrumentelle Analytik, FB 2, Biologie/Chemie)



**A4: Akkumulation und Biodegradation von in Bioschlamm vorhandener 3-Chlorbenzoesäure durch Pilze, insbesondere Mykorrhizapilze und durch Wurzeln höherer Pflanzen**

Prof. Dr. rer. nat. W. Heyser

Dipl.-Biol. J. Dittmann

(Physiologische Pflanzenanatomie, FB 2, Biologie/Chemie)

**A5: Flüssigkeitsanalyse Mikrosystem - Auswertung dielektrischer Messungen und Entwicklung eines Sensors zur Trockensubstanzbestimmung**

Prof. Dr. rer. nat. J. Binder

Dipl.-Ing. T. Kalinowski

(IMSAS, Inst. f. Mikrosensoren, -aktuatoren und -systeme, FB 1, Physik/Elektrotechn.)

**A6: Entwicklung eines wissensbasierten Systems zur intelligenten Interpretation von Messdaten**

Prof. Dr. rer. nat. O. Herzog

Dipl.-Ing. M. Boronowsky

(TZI, Technologie Zentrum Informatik, FB 3, Mathematik/Informatik)

**Projektbereich B:** Ingenieurtechnische, sozialwissenschaftliche und umweltrechtliche Bewertung der Produktionsintegrierbarkeit von Umwelttechniken

**B1: Dynamische Prozesssimulation im produktionsintegrierten Umweltschutz**

Prof. Dr.-Ing. N. Rübiger

Dipl.-Ing. S. Dullstein

(IUV, Inst. für Umweltverfahrenstechnik, FB 4, Produktionstechnik)

**B2: Überwachung und Störfalldiagnose bei produktionsintegrierten Abwasserbehandlungsanlagen - Entwicklung eines hybriden Expertensystems zur Prozessführung**

Prof. Dr. rer. nat. M. Wischnewsky

Dipl.-Math. T. Waschulzik,

(TZI, Technologie Zentrum Informatik, FB 3, Mathematik/Informatik)

**B3: Über- und zwischenbetriebliche Akteursfigurationen bei der Einführung produktionsintegrierter Abwassermeidungstechniken in kleinen Lohngalvaniken**

Prof. Dr. phil. Dipl.-Chem. W. Müller

Dipl.-Sozialw. K. Feseker

(artec, Forschungszentrum Arbeit und Technik, FB 1)

**B4: Förderung, Behinderung und Kontrolle verfahrensintegrierten Umweltschutzes durch Umweltrecht**

Prof. Dr. jur. G. Winter

N. Griem

(FG Öffentliches Recht, Verfahrensrecht, Rechtssoziologie, FB 6, Rechtswissenschaft)

**B5: OR-Verfahren zur Unterstützung optimaler betriebswirtschaftlicher Entscheidungen eines produktionsintegrierten Umweltschutzmanagements**

Prof. Dr. rer. pol. H.-D. Haasis

Dipl.-Oec. C. Spieker

(Allgemeine Betriebswirtschaftslehre, Produktionswirtschaft und Industriebetriebslehre, FB 7, Wirtschaftswissenschaften)

Die Einführung einer produktionsintegrierten Umweltschutzmaßnahme erfordert von der technischen Seite mehrere Bedingungen. Zunächst müssen die Anforderungen an das Prozesswasser definiert werden, auf deren Grundlage die verfahrenstechnische Konzeptionierung unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Gesichtspunkte erfolgt. Den nächsten Schritt stellt die Auslegung einer Abwasserreinigungsanlage mit Versuchen im Technikumsmaßstab und Laboruntersuchungen dar (Schierenbeck 1997). Hierbei werden die den Abbau der Schadstoffe bestimmenden Einflussparameter ermittelt, die zur Modellierung des Anlagenverhaltens, der Festlegung des Anlagendesigns und zu einem Scale-up notwendig sind.

In diesem Zusammenhang sind die "**Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor**" in das Gesamtprojekt "Produktionsintegrierte Umweltschutztechnik" eingebunden. Die Arbeiten dienen der reaktionstechnischen Beschreibung der im Reaktor stattfindenden biochemischen Umwandlungsprozesse. Bei der biologischen Teilstrombehandlung industrieller Abwässer müssen bessere Kenntnisse über die Wachstums- und Abbaukinetiken vorliegen, als das bei der Behandlung von Mischabwässern notwendig war, um für den Schadstoffabbau optimale Bedingungen schaffen zu können (Wiesmann 1991). Die gewonnenen Erkenntnisse sollen zudem zu einer leichteren Überwachung und zu einer Optimierung des Anlagenbetriebs führen.

## 1.2 Produktionsintegrierbare Abwassertechniken

Als produktionsintegrierbare Abwassertechniken wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Abwasserreaktoren untersucht:

- der Suspensions-Membranreaktor (SMR) als neu entwickelte Technik
- und der Airlift-Schlaufenreaktor (AIR) als Vergleichsreaktor nach dem derzeitigen Stand der Technik.

Der Suspensions-Membranreaktor ist ein druckbeaufschlagter Airliftreaktor mit äußerer Rückführung und integrierter Nanofiltration. Der SMR ist aus Edelstahl und PVC gefertigt und besteht aus einer unteren Kammer, einem Membranrohrbündel und einer oberen Kammer. Der geometrisch ähnliche Airlift-Schlaufenreaktor ist aus Glas gefertigt und besteht aus dem Auftriebsteil, der externen Rückführung und einer oberen Kammer. Ein Absetzbecken zur Schlammrückhaltung ist nachgeschaltet. Eine detaillierte Beschreibung der Reaktoren erfolgt in Kapitel 2.

## 1.3 Zielsetzung

Nach wie vor ist in der Abwassertechnologie eine reduktionistische "black box"-Betrachtungsweise vorherrschend. Dies wird deutlich an der Übertragung der von Monod erarbeiteten Gesetzmäßigkeiten für die Zusammenhänge zwischen Substratkonzentration und Wachstumsgeschwindigkeit von Mikroorganismen mit den dazugehörigen kinetischen Modellen auf die Abwasserreinigung. Dadurch ist es zwar gelungen, mathematische Verfahrensmodelle zu erstellen, die sich in der Praxis als sehr brauchbar für die Beschreibung der Geschwindigkeit der Elimination von organischen Substanzen und des Schlammzuwachses erwiesen haben, aber faktisch bedeutet dies eine Reduktion des Reinigungsprozesses auf ein Reinkultursystem (Güde 1996). Das Verfahren wird formal wie eine chemische Reaktion beschrieben, bei der die Gesamtheit der Mikroorganismen ebenso wie die der organischen oder anorganischen Schmutzstoffe weitgehend undifferenziert als Biomasse, DOC, AOX oder andere Summenparameter behandelt wird. Störsituationen durch Überhandnehmen unerwünschter Organismen oder die gezielte Förderung bestimmter Organismen mit günstigen Stoffwechseleinstellungen werden nicht erfasst (Güde 1996).

Daraus folgt, dass zur Beschreibung komplexer Prozesse wie der biologischen Abwasserreinigung eine vollständige Betrachtung physikalischer, chemischer, biologischer und technologischer Gegebenheiten notwendig ist (Kämpfer 1996). Abwasserreinigungsverfahren müssen als Systeme verstanden werden, deren Ganzes mehr ist als nur die Summe der Einzelkomponenten. Es handelt sich um ein komplexes Wirkungsgefüge aus Organismen und unbelebten natürlichen und anthropogenen Umweltfaktoren, die untereinander und mit ihrer

Umgebung in energetischen, stofflichen und informatorischen Wechselwirkungen stehen (Güde 1996, Kämpfer 1996). Ohne einen Einblick in die "black box" der im Abwasser lebenden Biozönosen kann eine weitere Optimierung der Abwasserreinigung mit ihren vielfältigen Ansprüchen nicht erreicht werden (Lemmer 1996).

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der "**Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor**", einen tieferen Einblick in das Wirkungsgefüge des Suspensions-Membranreaktors zu gewinnen. Im ersten Schwerpunkt der Arbeit sollten die am Schadstoffabbau beteiligten Mikroorganismen charakterisiert und ihr Substratverwertungsspektrum ermittelt werden. Es sollten die Mikroorganismenarten identifiziert werden, die die Fähigkeit für eine spezielle Anwendungsaufgabe mitbringen. Ferner sollten Informationen über die Milieuanforderungen und Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Vertretern der heterogen zusammengesetzten Biozönose gewonnen werden, um die Umweltfaktoren im Reaktor zielgerichtet einstellen zu können.

Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit sollten die im Reaktor ablaufenden biochemischen Umwandlungsprozesse beschrieben werden. Als Modellschadstoffe wurden 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA) und 4-Chlorphenol (4-CP) eingesetzt. Für die Beschreibung der Abbaewege sollte der Mechanismus der Aromatenspaltung, der Zeitpunkt der Dechlorierung und das Auftreten von Metaboliten, die den Abbau beeinträchtigen können, sowie die Abbaukinetiken der eingesetzten Schadstoffe untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse zum mikrobiellen Abbau der chlorierten Aromaten sollten einer leichteren Überwachung und einer Optimierung des Anlagenbetriebs dienen.

Die beiden Modellschadstoffe wurden schon in vielen Arbeiten zum mikrobiellen Abbau untersucht (Dorn & Knackmuss 1978, Chatterjee et al. 1981, Müller & Lingens 1986, Westmeier & Rehm 1987, Reineke 1989, Hollender 1994, Wobus et al. 1995). Die bisherigen Erkenntnisse lassen sich allerdings nicht ohne Berücksichtigung der besonderen Milieuverhältnisse auf den Suspensions-Membranreaktor übertragen, zumal die meisten Ergebnisse auf Reinkulturuntersuchungen beruhen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit Kulturen aus dem Suspensions-Membranreaktor, dem Airlift-Schlaufenreaktor, einem Laborfermenter, einer Blasensäule und den Rührkolben durchgeführt. In die Experimente wurden sowohl die Mischkulturen aus den Reaktoren als auch die isolierten Reinkulturen einbezogen.

Im Rahmen des Gesamtprojekts erfolgte eine enge Zusammenarbeit mit den benachbarten Teilprojekten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Die Modellschadstoffe

Die Auswahl der organischen Schadstoffe des für alle Versuche eingesetzten synthetischen Abwassers lehnte sich an die vorhandenen Erkenntnisse über Inhaltsstoffe mit Leitcharakter aus den Bereichen der Textilveredelung, der Reinigungsabwässer bei der Kosmetikherstellung und der Chemischen Industrie an (Schierenbeck 1997).

Als Modellschadstoff für eine nach dem WHG gefährliche Substanz, die nach Wellens (1990) zudem schwer abbaubar ist, wurde 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA) auf Beschluss der FNK eingesetzt. 3-Chlorbenzoesäure ( $C_7H_5ClO_2$ ) hat eine Molmasse von 156,57 g/mol, einen Schmelzpunkt von 155-158°C (sublimierend) und besteht aus einem einfach mit einem Chloratom substituierten Benzolring und einer Carboxyl-Gruppe. 3-CBA ist gesundheitsschädlich. 3-CBA ist gut in heißem Wasser und in polaren Lösungsmitteln löslich (Römpp 1989). 3-CBA wird als Konservierungsmittel und als Zwischenprodukt in der Synthese von Arzneimitteln, Schädlingsbekämpfungsmitteln, Biphenylen, Lösungsmitteln und Farbstoffen eingesetzt und dient als Bezugssubstanz für Elementaranalysen (Römpp 1989). 3-CBA ist das Abbauprodukt vieler chlorierter aromatischer Verbindungen und wurde daher schon oft als Modellsubstanz für den Abbau chlorierter Aromaten untersucht (Dorn et al. 1974, Dorn & Knackmuss 1978, Chatterjee et al. 1981, Müller & Lingens 1986).

Im Sommer 1997 wurde der Schadstoff nach Information der Teilprojekte durch das Institut für Umweltverfahrenstechnik (IUV) gewechselt, da für weitere Untersuchungen noch ein anderer Modellschadstoff eingesetzt werden sollte, der schwerer biologisch abbaubar ist als 3-CBA. In der Folgezeit wurden die Reaktoren dann mit 4-Chlorphenol (4-CP) beschickt, so dass die Untersuchungen auf diesen Schadstoff ausgedehnt wurden.

4-Chlorphenol ( $C_6H_5ClO$ ) hat eine Molmasse von 128,56 g/mol, einen Schmelzpunkt von 43°C, einen Siedepunkt von 219°C und besteht aus einem einfach mit einem Chloratom substituierten Benzolring und einer Hydroxyl-Gruppe. 4-CP ist schwach giftig und hat einen stechenden Geruch, der bereits bei 1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  Luft wahrnehmbar ist. 4-CP gilt laut Römpp (1989) als biologisch schwer abbaubar, wird aber bis 20 mg/l von einem nicht adaptierten Belebtschlamm vollständig und von einer adaptierten Mischkultur mit einer Abbaurate von 40 mg/g TS · h abgebaut (Rippen 1991). 4-CP wird für die Produktion von 2,4-Dichlorphenol, Tri- und Tetrachlorphenolen, von Farbstoffen, Bioziden, Arznei- und Desinfektionsmitteln, als Kraftstoffzusatz und Speziallösungsmittel in der Mineralölraffinerie sowie als Vergällungsmittel für Ethanol eingesetzt.

## 2.2 Versuchsanlagen

### 2.2.1 Der Suspensions-Membranreaktor

Der Suspensions-Membranreaktor (SMR) war ein druckbeaufschlagter Airliftreaktor mit äußerer Rückführung und integrierter Nanofiltration, der aus Edelstahl und PVC gefertigt war. Als zylindrischer Aufströmer bestand der SMR aus einer unteren Kammer, einem Membranrohrbündel und der oberen Kammer. Der Aufbau ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

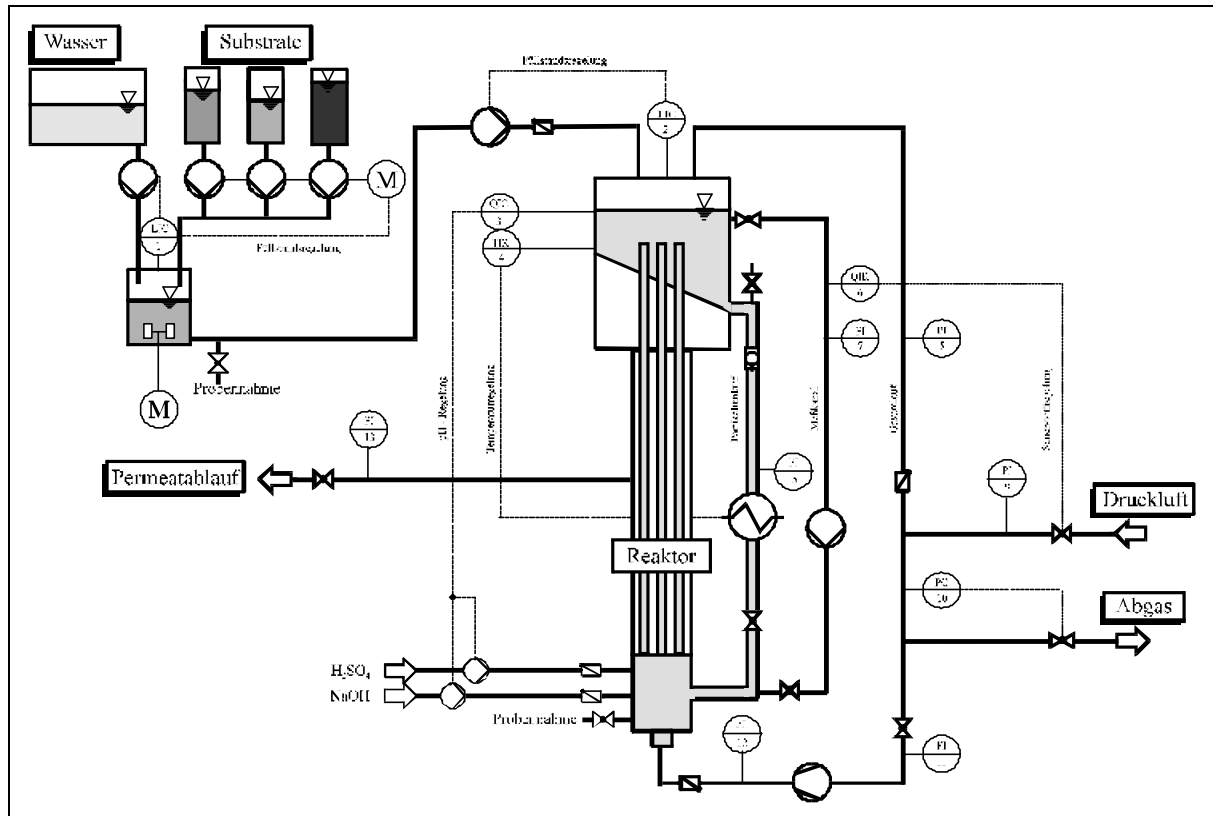


Abb. 2.1: Aufbau des Suspensions-Membranreaktors (aus: Schierenbeck 1997)

1) Niveausonde zur Steuerung der Abwasserzusammensetzung im Vorratsbehälter, 2) Niveausonde zur Füllstandsregelung, 3) pH-Messsonde, 4) Temperaturmessgerät, 5) Durchflussmessgerät, 6) Sauerstoffmessgerät, 7) Durchflussmessgerät, 8) Manometer 9) Manometer zur Druckregelung des Gasvolumenstroms, 10) Überdruckventil, 11) Schwebekörperdurchflussmessgerät zur Gasvolumenbestimmung, 12, 13) Manometer

In der unteren Kammer wurde durch Gaseintrag über eine Sintermetallplatte eine Wirbelschicht (Luft, Biosuspension, Trägermaterial) mit homogener Blasenströmung erzeugt. Das Gemisch wurde dann durch die Airlift-Strömung in das darüber axial angeordnete Membranrohrbündel aus sieben Membranrohren gefördert. Hier erfolgte eine Querstromfiltration, und durch gezielte Permeation der niedermolekularen Bestandteile konnte eine substratspezifische Verweilzeit eingestellt werden (Schierenbeck 1997). Für die Trennaufgabe wurde eine Membran aus Polyacrylnitril eingesetzt, deren Trenngrenze im Bereich der Ultrafiltration lag, so dass bei guter Rückhaltung eine hohe Permeatleistung erzielt wurde.

Die obere Kammer diente als Sedimentationsbecken für das Wirbelgut und zur Ausgasung der Luftblasen. Durch eine schiefe Ebene am Boden wurde der Feststoff über den Partikelumlauf der unteren Kammer zugeführt. Das über die Phasengrenze (Füllstand) austretende Abgas wurde zentral über ein manuell einstellbares Sicherheitsventil (10) an die Umgebung abgegeben. Über das Ventil wurde der Systemdruck am Manometer (13) ablesbar eingestellt. Mit einem Gasanalysator wurde kontinuierlich der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Abgasstrom gemessen. Über einen Pt 100-Temperaturfühler (4) wurde die Temperatur des Reaktionsmediums erfasst und mittels einer geregelten Temperiereinheit sowie einem Kühler im Rücklauf konstant auf 20°C eingestellt. An gleicher Stelle wurde über eine Einstabmesssonde (3) der pH-Wert bestimmt und durch eine PID-Regler-gesteuerte Zugabe von 0,2 N Schwefelsäure oder Natronlauge in die untere Kammer konstant gehalten. Die Förderung von Säure und Lauge erfolgte mit Hilfe zweier Membranpumpen über Rückschlagventile in den Druckreaktor.

Der mit der feinblasigen Belüftung zugeführte Gasvolumenstrom wurde über ein Schwebekörperdurchflussmessgerät (11) bestimmt und mittels eines mechanischen Manometers (9) gesteuert. Die Begasung mit Druckluft diente zum einen der Sauerstoffversorgung der aeroben Mikroorganismen und zum anderen zur Suspendierung des Wirbelguts. Die durch die Begasung erzeugte Umlaufströmung im Reaktor wurde im Rücklauf mittels eines induktiven Durchflussmessers (5) kontinuierlich bestimmt. Auf Grund des hohen Betriebsdrucks von 6 bar und der damit verbundenen erhöhten Sauerstofflöslichkeit wurden im Reaktor Sauerstoff-Konzentrationen von bis zu 40 mg/l gemessen (Schierenbeck 1997).

Im Verlauf des FNK-Forschungsprojekts wurde der SMR mit einer Kreislaufführung des Gasstromes ausgerüstet, um praxisrelevante Sauerstoff-Gehalte einstellen zu können und den Energieeintrag in den Reaktor zu minimieren. Damit musste mit Hilfe eines Kompressors lediglich der Druckverlust der Umlaufströmung im Reaktor von ca. 0,1 MPa aufgebracht werden und nicht das gesamte Gas von Umgebungsdruck auf einen Eingangsdruck von 0,8 MPa verdichtet werden, wie es bei einer reinen Druckluftbegasung der Fall war.

Der Sauerstoff-Gehalt wurde mittels eines Sauerstoffmessgerätes (6) in einem Teilstrom (Messkanal) bestimmt, der mit einem induktiven Durchflussmessgerät (7) erfasst wurde. Dieser Teilstrom wurde von einer Exzentrerschneckenpumpe gefördert, so dass eine konstante Anströmung der Sauerstoffelektrode mit definierter Anströmgeschwindigkeit gewährleistet war. Über einen PID-Regler wurde ein Proportionalventil zur Zuführung der Druckluft gesteuert und so der Sauerstoff-Gehalt im Reaktor konstant gehalten. Um den Druck und den Volumenstrom konstant zu halten, wurde durch das Überdruckventil (10) das überschüssige Gas an die Umgebung abgegeben. Ein Rückschlagventil verhinderte das Eindringen von Druckluft in den Reaktor entgegen des Gaskreislaufs (Schierenbeck 1997).

Auf Grund der transmembranen Druckdifferenz trat das Permeat aus dem Reaktorinneren durch die eingesetzten Rohrmembranen hindurch in den Mantelraum aus und wurde seitlich über ein im zentralen Ablauf angeordnetes Nadelventil abgeführt. Über dieses Nadelventil konnte die transmembrane Druckdifferenz und damit der Permeatablauf gezielt manuell eingestellt werden. Der Permeatablauf unterlag je nach Membranbelegung oder -blockierung umfangreichen Schwankungen. Der sich abweichend vom Umgebungsdruck einstellende Druck auf der Membranaußenseite wurde an einem Manometer (13) abgelesen.

Um das Absinken des Füllstandes in der oberen Kammer durch den austretenden Permeatvolumenstrom zu vermeiden, wurde eine Kolbenmembranpumpe über Niveausonden (2) und eine Füllstandsregelung angesteuert, die synthetisches Abwasser aus einem Vorratsbehälter über ein Rückschlagventil in die obere Kammer förderte. Im Vorratsbehälter wurde das synthetische Abwasser niveaugesteuert (1) aus Substratvorlage und Leitungswasser automatisch angemischt. Das Wasser und die Substrate wurden über eine Schlauchpumpe mit Mehrfachkopf definiert eingespeist (Schierenbeck 1997).

Durch die integrierte Anwendung der Nanofiltration war der Suspensions-Membranreaktor geeignet, selektiv nur die schwer abbaubaren Stoffe aus Mischabwässern im Reaktorraum zurückzuhalten und biologisch zu eliminieren. Dazu gehörten die höhermolekularen Bestandteile der gelösten organischen Kohlenstoffe (DOC) und 3-Chlorbenzoesäure sowie 4-Chlorphenol. Niedermolekulare DOC und Wasser gelangten erst in den Mantelraum des Reaktors und anschließend in den Permeatablauf.

Die Trenngrenze der Membran lag im Bereich der Ultrafiltration bei 10.000 Dalton (= 10.000 g/mol). Sie wirkte aber als Nanofiltrationsmembran mit einer Trenngrenze von ca. 100 bis 1.000 g/mol, da nicht die Trenneigenschaften des Membranmaterials entscheidend waren. Vielmehr übte das Scaling, die kompakte mineralische Deckschicht aus den anorganischen Bestandteilen des Abwassers, über Sorptionsvorgänge den maßgeblichen Einfluss auf den Rückhalt aus (Rautenbach 1990, Rosenwinkel 1999). Diese Trenncharakteristik wurde in Vorversuchen ohne Biomasse bestätigt (Schierenbeck 1997). Im Betrieb mit Biomasse bildeten sich auf Grund der hohen Druckdifferenz von 6 bar, mit der die Nanofiltration angetrieben wurde, Biofilme aus. Die Biofilme setzten die Permeabilität der Membranen herab, reduzierten die Rückhaltung und verschlechterten damit die Trennleistung. Um dies zu vermeiden, wurden Anthrazitpartikel mit 1,6 bis 2 mm Korngröße in einer Konzentration von 10 g/l eingesetzt. Der größte Teil der Bakterien lag daher in Flockenform vor (Rombaux 1995). Die Bakterienkulturen in beiden Reaktoren stammten ursprünglich aus der Kläranlage der Bremer Wollkämmerei.



Die Probenahme erfolgte hinter dem Vorratsbehälter, aus dem Partikelumlauf sowie aus dem Permeatablauf. Die maßgeblichen Kenn- und Betriebsdaten des Reaktors sind in Tab. 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1: Kenn- und Betriebsdaten Suspensions-Membranreaktor  
konstante Einstellungen sind unterstrichen

Parameter		Größe
Volumen	Reaktor / Füllvolumen	15,0 l / 10,5 l
Abmessungen	untere Kammer	$d_i = 80 \text{ mm}$ , $h = 225 \text{ mm}$
	obere Kammer	$d_i = 150 \text{ mm}$ , $h = 670 \text{ mm}$
	Abströmer	$d_i = 25 \text{ mm}$ , $h = 1.500 \text{ mm}$
Begasungseinheit	Edelstahl-Sinterplatte	$d = 65 \text{ mm}$ , $h = 8 \text{ mm}$
	Körnung Sintermaterial	$20 \mu\text{m}$
Rohrmembranen	ETL-Verfahrenstechnik, Peiting, Polyacrylnitril auf Polyesterfließ in PVC-Stützrohr	Typ PAN 10 kDa
	Permeatleistung, $\text{H}_2\text{O}$ , 298 K	ca. $55 \text{ l/m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{bar}$
Betriebsparameter	Anzahl	7 Stück
	Abmessungen	$d_i = 14,1 \text{ mm}$ , $h = 1.200 \text{ mm}$
	effektive ges. Membranfläche	$0,372 \text{ m}^2$
	Betriebsdruck, absolut	0,1-0,7 MPa, <u>0,6 MPa = 6 bar</u>
	Temperatur	15 - 25°C, <u>20°C</u>
	pH-Wert	2 - 12, 7,0
	Gasdurchsatz	0 - 1,5 $\text{Nm}^3/\text{h}$ , <u>0,95 <math>\text{Nm}^3/\text{h}</math></u>
	Gasleerrohrgeschw. M.-Rohr	0 - 7,6 cm/s, <u>4,8 cm/s</u>
	gemess. Fluidumlauf, $\text{H}_2\text{O}$	0 - 18 l/min
	Fluideerrohrgeschw. M.-Rohr	0 - 27 cm/s
Durchsatz	max. 100 l/h	
Verweilzeit	> 0,105 h	

## 2.2.2 Der Airlift-Schlaufenreaktor

Der in Abbildung 2.2 skizzierte Airlift-Schlaufenreaktor (AIR) war als Referenzreaktor analog zum Suspensions-Membranreaktors aufgebaut, um eine Bewertung der Verfahrenstechniken hinsichtlich der selektiven Eliminierung schwer abbaubarer Stoffe unter vergleichbaren Bedingungen durchzuführen (Schierenbeck 1997).

Dem Airlift-Schlaufenreaktor, der eine hydrodynamisch bestimmte Verweilzeitverteilung aufwies, war ein Absetzbecken zur Schlammrückhaltung nachgeschaltet. Der aus Glas gefertigte Reaktor wurde über eine Sinterplatte feinblasig am Fuß des Auftriebsteils mit Druckluft begast. Der zugeführte Gasvolumenstrom wurde über ein Schwebekörperdurchflussmessgerät (11) und ein Manometer (9) bestimmt. Die Begasung diente der Sauerstoffversorgung der

aeroben Mikroorganismen und sorgte für die zur Suspendierung notwendige und definierte Schlaufenströmung mit externer Rückführung in den Reaktor.

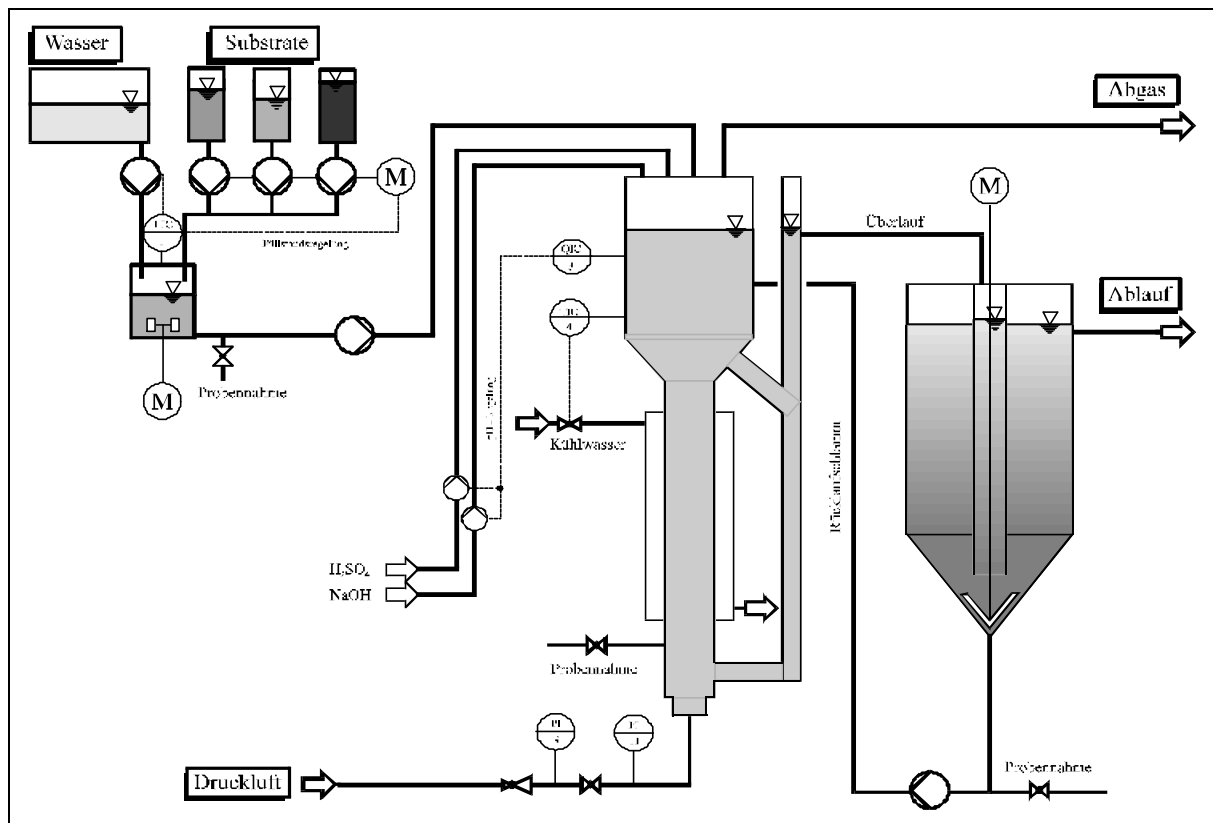


Abb. 2.2: Aufbau des Airlift-Schlaufenreaktor (aus: Schierenbeck 1997)

- 1) Niveausonde zur Steuerung der Abwasserzusammensetzung im Vorratsbehälter, 3) pH-Messsonde, 4) Temperaturmessgerät, 9) Manometer zur Druckregelung des Gasvolumenstroms, 11) Schwebekörperdurchflussmessgerät zur Gasvolumenbestimmung

In der oberen Kammer fand in Analogie zum Suspensions-Membranreaktor die Phasentrennung statt. Über ein Pt 100 (4) wurde die Temperatur im oberen Auftriebsteil erfasst und mittels einer geregelten Temperatureinheit über einen Kühlmantel am Auftriebsteil konstant auf 20°C eingestellt. Ebenso erfolgte auch bei dieser Versuchsanlage die pH-Wert-Steuerung im flüssigkeitsgefüllten Teil der oberen Kammer. Eine Einstabmesssonde (3) maß den pH-Wert und ein PID-Regler hielt ihn durch Zugabe von jeweils 0,2 N Schwefelsäure oder Natronlauge in den Reaktorkopf konstant.

Die externe Rückführung aus der oberen Kammer in den unteren Teil des Auftriebsteils war bis auf die Höhe des Reaktorkopfes verlängert und gegenüber der Umgebung offen. Hier lief der Ablauf blasenfrei durch eine seitliche Öffnung in das nachgeschaltete zylindrische Absetzbecken mit konischem Boden. Im unteren Teil des Absetzbeckens wurde der abgesetzte Schlamm über eine Schlauchpumpe abgezogen und in den oberen Teil des Reaktors

wieder zurück geführt. Der gleichmäßige Schlammabzug wurde durch ein in Intervallen betriebenes Rührwerk unterstützt.

Das synthetische Abwasser stammte aus dem gleichen Vorratsbehälter, der auch den Suspensions-Membranreaktor versorgte und wurde dem Reaktor kontinuierlich durch eine Schlauchpumpe zugeführt. Der Volumenstrom war über die Pumpe frei einstellbar.

Die Probenahme erfolgte hinter dem Vorratsbehälter, seitlich aus dem Auftriebsteil des Reaktors sowie aus dem Ablauf des Sedimentierbeckens. In der Tab. 2.2 sind die Kenn- und Betriebsdaten des Airlift-Schlaufenreaktors angegeben.

Tab. 2.2: Kenn- und Betriebsdaten Airlift-Schlaufenreaktor  
konstante Einstellungen sind unterstrichen

Parameter		Größe
Volumen	Reaktor / Füllvolumen	6 l / 4,5 l
Abmessungen	Auftriebsteil	$d_i = 60 \text{ mm}$ , $h = 800 \text{ mm}$
	Rückführung	$d_i = 22 \text{ mm}$ , $h = 1.200 \text{ mm}$
Begasungseinheit	Edelstahl-Sinterplatte	$d = 45 \text{ mm}$ , $h = 5 \text{ mm}$
	Körnung Sintermaterial	20 $\mu\text{m}$
Betriebsparameter	Betriebsdruck, absolut	1 bar, Umgebungsdruck
	Temperatur	15 - 25°C, <u>20°C</u>
	pH-Wert	2 - 12, <u>7,0</u>
	Gasdurchsatz	0 - 1,0 $\text{Nm}^3/\text{h}$ , <u>0,6 <math>\text{Nm}^3/\text{h}</math></u>
	Gasleerrohrgeschwindigkeit	0 - 9,8 $\text{cm/s}$ , <u>5,9 <math>\text{cm/s}</math></u>
	Durchsatz	beliebig einstellbar
	Mittlere Verweilzeit	beliebig einstellbar
Absetzbecken	Effektives Volumen	3,7 l

### 2.2.3 Rührkolben zur Bakterienkultivierung

Die in Abb. 2.3 gezeigten Rührkolben zur Anzucht von 3-Chlorbenzoesäure bzw. 4-Chlorphenol abbauenden Bakterienkulturen wurden eingesetzt, um jederzeit Abbauprobversuche mit den Modellschadstoffen durchführen zu können, da den Reaktoren nur begrenzt Biomasse entnommen werden konnte. Die Rührkolben wurden mit Bakterien aus dem SMR angeimpft. Da die Milieubedingungen des SMR, insbesondere der hohe Druck, nicht auf einen Rührkolben übertragbar waren, wurden in regelmäßigen Abständen aus dem SMR isolierte Reinkulturen zugegeben, die für den Abbau der 3-Chlorbenzoesäure besonders entscheidend waren.



Abb. 2.3: Rührkolben zur Kultivierung von 3-CBA- bzw. 4-CP-abbauenden Bakterien

Die Rührkolben wurden über Glasfritten mit befeuchteter Druckluft begast. Das Abgas wurde der Abluft des Abzugs zugeführt. Das Füllvolumen betrug 1,5 l. Der pH-Wert wurde mit 1,0 N NaOH auf 7,2 eingestellt, da der pH-Wert durch die Chlorid-Freisetzung abfiel. Die Versorgung mit den Modellschadstoffen erfolgte batchweise. Täglich wurden bis zu 6 mM 3-CBA bzw. 2 mM 4-CP zugefügt. Der Abbau wurde täglich mittels UV-Spektroskopie und der Chlorid-Gehalt über Schnelltests (Merck) kontrolliert. Einmal wöchentlich wurden zwischen 0,5 und 1,0 l der Kulturflüssigkeit abgezogen, die Biomasse über Zentrifugation abgetrennt und dem Rührkolben wieder zugeetzt. Die Gefäße wurden mit frischer Nährsalzlösung wieder auf 1,5 l aufgefüllt.

Die Bakterienkulturen wurden den Rührkolben für die Abbaueversuche sowohl nach einem guten Schadstoffabbau als auch nach Störungen entnommen.

#### 2.2.4 Fermenter

Für zwei Abbaueversuche in Zusammenarbeit mit dem Teilvorhaben A5 kam das Laborfermentersystem BIOSTAT<sup>®</sup> MD der Fa. B. Braun Diessel Biotech GmbH zum Einsatz.



Abb. 2.4: Laborfermenter BIOSTAT<sup>®</sup> MD der Fa. B. Braun Diessel Biotech GmbH

Das in Abb. 2.4 gezeigte System bestand aus:

- dem Kulturgefäß M5 (Doppelmantel mit 5 l Füllvolumen) aus Borosilicatglas mit Pt 100-Temperaturfühler, Begasungsrohr, Zu- und Abluftfilter, Impfstutzen und Ernterohr, 4-Blattscheibenrührer, die in einer Edelstahl-Deckplatte montiert sind,
- dem digitalen Mess- und Regelsystem DCU,
- der Versorgungseinheit mit Belüftungs- und Temperiersystem sowie der pH-Wertregulierung.

### 2.2.5 Blasensäule

In einer Blasensäule im Labormaßstab wurden Batch-Versuche zum Einfluss der Sauerstoff-Konzentration auf den Abbau von 3-Chlorbenzoesäure durchgeführt.

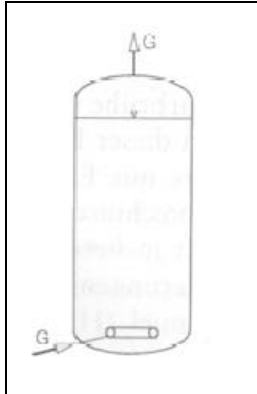


Abb. 2.5: Skizze einer Blasensäule

Eine in Abb. 2.5 skizzierte Blasensäule aus Borosilicatglas mit einem Füllvolumen von 3 Litern wurde von unten mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff begast, um zwei verschiedene Sauerstoff-Konzentrationen (8 und 40 mg/l) einzustellen. Die Blasensäule wurde mit der Mischkultur aus dem SMR befüllt. Die Untersuchungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit dem Teilvorhaben A1.

## 2.3 Biochemische und mikrobiologische Methoden zur Beschreibung der Biozönose

Zur Beschreibung der Lebensgemeinschaften der Mikroorganismen in den Versuchsreaktoren wurden routinemäßig die nicht differenzierenden Biomasseparameter Protein- und Trockensubstanz-Gehalt bestimmt. Beide Parameter fungierten als Bezugsparameter bei der Ermittlung der Gesamtzellzahlen (GZZ) und Lebendzellzahlen (KBE) sowie der Unterscheidung von aktiven und inaktiven Bakterienzellen. Aus der Ermittlung der KBE resultierten die Anreicherungskulturen, die die Grundlage für die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Mikroflora und für die Charakterisierung der 3-CBA-abbauenden Bakterien bildeten. Aus den Anreicherungskulturen wurden die Reinkulturen isoliert. Die Bakterienisolate wurden zell- und kolonimorphologisch beschrieben und ihr Substratverwertungsspektrum ermittelt. Anhand der stoffwechselphysiologischen Merkmale wurde ein Großteil der aus beiden Versuchsreaktoren isolierten Bakterien identifiziert.

In der Abb. 2.6 sind die Arbeitsabläufe zur biochemischen und mikrobiologischen Beschreibung der Biozönose dargestellt.

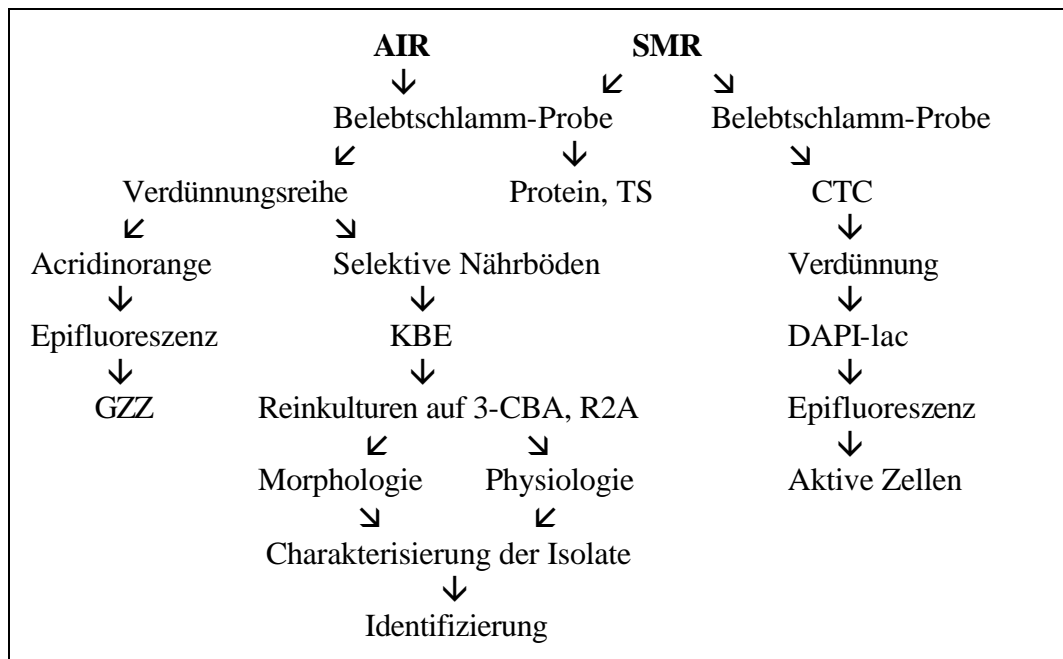


Abb. 2.6: Übersicht über die Arbeitsabläufe zur biochemischen und mikrobiologischen Beschreibung der Biozönose

### 2.3.1 Proteinbestimmung nach Pierce

Für die Bestimmung des Protein-Gehaltes wurde der "Pierce BCA Protein Assay Kit" verwendet (Pierce-Testbeschreibung 1997, Smith et al. 1985). Der Test basiert auf der bekannten Biuret-Reaktion, in der Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$  im alkalischen Milieu reagieren und  $\text{Cu}^{1+}$  produzieren. Ein Kupfer-Ion  $\text{Cu}^{1+}$  bildet mit zwei Molekülen Bischinolincarbonsäure (BCA) einen purpurnen Farbkomplex, dessen Extinktion bei 562 nm photometrisch gemessen wurde.

Zur quantitativen Bestimmung des Bakterienproteins wurden die Bakterien zunächst aufgeschlossen. Die Proben (5 ml) wurden bei 6.000 Upm für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge (Sorvall Superspeed RC-5 mit SM-24-Rotor) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml sterilem Leitungswasser resuspendiert und mit 1 ml 1 N NaOH für 10 Minuten aufgekocht. Bei auftretenden Ausflockungen wurden die Proben durch eine kurze Ultraschallbehandlung (10 Sekunden mit 30 Watt) homogenisiert. 0,1 ml dieser Probe wurde mit 2 ml des Pierce-Arbeitsreagenz versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 10-minütiger Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 562 nm im Spektralphotometer (Shimadzu UV 160) gemessen. Die Ergebnisse wurden in mg/l angegeben.

Die Eichreihe wurde mit Rinderserumalbumin (2 mg/ml, Pierce), gelöst in sterilem Leitungswasser, im Konzentrationsbereich von 0,0 bis 1,0 g/l Protein erstellt. Das Pierce-Arbeitsreagenz bestand aus 50 Teilen BCA Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat,

BCA (Bischinolincarbonsäure) und Natriumtartrat in 0,2 N NaOH) und 1 Teil BCA Reagenz B (4 % Kupfersulfat-Lösung).

### 2.3.2 Bestimmung des Trockensubstanz-Gehalts

Der Trockensubstanz-Gehalt der Biomasse in den Versuchsreaktoren wurde routinemäßig gemäß der DIN 38 409 Teil 1 durch ein Gerät zur Gewichtsbestimmung mit kombinierter Trocknungseinheit (Sartorius Moisture Analyser MA50) ermittelt. Dieses Gerät trocknet nach der Filtration der Probe (50 ml) die eingelegten Schwarzband-Papierfilter und wiegt sie aus. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 mg TS. Die Ergebnisse wurden in g/l angegeben.

Kleinere Volumina der Rührkolben (5 ml) wurden über Membranfilter mit 0,2 µm Porenweite (Nucleopore) mittels einer Unterdruckpumpe abfiltriert, im Trockenschrank bei 105°C getrocknet und bis zur Gewichtskonstanz im Exsikkator gelagert. Die getrockneten Filter wurden mit einer Feinwaage ausgewogen.

### 2.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl (GZZ) wurde über ein direktes Zellzählverfahren mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie ermittelt. Dabei wurde die Eigenschaft von Fluoreszenzfarbstoffen ausgenutzt, nach Anregung mit kurzwelliger Strahlung langwelliges (sichtbares) Licht zu emittieren. Die fluoreszierenden Bakterien können so über ein Raster mit definierter Größe ausgezählt werden. Als Farbstoffe kamen Acridinorange (Merck) und DAPI-lac (4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid-dilactat, Polyscience) zum Einsatz.

In den ersten Untersuchungen wurde der relativ unspezifische Farbstoff Acridinorange eingesetzt, der an Nucleinsäuren bindet. Acridinorange fluoresziert rötlich, wenn es sich an Einzelstränge anlagert und grünlich, wenn es an Doppelsträngen bindet (Daley 1979, Molecular Probes 1996). Laut Meyer-Reil (1987) und Porter & Feig (1980) lagert sich Acridinorange jedoch auch an Partikel an.

Für die Bestimmung der GZZ wurde die Biomasse den Reaktoren direkt über ein Ablassventil entnommen und anschließend kräftig gerührt. 10 ml wurden mit 90 ml Natriumtripolyphosphat (5 mg/l, pH 5,9) versetzt und 3 Minuten gerührt. Von dieser Suspension wurden 10 ml in Sarstedtröhrchen dreimal 20 Sekunden mit 30 Watt beschallt (Branson Sonifier B 15 mit Mikrospritze), um die Flocken zu dispergieren (Banks & Walker 1977, Bleich 1993, Kutzner 1993). 1 ml der beschallten Proben wurde in eine Verdünnungsreihe mit sterilem Leitungswasser eingesetzt. Je 1 ml der Verdünnungsstufen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  (SMR) sowie  $10^{-4}$  bis

$10^{-6}$  (AIR) wurden in dem Glaszylinder einer Filtrationsapparatur mit 1 ml Acridinorange-Lösung (0,1 g/l in 6,6 mM Phosphatpuffer, pH 6,7) versetzt. Der Ansatz wurde 3 Minuten im Glaszylinder inkubiert und über schwarze Nucleopore-Filter der Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert (Hobbie, Daley & Jasper 1976).

Der luftgetrocknete Filter kann in einer Petrischale auf Filterpapier mehrere Wochen unter Lichtabschluss aufbewahrt werden. Die Filter wurden geviertelt auf einem Objektträger in Cargille's Immersionsöl Typ A (Polyscience) eingebettet. Mit Hilfe von einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Zeiss, Typ Standard 14 mit Fluoreszenz-Auflichtkondensator IV FI sowie der Filterkombination: Anregungsfilter BP 455-490, Farbteiler FT 510 und Sperrfilter LP 520-560) wurden die fluoreszierenden Bakterien bei 1000-facher Vergrößerung über ein Raster mit definierter Größe ausgezählt. Als Kriterien für die Identifizierung von Bakterien gelten definierte Bakteriengestalt (Stäbchen, Kokke, Spirille, Vibrio), klarer Umriss und deutliche orangefarbene Fluoreszenz (Meyer-Reil 1987).

Die Bakterienzahl (N) pro ml Probe errechnet sich nach folgender Formel:

$$N = \frac{n \cdot D \cdot F}{V}$$

n = mittlere Bakterienzahl pro Rasterfläche im Durchschnitt aus 2 Verdünnungsstufen

D = Verdünnungsfaktor

F = Mikroskopfaktor (effektive Filterfläche = 346.360.000  $\mu\text{m}^2$  (10,5 mm Radius) dividiert durch Rasterfläche = 10.400  $\mu\text{m}^2$  bei 1.000-facher Vergrößerung

F = 34.636)

V = Volumen der filtrierten Probenmenge (ml)

### 2.3.4 Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Zellen

Da am Abbau von Schadstoffen nur die aktiven Bakterien beteiligt sind, sollte neben routinemäßig gemessenen Biomasseparametern wie dem Trockensubstanz-Gehalt auch ermittelt werden, welcher Anteil der Biomasse im SMR wirklich aktiv ist. Die Untersuchungen hierzu wurden während des 4-Chlorphenol-Betriebs des SMR durchgeführt.

Zur Bestimmung der stoffwechselaktiven Mikroorganismen im SMR wurde der Redoxfarbstoff 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC, Polyscience) eingesetzt. Dieses Tetrazoliumsalz wurde durch die Dehydrogenasen von stoffwechselaktiven Bakterien zu einem wasserunlöslichen Formazankristall reduziert, der nach Anregung rot fluoreszierend in der Bakterienzelle mittels Epifluoreszenzmikroskopie nachweisbar ist. Damit bietet CTC die Möglichkeit, auf zellulärer Ebene zwischen aktiven und inaktiven Zellen zu unterscheiden (Rodriguez et al. 1992, Schaule et al. 1993, Frølund et al. 1995, Yu et al. 1995).



Durch eine Gegenfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom 4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid-dilactat (DAPI-lac, Polyscience) werden alle Bakterien einer Belebtschlamm-Probe blau angefärbt (Coleman 1980, Porter & Feig 1980). Somit können die Gesamtzellzahl und die Anzahl aktiver Bakterien im gleichen Gesichtsfeld durch die Wahl geeigneter Filterkombinationen im Epifluoreszenzmikroskop ermittelt werden.

Da die Stoffwechselaktivität der Bakterien nach der Probenahme sehr schnell abnimmt (Griebe et al. 1996, Ohle 1997), wurden die SMR- oder Rührkolben-Proben (1 ml) sofort nach der Entnahme mit 1,2 mg kristallinem CTC (CTC-Endkonzentration 4 mM) 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 58 µl Formaldehyd (Endkonzentration 2 %) gestoppt. Die Probe wurde mit 3,94 ml sterilfiltriertem Leitungswasser verdünnt und mit Ultraschall im Eisbad 3 mal 10 Sekunden mit 30 Watt homogenisiert. Anschließend erfolgte eine weitere Verdünnung mit sterilem Leitungswasser.

Die Proben (1 ml) der Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  wurden mit 2 ml DAPI-lac-Lösung (10 mg/l in 0,1 M Phosphatpuffer) gegengefärbt und nach 30 Minuten über schwarze Nucleopore-Filter (Polycarbonat, 0,2 µm Porengröße) im Filtrationsgestell abgesogen. Der getrocknete Filter wurde in Cargill's Öl Typ A eingebettet und im Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss) bei 1.000-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Bestimmung der CTC-positiven Zellen (rot fluoreszierend) erfolgte mit dem Anregungsfilter BP 450-490, dem Farbteiler FT 510 und dem Sperrfilter LP 520 in Abweichung zu Griebe et al. (1996), die den Filter LP 590 einsetzten. Auf Grund des schnellen Fluoreszenzverlustes der CTC-Färbung wurde diese zuerst ausgezählt. Die Gesamtzellzahl (blau fluoreszierend) wurde mittels Anregungsfilter BP 365, Farbteiler FT 395 und Sperrfilter LP 420 bestimmt. Zur Berechnung der Zellzahl wurde die in Kap. 2.3.3 verwendete Formel herangezogen. Der Mikroskopfaktor betrug  $F = 23.260$ .

### **2.3.5 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) über das Spatelplattenverfahren mit verschiedenen Nährböden ermittelt. Die Biomasse wurde den Reaktoren über ein Ablassventil entnommen und anschließend kräftig gerührt. 10 ml wurden mit 90 ml Natriumtripolyphosphat (5 mg/l, pH 5,9) versetzt und 3 Minuten gerührt. Von dieser Suspension wurden 10 ml in Sarstedtröhrchen dreimal 20 Sekunden mit 30 Watt beschallt (Branson Sonifier B 15 mit Mikrospritze), um die Flocken zu dispergieren. 1 ml der beschallten Proben wurde in eine Verdünnungsreihe mit sterilem Leitungswasser eingesetzt. 0,1 ml Probe aus der Verdünnungsreihe wurde auf den Nährböden ausgespatelt und 14 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nährböden kamen der R2A-Agar nach Reasoner & Geldreich (1985), der DEV-(N)-Agar und selektive Nährböden mit verschiedenen Aromaten zum Einsatz. Die Rezepte der eingesetzten Nährböden sind im Anhang A.1 beschrieben.

Die selektiven Nährböden wurden mit den Kohlenstoffquellen

- 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA: 3 mM) sowie
- Benzoesäure (BA: 3 mM),
- 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA: 3 mM),
- Catechol (Cat: 1; 0,5 mM) und
- Protocatechuat (PCat: 1; 0,5 mM)

als mögliche Metaboliten zur Abschätzung der Nährstoffansprüche der Mikroflora angesetzt.

Als Grundlage diente das im Reaktor eingesetzte chlorfreie Mineralsalz-Medium (in Anlehnung an die Medien DSMZ 457. und DSMZ 465.) aus:

- 350 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 100 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 100 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 20 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 5 mg  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
- 1 mg  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 1 l Aqua bidest., pH 7,0

Die Kohlenstoffquellen wurden dem autoklavierten Mineralsalz-Medium sterilfiltriert zugegeben. Die Agarplatten mit R2A-Medium und 3-CBA dienen zur Bestimmung der KBE und zugleich als Anreicherungsplatten für die Anlage von Reinkulturen.

### **2.3.6 Zell- und koloniemorphologische Beschreibung der Bakterienisolate**

Sämtliche auf R2A- und 3-CBA-Agar gewachsenen Kolonien einer Verdünnungsstufe der Anreicherungskulturen wurden auf die entsprechenden Nährböden überimpft. Dadurch wurde eine ungezielte Entnahme der Stämme sichergestellt. Nach Kölbel-Boelke (1987), Bianchi & Bianchi (1982) und Kämpfer et al. (1991) sind 40 bis 60 Stämme pro Habitat zur Charakterisierung einer Biozönose ausreichend.

Alle Isolate wurden durch mehrfachen Verdünnungsausstrich gereinigt und kolonie- und zellmorphologisch beschrieben. Aus dem SMR konnten 90 (60 auf R2A, 30 auf 3-CBA) und aus dem AIR 83 (57 auf R2A, 26 auf 3-CBA) Reinkulturen isoliert werden. Zur Stammhaltung der Reinkulturen wurden die Isolate in das MicroBank™ System der Fa. PROLAB Diagnostics, Neston, UK, übertragen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Als Merkmale der Koloniemorphologie wurden die Farbe, die Form, der Rand, die Höhe, die Optik und die Oberfläche der Kolonien auf R2A-Agar erfasst. Als Merkmale der Zellmorpho-

logie wurden die Zellform (Stäbchen, Kokke, Spirille u.a.), Beweglichkeit, Sporenbildung und Gram-Färbung mikroskopisch untersucht.

### 2.3.7 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Bakterienisolate

Die 173 Isolate der beiden Vergleichsreaktoren wurden nach der kolonie- und zellmorphologischen Charakterisierung einem breiten Spektrum von 77 physiologisch-biochemischen Tests in den Vertiefungen von 96er Mikrotiterplatten unterzogen. Die Untersuchungen wurden in Anlehnung an Dott & Thofern (1980), Kölbel-Boelke (1987) und Kämpfer et al. (1988, 1989, 1991, 1996) durchgeführt und durch spezielle Nährböden zur Untersuchung des Aromatenabbaus ergänzt, um die am ursprünglichen Standort ablaufenden Prozesse durch die Tests möglichst genau abzubilden.

Untersucht wurde die Fähigkeit der einzelnen Isolate, bestimmte Kohlen- und Stickstoffquellen zu verwerten und bestimmte Enzyme zu bilden (siehe Anhang A.2). Der Nachweis dieser StoffwechsellLeistungen erfolgte zumeist über Trübungs- oder Farbänderungen eines Indikators oder durch Abbauhöfe und nur in wenigen Fällen über ein sichtbares Wachstum der Isolate auf einem Nährmedium.

Mittels Wachstumstests auf Festmedium wurden die 173 Isolate auf ihr metabolisches Potential untersucht, die Aromaten zu verwerten. Die eingesetzten Konzentrationen (Mikrotiter und Spatelplatten) sind der folgenden Aufstellung zu entnehmen:

- 3-Chlorbenzoesäure: 1; 3; 5 mM
- Benzoesäure: 1; 3 mM
- 4-Hydroxybenzoesäure: 1; 3 mM
- Catechol: 0,5; 1; 2 mM und
- Protocatechuat: 0,5; 1; 2 mM.

Einige der Reinkulturen wurden in 200 ml-Schüttelkolben mit 3-CBA und 4-CP sowie R2A-Flüssigmedium als Basis für weitergehende Untersuchungen (Aromatenspaltung) angezüchtet. Das R2A-Medium wurde schrittweise gegen höhere Chloraromatenkonzentrationen und Phosphatpuffer ausgetauscht.

Die Anzahl der positiven Reaktionen in den Mikrotiterplatten und auf den Festmedien wurde für die Berechnung der *in vitro*-Aktivitäten nach Dott & Trampisch (1983) herangezogen. Die *in vitro*-Aktivitäten wurden sowohl für die einzelnen Isolate nach der unten angegebenen Formel als auch für die Biozönosen der beiden Reaktoren berechnet. Dazu wurde die einfache Mehrheit der drei Parallelansätze von 68 physiologischen Tests (außer NIT-K, NFR,

Temperatur, Salztoleranz, KCN, PENC) gewertet. Die physiologische Gesamtaktivität eines Bakterienstammes ist:

$$G(I) \% = \frac{100 \cdot P_M(I)}{P_M(I) + N_M(I)} \text{ mit}$$

$G(I) \%$  = prozentuale Gesamtaktivität des Isolates (I),

$P_M(I)$  = Anzahl positiver Merkmale des Isolates (I) und

$N_M(I)$  = Anzahl negativer Merkmale des Isolates (I)

### **2.3.8 Taxonomie der Bakterienisolate**

Die physiologischen Merkmale Katalase, Oxidase, Oxidativer/fermentativer Stoffwechsel und Gasbildung aus Glucose gingen neben den Merkmalen der Zellmorphologie (Stäbchen, Kokke, Spirille u.a.), Beweglichkeit, Sporenbildung und Gram-Färbung als klassische Tests der Bakterienidentifizierung in die Primary Tests nach Kappesser (1990) ein, um eine Vorsortierung der Bakterienisolate in 20 taxonomische Gruppen zu erreichen.

Zur genaueren Identifizierung der Isolate wurden die aus den Mikrotiteransätzen gewonnenen Daten nach den Prinzipien der numerischen Taxonomie (Dott & Trampisch 1981) und mit Bestimmungsschlüsseln oder -tabellen für Mikroorganismen (z.B. Krieg & Holt 1984, Holmes et al. 1986) ausgewertet. 23 weitere Merkmale zur Physiologie wurden zudem an einer Auswahl von 56 Stämmen mit Hilfe eines kommerziellen Testsystems (API 20 NE der Firma Bio Merieux) getestet und ausgewertet. Zur Absicherung der Identifizierung eines sehr leistungsfähigen Stammes wurde eine Sequenzierung der 16S-rRNA von der Fa. GAG Genom Analytik GmbH im UFT Bremen durchgeführt. Die Aufbereitung führten freundlicherweise Mitglieder der AG Hildebrandt durch, die Arbeitsschritte sind im Anhang A.3 aufgeführt.

## **2.4 Chemisch-analytische Methoden zur Beschreibung des Chloraromatenabbaus**

Der mikrobielle Abbau der eingesetzten Chloraromaten 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA) und 4-Chlorphenol (4-CP) wurde in gemeinsamen Untersuchungen mit den Teilprojekten A1 und A5 über den Gehalt an gelösten organischen Kohlenwasserstoffen (DOC) erfasst. In allen anderen Versuchen wurden die Modellschadstoffe direkt mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und die Freisetzung von Chlorid mittels Ionenchromatographie bestimmt. Der Nachweis von Metaboliten erfolgte über die UV-Spektroskopie und über die HPLC. Zur Identifizierung von Metaboliten kam die Kopplung von HPLC mit der Massenspektroskopie (HPLC-MS) zum Einsatz.

### 2.4.1 Gehalt gelöster organischer Kohlenstoffe

Der Gehalt an gelösten organischen Kohlenstoffen (DOC = dissolved organic carbon) in SMR und Fermenter wurde im Institut für Umweltverfahrenstechnik routinemäßig nach DIN 38 409 Teil 3 mit einem DOC-Messgerät (Maihak, Typ Tokor 2) bestimmt. In den DOC gingen die 3-Chlorbenzoesäure, die beim Abbau entstehenden Metabolite, Natriumacetat als zweite Kohlenstoffquelle in den entsprechenden Versuchsreihen, die extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Anteile aus der lysierten Biomasse ein.

Ein Probenvolumen von 50 ml wurde mittels Membranfilter (0,45 µm) gefiltert und die klare Phase anschließend mit 1 N HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 2 bis 3 angesäuert. Die Probenlagerung erfolgte maximal 5 Tage bei 5°C, ansonsten bei -20°C.

### 2.4.2 UV-Spektroskopie

Die Absorptionsspektroskopie wird zur Aufklärung der Molekülstruktur von Substanzen eingesetzt (Hesse et al. 1984). Durch die Absorption ultravioletten (UV) und visuellen Lichts (VIS) werden einzelne Elektronen in einen höheren Energiezustand überführt. Voraussetzung ist, dass das Molekül Elektronen besitzt, die durch die betreffende Wellenlänge angeregt werden können. UV-Spektren geben Hinweise auf das Vorhandensein ungesättigter Gruppen, konjugierter Systeme und aromatischer Ringe in den Molekülen der untersuchten Substanz (Christen 1978). UV-Spektren sind daher für die eingesetzten aromatische Kohlenwasserstoffe sehr charakteristisch und damit für eine Identifizierung von Metaboliten über Referenzspektren geeignet.

Eingesetzt wurde ein Shimadzu UV/VIS-Spektralphotometer (UV 160), mit dem routinemäßig der Chloraromatenabbau in den Rührkolben kontrolliert, die Dauer des Aromatenabbaus in den Versuchen ermittelt und das Auftreten von Metaboliten nachgewiesen wurde.

Sämtliche Proben aus den Reaktoren und den Rührkolben wurden zur Abtrennung der Bakterien bei 6.000 Upm in einer Zentrifuge (Sorvall Superspeed RC-5 mit SM 24 Rotor) 10 Minuten zentrifugiert. Die Absorptionsspektren der Überstände wurden im Spektralphotometer in Quarzküvetten gegen Mineralsalz-Medium aufgenommen.

### 2.4.3 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die quantitative Bestimmung der in den Abbauversuchen eingesetzten Substanzen sowie der qualitative Nachweis von auftretenden Metaboliten erfolgte über die Hochleistungs-Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit anschließender UV-Detektion.

In der HPLC wird die Probe unter einem Druck von ca. 240 bar durch eine Trennsäule gepumpt. Die Verzögerung (= Retention) der einzelnen Stoffe erfolgt durch die unterschiedlich lange Adsorption an die stationäre Phase (Unger 1989). An einem nachfolgenden Detektor werden die nacheinander eintreffenden Substanzen registriert und anhand der für einen Stoff charakteristischen Retentionszeit bestimmt. Die Retentionszeit und die Kalibrierung wird mit Standardlösungen der zu ermittelnden Substanz zuvor ermittelt. Über die Integration der erhaltenden Flächen erfolgt die quantitative Bestimmung der gesuchten Substanz. In einer Probe können so bekannte Substanzen identifiziert und quantifiziert werden sowie auftretende Metabolite nachgewiesen werden.

Zur Abtrennung der Bakterienmasse wurden die Proben nach den Abbaubersuchen bei 6.000 Upm für 10 Minuten in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Die Proben wurden nach der UV-Spektroskopie zur Sicherheit nochmals bei 12.000 Upm zentrifugiert und 2 ml der Überstände in Probenfläschchen für den Autosampler des HPLC-Gerätes abgefüllt.

Die 3-Chlorbenzoesäure-Konzentration wurde über den Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographen (Hewlett Packard, Series II 1090 Liquid Chromatograph) in Verbindung mit einem Dioden Array Detector DAD, Vorsäule (Macherey-Nagel, Typ ET 125/4 Nucleosil 100-5C18AB) und Trennsäule (Macherey-Nagel, Typ KS 11/4 Nucleosil 100-5C18AB) ermittelt. Der Dioden Array Detector ermöglicht neben der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge auch gleichzeitig die Erfassung des gesamten UV-Spektrums (Unger 1989). Die Fließgeschwindigkeit in der Säule betrug 1 ml/min (isokratische Trennbedingung), die Temperatur 30°C, das Injektionsvolumen 10 µl, die Detektionswellenlänge 231 nm und die Referenzwellenlänge 450 nm mit je 10 nm Bandbreite. Die mobile Phase bestand aus 45 % Acetonitril und 55 % 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 3,5 (eingestellt mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Zur Messung von 4-Chlorphenol wurde eine Säule des Typs HP ODS Hypersil (799160D-554, 5 µm, 100 x 4,6 mm) eingesetzt. Die mobile Phase bestand aus 30 % Methanol und 70 % 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 2,5 (eingestellt mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Temperatur 40°C, das Injektionsvolumen 5 µl, die Detektionswellenlänge 225 nm und die Referenzwellenlänge 450 nm mit je 10 nm Bandbreite.

#### **2.4.4 Kopplung HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS)**

Die Identifizierung der aufgefundenen Metabolite sollte auf Grund der niedrigen Nachweisgrenze für kleine Substanzmengen (Hesse et al. 1984) durch die Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) erfolgen. Die Massenspektrometrie wird zur Identifizierung und Strukturaufklärung von organischen Verbindungen angewandt (Analytikum 1974). Mit einem Massenspektrometer können auch Moleküle detektiert werden, die über

kein Chromophor verfügen und sich somit der Detektion über einen UV/VIS- oder Dioden Array Detektor entziehen. Durch Aufnahme von Massenspektren mit Hilfe einer HPLC-MS-Kopplung können einzelne Metabolitenpeaks nach der HPLC-Trennung analysiert werden.

Dazu wird das Eluat der HPLC-Trennung bei der ESI-Technik (Electrospray Ionization) durch eine Kapillare vom HPLC in eine Zerstäuberkapillare geleitet. Die Ionen liegen schon im Eluentenstrom vor, d.h. es sind präformierte Ionen, die durch die Zerstäuberkapillare nur noch verdampft werden müssen. Durch das Anlegen einer Hochspannung von ca. 4 kVolt zwischen der Kapillare und dem Kollektorschild werden die hochgeladenen Tröpfchen aus dem Spray Richtung Kollektor gezogen. Mittels eines 300°C warmen N<sub>2</sub>-Stroms werden die neutralen Lösungsmittelmoleküle verdampft (Klamka 1995) und im unter Hochvakuum stehenden Massenspektrometer mittels Hochvakuum pumpen abgezogen (Hesse et al. 1984). In Folge der Ladungsabstoßung der immer dichter liegenden Ionen kommt es zum Austritt der Ionen aus dem Lösungsmitteltropfen. Die Molekülionen treten bei Atmosphärendruck in die Gasphase über (API, Atmospheric Pressure Ionization). An der ersten Lochblende, die zur Fokussierung der Ionen dient, werden die Molekülionen durch eine Skimmer collision induced decomposition (sCID) mit einer Spannung von ca. 70 Volt zur Fragmentierung angeregt. Im Analysator (Quadrupol) werden die Ionen in einem elektromagnetischen Feld proportional zu ihrer Masse aufgetrennt (Mortimer 1987). Der Zerfall der Moleküle ergibt ein typisches Fragmentierungsmuster.

Zur Identifizierung der aufgefundenen Metabolite wurde ein Hewlett Packard HPLC-Massenspektrometer der HP Series 1100 MSD mit integriertem Dioden Array Detector (DAD G 1315 A), Autosampler (ALS G 1313 A), Säulentermostat (Col Comp G 1316 A), Hochdruckgradientenpumpe (Bin Pump G 1312 A) und Entgasungseinheit (Degasser G 1322 A) eingesetzt. Als Fließmittel diente eine Mischung aus 30 % Methanol + 70 % H<sub>2</sub>O + 2 mM NH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>COOH, die Fließgeschwindigkeit betrug zwischen 0,4 und 1,0 ml/min und das Injektionsvolumen 10 und 20 µl. Die Detektionswellenlängen des DAD G 1315 A lagen bei 210, 231, 260, 275 und 375 nm. Das Massenspektrometer nutzte die API-ES (Atmospheric Pressure Electrospray Ionization) zur Ionen-Erzeugung und die negative Polarität (API-ES Negativ Mode) bei einer Ionisierungsspannung von 4.000 V. Die Temperatur des Trocknungsgases lag bei 300°C, der Gasfluss bei 10 l/min und der Verneblerdruck (nebulizer pressure) bei 20 psi. Die Fragmentorspannung betrug 70 Volt und der eingestellte Massenbereich lag zwischen 50 und 300 amu (atom mass unit, bezogen auf <sup>16</sup>O).

### 2.4.5 Ionenchromatographie

Die Eliminierung des Chlorsubstituenten aus 3-CBA und 4-CP während der Abbauprobversuche wurde über die freigesetzten Chlorid-Ionen mittels Ionenchromatographie (IC) verfolgt. Aus dem Probensammler des Ionenchromatographen wird über eine Pumpe 1 ml Probenvolumen unter Druck durch eine Trennsäule gepumpt. Die gelösten Ionen werden in einer Säule auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen mit der stationären Phase voneinander getrennt (Unger 1989). An einem nachfolgenden Leitfähigkeitsdetektor werden die nacheinander eintreffenden Ionen registriert und anhand charakteristischer Retentionszeiten identifiziert. Die Retentionszeit und die Kalibrierung werden zuvor mit Standardlösungen der zu ermittelnden Substanz bestimmt. Über die Integration der erhaltenen Flächen erfolgt die quantitative Bestimmung der gesuchten Ionen.

Zum Einsatz kam ein Ionenchromatograph (Metrohm), bestehend aus dem IC Separation Center 733, dem IC Detector 732, dem Suppressor-Modul MSM 730, dem Autosammler 750 und dem Auswertesystem IC-Metrodata 714. Verwendet wurde die IC-Anionensäule Metrosep Anion Dual 2 (6.1006.100, 75 x 4,6 mm, Number: W0053, Part Size: 6,0 µm) aus Polymethacrylat mit quaternären Ammonium-Gruppen und einer IC-Vorsäulenkartusche (PRP-1 6.1005.050). Als Anionen-Eluent wurde eine Mischung (1:1) aus 2 mM NaHCO<sub>3</sub> und 1,3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eingesetzt. 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diente als Regenerationslösung für das dreiteilige Suppressor-Modul und 0,1 M HNO<sub>3</sub> zur Regeneration der Säule. Die Fließgeschwindigkeit betrug 800 µl/min, die Temperatur 20°C und der Druck 38 bar (Metrohm 1995).

Analysiert wurde ein Aliquot der Proben, die zuvor in der HPLC analysiert wurden. Somit war außer einer eventuellen Verdünnung mit Aqua bidest. keine weitere Probenaufarbeitung notwendig.

## 2.5 Versuche zur Beschreibung des Chloraromatenabbaus

Zur Beschreibung der im Reaktor ablaufenden biochemischen Umwandlungsprozesse während des mikrobiellen Abbaus der chlorierten Aromaten wurden Versuche zum Einfluss der Sauerstoff-Konzentration, zum Mechanismus der Aromatenringspaltung, zum Auftreten von Metaboliten, die den Abbau beeinträchtigen können, zur Ermittlung des Zeitpunktes der Dechlorierung und zur Abbaukinetik der eingesetzten Schadstoffe durchgeführt. In der Tab. 2.3 ist eine Übersicht über das Untersuchungsprogramm zur Beschreibung des Chloraromatenabbaus in den verschiedenen Versuchsanlagen dargestellt.



Tab. 2.3: Übersicht über das Untersuchungsprogramm zur Beschreibung des Chloraromatenabbaus in den verschiedenen Versuchsanlagen

Untersuchungsparameter	Schadstoff	Ursprung der Proben
<b>O<sub>2</sub>-Einfluss</b>	3-CBA	SMR, Blasensäule
<b>Aromatenringsspaltung</b>	3-CBA 4-CP Catechol Protocatechuat	SMR, AIR, Rührkolben, Reinkultur SMR, AIR, Rührkolben, Reinkultur SMR, AIR, Rührkolben, Reinkultur SMR, AIR, Rührkolben, Reinkultur
<b>Metabolitennachweis</b> im Betrieb	3-CBA 4-CP	SMR, AIR, Rührkolben, Reinkultur SMR, Rührkolben, Reinkultur
in Abbauversuchen	3-CBA 4-CP	Rührkolben SMR, Rührkolben
in Vorversuchen	3-CBA	SMR
<b>Abbaukinetik</b> in Abbauversuchen		
Röhrchenansatz	3-CBA 4-CP	Rührkolben, Fermenter SMR, Rührkolben
Schüttelkolbenansatz	4-CP	SMR
Chlorid-Freisetzung	3-CBA 4-CP	Rührkolben SMR, Rührkolben
Ertragskoeffizient	4-CP	Rührkolben

### 2.5.1 Einfluss der Sauerstoff-Konzentration

Beim Betrieb des Suspensions-Membranreaktors stellten sich auf Grund des hohen Betriebsdruckes von 0,6 MPa (= 6 bar) im Reaktor und der damit verbundenen erhöhten Gaslöslichkeit Sauerstoff-Konzentrationen von ca. 40 mg/l ein. Hohe Sauerstoff-Konzentrationen sollen laut Bräutigam & Sekoulov (1986) toxische Auswirkungen auf die den biologischen Umsetzungsprozess bewirkenden Bakterien haben.

Um den Einfluss der O<sub>2</sub>-Konzentration festzustellen, wurden in einer Blasensäule im Labormaßstab (3 l) mit der Mischkultur aus dem SMR Batch-Versuche zum Abbau von 3-CBA bei zwei verschiedenen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (8 und 40 mg/l) durchgeführt, die durch die Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff eingestellt wurden. Die Kultur aus dem SMR musste zuvor mit eingefrorener Biomasse versetzt werden, um einen TS-Gehalt von 1,0 bis 1,2 g/l zu erreichen. Vor dem ersten Versuch wurden der Blasensäule drei Tage lang 1,6 mM 3-CBA batchweise bei einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 8 mg/l zugeführt.

Zu Versuchsbeginn wurden in die Blasensäule 4 bzw. 8 ml der 0,6 M 3-CBA-Stammlösung gegeben und der 3-CBA-Abbau über die Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) verfolgt. Alle 15 Minuten wurden 10 ml Probe entnommen und 1:4 verdünnt. Die Grundbelastung an DOC aus niedermolekularen Metaboliten, extrazellulären polymeren

Substanzen (EPS) und Lyseprodukten schwankte zwischen 50 und 75 mg DOC/l. Sie wurde vor Substratzugabe gemessen und vom Ausgangswert abgezogen. Die zugeführte 3-CBA (125 mg/l) entspricht rechnerisch einem DOC-Gehalt von 67 mg/l.

Desweiteren wurde das Abgas aus dem SMR in einem Versuchsabschnitt im Kreislauf geführt, um im SMR bei minimierter Energieaufwendung verschiedene Sauerstoffkonzentrationen einstellen und deren Einfluss im praktischen Betrieb überprüfen zu können.

## 2.5.2 Nachweis der Aromatenringspaltung

Der Weg der Ringspaltung, den die Biozönose maßgeblich beschreitet, lässt Aussagen zur Betriebsstabilität des SMR zu. So beschreibt Knackmuss (1979) eine Anreicherung von toxischen "Dead-end-Produkten" nur für den *meta*-Abbauweg, wogegen der *ortho*-Weg zu einem vollständigen Abbau der Aromaten führt. Die beiden Wege sind für Catechol und Protocatechuat in den Abbildungen 2.7 und 2.8 dargestellt.

Der Mechanismus der aromatischen Ringspaltung kann über den Nachweis bestimmter Farbstoffreaktionen ermittelt werden. Mehrere Schritte nach der *ortho*-Spaltung von Catechol und Protocatechuat als zentrale Metabolite des aeroben Aromatenabbaus (Gottschalk 1986) entsteht in der Rothera-Reaktion ein roter Farbstoff bei der Umsetzung von 3-Oxoadipyl-CoA mit Nitroprussid-Natriumdihydrat. Unmittelbar nach der *meta*-Spaltung lassen sich 2-Hydroxy-muconat-semialdehyd (maximale Absorption bei 375 nm) als Ringspaltungsprodukt von Catechol und 2-Hydroxy-4-carboxy-muconat-semialdehyd (maximale Absorption bei 410 nm) als Ringspaltungsprodukt von Protocatechuat mit Toluol gelb färben (Süßmuth 1987, Lidstrom 1990). Beide Reaktionen wurden in einem Testansatz nacheinander überprüft.

Die Untersuchungen wurden in zwei Parallelen an den Mischkulturen aus beiden Reaktoren, den Rührkolben und an isolierten Reinkulturen, die zuvor mit 3-CBA bzw. 4-CP angezüchtet wurden, vorgenommen. 5 ml Probe der Reaktoren sowie ein Reinkulturansatz wurden bei 4.000 bzw. 7.000 Upm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift in 5 ml Mineralsalz-Medium wurden die Pellets in 2 ml Trispuffer resuspendiert. Danach wurde 2 ml Substratlösung (je 4 mM 3-CBA, Catechol, Protocatechuat, 2 mM 4-CP) hinzugegeben und 10 Minuten gewartet, bevor 0,5 ml Toluol (konzentriert) zugefügt wurde. Werden die Substrate über den *meta*-Weg gespalten, färbt sich der Testansatz gelb.

Tritt keine Färbung auf, wird der Ansatz für 3 bis 6 Stunden bebrütet und anschließend mit 1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 ml Ammoniaklösung und 0,2 ml Rothera-Reagenz (Nitroprussid-Natriumdihydrat, 1 % Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO] · 2H<sub>2</sub>O) versetzt. Liegt 3-Oxoadipyl-CoA als gemeinsamer

Metabolit von Catechol und Protocatechuat nach der *ortho*-Spaltung vor, entsteht in der Rothera-Reaktion ein roter Farbstoff (mod. nach Süßmuth 1987).

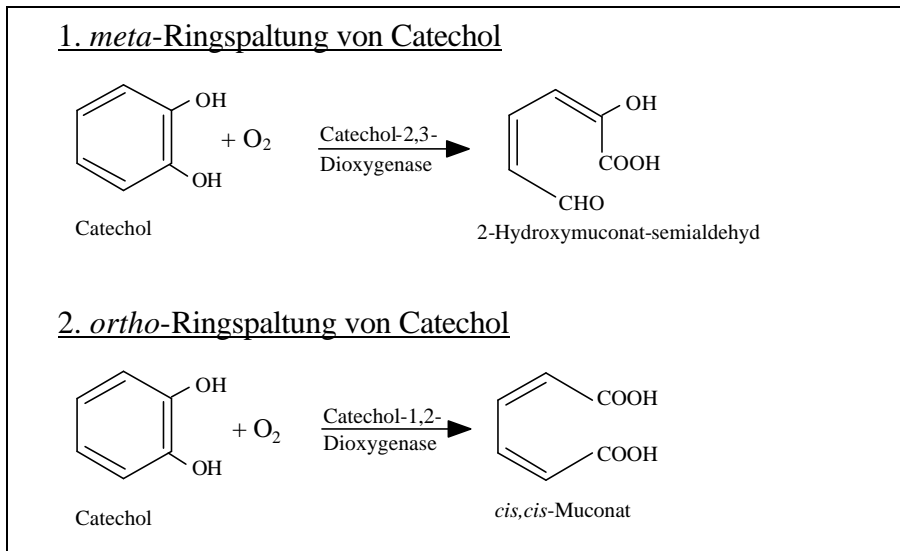


Abb. 2.7: Ringspaltung von Catechol über die *meta*- und die *ortho*-Spaltung

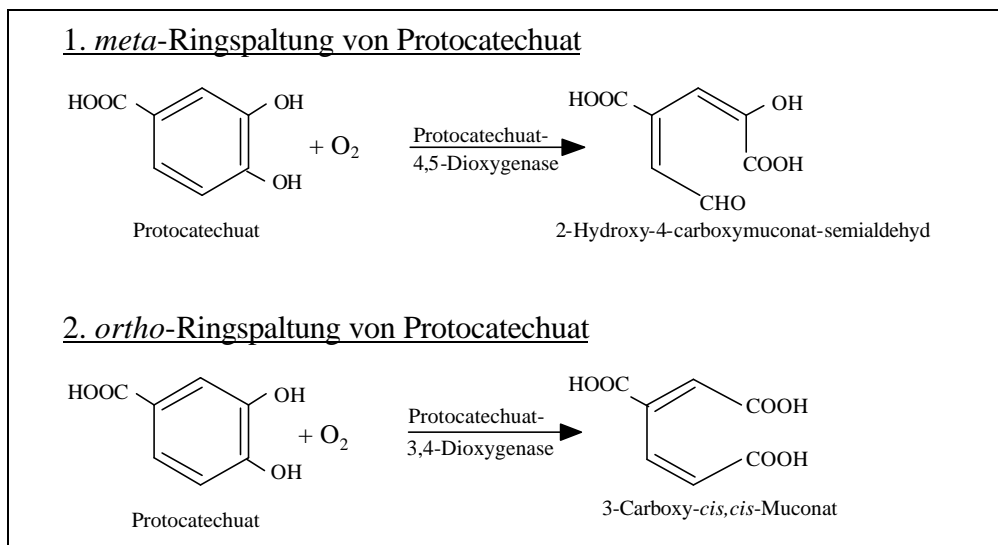


Abb. 2.8: Ringspaltung von Protocatechuat über die *meta*- und die *ortho*-Spaltung

Für den Test sollte eine Biomassekonzentration von mindestens 2 g TS/l vorliegen, um eine ausreichend kräftige Anfärbung zu erzielen.

### 2.5.3 Nachweis von Metaboliten

Die Abbauege von 3-Chlorbenzoesäure und 4-Chlorphenol wurden über die Aufnahme von UV/VIS-Absorptionsspektren mittels UV-Spektroskopie (Shimadzu UV/VIS-Spektralphotometer UV 160) und HPLC (Hewlett Packard, Series II 1090 Liquid Chromatograph) beschrieben. Mögliche Metabolite wurden anhand ihrer Absorptionsmaxima nachgewiesen. In Vorversuchen mit Proben aus dem SMR stand nur das UV/VIS-Spektralphotometer zur Verfügung.

Das HPLC-Gerät mit dem Dioden Array Detektor ermöglichte die Aufnahme von dreidimensionalen UV-Spektren (Auftragung der Wellenlänge gegen Retentionszeit und Peakhöhe) während der Messung, so dass Metabolite nicht nur über ihre Retentionszeit, sondern auch über ihre UV-Spektren mit Referenzsubstanzen verglichen werden konnten. Die Identifizierung der Intermediate erfolgte später über ein HPLC-Massenspektrometer. Im Zuge der Metabolitensuche wurden auch die im Institut für Umweltverfahrenstechnik gespeicherten Daten alter Proben aus dem kontinuierlichen Betrieb des SMR auf charakteristische Peaks überprüft.

Die Abbauprobversuche von 3-CBA und 4-CP wurden im sogenannten Röhrenansatz durchgeführt, der im Folgenden beschrieben wird. Dazu wurden aus dem SMR oder den Rührkolben 50 ml Probe entnommen und mit 6.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Volumeneinheit des Überstandes in Mineralsalz-Medium resuspendiert. Je 3,8 ml der aufbereiteten Probe wurden unverdünnt in 10 Sarstedtröhrchen gefüllt. Die Reaktionen in den einzelnen Röhren wurden in Abständen von 5 Minuten durch die Zugabe von 0,2 ml 0,01 M 3-CBA- bzw. 4-CP-Lösung (pH 7,5) gestartet. Die Testkonzentration der Modellschadstoffe betrug 0,5 mM. Die Röhren wurden mit 200 Upm auf einem Schüttler gemischt. Nach Substratzugabe in das letzte Röhren wurden die Reaktionen aller Testansätze durch Zentrifugation mit 4.000 Upm gestoppt. Anschließend wurden die Absorptionsspektren der Überstände im UV/VIS-Spektralphotometer gegen Mineralsalz-Medium aufgenommen. Über dieses Verfahren ("Röhrenansatz") war es möglich, den Abbau von 3-CBA und 4-CP in 5-Minutenschritten zu verfolgen und Metabolite anhand ihrer Absorptionsmaxima nachzuweisen.

Sechs Versuchsansätze liefen unter Zugabe von 4 mM Natrium-EDTA ab, um zu untersuchen, ob dies zu einer Anreicherung von Metaboliten führte. Na-EDTA hemmt das Enzym Muconat-Cycloisomerase (Sistrom & Stanier 1954, Hegemann 1965 und Ngai et al. 1990), so dass auf einem Abbauweg über Catechole *cis,cis*-Muconat oder Chlor-*cis,cis*-Muconat akkumulieren müssten.

#### **2.5.4 Versuche zur 3-Chlorbenzoesäure-Abbaukinetik**

Der 3-CBA-Abbau wurde nach Stoßbelastungen von 0,5, 1,0 und 2,0 mM über HPLC- und Chlorid-Messungen (Ionenchromatographie) erfasst. Der größte Teil der 3-CBA-Abbaukinetikversuche wurde mit Rührkolben-Proben im Röhrenansatz ausgeführt, da der SMR zum Zeitpunkt der kinetischen Versuche bereits auf den Schadstoff 4-CP umgestellt war.

Auf Grund des hohen Schlammalters im Reaktor wurden auch Untersuchungen in einem Fermenter vorgenommen. Die Bakterien sollten sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, um einen maximalen Substratumsatz zu gewährleisten. Der Fermenter diente als Referenzreaktor, um Messungen vorzunehmen, die unabhängig von Transportwiderständen in der Grenzschicht der Belebtschlammflocken und in der Flocke selbst sind. Die Untersuchungen wurden in enger Kooperation mit den Teilprojekten A1, A5 und B1 durchgeführt.

Der pH-Wert wurde auf 7,0 geregelt, der O<sub>2</sub>-Gehalt permanent gemessen und die Rührergeschwindigkeit auf 600 Upm eingestellt. Der 3-CBA-Abbau wurde nach einer Stoßbelastung von 1 mM und 2 mM über HPLC-, DOC-, und Chlorid-Messungen verfolgt. Proben wurden vor der Stoßbelastung, unmittelbar danach und dann alle 15 Minuten gezogen. Die Proben wurden über einen dünnen Schlauch mit einer 10 ml Spritze aus dem Fermenter entnommen und anschließend durch einen 0,2 µm Filteraufsatz steril filtriert. Knapp 2 ml wurden in HPLC-Probengläser gefüllt und bis zur Messung eingefroren. Die restliche Menge wurde für die DOC-Messung und die Sensor-Messungen des Teilvorhabens A5 verwendet.

#### **2.5.5 Versuche zur 4-Chlorphenol-Abbaukinetik**

Die 4-CP-Abbauversuche wurden mit Rührkolben-Kulturen im Röhrenansatz und mit SMR-Kulturen im Schüttelkolbenansatz vorgenommen, der nachfolgend beschrieben wird.

Nach der Probenahme aus dem SMR wurde die Biomasse mit 6.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Volumenmenge des Überstandes in Mineralsalz-Medium resuspendiert. Jeweils 200 ml Biomasse mit einem TS-Gehalt von ungefähr 2,2 g/l wurden auf Erlenmeyerkolben verteilt. Den einzelnen Kolben wurden unterschiedliche 4-CP-Konzentration (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,8 und 1,0 mM) hinzugefügt. Der Abbau wurde nach diesen Stoßbelastungen über HPLC- und Chlorid-Messungen (Ionenchromatographie) erfasst. Aus den Kolben wurden im 10-Minuten-Rhythmus 5 ml Probe entnommen und analog zu den Röhrenansätzen (Kap. 2.5.3) aufbereitet.

### **2.5.6 Ertragskoeffizient für 4-Chlorphenol**

Zur Ermittlung des Ertragskoeffizienten für 4-CP wurde die Korrelation zwischen Substratzugabe und Biomassezunahme im Rührkolben überprüft. Das Biomassewachstum wurde täglich bzw. nach zwei Tagen als Protein- und TS-Gehalt gemessen. Die Untersuchungen wurden zur Absicherung des kinetischen Modells durchgeführt.

Der Versuchszeitraum betrug 20 Tage und war in drei Versuchsabschnitte unterteilt. Am Ende dieser Abschnitte wurde aus dem Rührkolben 1 l Medium abgezogen, um die Konzentration von Chlorid und anderen Stoffwechselfausscheidungen zu senken. Pro Versuchstag wurden dem Rührkolben 1,0 bis 2,5 mM bei 4-CP zugegeben. Der Zuwachs der Biomasse wurde für jeden der drei Versuchsabschnitte mittels einer Trendlinie berechnet. Aus der Mittelwertbildung der drei Einzeltrendlinien ergab sich der Ertragskoeffizient für jeden Biomasseparameter.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung der Biozöosen von SMR und AIR

Zur Beschreibung der Lebensgemeinschaften der Mikroorganismen in den Versuchsreaktoren wurden zuerst die Gesamtzellzahlen (GZZ) und die Lebendzellzahlen (KBE) ermittelt. Die Lebendzellzahlen wurden auf selektiven Nährmedien ermittelt, um erste Hinweise auf die Anzahl an Mikroorganismen in der Mikroflora zu erhalten, die aromatische Kohlenwasserstoffe umsetzen konnten. Von den Anreicherungsmedien R2A und 3-CBA wurden insgesamt 173 Reinkulturen gewonnen, um die Zusammensetzung der Mikroflora der Reaktoren abzubilden. Mittels der stoffwechselfysiologischen Charakterisierung wurden wichtige 3-CBA-abbauende Bakterien aus dem SMR und dem AIR identifiziert. Um festzustellen, welcher Anteil der Bakterien aktiv an der Umsetzung der Modellschadstoffe beteiligt war, wurden die aktiven von den inaktiven Bakterienzellen über die Doppelfärbung mit CTC und DAPI-lac unterschieden.

##### 3.1.1 Gesamt- und Lebendzellzahlen der Biozöosen

In den Abbildungen 3.1 und 3.2 sind für beide Reaktoren die Gesamtzellzahl (GZZ) und die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) auf verschiedenen Nährmedien an vier Probenahme-terminen dargestellt.

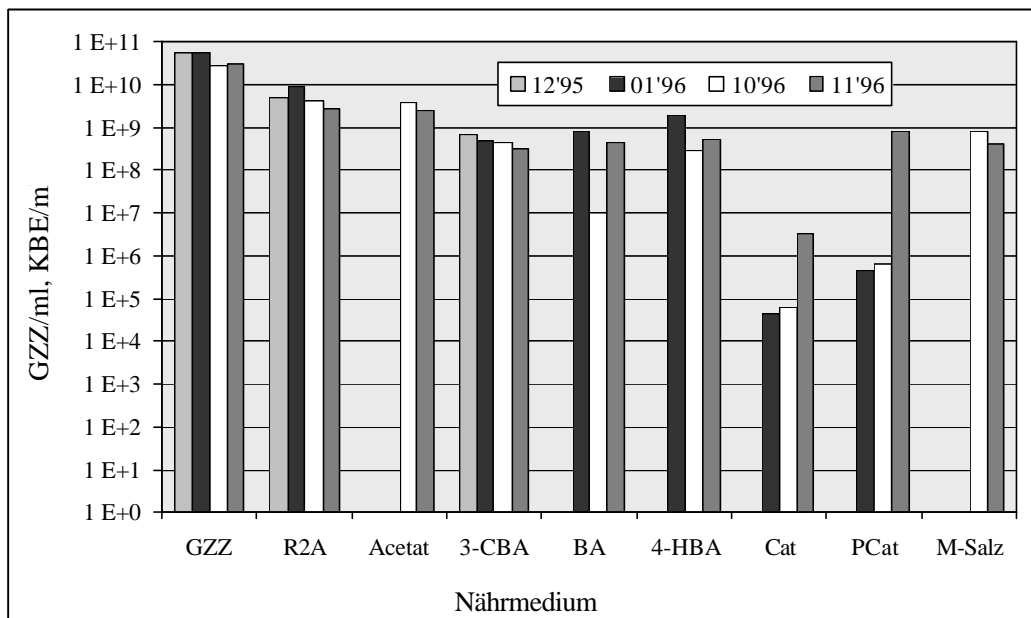


Abb. 3.1: Gesamtzellzahl und KBE des Suspensions-Membranreaktors  
 GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure,  
 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz

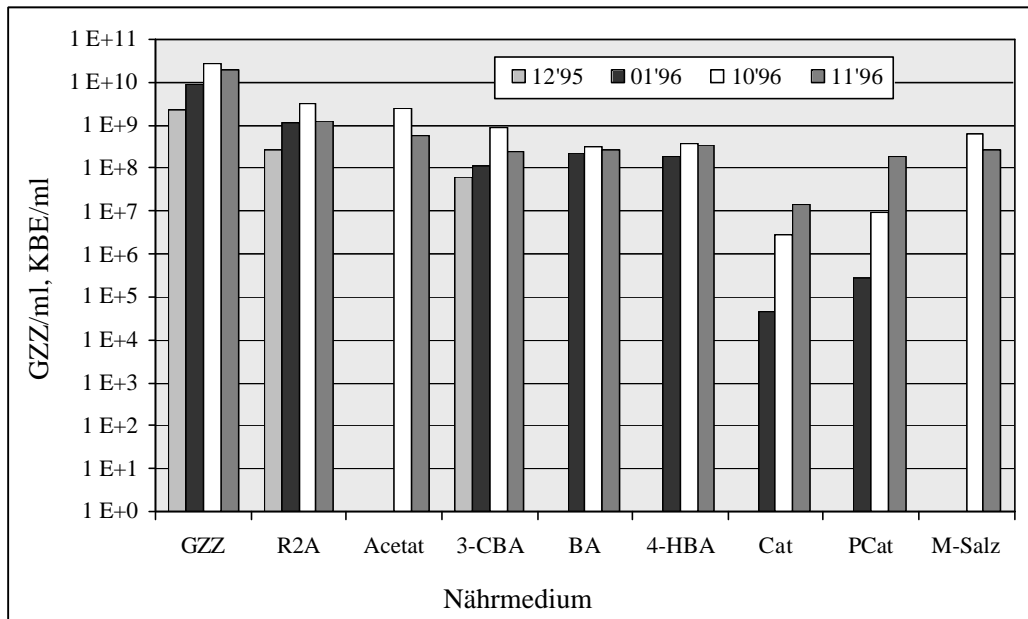


Abb. 3.2: Gesamtzellzahl und KBE des Airlift-Schlaufenreaktors

GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz

Die GZZ wurde über die Acridinorange-Färbung ermittelt und lag im SMR bei 2,7 bis  $5,6 \cdot 10^{10}$ /ml und damit bis zu einer Zehnerpotenz höher als im AIR, dessen GZZ 0,23 bis  $2,8 \cdot 10^{10}$ /ml betrug. Vergleichszellzahlen von Lampe (1998), die über die Zählkammermethode ermittelt wurden, lagen für den SMR in stabilen Betriebsphasen über einen Zeitraum von 15 Wochen im Bereich von 0,3 bis  $2,3 \cdot 10^{10}$  Zellen/ml. In Relation zu den Biomasseparametern (Tab. 3.1 und 3.2) lag die GZZ bei 0,65 und  $1,8 \cdot 10^{10}$ /mg Protein und bei 2,6 und  $5,6 \cdot 10^{12}$ /g TS im SMR. Sie war somit durchschnittlich doppelt so hoch wie im AIR. Der Anteil der Bakterienzellen an der gesamten Biomasse war im SMR deutlich höher als im AIR.

Die KBE wurden auf R2A-Agar nach Reasoner & Geldreich (1985) und auf selektiven Nährböden nach 14 Tagen Inkubation ermittelt. Die Bakterien wuchsen relativ langsam, erst nach vier bis fünf Tagen zeigten sich die ersten Kolonien auf den Nährböden. Auf dem R2A-Agar wurde die höchste Zahl kultivierbarer Zellen ermittelt, so dass die KBE der selektiven Nährböden hierzu in Beziehung gesetzt wurden. DEV-(N)-Agar wies in Vorversuchen auf Grund seines hohen Nährstoffgehaltes niedrigere KBE-Zahlen auf. Reines Mineralsalz-Medium diente als Vergleichsmedium, auf dem sehr kleine und äußerst langsam wachsende Kolonien in einer Anzahl von 4,0 bis  $8,0 \cdot 10^8$ /ml festgestellt wurden.

Die auf R2A-Agar ermittelten Koloniezahlen des SMR erreichten einen Wert zwischen 2,6 und  $8,8 \cdot 10^9$  KBE/ml und die des AIR zwischen 0,27 und  $3,1 \cdot 10^9$ /ml. Sie lagen damit in der Größenordnung von  $3 \cdot 10^9$  KBE/ml ( $1 \cdot 10^{12}$  KBE/g TS), die Kutzner (1993) für Belebtschlämme auf Belebtschlamm-Agar angibt. Der SMR zeigte einen zwei- bis fünffach höheren



Gehalt an auf R2A kultivierbaren Zellen in Relation zum TS- und zum Protein-Gehalt (Tab. 3.1 und 3.2) als der AIR. Der Anteil der auf R2A kultivierbaren Bakterien machte zwischen 6,6 und 13,0 % der GZZ im AIR und zwischen 9,0 und 16,3 % der GZZ im SMR aus.

Tab. 3.1: Biomasseparameter der Biozönose des Suspensions-Membranreaktors  
GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, DEV = DEV-(N)-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz

SMR	24.11.95		08.12.95		16.01.96				
Protein [mg/l]	4563		5740		2997				
TS [g/l]	14,9		16,0		10,0				
GZZ/ml	3,9 E+10		5,6 E+10		5,4 E+10				
GZZ/mg Prot.	8,5 E+9		9,8 E+9		1,8 E+10				
GZZ/g TS	2,6 E+12		3,5 E+12		5,4 E+12				
Nährmedium	R2A	DEV	3-CBA	R2A	3-CBA	BA	4-HBA	Cat	PCat
KBE/ml	4,8 E+9	2,0 E+9	7,0 E+8	8,8 E+9	5,2 E+8	8,9 E+8	1,9 E+9	4,5 E+4	4,4 E+5
KBE/GZZ	12,27 %	5,06 %	1,26 %	16,30 %	0,96 %	1,64 %	3,59 %	0,00 %	0,00 %
KBE/mg Prot.	1,0 E+9	4,3 E+8	1,2 E+8	2,9 E+9	1,7 E+8	3,0 E+8	6,5 E+8	1,5 E+4	1,5 E+5
KBE/g TS	3,2 E+11	1,3 E+11	4,4 E+10	8,8 E+11	5,2 E+10	8,9 E+10	1,9 E+11	4,5 E+6	4,4 E+7

SMR	10.10.96								
Protein [mg/l]	2350								
TS [g/l]	4,9								
GZZ/ml	2,7 E+10								
GZZ/mg Prot.	1,2 E+10								
GZZ/g TS	5,6 E+12								
Nährmedium	R2A	Acetat	3-CBA	BA	4-HBA	Cat	PCat	M-Salz	
KBE/ml	4,3 E+9	3,9 E+9	4,6 E+8	1,0 E+7	3,0 E+8	6,1 E+4	6,6 E+5	8,0 E+8	
KBE/GZZ	15,69 %	14,05 %	1,68 %	0,04 %	1,11 %	0,00 %	0,00 %	2,92 %	
KBE/mg Prot.	1,8 E+9	1,6 E+9	2,0 E+8	4,3 E+6	1,3 E+8	2,6 E+4	2,8 E+5	3,4 E+8	
KBE/g TS	8,8 E+11	7,9 E+11	9,4 E+10	2,0 E+9	6,2 E+10	1,2 E+7	1,4 E+8	1,6 E+11	

SMR	04.11.96								
Protein [mg/l]	4410								
TS [g/l]	7,6								
GZZ/ml	2,9 E+10								
GZZ/mg Prot.	6,5 E+9								
GZZ/g TS	3,8 E+12								
Nährmedium	R2A	Acetat	3-CBA	BA	4-HBA	Cat	PCat	M-Salz	
KBE/ml	2,6 E+9	2,5 E+9	3,1 E+8	4,3 E+8	5,6 E+8	3,1 E+6	8,5 E+8	4,0 E+8	
KBE/GZZ	9,03 %	8,68 %	1,08 %	1,49 %	1,94 %	0,01 %	2,95 %	1,38 %	
KBE/mg Prot.	5,9 E+8	5,7 E+8	7,0 E+7	9,8 E+7	1,3 E+8	7,0 E+5	1,9 E+8	9,0 E+7	
KBE/g TS	3,4 E+11	3,3 E+11	4,1 E+10	5,7 E+10	7,4 E+10	4,1 E+8	1,1 E+11	5,2 E+10	

Bis auf Catechol (Cat) und Protocatechuat (PCat) wurden alle Aromaten in einer Konzentration von 3 mM angesetzt. Die Konzentration von Catechol und Protocatechuat wurde auf Grund des toxischen Effekts im Vergleich zu den Mineralsalz-Platten von anfangs 2 mM auf 0,5 mM gesenkt, was mit einem schrittweisen Anstieg der Lebendzellzahlen von  $4,5 \cdot 10^4$ /ml auf  $3,1 \cdot 10^6$ /ml auf Catechol und von  $4,4 \cdot 10^5$ /ml auf  $8,5 \cdot 10^8$ /ml auf Protocatechuat im SMR verbunden war. Die KBE auf diesen potenziellen Metaboliten des 3-CBA-Abbaus war im

AIR höher als im SMR. Erst nach Verringerung auf 0,5 mM war die KBE im SMR auf Protocatechuat höher.

Tab. 3.2: Biomasseparameter der Biozönose des Airlift-Schlaufenreaktors

GZZ = Gesamtzellzahl, R2A = R2A-Agar, DEV = DEV-(N)-Agar, 3-CBA = 3-Chlorbenzoesäure, BA = Benzoesäure, 4-HBA = 4-Hydroxybenzoesäure, Cat = Catechol, PCat = Protocatechuat, M-Salz = Mineralsalz

<b>AIR</b>	<b>08.12.95</b>			<b>16.01.96</b>					
Protein [mg/l]	1271			1887					
TS [g/l]	3,4			6,3					
GZZ/ml	2,3 E+9			9,0 E+9					
GZZ/mg Prot.	1,8 E+9			4,8 E+9					
GZZ/g TS	6,8 E+11			1,4 E+12					
Nährmedium	<b>R2A</b>	<b>DEV</b>	<b>3-CBA</b>	<b>R2A</b>	<b>3-CBA</b>	<b>BA</b>	<b>4-HBA</b>	<b>Cat</b>	<b>PCat</b>
KBE/ml	2,7 E+8	1,1 E+8	6,3 E+7	1,2 E+9	1,1 E+8	2,3 E+8	1,8 E+8	4,6 E+4	2,9 E+5
KBE/GZZ	11,59 %	4,74 %	2,72 %	13,01 %	1,22 %	2,51 %	2,05 %	0,00 %	0,00 %
KBE/mg Prot.	2,1 E+8	8,7 E+7	5,0 E+7	6,2 E+8	5,8 E+7	1,2 E+8	9,8 E+7	2,4 E+4	1,5 E+5
KBE/g TS	7,9 E+10	3,2 E+10	1,9 E+10	1,8 E+11	1,7 E+10	3,6 E+10	2,9 E+10	7,3 E+6	4,5 E+7
<b>AIR</b>	<b>10.10.96</b>								
Protein [mg/l]	3275								
TS [g/l]	7,6								
GZZ/ml	2,8 E+10								
GZZ/mg Prot.	8,6 E+9								
GZZ/g TS	3,7 E+12								
Nährmedium	<b>R2A</b>	<b>Acetat</b>	<b>3-CBA</b>	<b>BA</b>	<b>4-HBA</b>	<b>Cat</b>	<b>PCat</b>	<b>M-Salz</b>	
KBE/ml	3,1 E+9	2,6 E+9	5,5 E+8	3,0 E+8	3,9 E+8	2,9 E+6	9,1 E+6	6,3 E+8	
KBE/GZZ	11,06 %	9,08 %	1,95 %	1,08 %	1,37 %	0,01 %	0,03 %	2,23 %	
KBE/mg Prot.	9,5 E+8	7,8 E+8	1,7 E+8	9,3 E+7	1,2 E+8	8,9 E+5	2,8 E+6	1,9 E+8	
KBE/g TS	4,1 E+11	3,4 E+11	7,2 E+10	4,0 E+10	5,1 E+10	3,8 E+8	1,2 E+9	8,3 E+10	
<b>AIR</b>	<b>04.11.96</b>								
Protein [mg/l]	3054								
TS [g/l]	8,0								
GZZ/ml	2,0 E+10								
GZZ/mg Prot.	6,5 E+9								
GZZ/g TS	2,5 E+12								
Nährmedium	<b>R2A</b>	<b>Acetat</b>	<b>3-CBA</b>	<b>BA</b>	<b>4-HBA</b>	<b>Cat</b>	<b>PCat</b>	<b>M-Salz</b>	
KBE/ml	1,3 E+9	6,0 E+8	2,4 E+8	2,8 E+8	3,5 E+8	1,4 E+7	1,9 E+8	2,7 E+8	
KBE/GZZ	6,57 %	3,03 %	1,21 %	1,41 %	1,79 %	0,07 %	0,96 %	1,34 %	
KBE/mg Prot.	4,3 E+8	2,0 E+8	7,9 E+7	9,2 E+7	1,2 E+8	4,6 E+6	6,2 E+7	8,7 E+7	
KBE/g TS	1,6 E+11	7,5 E+10	3,0 E+10	3,5 E+10	4,4 E+10	1,8 E+9	2,4 E+10	3,3 E+10	

Die KBE des SMR auf 3-CBA-Agar lagen bei 3,1 bis  $7,0 \cdot 10^8$ /ml und die des AIR bei 0,63 bis  $5,5 \cdot 10^8$ /ml. Der SMR wies mit 0,7 bis  $2,0 \cdot 10^8$ /mg Protein und 4,1 bis  $9,4 \cdot 10^{10}$ /g TS einen bis zu doppelt so hohen Gehalt an kultivierbaren Zellen auf 3-CBA wie der AIR in Relation zu den Biomasseparameter auf. Die KBE auf 3-CBA-Agar im SMR machten 6 bis 12 % der auf R2A-Agar kultivierbaren Zellen aus, im AIR waren es zwischen 9 und 18 %.

Die KBE auf Benzoesäure (BA) und 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA) lagen im AIR gleich hoch bei 1,8 bis  $3,9 \cdot 10^8$ /ml. Die Lebendzellzahl auf beiden Substraten war damit genauso

hoch wie auf 3-CBA. Die KBE des SMR lagen bei 4,3 und  $8,9 \cdot 10^8/\text{ml}$  auf Benzoesäure und bei  $3,0 \cdot 10^8/\text{ml}$  bis  $1,9 \cdot 10^9/\text{ml}$  auf 4-HBA und damit oberhalb der Zahlen für 3-CBA.

Im Oktober und November 1996 wurde zudem die Lebendzellzahl auf Natriumacetat ermittelt, das seit Anfang August 1996 zusätzlich als sogenannte leicht abbaubare Kohlenstoffquelle eingesetzt wurde. Zuvor wurde der Belebtschlamm beider Reaktoren im Institut für Umweltverfahrenstechnik zusammengeschüttet und wieder aufgeteilt, um gleiche Startbedingungen für den Reaktorbetrieb mit 3-CBA und Na-Acetat zu schaffen. Die KBE auf Na-Acetat erreichte in beiden Reaktoren etwa das Niveau der KBE auf R2A-Agar und war damit deutlich höher als die KBE auf 3-CBA. Das nur im AIR beobachtete Phänomen einer langsamen Anreicherung von 3-CBA (Schierenbeck 1997) in Folge einer Veränderung der Biozönose konnte anhand des Wachstums auf den Nährböden nicht bestätigt werden.

### 3.1.2 Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Zellen

Zur Unterscheidung von aktiven und inaktiven Zellen im Belebtschlamm wurden Doppelfärbungen mit CTC und DAPI-lac durchgeführt. Untersucht wurden Proben aus dem Rührkolben (RK) und dem SMR, als diese mit 4-CP beschickt wurden. Nach der Entnahme wurden die Belebtschlammproben sofort mit CTC versetzt, um die stoffwechselaktiven Zellen rot anzufärben. Nach einer zweistündigen Inkubation und anschließender Verdünnung erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI-lac zur Blaufärbung der Gesamtzellzahl.

In Tab. 3.3 sind die ermittelten Zellzahlen sowie die Korrelation mit den Biomasseparametern TS und Protein dargestellt.

Tab. 3.3: Ergebnisse der CTC und DAPI-lac-Färbung  
RK = Rührkolben, vor/nach = vor bzw. nach der 4-CP-Zugabe

Datum Ursprung	TS	Protein	Prot/TS	CTC	DAPI	CTC/DAPI	CTC	CTC	DAPI	DAPI
1999	[g/l]	[mg/l]	[mg/g]	[Zellen/ml]	[Zellen/ml]	%	[g TS <sup>-1</sup> ]	[mg Prot <sup>-1</sup> ]	[g TS <sup>-1</sup> ]	[mg Prot <sup>-1</sup> ]
25.01. RK (vor)	0,54	210,1	389	2,7 E+8	1,4 E+9	19,5	5,0 E+11	1,3 E+9	2,5 E+12	6,5 E+9
25.01. RK (nach)	0,54	210,1	389	1,1 E+8	7,1 E+8	16,1	2,1 E+11	5,4 E+8	1,3 E+12	3,4 E+9
03.02. RK (vor)	0,67	249,3	372	3,6 E+8	2,6 E+9	13,7	5,3 E+11	1,4 E+9	3,9 E+12	1,0 E+10
03.02. RK (nach)	0,67	249,3	372	2,0 E+8	1,6 E+9	12,6	3,0 E+11	8,0 E+8	2,4 E+12	6,4 E+9
05.02. RK	0,53	231,1	436	2,1 E+8	1,5 E+9	14,7	4,0 E+11	9,3 E+8	2,8 E+12	6,3 E+9
23.02. RK (vor)	0,56	214,3	383	2,1 E+8	9,6 E+8	22,0	3,8 E+11	9,8 E+8	1,7 E+12	4,5 E+9
23.02. RK (nach)	0,56	214,3	383	1,4 E+8	7,2 E+8	20,2	2,6 E+11	6,8 E+8	1,3 E+12	3,3 E+9
24.02. SMR	1,19	287,1	241	1,0 E+8	1,2 E+9	8,3	8,4 E+10	3,5 E+8	1,0 E+12	4,2 E+9
09.03. SMR	2,25	577,0	256	2,5 E+8	2,2 E+9	11,4	1,1 E+11	4,3 E+8	9,7 E+11	3,8 E+9
11.03. SMR	2,22	663,8	299	2,4 E+8	2,0 E+9	11,6	1,1 E+11	3,5 E+8	9,1 E+11	3,1 E+9
16.03. SMR	1,89	445,3	236	2,1 E+8	2,0 E+9	10,7	1,1 E+11	4,7 E+8	1,0 E+12	4,4 E+9

Im Rührkolben wurden 1,1 bis  $3,6 \cdot 10^8$  CTC-positive Zellen/ml ermittelt, die Gesamtzellzahl lag bei 0,7 bis  $2,6 \cdot 10^9$  Zellen/ml. Die Zahlen des SMR waren mit 1,0 bis  $2,5 \cdot 10^8$  CTC-positiver Zellen/ml und 1,2 bis  $2,2 \cdot 10^9$  GZZ/ml ähnlich hoch. Das Verhältnis von stoffwechselaktiven Zellen zur Gesamtzellzahl war im SMR mit 8,3 bis 11,6 % jedoch niedriger als im Rührkolben, dessen aktiver Anteil 12,6 bis 22,0 % betrug, was auf eine Hemmung der Bakterien des SMR in ihrer Aktivität hindeutete.

Das Verhältnis der GZZ zu den Biomasseparametern TS- und Protein-Gehalt war im SMR zudem geringer als im Rührkolben, wie in Tab. 3.3 dargestellt ist. Im SMR wurde nur eine GZZ von  $1,0 \cdot 10^{12}$  Zellen/g TS und 3,1 bis  $4,4 \cdot 10^9$  Zellen/mg Protein ermittelt, im Rührkolben 1,3 bis  $3,9 \cdot 10^{12}$  Zellen/g TS und 0,3 bis  $1,0 \cdot 10^{10}$  Zellen/mg Protein. Auf einen relativ niedrigen Zellanteil an der Biomasse weist auch ein Vergleich der im 3-CBA-Betrieb des SMR festgestellten GZZ (Kap. 3.1.1) hin. In der Färbung mit Acridinorange (AO) wurde mit 2,6 bis  $5,6 \cdot 10^{12}$  AO-positive Zellen/g TS und 0,65 bis  $1,2 \cdot 10^{10}$  AO-positive Zellen/mg Protein die drei- bis fünffache Zellzahl bezogen auf den Biomassegehalt gezählt.

Im Rührkolben wurde zusätzlich untersucht, welchen Einfluss die Substratzugabe auf die Aktivität der Bakterien hatte. Dazu wurden Proben vor und 5 Minuten nach der Zugabe von 0,5 mM 4-CP entnommen. Hierbei wurde festgestellt, dass die 4-CP-Zugabe einen negativen Einfluss auf die Anfärbbarkeit der Zellen hatte. Sowohl in der CTC- als auch in der DAPI-Färbung wurden deutlich weniger Zellen gezählt. Die Zahl der CTC-gefärbten Zellen verringerte sich um 30 bis 60 %, die Zahl der DAPI-gefärbten Zellen um 25 bis 50 %. Der Anteil stoffwechselaktiver Zellen sank minimal von 13,7 auf 12,6 % und maximal von 19,5 auf 16,1 %.

Unverdünnte Proben zeigten eine höhere CTC-Fluoreszenz. Durch die Verdünnung der Proben verringerte sich die Intensität der CTC-gefärbten Zellen. Im Gegensatz dazu konnten die DAPI-gefärbten Zellen in der höheren Verdünnung etwas besser vom Hintergrund unterschieden werden.

Zur Veranschaulichung ist in den Abbildungen 3.3a,b die Doppelfärbung mit CTC und DAPI-lac von Bakterienzellen einer unverdünnten Probe aus dem Rührkolben zu sehen. Die Fotos zeigen das gleiche mikroskopische Gesichtsfeld. Von den blau fluoreszierenden Bakterien lassen sich in diesem Ausschnitt ungefähr 25 % der Zellen durch ihre rote Fluoreszenz als stoffwechselaktiv detektieren. Deutlich sichtbar ist der geringere Anteil an aktiven Bakterien in den Flocken.

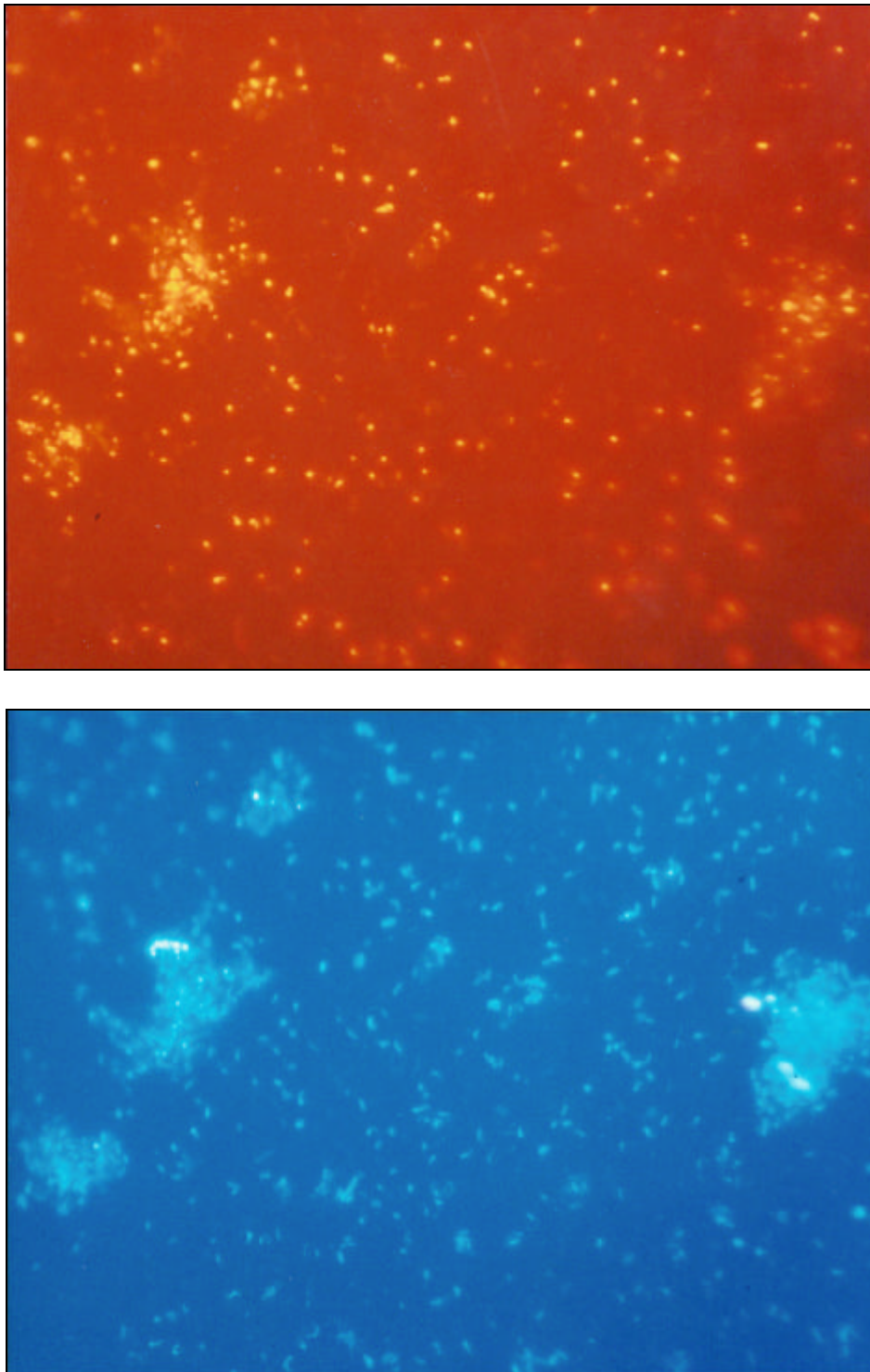


Abb. 3.3: a) oben CTC-positive Bakterienzellen aus dem Rührkolben, in den stoffwechselaktiven Zellen fluoreszieren die Formazan-Kristalle rot,  
b) unten im selben mikroskopischen Gesichtsfeld fluoreszieren DAPI-lac gefärbte Bakterienzellen blau;  
bei 1000-facher Vergrößerung im Epifluoreszenzmikroskop fotografiert

### 3.1.3 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Bakterienisolate

Mit Hilfe der durchgeführten biochemischen Tests in den Mikrotiterplatten wurden Hinweise auf das physiologische Potential der Biozönosen gewonnen und die am Abbau von 3-CBA maßgeblich beteiligten Bakteriengattungen identifiziert (Kap. 3.1.4). Die Isolate stammten von den in Kap. 3.1.1 beschriebenen R2A- und 3-CBA-Anreicherungsplatten.

Die Abb. 3.4 und 3.5 zeigen die Verwertung der Substanzklassen durch die Bakteriengemeinschaften beider Reaktoren. In Abb. 3.4 sind die Verwertungsspektren der 173 Isolate der Probenahme vom 16.01.96 nach den jeweiligen Anreicherungsmedien unterteilt dargestellt, wobei "AIR" und "SMR" die Herkunft der Isolate und "R2A" und "3-CBA" das Anreicherungsmedium kennzeichnen. Im folgenden Text werden die Bezeichnungen "Isolate AIR/R2A", "Isolate AIR/3-CBA", "Isolate SMR/R2A" und "Isolate SMR/3-CBA" verwendet.

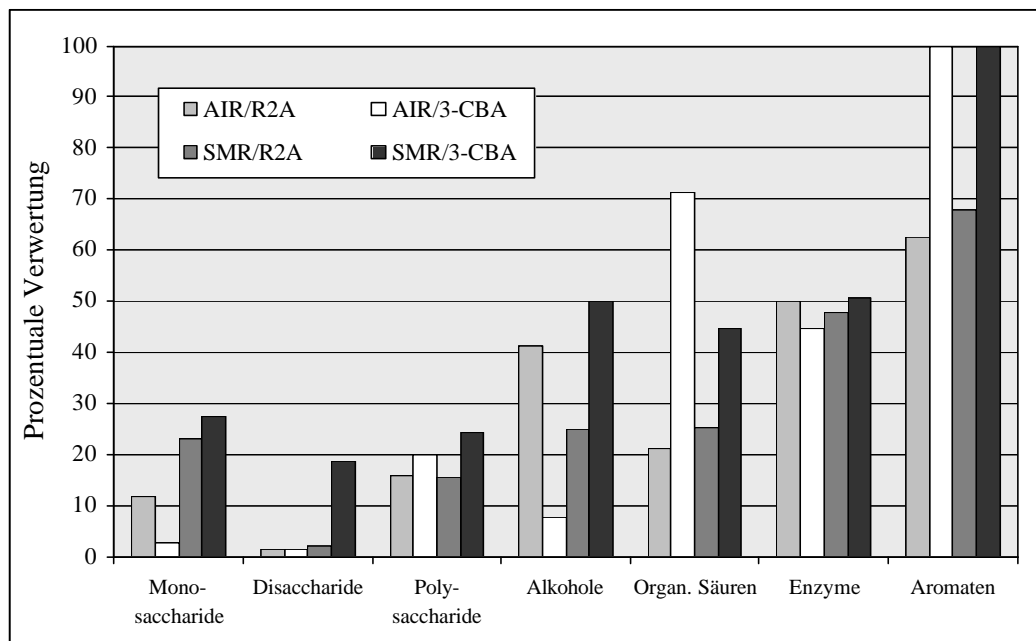


Abb. 3.4: Verwertungsspektrum der Isolate aus dem SMR und AIR unterteilt nach dem Anreicherungsmedium

AIR/R2A = vom R2A-Agar stammende Isolate aus dem AIR, AIR/3-CBA = vom 3-CBA-Agar stammende Isolate aus dem AIR, SMR/R2A = vom R2A-Agar stammende Isolate aus dem SMR, SMR/3-CBA = vom 3-CBA-Agar stammende Isolate aus dem SMR

Die beiden Reaktoren wiesen einen großen Unterschied zwischen den Isolatenspektren auf, die vom R2A-Agar und vom 3-CBA-Agar stammten. Das korrelierte mit dem unterschiedlichen Artenspektrum, das in den Reaktoren festgestellt wurde (Kap. 3.1.4). In Abb. 3.5 ist der Vergleich zwischen den Biozönosen beider Reaktoren unabhängig vom Isolationsmedium dargestellt.

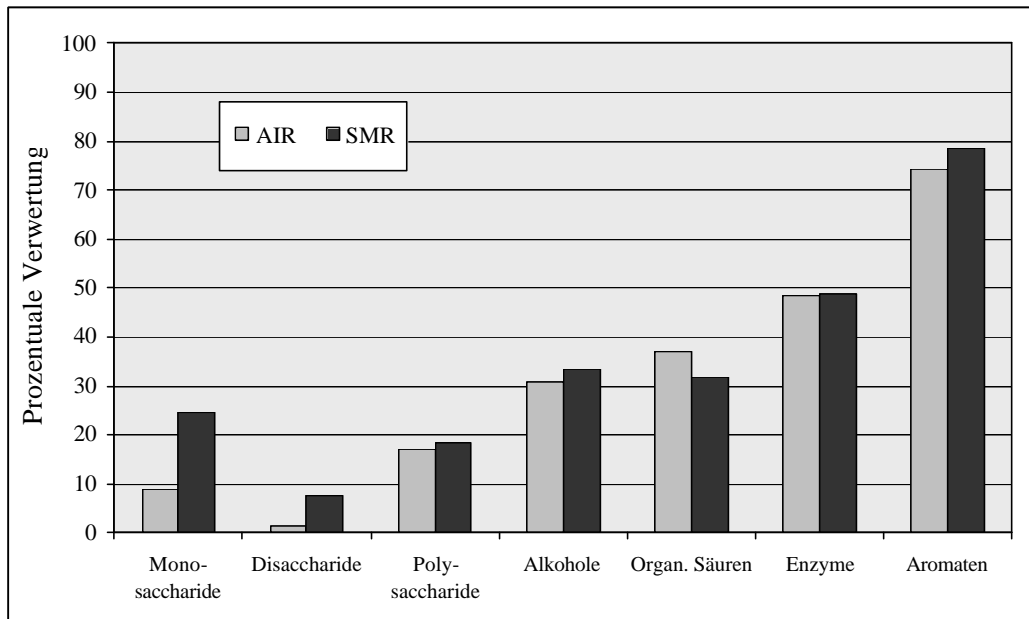


Abb. 3.5: Verwertungsspektrum der Biozönosen aus dem SMR und AIR

In den Abb. 3.4 und 3.5 wird deutlich, dass die angebotenen aromatischen Kohlenwasserstoffe am besten verwertet wurden. 3-CBA, BA und 4-HBA (je 1 mM) sowie PCat (0,5 mM) wurden von allen Isolaten zum Wachstum genutzt. Diese Wachstumstests sollten Hinweise auf den 3-CBA-Abbauweg liefern. Sie konnten nicht mit potenziellen, chlorierten Metaboliten durchgeführt werden, da die meisten der chlorierten Stoffwechselprodukte nicht in größeren Mengen für analytische Zwecke hergestellt werden (Knorr 1997) oder zu schnell zerfallen. Da substituierte Aromaten höhere Anforderungen an die enzymatische Ausstattung der Bakterien stellen als einfache Aromaten (Knackmuss 1979), sollte mit den Tests in einer Art Ausschlussverfahren nachgewiesen werden, ob zumindest nicht-substituierte Metabolite verwertet wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Isolate SMR/3-CBA und AIR/3-CBA auf allen Aromaten in allen Konzentrationen von 0,5 bis 5,0 mM zum Wachstum kamen. In ihrer Summe wurden die aromatischen Kohlenwasserstoffe von den SMR-Isolaten etwas besser verwertet.

Alle SMR- und AIR-Isolate wuchsen auf dem Festmedium der Mikrotiterplatten mit 1 mM (156,6 mg/l) 3-CBA. Eine hohe Konzentration von 5 mM konnten noch 88 % der SMR- und sogar 97 % der AIR-Isolate zum Wachstum nutzen. Auf 3 mM Agarplatten, auf denen die Isolate mit der Impföse ausgestrichen wurden, war das Wachstum geringer. 47 % der SMR-Isolate und nur 41 % der AIR-Isolate wuchsen auf diesen Nährböden.

Von den potenziellen Metaboliten Catechol und Protocatechuat wurde letzteres besser verwertet, wobei die Zahl positiv reagierender Isolate mit einer Verringerung der Konzentration beider Stoffe in den Nährböden gesteigert werden konnte. Auf 0,5 mM (55 mg/l) Catechol-Agar wuchsen 64 % der SMR-Isolate und 43 % der AIR-Isolate. Die Konzentration von 0,5 mM (77 mg/l) Protocatechuat nutzten 100 % aller SMR- und AIR-Isolate zum Wachstum.

Zudem ließ sich anhand der Koloniegröße auf Protocatechuat ein deutlich kräftigeres Wachstum beobachten als auf Catechol.

Sämtliche Isolate zeigten auf 1 mM Benzoesäure (BA) und 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA) Wachstum. Der Ausstrich auf 3 mM Nährböden ergab für 86 % der SMR-Isolate auf BA und 78 % auf 4-HBA ein positives Ergebnis. 75 % der AIR-Isolate wuchsen auf BA und 72 % auf 4-HBA.

Die Anzahl positiver Enzymreaktionen war mit fast 50 % für beide Reaktoren gleich hoch. Besonders hoch waren die enzymatischen Aktivitäten der Desoxyribonuclease, der Hippurat-Hydrolase und die lipolytische Aktivität auf Tween 20. Ebenfalls sehr häufig war bei allen Isolaten die Penicillinresistenz, die auf eine sehr hohe Verbreitung der enzymatischen Fähigkeit zur Penicillinspaltung schließen ließ. Unterschiedlich war die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase verteilt, die 84 % der SMR-Isolate zeigten, aber nur 52 % der AIR-Isolate. Dagegen waren zur Umsetzung von Nitrat zu Nitrit mit 76 % wesentlich mehr AIR-Isolate fähig als SMR-Isolate mit nur 34 %.

Die organischen Säuren wurden von den AIR-Isolaten besser als von den SMR-Isolaten verwertet, wobei über 70 % der Isolate AIR/3-CBA diese C-Quellen umsetzten, nur die Aromaten wurden von einem höheren Prozentsatz verwertet. Von den Isolaten AIR/R2A zeigten nur 22 % eine Verwertung der organischen Säuren. Der prozentuale Anteil der organische Säuren umsetzenden Isolate SMR/3-CBA war mit 45 % ebenfalls wesentlich höher als der Anteil der Isolate SMR/R2A mit 26 %. Auffällig an diesem Zusammenhang war, dass überwiegend die Isolate mit 100 %iger Aromatenverwertung zu den aktivsten Verwertern der organischen Säuren zählten.

Zur Ausnutzung der Alkohole waren ca. 30 % aller Isolate fähig (Abb. 3.5), jedoch gab es große Unterschiede in Abhängigkeit vom Anreicherungsmedium (Abb. 3.4). So zeigten über 40 % der Isolate AIR/R2A und 50 % der Isolate SMR/3-CBA eine Umsetzung der Alkohole.

Die Verwertung der Kohlenhydrate war von allen Substanzklassen am geringsten. Am schlechtesten wurden die Disaccharide verwertet. Nur 2 % der AIR-Isolate und 8 % der SMR-Isolate zeigten eine Umsetzung. Mono- und Polysaccharide wurden ebenfalls besser von den SMR-Isolaten abgebaut. Von den Polysacchariden wurde nur Inulin sehr gut verwertet, 86 % aller Isolate konnten dieses Substrat umsetzen. Die Substanzklasse Polysaccharide wurde nur von 17 % aller Isolate verwertet.

Die Kohlenhydrate wiesen die meisten negative Ergebnisse aller biochemischen Tests auf. Die Disaccharide Lactose (fermentativ) und Saccharose, die Trisaccharide Melzitose,



Raffinose und N-Acetyl-Glucosamin\*, die Polysaccharide Xylan, Glycogen und Zellulose wurden nicht verwertet. Ebenfalls wurden die organischen Säuren Propionat und Gluconat\* sowie Gelatine\* (Hydrolyse) von keinem Isolat umgesetzt. Abweichend von den Ergebnissen der Mikrotiteransätze gab es für die mit \* gekennzeichneten Substrate im API-Test positive Ergebnisse.

Aus 68 der physiologischen Tests wurden die *in vitro*-Aktivität berechnet, die die Fähigkeit eines Bakterienstammes oder einer Bakteriengemeinschaft beschreibt, unter den gewählten *in vitro*-Bedingungen Substrate umzusetzen. Dabei zeigte sich eine insgesamt höhere *in vitro*-Aktivität der SMR-Isolate. In den Abbildungen 3.6a-f sind die *in vitro*-Aktivitäten der Isolate der Vergleichsreaktoren SMR und AIR unterteilt nach dem jeweiligen Anreicherungsmedium dargestellt.

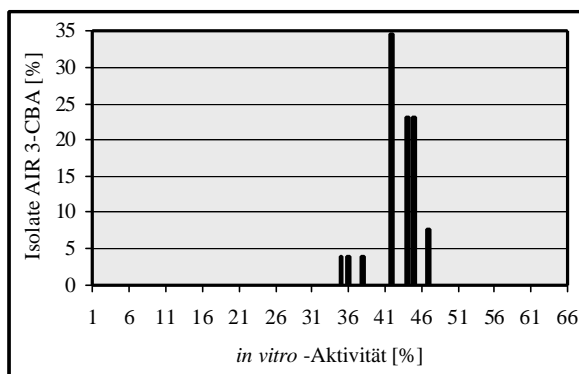


Abb. 3.6a: *in vitro*-Aktivitäten der Isolate AIR/3-CBA

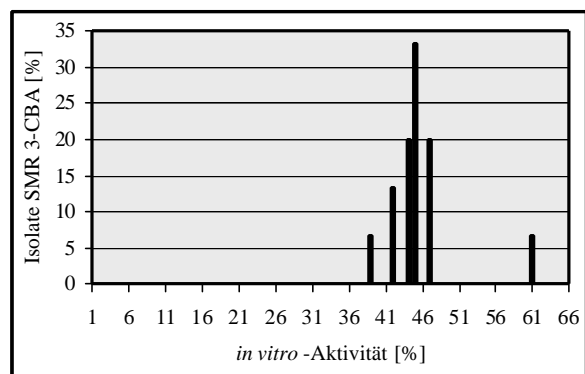


Abb. 3.6b: *in vitro*-Aktivitäten der Isolate SMR/3-CBA

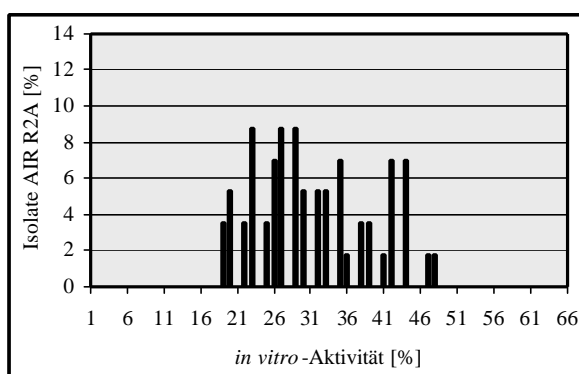


Abb. 3.6c: *in vitro*-Aktivitäten der Isolate AIR/R2A

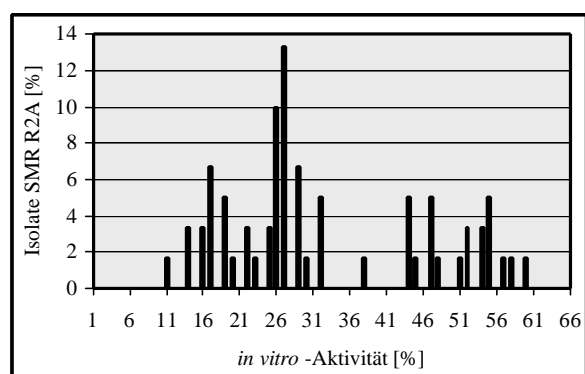


Abb. 3.6d: *in vitro*-Aktivitäten der Isolate SMR/R2A

Die meisten Isolate AIR/3-CBA (Abb. 3.6a) zeigten eine nach Dott & Wetzel (1984) mittlere *in vitro*-Aktivität von 42 bis 45 %, die meisten Isolate SMR/3-CBA (Abb. 3.6b) eine nur

etwas höhere *in vitro*-Aktivität von 44 bis 47 %. Allerdings waren 7 % der SMR-Isolate mit einer *in vitro*-Aktivität von 61 % deutlich aktiver.

Die AIR-Isolate vom R2A-Agar (Abb. 3.6c) zeigten im Vergleich zu den SMR-Isolaten (Abb. 3.6d) einen engeren Bereich an *in vitro*-Aktivität von 19 bis 48 % mit einer relativ gleichmäßigen Verteilung. Je 9 % der Isolate wiesen eine niedrige *in vitro*-Aktivität von 23 %, 27 % und 29 % auf. Bei den SMR-Isolaten variierte die *in vitro*-Aktivität von 11 bis 60 % mit einem Verteilungsmaximum von 25 und 26 % Aktivität, für das 24 % der Isolate sorgten.

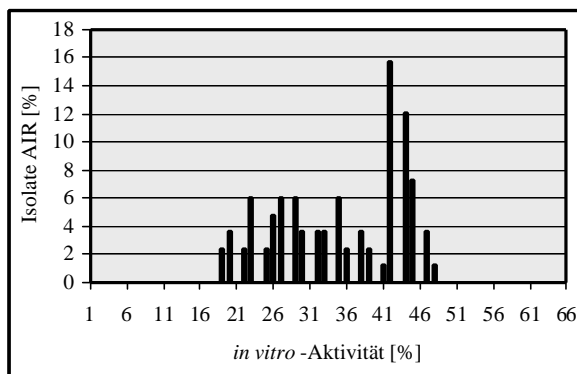


Abb. 3.6e: *in vitro*-Aktivitäten sämtlicher AIR-Isolate

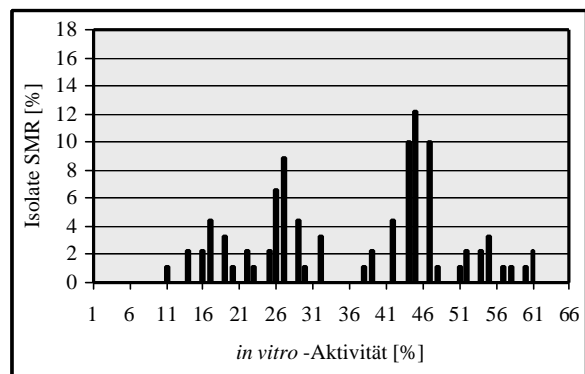


Abb. 3.6f: *in vitro*-Aktivitäten sämtlicher SMR-Isolate

In den Abb. 3.6e-f sind die *in vitro*-Aktivitäten sämtlicher SMR- und AIR-Isolate dargestellt. 12 bzw. 16 % der AIR-Isolate wiesen ein Maximum von 42 und 44 % *in vitro*-Aktivität auf. Von den SMR-Isolaten zeigten 7 bzw. 9 % ein Maximum von 25 und 26 % *in vitro*-Aktivität sowie 32 % ein Maximum von 44 bis 47 % *in vitro*-Aktivität. Merklich stoffwechselaktivere Stämme (14 % der Isolate) mit *in vitro*-Aktivitäten von 51 bis 61 % wurden nur aus dem SMR isoliert.

Auch die Gesamtaktivität als Mittelwert der *in vitro*-Aktivitäten wies die aus dem SMR isolierten Stämme als stoffwechselaktiver aus. Die SMR-Isolate zeigten eine Gesamtaktivität von 37,4 % (3-CBA-Isolate: 45,9 %, R2A-Isolate: 33,1 %), die AIR-Isolate kamen mit 35,4 % (3-CBA-Isolate: 43,3 %, R2A-Isolate: 31,8 %) auf eine geringere Gesamtaktivität.

### 3.1.4 Taxonomie der Bakterienisolate

Die aus den Mikrotiteransätzen gewonnenen Erkenntnisse über die metabolischen Fähigkeiten wurden zur taxonomischen Einordnung der isolierten Bakterien genutzt. Dazu wurde Bestimmungsliteratur (Balows et al. 1992, Bradbury 1984, Brock et al. 1994, Busse & Auling 1992, Holmes et al. 1984, Holmes et al. 1986a,b; Kappesser 1990, Kersters & De Ley 1984,

Krieg & Holt 1984, Palleroni 1984 und 1992) verwendet. Als Ergänzung wurde der API-Test 20 NE der Fa. BioMerieux herangezogen.

Tab. 3.4 gibt die Liste der Isolate wieder, die einer Gattung bzw. Spezies zugeordnet werden konnten. Im Speziesnamen ist die alte Bezeichnung in Klammern gesetzt.

Tab. 3.4: Taxonomische Einordnung der isolierten Bakterien.  
In Klammern: alter Name bzw. Häufigkeit der Spezies;  
fett gedruckt: Stämme mit großer Bedeutung für den 3-CBA-Abbau

Isolate SMR/R2A	Isolate AIR/R2A
<i>Acidovorax (Pseudomonas) delafieldii</i> (2)	<i>Acidovorax (Pseudomonas) delafieldii</i> (4)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (2)
<i>Aeromonas hydrophila</i> (3)	<b><i>Agrobacterium radiobacter</i></b>
<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b><i>Alcaligenes denitrificans</i></b> (4)
<b><i>Alcaligenes denitrificans</i></b>	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> (3)	<i>Alteromonas putrefaciens</i>
<i>Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta</i> (11)	<i>Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta</i>
<i>Burkholderia (Pseudomonas) mallei</i>	<i>Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes</i> (5)
<b><i>Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei</i></b> (10)	<i>Flavobacterium aquatile</i>
<i>Cardiobacterium hominis</i>	<i>Flavobacterium breve</i>
<i>Comamonas acidovorans</i>	<i>Hydrogenophaga (Pseudomonas) palleroni</i> (4)
<i>Empedobacter brevis (Flavobacterium breve)</i> (3)	<i>Kingella denitrificans</i>
<i>Methylobacterium mesophilicum (Ps. mesophil.)</i> (2)	<i>Methylobacterium mesophilicum (Ps. mesophilica)</i>
<i>Oligotropha (Pseudomonas) carboxydovorans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Pasteurella aerogenes</i>	<i>Myroides odoratus (Flavobacterium odoratum)</i> (2)
<i>Pseudomonas (Chryseomonas) luteola</i>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<b><i>Pseudomonas chlororaphis</i></b>
<i>Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens</i> (2)	" <i>Pseudomonas denitrificans</i> " (5)
<i>Sphingomonas (Pseudomonas) paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (13)
<b><i>Variovorax (Alcaligenes) paradoxus</i></b> (4)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>
	<b><i>Xanthomonas campestris</i></b>
nicht identifiziert: 8 Isolate	nicht identifiziert: 4 Isolate

Isolate SMR/3-CBA	Isolate AIR/3-CBA
<b><i>Variovorax (Alcaligenes) paradoxus</i></b> (6)	<b><i>Alcaligenes denitrificans</i></b> (18)
<b><i>Alcaligenes denitrificans</i></b> (8)	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> (3)
<i>Hydrogenophaga pseudoflava (Ps. carboxydofl.)</i> (2)	<b><i>Burkholderia (Pseudomonas) cepacia</i></b> (2)
<b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b> (2)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> (3)
<b><i>Xanthomonas campestris</i></b> (12)	

Die aus der Literatur abgeleiteten Gattungs- und Speziesnamen der Bakterienstämme wurden mit der gültigen Nomenklatur im Catalogue of Strains 1998 der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ 1998) und im Internet (2000) abgeglichen. Ein Großteil der Isolate musste in neu geschaffene bzw. andere Spezies eingeordnet werden.

In Tab. 3.4 ist erkennbar, dass auf 3-CBA wesentlich weniger Spezies isoliert wurden als auf R2A. Mit nur 5 bzw. 4 verschiedenen Spezies ließ sich auf 3-CBA nur ein relativ geringer Anteil der Mikroflora anreichern, der zum Teil nicht auf R2A-Medium wiederzufinden war. Die 56 Isolate AIR/R2A wurden 26 Spezies und die 60 Isolate SMR/R2A wurden 29 Spezies zugeordnet. Alle 173 Isolate waren Gram-negativ und zumeist Katalase-positiv. Ein Grund für das Fehlen Gram-positiver Bakterien ist nicht ersichtlich. In Belebtschlämmen überwiegen zwar Gram-negative Bakterien (Seiler & Busse 1978, Wetzel & Dott 1984, Kämpfer & Dott 1989), aber ein geringer Anteil von ungefähr 10 % Gram-positiven Bakterien an Abwasserisolaten wurde allgemein nachgewiesen (Kämpfer 1996).

Bezogen auf die alte Nomenklatur war das Artenspektrum in beiden Reaktoren recht begrenzt. Von den 90 Isolaten aus dem SMR wurden nach der alten Nomenklatur 39 % als *Pseudomonas* (neu: *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Hydrogenophaga*, *Methylobacterium*, *Oligotropha*, *Shewanella*, *Sphingomonas*), 13 % als *Xanthomonas*, 24 % als *Alcaligenes* (*Variovorax*) und 3 % als *Flavobacterium* (*Empedobacter*) eingeordnet. Die restlichen Anteile verteilten sich auf Vertreter der Gattungen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Cardiobacterium*, *Comamonas*, *Pasteurella* und *Xanthobacter*. 9 % der SMR-Isolate wurden nicht identifiziert.

Von den 83 Isolaten aus dem AIR wurden 37 % als *Pseudomonas*, 28 % als *Alcaligenes*, 5 % als *Xanthomonas* und 11 % als *Flavobacterium* (neu: *Chryseobacterium*, *Myroides*) identifiziert. Die restlichen Anteile entfielen auf die fünf Gattungen *Agrobacterium*, *Alteromonas*, *Kingella*, *Moraxella* und *Xanthobacter*. 5 % der AIR-Isolate wurden nicht identifiziert.

Die in Tab. 3.4 fett markierten Bakterienarten waren für den Abbau der 3-Chlorbenzoesäure im SMR und im AIR von besonderer Bedeutung. Sie wuchsen besonders gut auf 3-CBA und den weiteren angebotenen Aromaten und wiesen das breiteste Substratverwertungsspektrum auf. Insbesondere die Vertreter der Gattungen *Variovorax* (*Alcaligenes*) und *Burkholderia* (*Pseudomonas*) waren maßgeblich am 3-CBA-Abbau beteiligt.

Einen Rückschluss auf die Leistungsfähigkeit der Reaktoren ließ die Verteilung der verschiedenen Gattungen nicht zu. Allerdings war auffällig, dass die am besten auf 3-CBA wachsenden Bakterienstämme, die als *Variovorax* (*Alcaligenes*) *paradoxus* identifiziert wurden, nur im SMR zu finden waren (siehe Abb. 3.7).

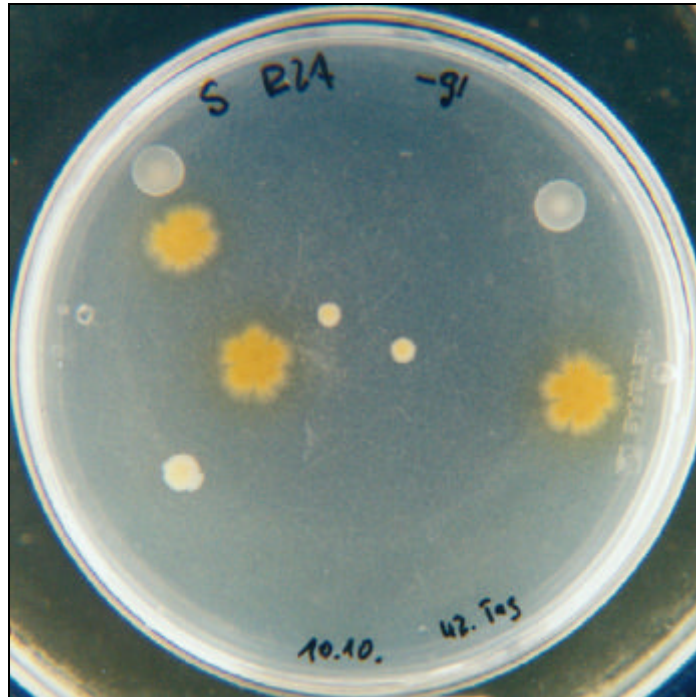


Abb. 3.7: Gelbe Kolonien von *Variovorax (Alcaligenes) paradoxus* auf R2A-Agarplatte

Diese Isolate wiesen auf R2A-Agar eine grelle gelbe Pigmentierung auf. Es handelte sich um dickliche Gram-negative Stäbchen mit 1-1,8  $\mu\text{m}$  Länge, die Oxidase- und Katalase-positiv waren. Durch die Rothera-Reaktion (Kap. 3.2.2, Süßmuth 1987, Tabor & Tabor 1970) wurde nachgewiesen, dass sie 3-Chlorbenzoesäure, 4-Chlorphenol und sowohl Catechol als auch Protocatechuat über die *ortho*-Spaltung abbauen. Sie wuchsen von allen Isolaten am besten auf den angebotenen Aromaten. Sie ähnelten in ihrem Verwertungsmuster den Vertretern der Gattung *Pseudomonas*, wurden aber über die Sequenzierung ihrer 16S-rRNA und dem anschließenden Datenbankabgleich der Gattung *Alcaligenes* zugeordnet. Durch die Sequenzierung wurden nur Bereiche des 16S-rRNA-Gens von *Alcaligenes sp.* erfasst. Zur endgültigen Identifizierung dieser Isolate als *Variovorax paradoxus* nach der gültigen Nomenklatur (DSMZ 1998/2000) waren die auffälligen Merkmale der Koloniemorphologie und das physiologische Verwertungsmuster unverzichtbar.

### 3.2 Beschreibung des Chloraromatenabbaus

Zur Beschreibung der Abbauege der eingesetzten Modellschadstoffe 3-Chlorbenzoesäure und 4-Chlorphenol wurden Untersuchungen zum Einfluss der Sauerstoff-Konzentration, zum Ringspaltungsmechanismus der aromatischen Kohlenwasserstoffe, zum Auftreten von Metaboliten, zur Reaktionskinetik und zum Zeitpunkt der Dechlorierung durchgeführt.

### 3.2.1 Einfluss der Sauerstoff-Konzentration

Um den Einfluss des Sauerstoffs zu ermitteln, der laut Bräutigam & Sekoulov (1986) in hohen Konzentrationen toxisch auf Bakterien wirkt, wurden in einer Blasensäule im Labormaßstab (3 l) Batch-Versuche zum Abbau von 3-CBA bei zwei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen (8 und 40 mg/l) durchgeführt. Dem SMR, der bis zu 40 mg/l  $O_2$  aufwies, konnte für diese Versuche nicht genügend Biomasse entnommen werden, ohne dessen Betrieb zu gefährden. Der TS-Gehalt der Biomasse in der Blasensäule lag bei 1,0 bis 1,2 g/l.

Der Blasensäule wurden 4 bzw. 8 ml der 0,6 M 3-CBA-Stammlösung zugeführt und der 3-CBA-Abbau als gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) bestimmt. Die Grundbelastung an DOC aus niedermolekularen Metaboliten, EPS und Lyseprodukten zwischen 50 und 75 mg/l wurde vom ersten Messwert abgezogen. Diese Werte waren höher als die von Wellens (1990) angegebenen 10 bis 20 mg DOC/l Grundbelastung. Die zugeführten 4 ml 3-CBA (125 mg/l) entsprechen rechnerisch einem DOC-Gehalt von 67 mg/l. In Abb. 3.8 ist der zeitliche Verlauf der DOC-Konzentration nach der 3-CBA-Zugabe dargestellt.

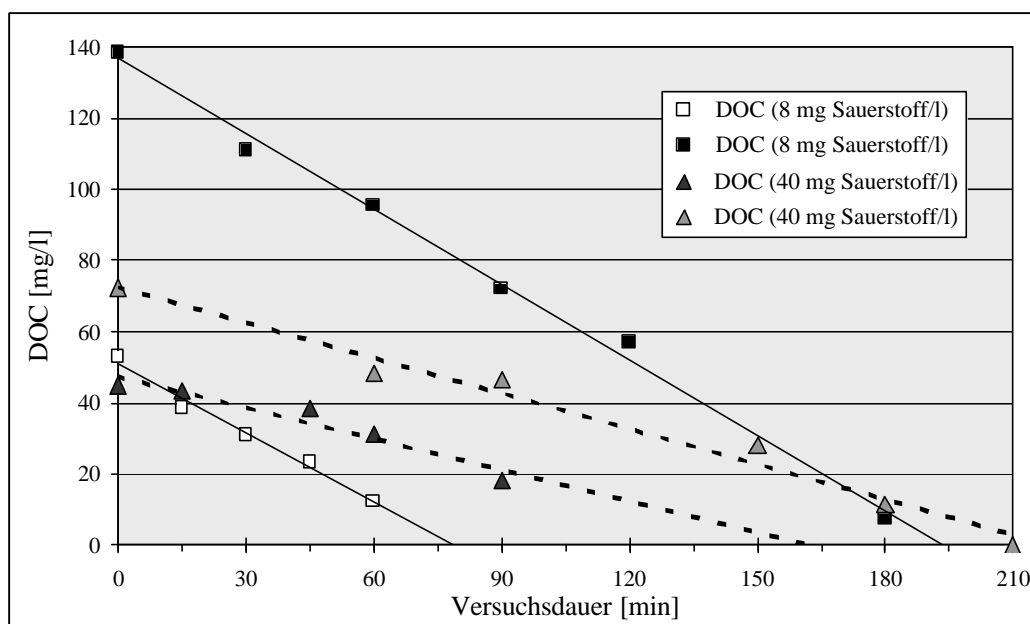


Abb. 3.8: Batch-Versuche zum Abbau von 3-Chlorbenzoesäure bei zwei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen in der Blasensäule

In der Blasensäule nahm der DOC-Gehalt bei 40 mg deutlich langsamer ab als bei 8 mg  $O_2/l$ , was auf eine Hemmung des 3-CBA-Abbaus durch sehr hohe  $O_2$ -Konzentrationen hinweist. Die Reaktionsgeschwindigkeit war für die beiden untersuchten  $O_2$ -Konzentrationen unabhängig von der DOC-Ausgangskonzentration gleich hoch. Die Versuche mit 8 mg/l  $O_2$  ergaben eine DOC-Abbaurrate von ungefähr 42 mg DOC/l·h, die Versuche mit 40 mg/l  $O_2$  erreichten nur ca. 20 mg DOC/l·h. Die Aussagekraft der Blasensäulen-Versuche wurde

allerdings dadurch eingeschränkt, dass die eingesetzte Kultur nach drei Tagen bereits an die Bedingungen in der Blasensäule mit einem niedrigen  $O_2$ -Gehalt adaptiert war.

Um den Einfluss des  $O_2$ -Gehalts auf eine an hohe  $O_2$ -Konzentrationen adaptierte Bakterienkultur zu untersuchen, wurde das Abgas aus dem SMR in einem Versuchsabschnitt im Kreislauf geführt. Damit konnten im SMR verschiedene  $O_2$ -Konzentrationen eingestellt und der Einfluss im praktischen Betrieb überprüft werden (Schierenbeck 1997). Die Versuchsreihen hierzu wurden im Institut für Umweltverfahrenstechnik durchgeführt. Die gemessenen Raum-Zeit-Ausbeuten sind in Abhängigkeit von der Schlammbelastung in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Schlammbelastung wurde durch Variation der Verweilzeit und der Zulaufkonzentration eingestellt. In diesem Zeitraum wurde der SMR zusätzlich zur 3-CBA mit dem leicht abbaubaren Na-Acetat beschickt, was auf die Aussagekraft bezüglich des  $O_2$ -Gehalts keine Auswirkung hatte.

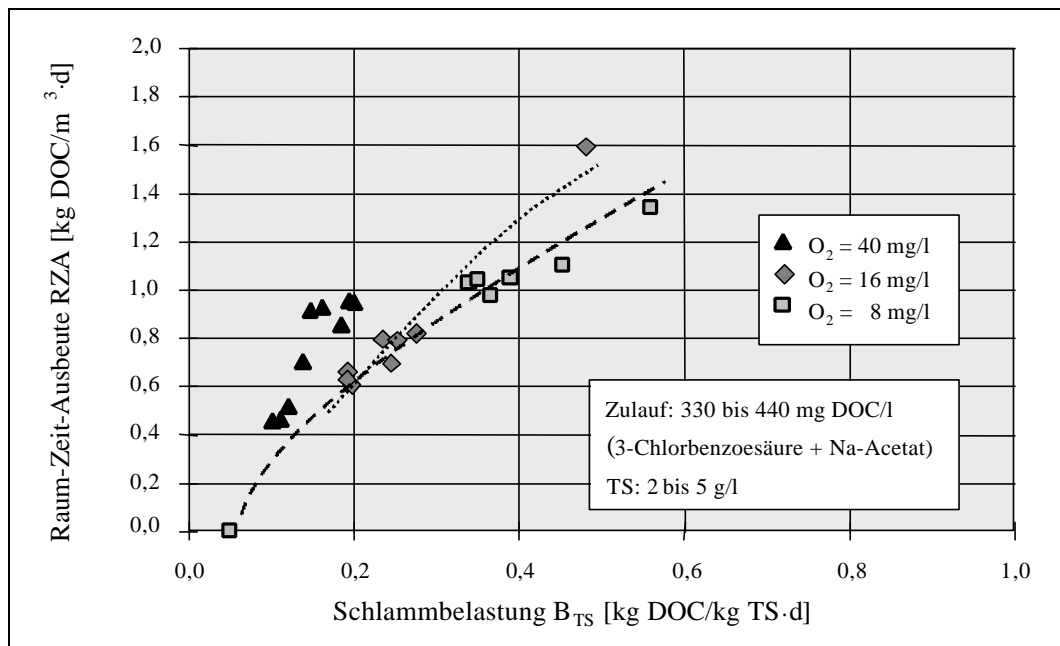


Abb. 3.9: Raum-Zeit-Ausbeute im SMR in Abhängigkeit der Schlammbelastung bei verschiedenen Sauerstoff-Konzentrationen (mod. nach Schierenbeck 1997)

Mit zunehmender Substratkonzentration im SMR, in Abb. 3.9 als Schlammbelastung dargestellt, nahm der Substratumsatz, als Raum-Zeit-Ausbeute angegeben, bei den drei verschiedenen  $O_2$ -Konzentrationen zu. Eine erhöhte  $O_2$ -Konzentration im Reaktor führte zu einem schnelleren Anstieg der Raum-Zeit-Ausbeute. Im Gegensatz zu den Versuchen in der Blasensäule wurde der 3-CBA-Abbau durch höhere  $O_2$ -Konzentrationen beschleunigt.

Auch aus den in Abb. 3.10 dargestellten Ergebnissen zur Abhängigkeit des mittleren DOC-Umsatzgrades von der  $O_2$ -Konzentration wird deutlich, dass, anders als von Bräutigam &

Sekoulov (1986) angegeben, keine Hemmung bei einer hohen O<sub>2</sub>-Konzentration auftrat. Der erzielte Umsatzgrad stieg beim Abbau der verwendeten organischen Kohlenstoffquellen mit zunehmender O<sub>2</sub>-Konzentration an.

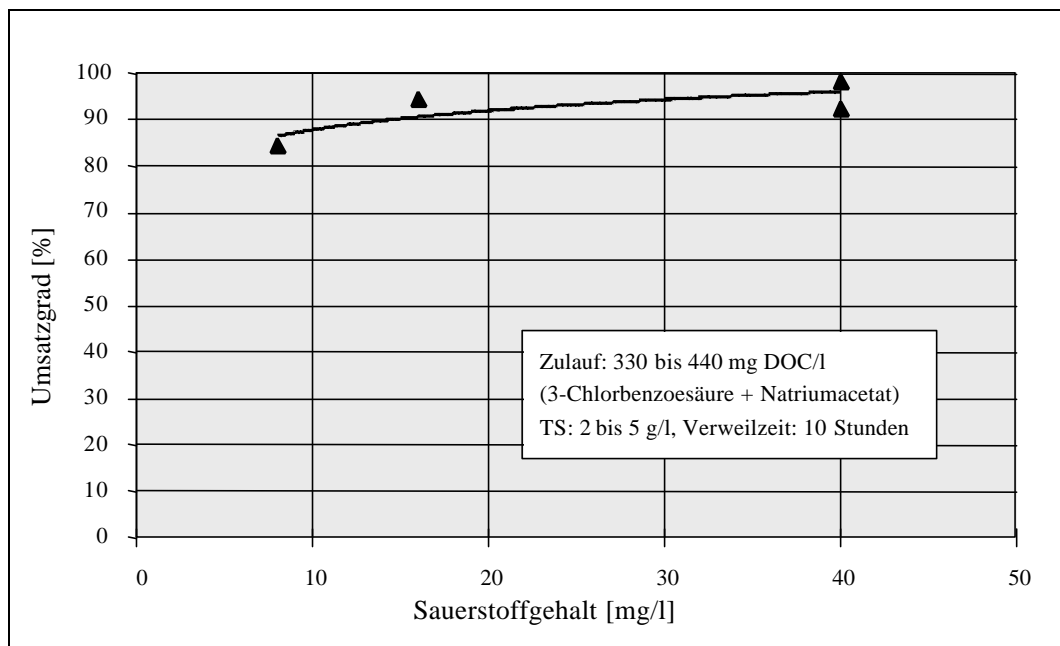


Abb. 3.10: Umsatzgrad in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration im SMR (aus: Schierenbeck 1997)

### 3.2.2 Nachweis der Aromatenringspaltung

Der in den Biozönosen hauptsächlich beschrittene Weg der aromatischen Ringspaltung wurde über die Entstehung eines roten Farbstoffs in der Rothera-Reaktion (Focht & Shelton 1987) ermittelt. Durch die Rotfärbung wurde mit 3-Oxoadipyl-CoA ein Metabolit nachgewiesen, der mehrere Reaktionsschritte nach der *ortho*-Spaltung von Catechol und Protocatechuat auftritt (Süßmuth 1987, Lidstrom 1990).

Über den *ortho*-Weg wurden im SMR und im AIR 3-Chlorbenzoesäure, 4-Chlorphenol sowie Catechol und Protocatechuat als zentrale Metabolite des aeroben Aromatenabbaus gespalten. Für die Biozönosen der beiden Rührkolben ergab sich das gleiche Ergebnis. Die isolierte Reinkultur *Variovorax paradoxus* aus dem SMR zeigte ebenfalls eine *ortho*-Spaltung von 3-CBA, 4-CP und Catechol. Durch photometrische Messungen im Spektralphotometer bei 260 nm wurden zudem in Vorversuchen (Lampe 1998) die *ortho*-Spaltungsprodukte *cis,cis*-Muconat als Metabolit des Catechol-Abbaus und *cis,cis*-Muconat bzw. Chlor-*cis,cis*-Muconat als Metabolit des 3-CBA-Abbaus durch Enzymrohextrakte des SMR nachgewiesen.



Eine *meta*-Spaltung des aromatischen Rings beim Abbau von 3-CBA, 4-CP, Catechol und Protocatechuat durch Proben aus dem SMR, dem AIR und den Rührkolben war durch den optischen Farbttest nicht nachweisbar. Auch die direkte photometrische Bestimmung von Metaboliten bei bestimmten Wellenlängen im Spektralphotometer durch Enzymrohextrakte aus dem SMR zeigte keinen Abbau von 3-CBA bzw. Catechol und Protocatechuat über die *meta*-Spaltung des aromatischen Rings (Lampe 1998).

### 3.2.3 Nachweis der Metaboliten des Chloraromatenabbaus

Der Abbau der Schadstoffe wurde über die Aufnahme von UV/VIS-Absorptionsspektren mittels UV-Spektroskopie und HPLC verfolgt. Mögliche Metabolite wurden anhand ihrer Absorptionsmaxima nachgewiesen. Eine Identifizierung der Metabolite sollte über die Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie erfolgen. In diese Untersuchungen wurden die Versuche zur Abbaukinetik mit den Mischkulturen aus dem SMR und den Rührkolben sowie Versuche mit Reinkulturen einbezogen. Die über mehrere Jahre im Institut für Umweltverfahrenstechnik gespeicherten HPLC-Daten der routinemäßigen Betriebskontrollen des SMR und des AIR wurden bezüglich des Auftretens von Metaboliten ausgewertet.

#### 3.2.3.1 Nachweis von Metaboliten des 3-Chlorbenzoesäure-Abbaus

In Vorversuchen wurden in mehreren Batch-Versuchen zum 3-CBA-Abbau im SMR mittels UV-Spektroskopie Peaks von Metaboliten bei 260 nm festgestellt. Ein Verlauf des 3-CBA-Abbaus anhand der Absorptionsspektren ist in Abb. 3.11 dargestellt. Laut Ngai et al. (1990) absorbieren *cis,cis*-Muconat oder Chlor-*cis,cis*-Muconat bei 260 nm besonders stark. In einem Parallelversuch mit Na-EDTA-Zugabe war eine Erhöhung dieser Peaks zu beobachten, was auf die von Siström & Stanier (1954), Hegemann (1965) und Ngai et al. (1990) beschriebene Hemmung des Enzyms Muconat-Cycloisomerase durch Na-EDTA zurückzuführen war. Aber auch ohne EDTA reicherten sich Metabolite an dieser Stelle des Metabolismus an, was der auffallend hohe Peak bei 260 nm anzeigte.

In Abb. 3.11 ist zum Vergleich das UV-Spektrum von *cis,cis*-Muconat (1 mM in Aqua bidest.) eingefügt. Die Spektren von *cis,cis*-Muconat und dem Metaboliten zeigen eine große Übereinstimmung. Da aber die Peakform leicht abweicht und kein gemeinsamer Schnittpunkt der Spektren im Verlauf des 3-CBA-Abbaus zu erkennen ist, muss davon ausgegangen werden, dass der Peak nach 15 Minuten nicht nur durch *cis,cis*-Muconat erzeugt wurde und sich folglich die Spektren von mehreren Metaboliten überlagerten. Die fehlende Auftrennung von Substanzen im UV-Spektrometer beeinträchtigte die Unterscheidung von Substrat- und Metabolitenanteilen in den Spektren.

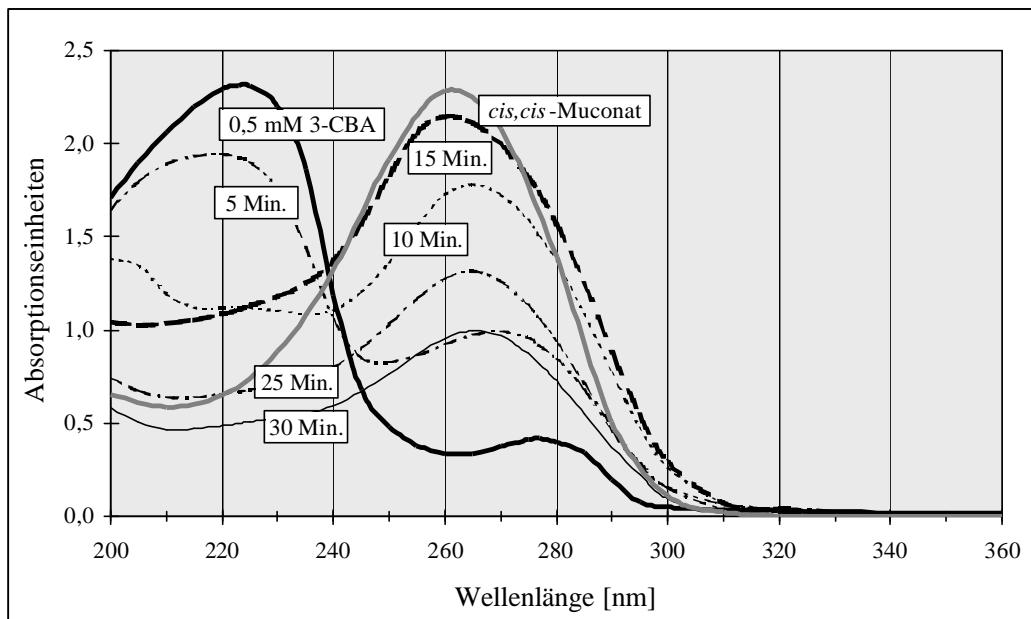


Abb. 3.11: UV-Absorptionsspektren von 3-CBA und Metaboliten beim Abbau durch SMR-Kultur

Der 3-CBA-Abbau war nach 40 Minuten abgeschlossen. Die Zeiten sämtlicher Abbaureihen der von Lampe (1998) durchgeführten Vorversuche variierten von 30 bis 180 Minuten und ließen eindeutig auf den Aktivitätszustand der Biomasse schließen. Bei einem verzögerten Abbau von mehr als 60 Minuten wurden in den SMR-Proben nie Metabolite gefunden. Aber auch der Nachweis der Peaks bei 260 nm war nur für einen kurzen Zeitraum im 3-CBA-Betrieb des SMR möglich. In später folgenden Versuchen wurden entweder keine Metaboliten nachgewiesen oder auftretende Peaks waren verschoben.

Die Recherche in den gespeicherten HPLC-Daten mehrerer hundert Proben aus der routinemäßigen Kontrolle des 3-CBA-Abbaus in den Reaktoren ergab nur in wenigen Proben Signale, die auf die Bildung von Metaboliten hindeuteten. In einigen Absorptionsspektren von SMR-Proben wurden Peaks bei 290 nm festgestellt, die auf 3-Carboxy-*cis,cis*-Muconat als *ortho*-Ringspaltungsprodukt im Abbauweg von Protocatechuat hinweisen. In einigen AIR-Spektren wurden Peaks bei 280 nm erfasst, die keiner Verbindung zugeordnet werden konnten. Ansonsten wurden keine Metabolitenpeaks festgestellt.

In den Batch-Versuchen zur Abbaukinetik mit den Mischkulturen aus den Rührkolben und den Versuchen mit Reinkulturen traten hingegen Metabolite auf. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt. In fast allen 3-CBA-Abbauversuchen mit Rührkolben-Kulturen wurden unmittelbar nach Reaktionsstart sehr geringe Konzentrationen eines Metaboliten bzw. einer Mischung verschiedener Verbindungen angereichert, die im Versuchszeitraum wieder abnahmen, aber auch noch nach Abbau der 3-CBA messbar waren. Die geringen Konzentrationen konnten mit dem Spektralphotometer nicht gemessen werden. Im Unterschied zum

SMR war die Abbaugeschwindigkeit der 3-CBA im Rührkolben für eine Metabolitenanreicherung nicht von Bedeutung.

Die Abbildungen 3.12a,b und 3.13a,b wurden wie die weiteren Abbildungen mit der Software HP ChemStation erstellt. Sie zeigen die Intermediate in den Spektren des Dioden Array Detectors (DAD) des HPLC (HP Series II 1090 LC) vom 9. 3-CBA-Abbauversuch durch die Rührkolben-Kultur 100 Minuten nach einer 1 mM 3-CBA-Zugabe mit und ohne Einfluss von Na-EDTA.

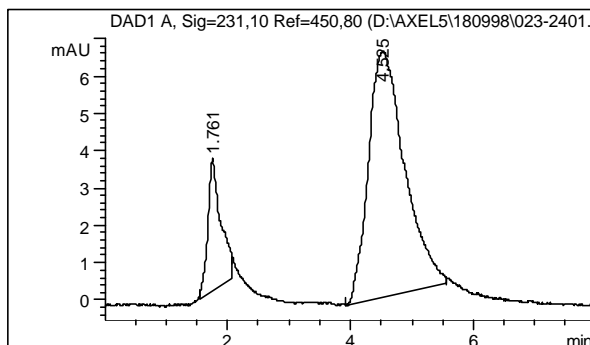


Abb. 3.12a: 9. 3-CBA-Abbau 100 Minuten, Peak von Metabolit nach 1,761 und 3-CBA nach 4,525 Minuten

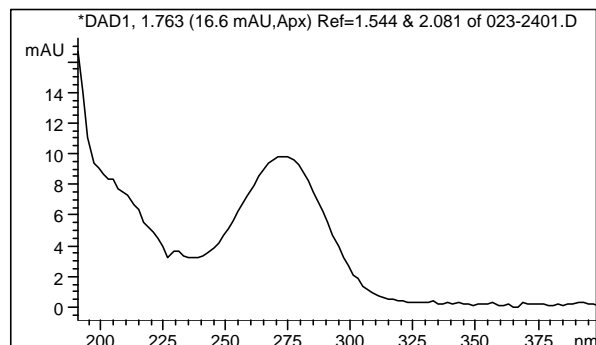


Abb. 3.12b: 9. 3-CBA-Abbau 100 Minuten, UV-Spektrum des Metaboliten-peaks nach 1,761 Minuten

Der nach 1,761 Minuten aufgetretene Metabolit hatte ein Absorptionsmaximum bei 275 nm und lag in einer sehr geringen Konzentration vor. Das Peakmaximum betrug 10 mAU (milli absorbance units). Das UV-Spektrum in Abb. 3.12b entspricht in seiner Form dem in allen 3-CBA-Abbauversuchen ohne EDTA (vergl. Kap. 3.2.4.1) vorgefundenen Spektrum eines Metaboliten bzw. eines Gemisches, wie auch den Abbildungen 3.14a,b zu entnehmen ist. Die Retentionszeit (ca. 1,76 Minuten) war in allen Versuchen gleich. Der 3. Abbauversuch mit 0,5 mM 3-CBA-Ausgangskonzentration ist im Anhang A.4 und in den Abbildungen 3.14a-h dargestellt. Diese Spektren wurden mit dem HPLC-Massenspektrometer erstellt und weisen in Folge anderer Trennbedingungen Unterschiede im DAD-Spektrum auf.

Die Abbildungen 3.13a,b zeigen den 9. 3-CBA-Abbauversuch unter Einfluss der EDTA-Zugabe. Das nach 1,686 Minuten aufgetretene Metabolitengemisch (Abb. 3.13b) war zwar vom EDTA (1,542 Minuten) nicht gut getrennt, hatte aber trotzdem ein gut detektierbares Maximum bei 275 nm und lag in einer geringen Konzentration vor. Das Peakmaximum erreichte 30 mAU. Das UV-Spektrum ähnelt zwar in seiner Form dem in Abb. 3.12b gezeigten, hatte aber nicht die gleiche Retentionszeit. Untersuchungen der AG Leibfritz mit NMR-Spektroskopie ergaben, dass dieser Peak das Ergebnis von mindestens zwei Metaboliten mit unterschiedlicher Struktur war. In Anwesenheit von EDTA wurde eine aromatische Struktur mit drei benachbarten Substituenten und der gleiche Metabolit gebildet, der im

Ansatz ohne EDTA gefunden wurde. Diese Struktur konnte in Folge der zu geringen Konzentration mit der NMR-Spektroskopie nicht vollständig aufgeklärt werden, trug aber wahrscheinlich eine Carboxylgruppe und könnte einen Ringschluss aufgewiesen haben (Engelmann 2000, pers. Mitteilung).

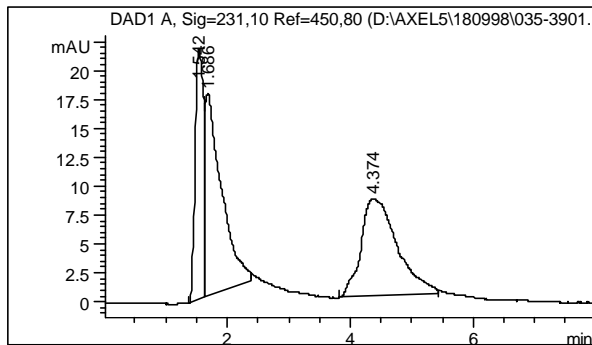


Abb. 3.13a: 9. 3-CBA-Abbau+EDTA 100',  
Peak von EDTA, Metabolit  
und 3-CBA

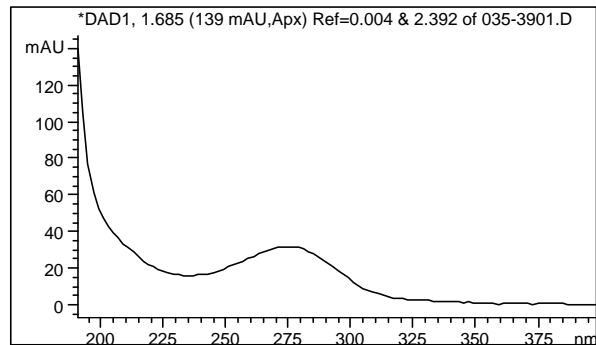


Abb. 3.13b: 9. 3-CBA-Abbau+EDTA 100',  
UV-Spektrum des Metaboliten-  
peaks nach 1,686 Minuten

In den Abbildungen 3.14a-h ist der 3. 3-CBA-Abbauversuch nach 60 Minuten dargestellt. In Abb. 3.14a ist das DAD-Signal des HPLC-Massenspektrometers (HP Series 1100 MSD mit integriertem Dioden Array Detector) zu sehen, in Abb. 3.14b das MSD-Signal. Die Auftrennung erfolgte im HPLC-Massenspektrometer mit Methanol. Die entsprechenden DAD-Spektren des HPLC mit Acetonitril/Puffer als Fließmittel (DAD1 A, siehe Anhang A.4) waren nahezu deckungsgleich mit den Spektren in den Abbildungen 3.12a,b.

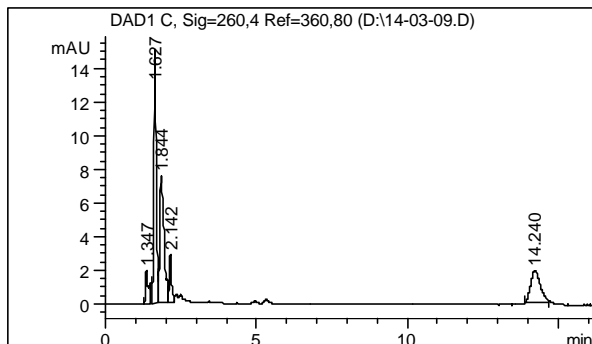


Abb. 3.14a: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten,  
DAD-Signale der Metaboliten  
und von 3-CBA (14,24 Minuten)

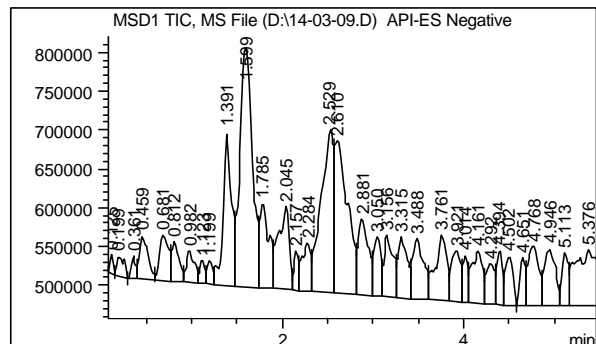


Abb. 3.14b: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten,  
MSD-Signale der Metaboliten

Der Metabolitenpeak in Abb. 3.14a wurde durch den Austausch von Acetonitril gegen Methanol als Fließmittel erheblich besser aufgetrennt als der Metabolitenpeak der Abb. 3.12a. Daher kann das UV-Spektrum in Abb. 3.12b nicht von einer Reinsubstanz stammen.

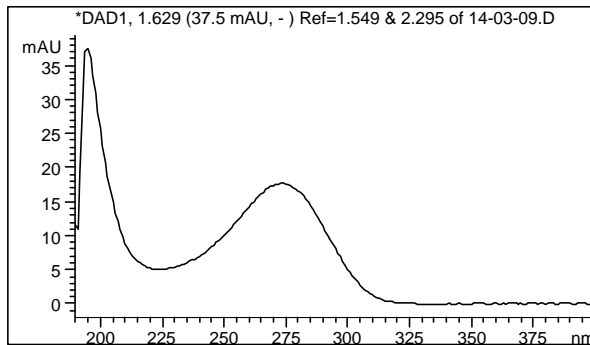


Abb. 3.14c: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten,  
UV-Spektrum des Metaboliten-  
peaks nach 1,629 Minuten

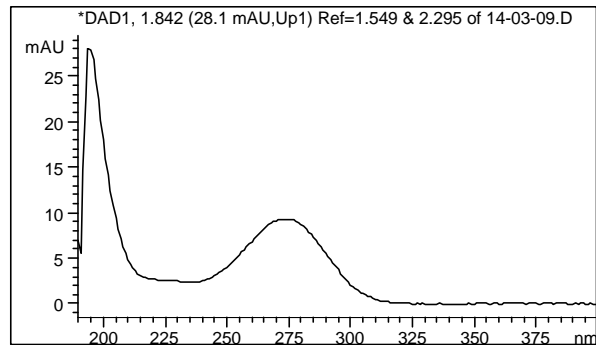


Abb. 3.14d: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten,  
UV-Spektrum des Metaboliten-  
peaks nach 1,842 Minuten

In den Abbildungen 3.14c und 3.14d sind die UV-Spektren des getrennten Metabolitenpeaks zu sehen. Die Peaks bei 195 nm waren auf das Lösemittel zurückzuführen. Das Absorptionsmaximum lag jeweils bei 275 nm. Im Massenspektrum (Abb. 3.14b) sind im Bereich der Metaboliten mehrere Peaks zu erkennen.

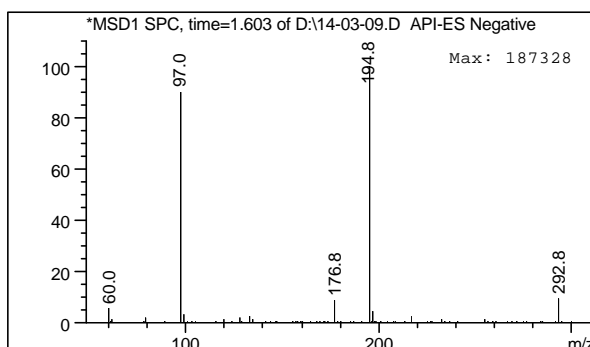


Abb. 3.14e: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten,  
Massenspektrum des Metabo-  
litenpeaks nach 1,603 Minuten

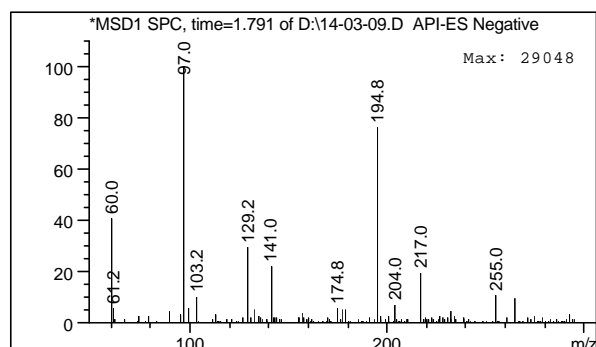


Abb. 3.14f: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten,  
Massenspektrum des Metaboliten-  
peaks nach 1,791 Minuten

In den Abbildungen 3.14e und 3.14f sind die Massenspektren dargestellt, die den DAD-Spektren zeitlich am nächsten liegen. Sie konnten nicht genau zugeordnet werden. Nach der Trennung in der Säule passiert die Probe den Detektor, bevor sie im Massenspektrometer ionisiert wird. Das Massenspektrum einer Probe erscheint daher normalerweise 0,03 bis 0,2 Minuten nach dem DAD-Spektrum. Der MSD-Peak nach 1,603 Minuten zeigt genau das Fragmentmuster, das in den Massenspektren vieler Proben zu erkennen war und über die Untersuchung des Mineralsalz-Mediums (siehe Anhang A.4) als Fragmentmuster dieser Salzlösung identifiziert wurde. Die Retentionszeit lag zwischen 1,589 und 1,729 Minuten. Auch der MSD-Peak nach 1,791 Minuten lag mit seiner Retentionszeit genau zwischen den DAD-Peaks und zeigte eine sehr schlechte Fragmentierung und einige "Mineralsalzfragmente". Mit dem Massenspektrometer konnten in diesen Proben keine Metabolite detektiert

werden. Die als Intermediate erfassten chromophoren Substanzen in beiden UV-Spektren (Abb. 3.14c,d) müssen nicht ionisierbar gewesen sein und konnten daher nicht im Massenspektrum dargestellt werden (Kienzler 2000, pers. Mitteilung).

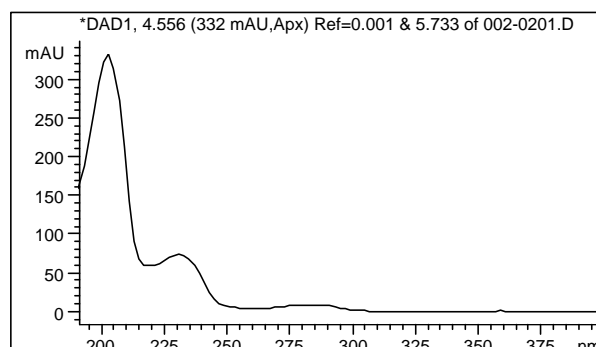


Abb. 3.14g: UV-Spektrum von 3-CBA

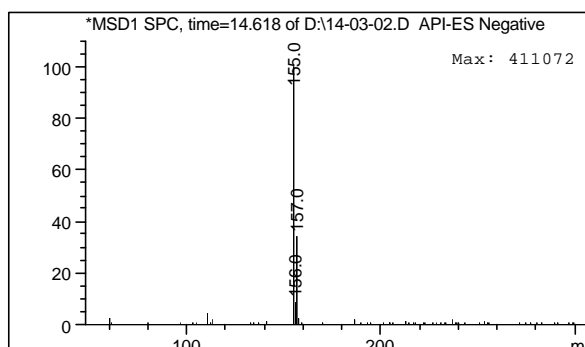
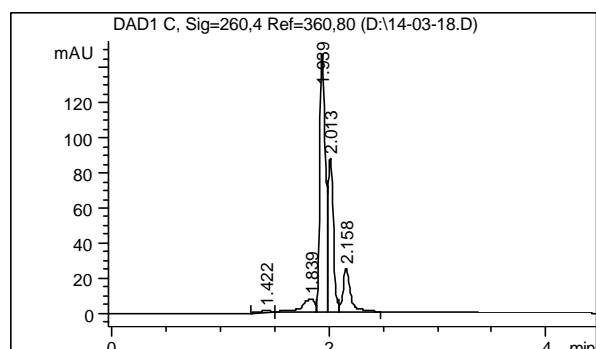
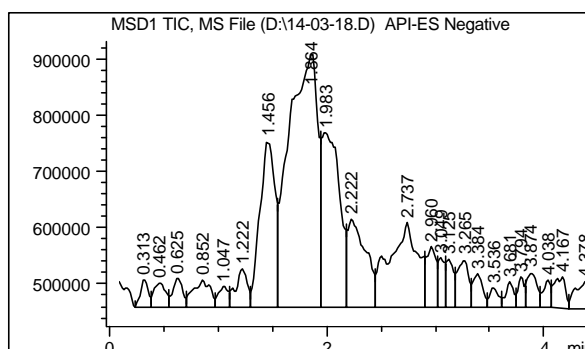


Abb. 3.14h: Massenspektrum von 3-CBA

Die Abbildungen 3.14g,h zeigen das typische UV-Spektrum von 3-CBA sowie das Fragmentmuster im Massenspektrum mit dem Molekülion von 155 m/z und den Isotopenpeaks (m/z entspricht der Massenzahl, m = Ionenmasse, z = Ionenladung). Die Chlorisotopen  $^{35}\text{Cl}$  und  $^{37}\text{Cl}$  treten ungefähr im Verhältnis von 100:32 auf (Mortimer 1987). Die Molekülmassen der relevanten Verbindungen, mit deren Hilfe die Zuordnung der aufgefundenen Fragmente erfolgte, sind im Anhang A.4 dargestellt.

Im 3-CBA-Betrieb des Rührkolbens wurde häufiger ein Metabolitengemisch nachgewiesen. Die Abbildungen 3.15a-g zeigen die Spektren des Metabolitengemisches, das die Folge eines unvollständigen 3-CBA-Abbaus durch Störungen war. Die abzentrifugierte Probenlösung wies eine ungewöhnliche gelbe Färbung auf. Wie im SMR waren unter stabilen Bedingungen keine Metabolite nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Abbaueversuchen im Batch-Ansatz war die Retentionszeit verschoben, die Peaks traten erst nach 1,9 Minuten auf.

Abb. 3.15a: RK 23.01.98 (3-CBA),  
DAD-Signale der MetabolitenAbb. 3.15b: RK 23.01.98 (3-CBA),  
MSD-Signale der Metaboliten

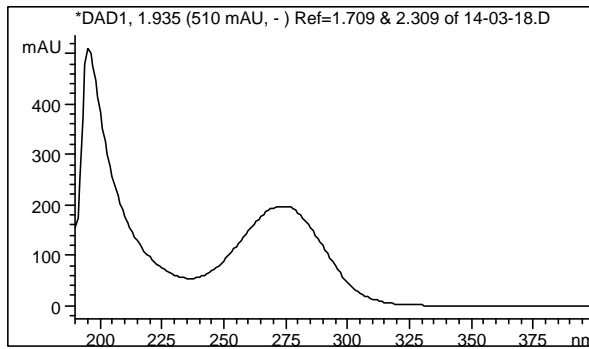


Abb. 3.15c: RK 23.01.98 (3-CBA),  
UV-Spektrum des Metaboliten-  
peaks nach 1,935 Minuten

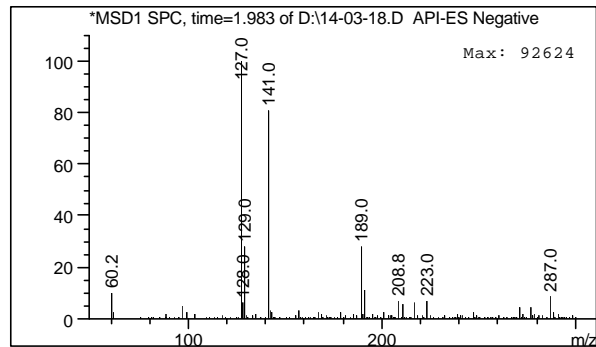


Abb. 3.15d: RK 23.01.98 (3-CBA), Massen-  
spektrum des Metabolitenpeaks  
nach 1,983 Minuten

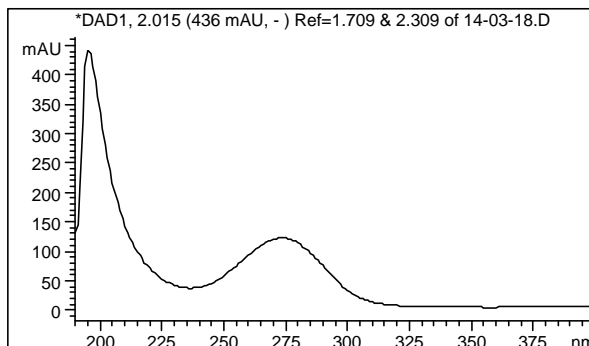


Abb. 3.15e: RK 23.01.98 (3-CBA), UV-Spektrum des Metabolitenpeaks nach 2,015 Minuten

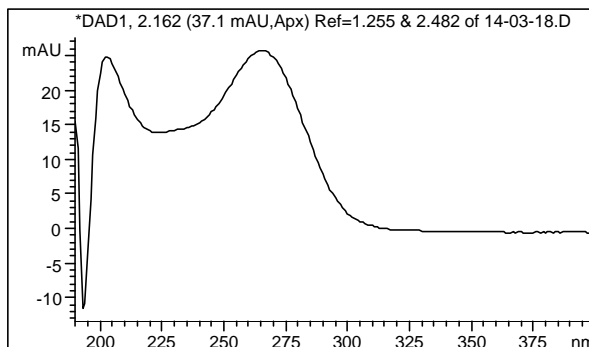


Abb. 3.15f: RK 23.01.98 (3-CBA),  
UV-Spektrum des Metaboliten-  
peaks nach 2,162 Minuten

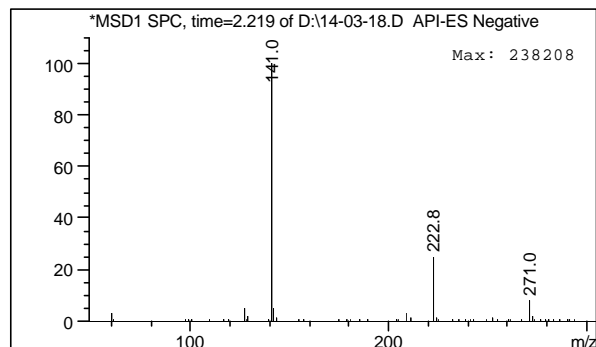


Abb. 3.15g: RK 23.01.98 (3-CBA), Massen-  
spektrum des Metabolitenpeaks  
nach 2,219 Minuten

Die aufgetrennten Metabolitenpeaks in Abb. 3.15a kamen etwas später aus der Säule als die bisher gezeigten Intermediate. Den Hauptanteil hatten die Peaks nach 1,939 und 2,013 Minuten. Die beiden dazugehörigen UV-Spektren (Abb. 3.15c,e) hatten wieder ein Absorptionsmaximum von 275 nm und waren fast deckungsgleich. Das Massenspektrum des Peaks nach 1,983 Minuten (Abb. 3.15d) ist nicht gut aufgespalten, was die große Zahl von Banden

zeigt und weist ein Gemisch aus Metaboliten aus. Es erschien ein Metabolitenfragment, das mit 127 m/z zwar die Masse von 4-Chlorphenol besaß, aber nicht die zu erwartende Chlorisotopenverteilung und das dazugehörige UV-Spektrum aufwies (vgl. Abb. 3.18c,d). Die chromatografische Auftrennung war sowohl im UV- als auch im Massenspektrum (Abb. 3.15a,b) nicht ausreichend. Eine sehr hohe Bande zeigte das Fragment mit der Masse 141 m/z. Nach 2,162 Minuten (Abb. 3.15f) erschien ein weiterer Metabolitenpeak im DAD-Spektrum, der im Massenspektrum ein Fragment von 141 m/z aufwies. Das Absorptionsmaximum im UV-Spektrum lag bei 266 nm. Eine Zuordnung zu einer Verbindung war nicht möglich.

Die aus dem SMR isolierte Reinkultur *Variovorax paradoxus* wurde auf den Abbau von bis zu 2 mM 3-CBA pro Tag getestet, wobei regelmäßig ein Metabolit nachgewiesen wurde. Er ist im DAD-Spektrum der Abb. 3.16a nach 1,990 Minuten und im MSD-Spektrum der Abb. 3.16b nach 2,058 Minuten zu sehen.

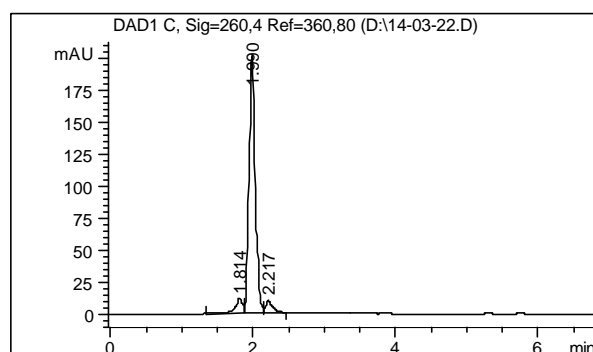


Abb. 3.16a: *Variovorax paradoxus* (3-CBA), DAD-Signal des Metaboliten

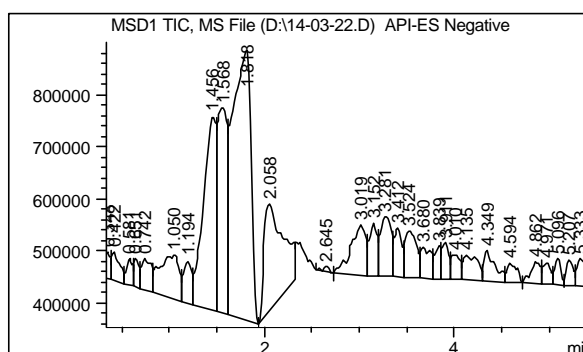


Abb. 3.16b: *Variovorax paradoxus* (3-CBA), MSD-Signale des Metaboliten

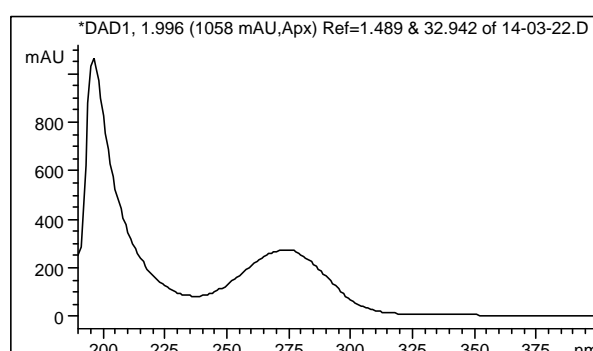


Abb. 3.16c: *Variovorax paradoxus* (3-CBA), UV-Spektrum des Metaboliten-peaks nach 1,996 Minuten

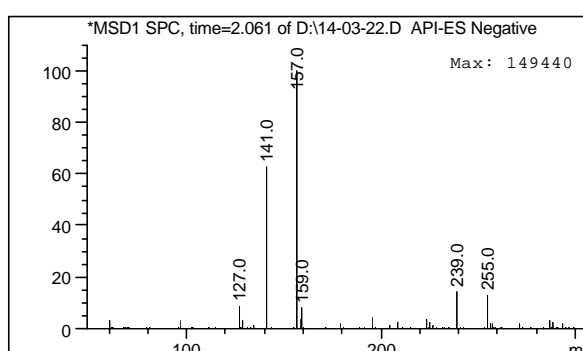


Abb. 3.16d: *Variovorax paradoxus* (3-CBA), Massenspektrum des Metaboliten-peaks nach 2,061 Minuten

Der in Abb. 3.16c gezeigte Metabolit hatte das UV-Maximum bei 275 nm, ein ähnliches Spektrum wie der Metaboliten des Rührkolbens (Abb. 3.15e) und wies fast die gleiche





Muconat im Massenspektrometer hinwies. Beide Teile des Doppelpeaks waren sowohl in den UV- als auch den Massenspektren fast deckungsgleich. Wurde Methanol als Lösungsmittel eingesetzt, trat nur ein Peak auf.

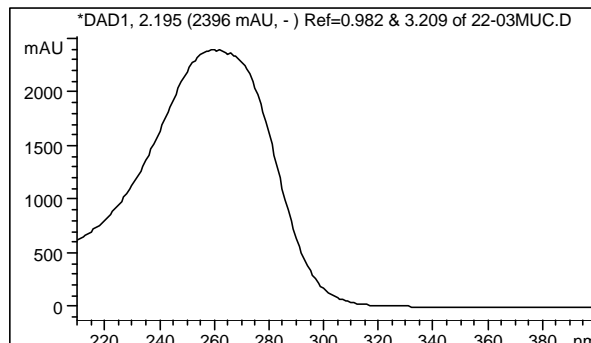


Abb. 3.17e: UV-Spektrum des zweiten *cis,cis*-Muconat-Peaks nach 2,195 Minuten

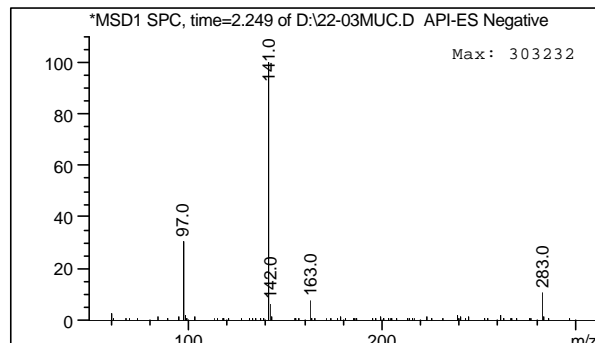


Abb. 3.17f: Massenspektrum des zweiten *cis,cis*-Muconat-Peaks nach 2,249 Minuten

In den Abbildungen 3.17c-f sind die für *cis,cis*-Muconat typischen UV-Spektren mit dem Absorptionsmaximum bei 260 nm und die Massenspektren zu sehen. Die Massenzahl 141 m/z kennzeichnete das Molekülion nach Protonenabspaltung, die Massenzahl 97 m/z die Abspaltung einer COO-Gruppe und die Massenzahl 283 m/z die Zusammenlagerung zweier Molekülionen. Treten die Fragmente von 97 und 141 m/z in gleicher Höhe auf, handelte es sich bei der Verbindung nicht um *cis,cis*-Muconat sondern um *trans,trans*-Muconat, wie die Vermessung von *trans,trans*-Muconat ergab.

In allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben des 3-CBA-Abbaus wurde kein zweites Mal der Metabolit nachgewiesen, der ein Absorptionsspektrum zeigt, wie es in der Abb. 3.11 zu sehen war. Alle festgestellten Metabolite oder Metabolitengemische absorbierten bei anderen Wellenlängen als 260 nm. Damit konnte *cis,cis*-Muconat mittels HPLC und HPLC-MS nicht als Intermediat identifiziert werden.

### 3.2.3.2 Nachweis von Metaboliten des 4-Chlorphenol-Abbaus

In den Abbaueversuchen von 4-CP mit den Mischkulturen aus dem SMR und dem Rührkolben wurden keine Metabolite nachgewiesen, es war lediglich die Abnahme von 4-CP messbar.

Die aus dem SMR isolierte Reinkultur *Variovorax paradoxus* baute bis zu 1 mM 4-CP pro Tag vollständig ab, wobei keine Metabolitenanreicherung zu beobachten war. Höhere Konzentrationen führten zu einer Hemmung des Abbaus.

In den Rührkolben im 4-CP-Betrieb traten jedoch an einigen Tagen äußerst geringe Konzentrationen an Metaboliten auf. In den UV-Spektren des Spektralphotometers von frisch abzentrifugierten Proben zeigten sich Peaks bei 380 nm. Zumeist fiel das Auftreten mit Störungen des 4-CP-Abbaus zusammen. Die in den folgenden Abbildungen 3.18a-f dargestellten Spektren stammten aus einer gelbgefärbten Belebtschlammprobe, die noch eine Restkonzentration an 4-CP aufwies. In der HPLC war das Absorptionsmaximum von 380 nm nach der Lagerung der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nicht mehr nachweisbar.

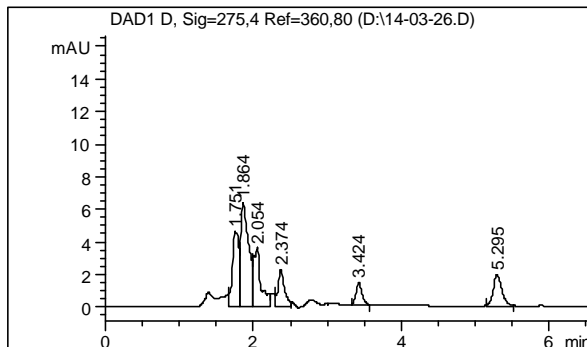


Abb. 3.18a: RK 07.08.98 (4-CP),  
DAD-Signale der Metaboliten

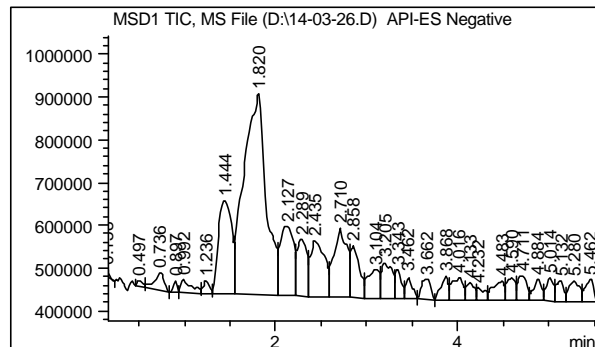


Abb. 3.18b: RK 07.08.98 (4-CP), MSD-  
Signale der Metaboliten

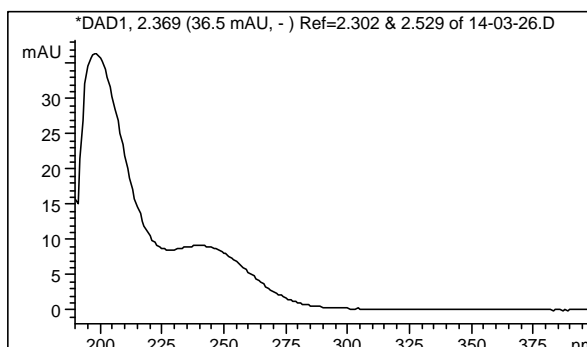


Abb. 3.18c: RK 07.08.98, UV-Spektrum  
des Metabolitenpeaks nach  
2,369 Minuten

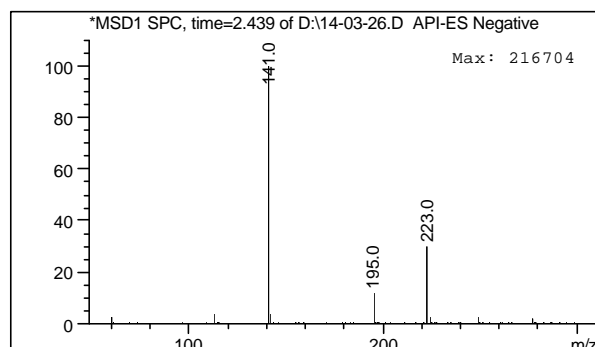


Abb. 3.18d: RK 07.08.98, Massenspektrum  
des Metabolitenpeaks nach  
2,439 Minuten

Im DAD-Spektrum (Abb. 3.18a) waren mehrere kleine Metabolitenpeaks zu erkennen, von denen nur der Peak nach 2,369 Minuten im UV-Spektrum (Abb. 3.18c) ein auswertbares Massenspektrum mit Fragmenten einer Massenzahl von 141 und 223  $m/z$  besaß. Einem bekannten Muster konnten diese Fragmente nicht zugeordnet werden.

Die Abbildungen 3.18e,f zeigen das typische UV-Spektrum sowie das Molekülion mit der Massenzahl 127  $m/z$  und der charakteristischen Chlorisotopenverteilung von 4-CP.

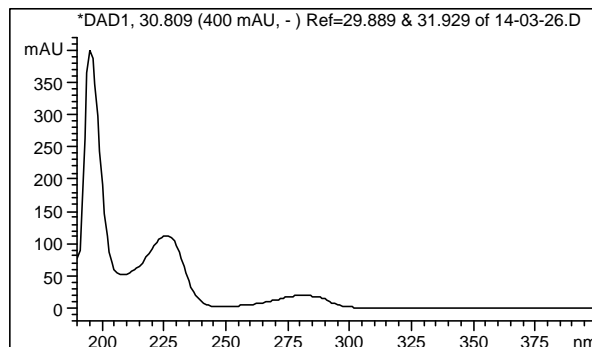


Abb. 3.18e: RK 07.08.98, UV-Spektrum von 4-CP nach 30,809 Minuten

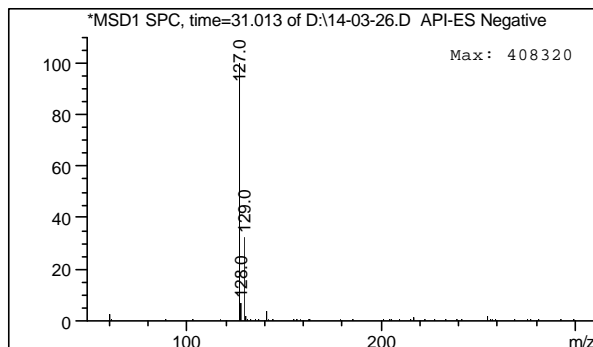


Abb. 3.18f: RK 07.08.98, Massenspektrum von 4-CP nach 31,013 Minuten

### 3.2.4 Abbaukinetik des Chloraromatenabbaus

#### 3.2.4.1 3-Chlorbenzoesäure-Abbaukinetik

Die Versuche zur Reaktionskinetik klärten zugleich über die Dauer des Abbaus und den Zeitpunkt der Dechlorierung auf. Der 3-CBA-Abbau wurde nach Stoßbelastungen mit 0,5 und 1,0 mM 3-CBA (2,0 mM nur im Fermenter) erfasst. Die kinetischen Parameter wurden über die Linearisierungen nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee zur Ermittlung von  $v_{\max}$  und  $K_S$  sowie nach Dixon-Webb zur Ermittlung von  $K_I$  berechnet.

Der größte Teil der 3-CBA-Abbaukinetikversuche wurde mit Rührkolben-Proben im Röhrenansatz ausgeführt, um den Abbau in kurzen Intervallen von 5 Minuten zu verfolgen. Auf Grund des hohen Schlammalters im Reaktor lagen die Bakterien in der stationären Wachstumsphase vor (Wetzel & Dott 1984). Um eine Bakterienkultur in der exponentiellen Phase anzuzüchten und einen maximalen Substratumsatz unabhängig von Transportwiderständen in der Grenzschicht der Belebtschlammflocken und in der Flocke selbst zu gewährleisten, wurden auch Untersuchungen in einem Fermenter vorgenommen.

In Abb. 3.19 sind die Ergebnisse der Batch-Versuche zur Abbaukinetik im Fermenter der AG Räßiger dargestellt. Im ersten Versuch (Ferm 1) mit 1 mM 3-CBA (= 156 mg/l) lief der Abbau sehr langsam ab. Die Biozönose war nicht sehr aktiv bzw. in Folge der hohen Restkonzentration von 550 mg/l 3-CBA überlastet, die der kontinuierlich beschickte Fermenter bereits vor der Stoßbelastung aufwies. Zu einer völligen Hemmung kam es jedoch nicht.

Der zweite Versuch (Ferm 2) zeigte einen verbesserten 3-CBA-Abbau bei doppelter Substratkonzentration (2 mM), wobei die 3-CBA- und die DOC-Kurve in ihrem Verlauf sehr gut korrelierten. Die Abbaudauer von 180 Minuten lag in der gleichen Größenordnung, die sowohl durch Kulturen aus dem SMR als auch aus dem Rührkolben ermittelt wurden. Eine

Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase sollte unabhängig von Transportwiderständen höhere Substratumsätze aufweisen. Ein nicht beabsichtigtes, zu hohes Schlammalter im Fermenter dürfte sich im zweiten Versuch negativ auf die Umsatzrate ausgewirkt haben.

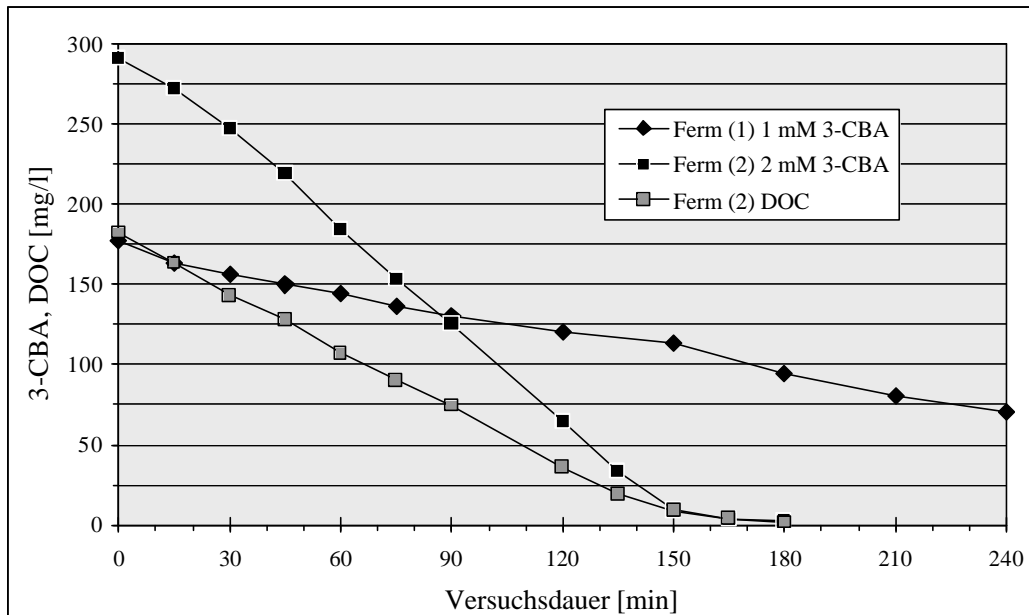


Abb. 3.19: 3-CBA-Abbau nach Stoßbelastungen im Fermenter

In Abb. 3.20 bis 3.23 sind die Ergebnisse der Batch-Versuche zur 3-CBA-Abbaukinetik mit den Mischkulturen aus dem Rührkolben im Röhrenansatz dargestellt.

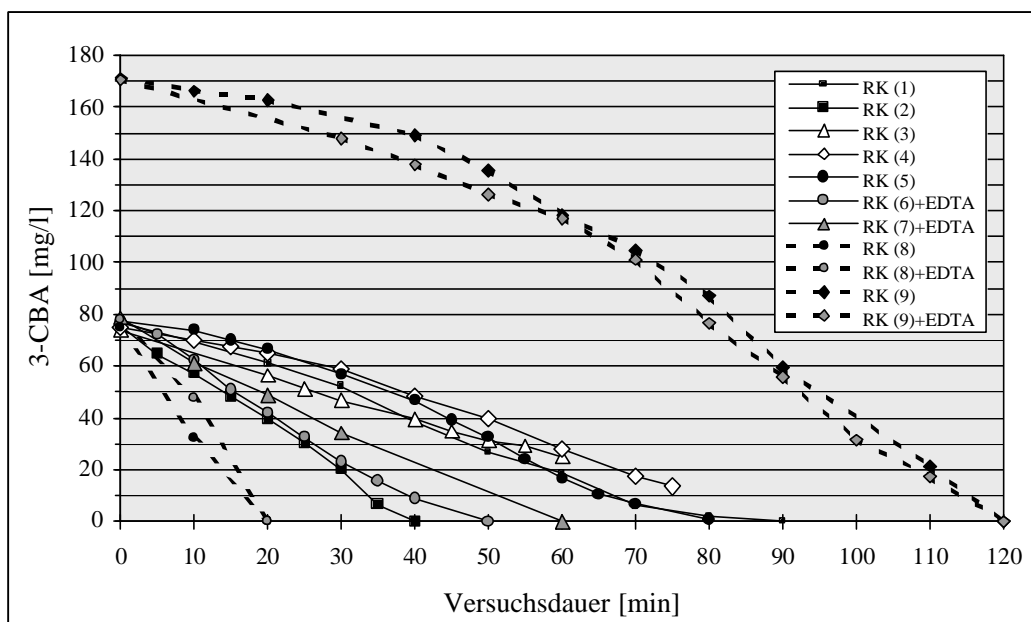


Abb. 3.20: 3-CBA-Abbau durch Rührkolben-Kulturen (RK) im Röhrenansatz, in den grau unterlegten Versuchsreihen wurde Na-EDTA zur Hemmung der Muconat-Cycloisomerase eingesetzt

In Abb. 3.20 ist zu erkennen, dass die Abbaugeschwindigkeit bei gleicher Ausgangskonzentration von 0,5 mM 3-CBA (= 78 mg/l) auffallend variierte. Dies war auf schon kleinste Veränderungen in den Betriebsbedingungen des Rührkolbens wie z.B. Höhe der Substratzugabe, pH-Wert und Chlorid-Gehalt zurückzuführen. Die Zugabe von EDTA führte zu keiner Verzögerung des 3-CBA-Abbaus, auch wenn es zu einer zwischenzeitlichen Anreicherung von Metaboliten kam, wie die Abbildungen 3.13a,b zeigten. Die initialen Reaktionsschritte liefen unbehelligt vom Stoffwechsellhemmer EDTA ab, was aus dem linearen Verlauf der Abbaukurven zu erkennen ist.

In den Abbildungen 3.21 bis 3.23 wurde der Abbau der 3-CBA gegen die Zunahme an Chlorid-Ionen aufgetragen. Sowohl bei schneller Umsetzung in maximal 60 Minuten (Abb. 3.21) als auch bei längeren Abbauzeiten bis zu 90 Minuten (Abb. 3.22) wurde beim Abbau von 0,5 mM 3-CBA eine stöchiometrische Chlorid-Freisetzung festgestellt. Die freigesetzte Konzentration der Chlorid-Ionen entsprach über die gesamte Versuchsdauer genau der abgebauten 3-CBA-Konzentration.

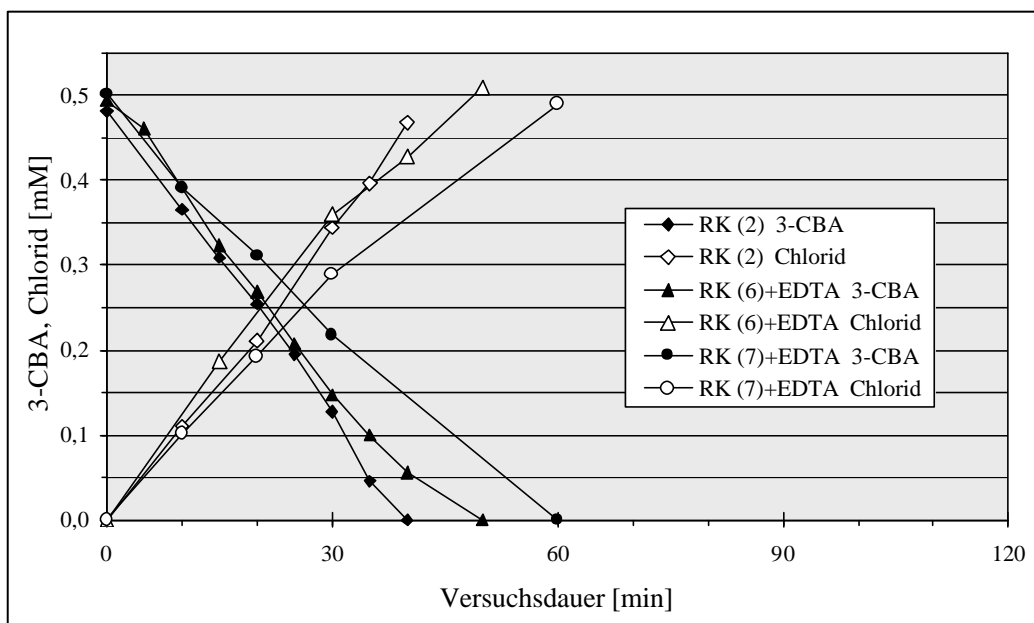


Abb. 3.21: 3-CBA-Abbau und Chlorid-Zunahme von Rührkolben-Kulturen im Rührchenansatz (1).

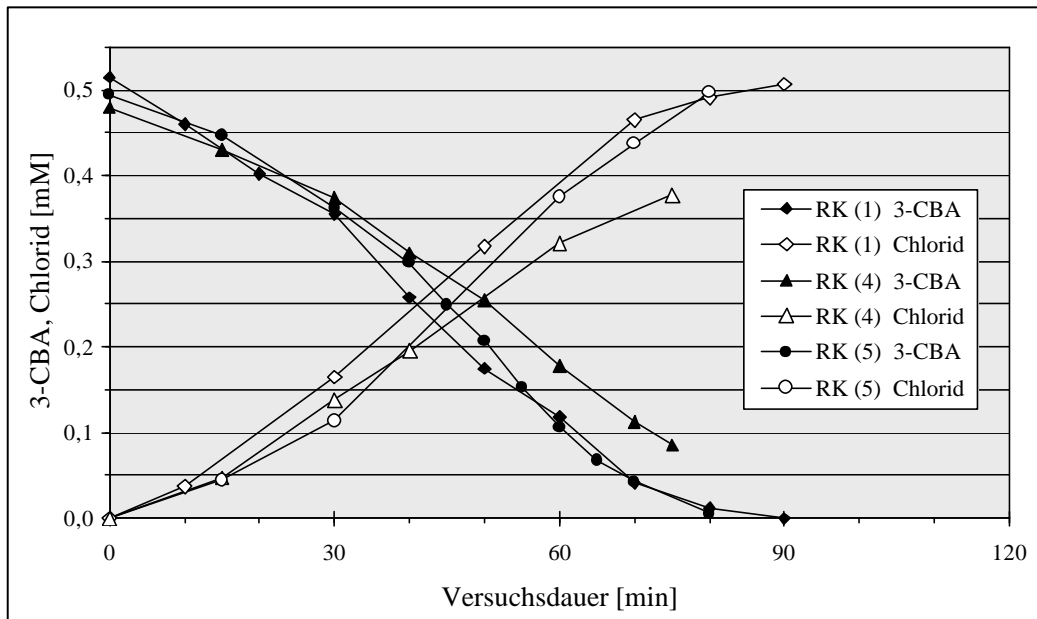


Abb. 3.22: 3-CBA-Abbau und Chlorid-Zunahme von Rührkolben-Kulturen im Röhrenchenansatz (2).

Aus Abb. 3.23 geht hervor, dass auch bei einer höheren Substratzugabe von 1 mM 3-CBA Chlorid in einem stöchiometrischen Verhältnis freigesetzt wurde. Zudem zeigte sich nochmals, dass sich die Zugabe von 4 mM Na-EDTA nicht auf den Zeitraum auswirkte, in dem 3-CBA messbar war.

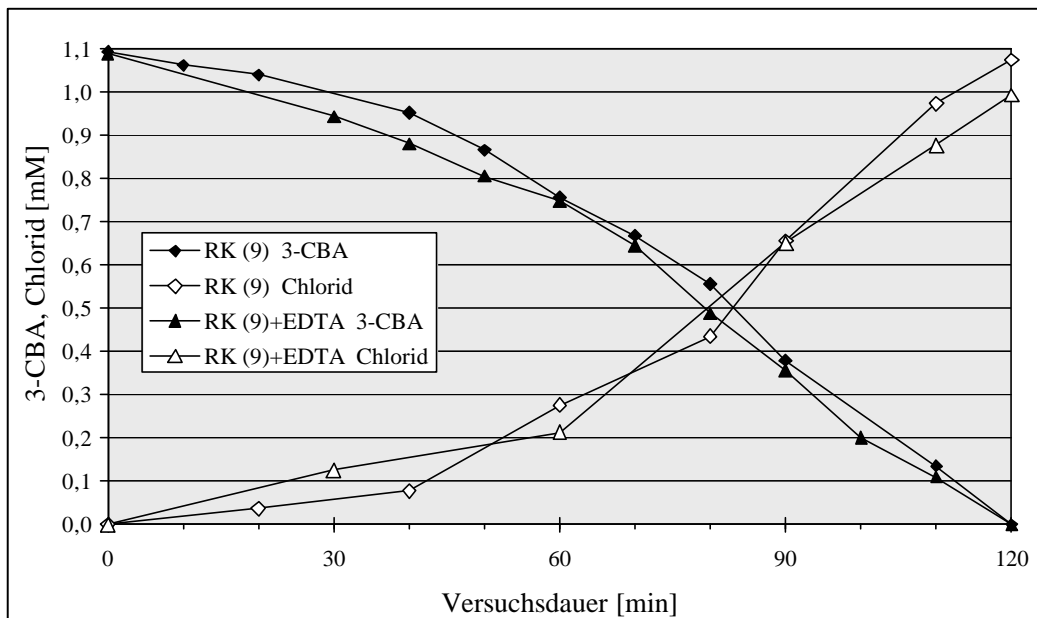


Abb. 3.23: 3-CBA-Abbau durch Rührkolben-Kultur und Chlorid-Zunahme im Röhrenchenansatz (1 mM)

Eine Hemmung des *cis,cis*-Muconat umsetzenden Enzyms Muconat-Cycloisomerase ist aus der Abb. 3.23 nicht abzuleiten. Die Untersuchungen der AG Leibfritz brachten jedoch die Erkenntnis, dass EDTA einen Einfluss auf die Struktur der kurzzeitig angereicherten Metabolite hatte, die in den UV-Spektren (Abb. 3.13a,b) zu erkennen waren. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde eine aromatische Verbindung mit drei benachbarten Substituenten nachgewiesen (vgl. Kap. 3.2.3.1).

Die kinetischen Parameter des 3-CBA-Abbaus wurden aus den vorliegenden Abbaukurven der Batch-Versuche ermittelt. Hierzu wurde die 3-CBA-Konzentration gegen die Abbau-geschwindigkeit von vier Rührkolben-Kulturen (aus Abb. 3.20) und der Fermenter-Kultur in der Abb. 3.24 aufgetragen.

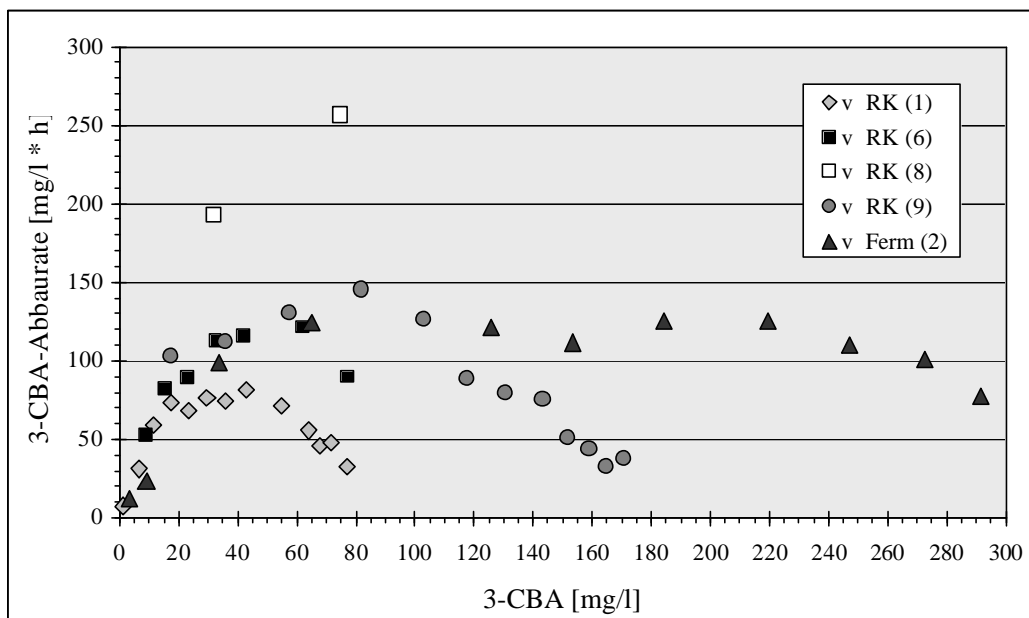


Abb. 3.24: Auftragung der Substratkonzentration 3-CBA gegen die 3-CBA-Abbau-geschwindigkeit  $v$  der Rührkolben- und Fermenter-Kulturen  
RK = Rührkolben, Ferm = Fermenter

Aus der Auftragung in Abb. 3.24 geht hervor, dass der 3-CBA-Abbau einer Substratüberschusshemmung nach Haldane (1930) folgte mit der Reaktionsgleichung

$$v = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$$

mit  $v_{\max}$  = maximale Stoffumsatzgeschwindigkeit

$K_S$  = Halbwerts-Konstante, Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Stoffumsatzgeschwindigkeit erreicht wird

$K_I$  = Hemmkonstante der Substratüberschusshemmung

$S$  = Substratkonzentration.



In allen Ansätzen (Abb. 3.24) ist eine rapide Steigerung der 3-CBA-Abbauraten mit zunehmender Substratkonzentration erkennbar. Nach Überschreiten der maximalen Umsatzrate wurde die Abbaugeschwindigkeit bis auf Ansatz RK (8) wieder deutlich reduziert. Dies kennzeichnet eine Hemmung durch Substratüberschuss.

Die kinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_S$  wurden über die Linearisierungen nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee berechnet. Die Ermittlung von  $K_I$  erfolgte über die Linearisierung nach Dixon-Webb. Das Biomassewachstum während des Abbaus konnte zur Berechnung vernachlässigt werden. Aus der Messung der Biomassezunahme (Kap. 3.2.4.3) ging ein so geringes Wachstum hervor, das in den kurzen Versuchszeiträumen von 60 bis maximal 180 Minuten nicht reproduzierbar zu messen war.

Tabelle 3.5 zeigt eine große Varianzbreite der ermittelten kinetischen Parameter, die auf die jeweiligen Betriebsbedingungen im Rührkolben zurückzuführen war. Einen erheblichen Einfluss übte die Konzentration der Substratzugaben ein paar Tage vor dem Versuchsbeginn aus. Die Werte für  $v_{\max}$  differierten für den Abbau von 0,5 mM 3-CBA im Rührkolben von 112,4 bis 340,4 mg 3-CBA/l·h. Auf den Biomassegehalt bezogen lag die maximale Umsatzgeschwindigkeit bei 62,8 bis 121,5 mg 3-CBA/g TS·h. Die Halbwerts-Konstanten  $K_S$  betragen 15,1 bis 24,5 mg/l.

Tab. 3.5: Kinetische Parameter des 3-CBA-Abbaus

Ursprung der Probe	$v_{\max}$	$K_S$ [mg/l]	$K_I$ [mg/l]
Rührkolben (1) [0,5 mM] 1,79 g TS/l	112,4 mg 3-CBA/l·h 62,8 mg 3-CBA/g TS·h	15,1	43,9
Rührkolben (6) [0,5 mM] 2,59 g TS/l	166,6 mg 3-CBA/l·h 64,3 mg 3-CBA/g TS·h	18,3	76,7
Rührkolben (8) [0,5 mM] 2,80 g TS/l	340,2 mg 3-CBA/l·h 121,5 mg 3-CBA/g TS·h	24,5	---
Rührkolben (9) [1,0 mM] 404 mg Protein/l 2,34 g TS/l	154,8 mg 3-CBA/l·h 0,383 mg 3-CBA/mg Protein·h 66,2 mg 3-CBA/g TS·h	9,83	117,4
Fermenter [2,0 mM] 2,51 g TS/l	151,6 mg 3-CBA/l·h 60,4 mg 3-CBA/g TS·h	35,6	251,0

Der schnellste Abbau (Rührkolben RK 8) war nach der höchsten Nährstoffzufuhr der Rührkolben mit 3 bis 5 mM 3-CBA pro Tag zu beobachten. Vor den anderen Versuchen wurden dem Rührkolben nur 2 mM 3-CBA pro Tag zugeführt. Die Werte für  $v_{\max}$  und  $K_S$  des Rührkolben mit 1 mM und des Fermenters mit 2 mM 3-CBA-Ausgangskonzentration lagen in der gleichen Größenordnung. Die Hemmkonstante der Substratüberschusshemmung  $K_I$  war

bei den höheren Ausgangskonzentrationen jedoch mit 117,4 bzw. 251 mg/l 3-CBA deutlich größer.

### 3.2.4.2 4-Chlorphenol-Abbaukinetik

Die Versuche zur 4-CP-Abbaukinetik wurden mit Kulturen aus dem Rührkolben im Röhrenansatz und aus dem SMR im Schüttelkolbenansatz durchgeführt. Die Versuche erlaubten Rückschlüsse über die Dauer des Abbaus und den Zeitpunkt der Dechlorierung. Der 4-CP-Abbau wurde nach Stoßbelastungen mit 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,8 und 1,0 mM 4-CP erfasst. Die kinetischen Parameter  $v_{\max}$  und  $K_S$  wurden über die Linearisierungen nach Lineweaver-Burk und Eadie-Hofstee berechnet. Die Ermittlung von  $K_f$  erfolgte über die Linearisierung nach Dixon-Webb.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen mit den Rührkolben-Kulturen und einer SMR-Kultur im Röhrenansatz sind in der Abb. 3.25 dargestellt.

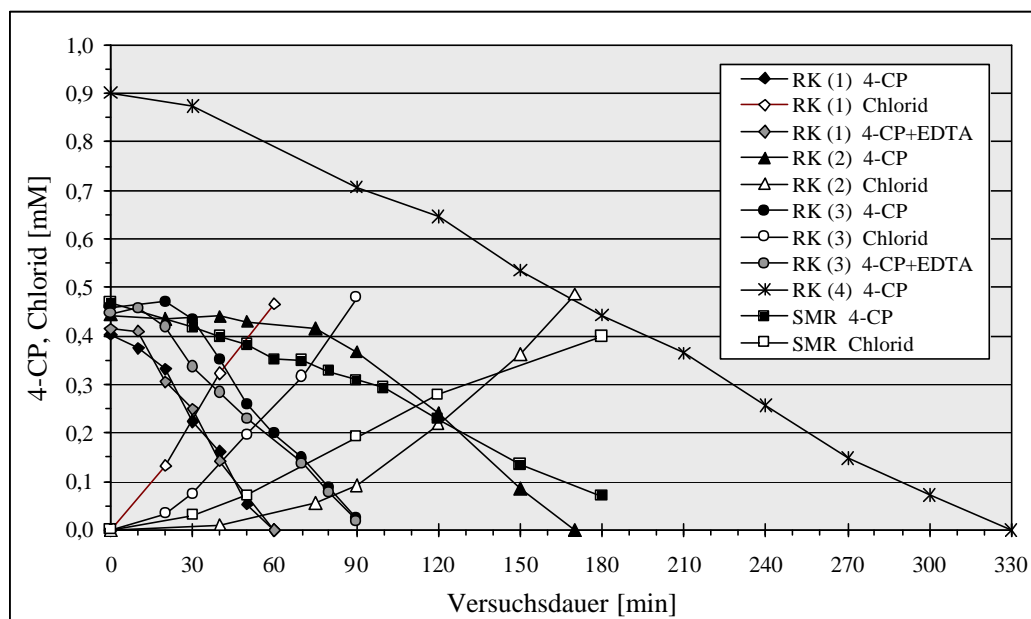


Abb. 3.25: 4-CP-Abbau durch Rührkolben- und SMR-Kulturen sowie Chlorid-Zunahme im Röhrenansatz

RK = Rührkolben, Ferm = Fermenter, in den grau unterlegten Versuchsreihen wurde Na-EDTA zur Hemmung der Muconat-Cycloisomerase eingesetzt

Der Abbau von 0,5 mM 4-CP (= 64,3 mg/l) durch Rührkolben-Kulturen dauerte 60 bis 170 Minuten. Die zum Vergleich eingesetzte Kultur aus dem SMR benötigte für den Abbau von 0,5 mM 4-CP ungefähr 210 Minuten. Der Abbau von 1,0 mM 4-CP durch die Rührkolben-Kultur dauerte 330 Minuten. Im Vergleich zum 3-CBA-Abbau fiel die Adaptionszeit nach der Substratzugabe und die langsamere 4-CP-Abbaugeschwindigkeit auf. Die EDTA-Zugabe

hatte wie beim 3-CBA-Abbau keinen Einfluss auf die Abbaudauer. Die Abb. 3.25 veranschaulicht, dass die Chlorid-Freisetzung wie beim 3-CBA-Abbau über die gesamte Abbaudauer äquimolar zur 4-CP-Abnahme war.

In den Abbildungen 3.26 und 3.27 sind die Ergebnisse von zwei Abbaueversuchen mit der Mischkultur aus dem SMR dargestellt. Die beiden Abbaueversuche fanden im Abstand von fünf Tagen statt. Die Proben aus dem SMR wurden verdünnt und mit einem TS-Gehalt von ungefähr 2,2 g/l auf fünf Schüttelkolben (200 ml) mit fünf unterschiedlichen 4-CP-Anfangskonzentrationen verteilt.

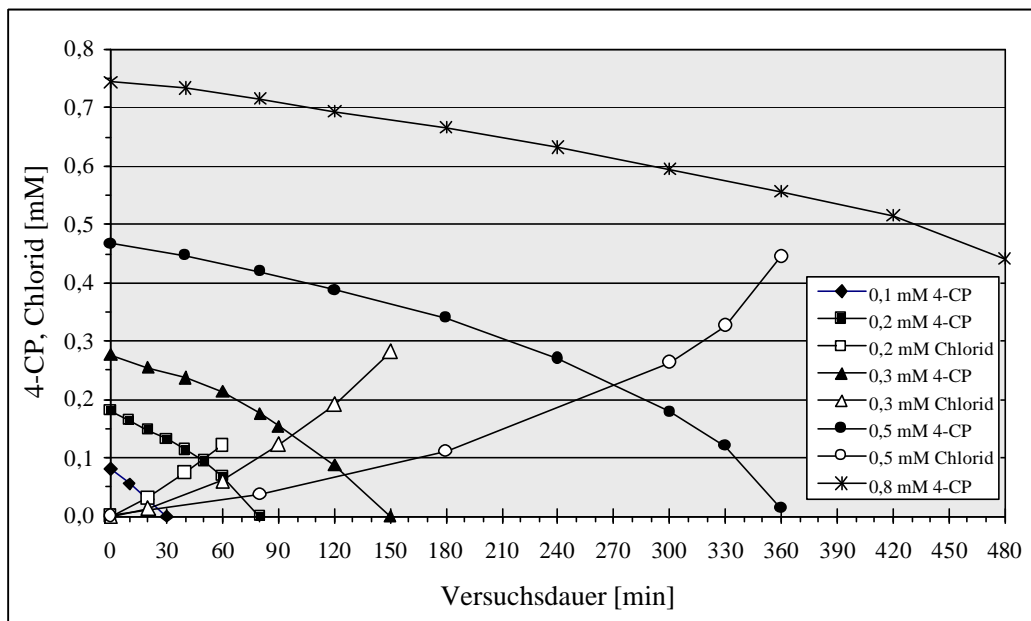


Abb. 3.26: 4-Chlorphenol-Abbau durch SMR-Kultur und Chlorid-Freisetzung im Schüttelkolben (1)

Die Kurven aller 4-CP-Anfangskonzentrationen in Abb. 3.26 zeigten in ihrem Verlauf die gleiche Tendenz. Die Abbaugeschwindigkeit nahm jeweils mit abnehmender 4-CP-Konzentration deutlich zu. Anders als beim 3-CBA-Abbau war eine Substratüberschusshemmung bereits aus diesen Zeit-Umsatz-Kurven zu erkennen, da die anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten mit steigenden Anfangskonzentrationen reduziert waren (Hartmann 1992). Die Freisetzung von Chlorid lief wie in den vorherigen Untersuchungen äquimolar zum 4-CP-Abbau ab.

Zwischen den Versuchstagen kam es im SMR zu einer schrittweisen Verringerung der Zulaufkonzentration an 4-Chlorphenol von 164 mg/l auf 67 mg/l, was einer Reduzierung der Raumbelastung von ca. 0,1 auf 0,05 mM 4-CP/1·d entsprach. Die Abbaugeschwindigkeiten aller eingesetzten Substratkonzentrationen verlangsamten sich daraufhin erheblich, wie in Abb. 3.27 dargestellt ist. Die Biozönose benötigte für den Abbau von 0,1 und 0,2 mM 4-CP

mit 60 bzw. 150 Minuten die doppelte Zeit wie im Versuch vor der Verringerung der Substratkonzentration (Abb. 3.26). Ein Einfluss auf die Freisetzung von Chlorid war nicht festzustellen.

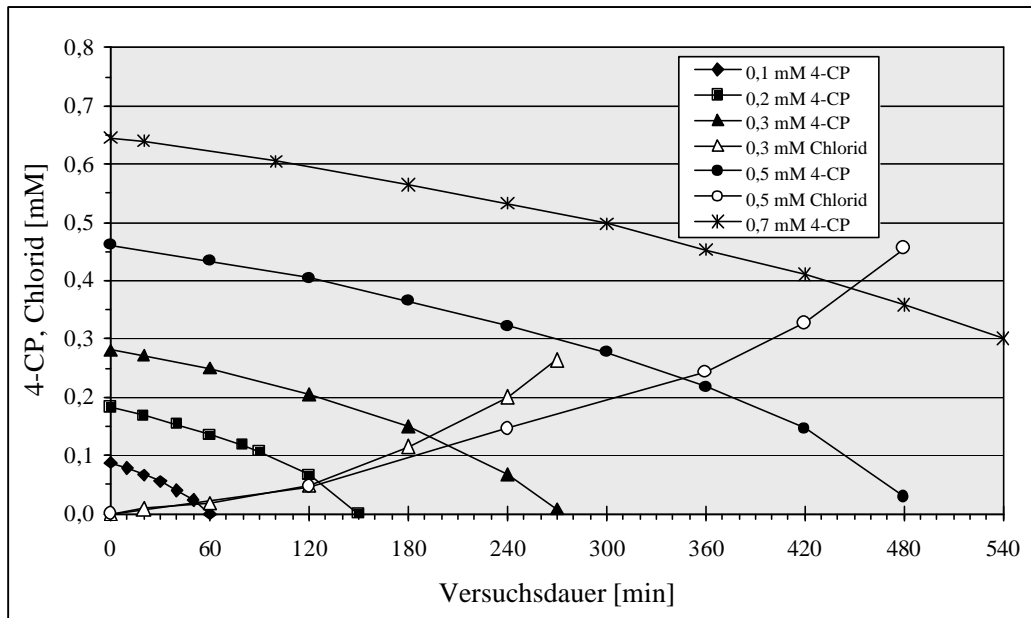


Abb. 3.27: 4-Chlorphenol-Abbau durch SMR-Kultur und Chlorid-Freisetzung im Schüttelkolben (2)

Die kinetischen Parameter des 4-CP-Abbaus wurden mittels Linearisierungen aus den Abbaukurven der Batch-Versuche berechnet. Das Biomassewachstum während des Abbaus wurde zur Berechnung vernachlässigt, da es äußerst gering war. Die Versuche zur Ermittlung des Ertragskoeffizienten (Kap. 3.2.6) ergaben einen Zuwachs von nur 4,2 mg Protein bzw. 15,9 mg TS beim Abbau von 0,5 mM 4-CP. Dieser Zuwachs wäre im Versuchszeitraum von acht Stunden nicht reproduzierbar zu bestimmen gewesen.

In der Abb. 3.28 wurde die 4-CP-Konzentration gegen die Abbaugeschwindigkeit von drei Rührkolben-Kulturen und einer SMR-Kultur aufgetragen, die in der Abb. 3.25 als Zeit-Umsatz-Auftragung dargestellt waren. In der Abb. 3.28 ist die Substratüberschusshemmung nach Haldane (1930) in allen 4-CP-Abbauversuchen am Abfallen der Kurven bei den höheren Substratkonzentrationen der einzelnen Versuchsreihen zu erkennen. Die Abbauraten aller Versuchsansätze stiegen im Bereich niedriger Substratkonzentrationen leicht an und fielen nach Überschreiten einer maximalen Abbaurate rapide ab. Die höchsten 4-CP-Abbauraten erzielten die Rührkolben-Kulturen RK (1) und RK (3) mit einer Ausgangskonzentration von 0,5 mM 4-CP (= 64 mg/l). Die Kultur aus dem SMR zeigte die niedrigste 4-CP-Umsatzrate. Etwas höher war die 4-CP-Abbaurate der Rührkolben-Kultur RK (4), die eine 4-CP-Ausgangskonzentration von 1,0 mM aufwies.

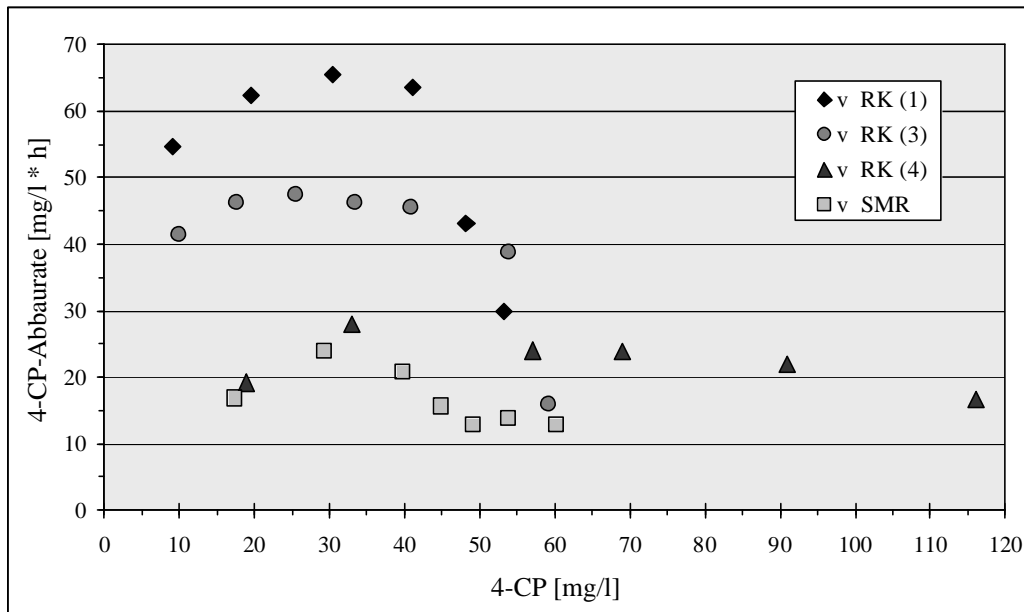


Abb. 3.28: Auftragung der Substratkonzentration 4-CP gegen die 4-CP-Abbaugeschwindigkeit  $v$  von drei Rührkolben- und einer SMR-Kultur im Rührchenansatz

In Abb. 3.29 werden die Reaktionsgeschwindigkeiten aller fünf Abbaukurven aus Abb. 3.27 (SMR 1) dargestellt. Es ist fast ausschließlich der abfallende Teil der Haldane-Kinetik zu erkennen. Nur im Bereich äußerst niedriger Substratkonzentrationen war ein Ansteigen der Abbaurrate festzustellen.

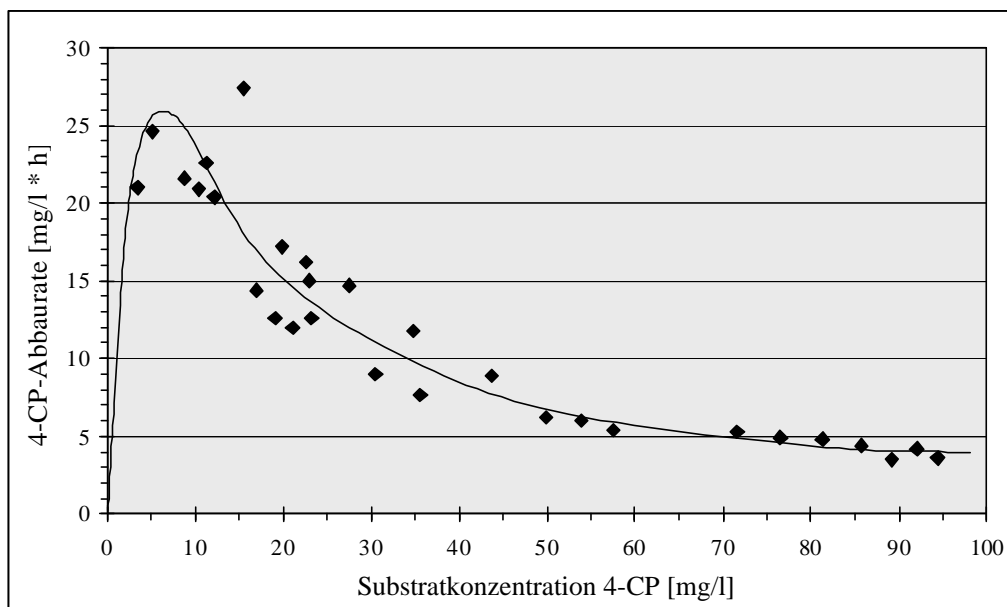


Abb. 3.29: Auftragung der Substratkonzentration 4-CP gegen die 4-CP-Abbaurrate  $v$  der SMR-Kultur (1) im Schüttelkolbenansatz

In Tabelle 3.6 sind die ermittelten kinetischen Parameter des 4-CP-Abbaus aufgelistet. Die maximalen Reaktionsraten  $v_{\max}$  waren im Rührkolben beim Abbau von 0,5 mM 4-CP mit höchstens 69,7 mg 4-CP/l·h bzw. 30,7 mg 4-CP/g TS·h nur halb so hoch wie die, die für 3-CBA ermittelt wurden. Bereits bei Konzentrationen von  $K_S = 2,53$  bzw. 2,74 mg 4-CP/l wurde die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht. Die Hemmkonstante, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit wieder halbmaximal ist, lag mit  $K_I = 36,8$  bis 50,1 mg 4-CP/l im Vergleich zum 3-CBA-Abbau nur etwas niedriger. Bei Verdopplung der Anfangskonzentration auf 1,0 mM 4-CP im Rührkolben, die zu einer fünffachen Abbaudauer führte, wurde  $v_{\max}$  unabhängig von den Bezugsparametern Volumen, Protein oder TS halbiert. Die Hemmkonstante  $K_I$  wurde fast verdoppelt und  $K_S$  stieg um das vierfache.

Tab. 3.6: Kinetische Parameter des 4-CP-Abbaus

Ursprung der Probe	$v_{\max}$	$K_S$ [mg/l]	$K_I$ [mg/l]
Rührkolben (1) [0,5 mM] 431 mg Protein 2,27 g TS/l	69,7 mg 4-CP/l·h 0,162 mg 4-CP/mg Protein·h 30,70 mg 4-CP/g TS·h	2,53	36,8
Rührkolben (3) [0,5 mM] 376 mg Protein/l 1,83 g TS/l	52,9 mg 4-CP/l·h 0,141 mg 4-CP/mg Protein·h 28,91 mg 4-CP/g TS·h	2,74	50,1
Rührkolben (4) [1,0 mM] 355 mg Protein 1,98 g TS/l	31,7 mg 4-CP/l·h 0,089 mg 4-CP/mg Protein·h 16,01 mg 4-CP/g TS·h	11,0	72,9
SMR [0,5 mM] 456 mg Protein 2,80 g TS/l	30,3 mg 4-CP/l·h 0,066 mg 4-CP/mg Protein·h 10,82 mg 4-CP/g TS·h	13,2	51,0
SMR (1) [0,1 - 0,8 mM] 264 mg Protein/l 2,14 g TS/l	30,6 mg 4-CP/l·h 0,116 mg 4-CP/mg Protein·h 14,30 mg 4-CP/g TS·h	1,59	10,7
SMR (2) [0,1 - 0,7 mM] 291 mg Protein/l 2,24 g TS/l	17,2 mg 4-CP/l·h 0,059 mg 4-CP/mg Protein·h 7,68 mg 4-CP/g TS·h	2,60	28,2

Die kinetischen Parameter des SMR wichen von denen des Rührkolbens ab. Die maximale Umsatzrate  $v_{\max} = 10,8$  mg 4-CP/g TS·h der SMR-Kultur mit 0,5 mM 4-CP war geringer und erreichte nur ein Drittel des Rührkolbenniveaus. Der Wert für  $K_S = 13,2$  mg/l war deutlich erhöht, die Hemmkonstante  $K_I$  war mit 51 mg 4-CP/l etwas größer als im Rührkolben.

Die SMR-Schüttelkolbenansätze 1 und 2 zeigten wesentlich niedrigere  $K_S$ - und  $K_I$ -Werte bei einer ähnlich hohen maximalen Umsatzrate von  $v_{\max} = 14,3$  bzw. 7,7 mg 4-CP/g TS·h. Zwischen beiden Versuchen stieg die Hemmkonstante  $K_I$  von 10,7 auf 28,2 mg 4-CP/l. Ein

Anstieg der Hemmkonstanten bei gleichzeitiger Verlangsamung von  $v_{\max}$  zeigte sich sowohl bei den Rührkolben- als auch bei den SMR-Proben.

### 3.2.4.2.1 Ertragskoeffizient für 4-Chlorphenol

Der Ertragskoeffizient wurde ermittelt, um zu überprüfen, ob es während der Zeiträume der Abbauprobe zu einem nennenswerten Biomassewachstum kam. Das angewendete kinetische Modell nach Haldane (1930) - die Substratüberschusshemmung - vernachlässigt ein Biomassewachstum.

Der Versuchszeitraum betrug 20 Tage und war in drei Versuchsabschnitte unterteilt. Am Ende dieser Abschnitte wurde aus dem Rührkolben 1 l Medium abgezogen, um die Konzentration von Chlorid und anderen Stoffwechsellauscheidungen zu senken. Dabei kam es zu geringen Biomasseverlusten, wie in der Abb. 3.30 am 7. und 13. Tag zu sehen ist.

Pro Versuchstag wurden dem Rührkolben 1,0 bis 2,5 mM 4CP zugegeben. Das Biomassewachstum wurde täglich bzw. nach zwei Tagen als Protein- und TS-Gehalt gemessen. Der Zuwachs der Biomasse wurde für jeden der drei Versuchsabschnitte mittels einer Trendlinie berechnet. Die in Abb. 3.30 mit der Geradengleichung dargestellten Trendlinien wiesen unterschiedliche Steigungen auf, die die Folge der zum Teil verschiedenen hohen Substratzugaben waren.

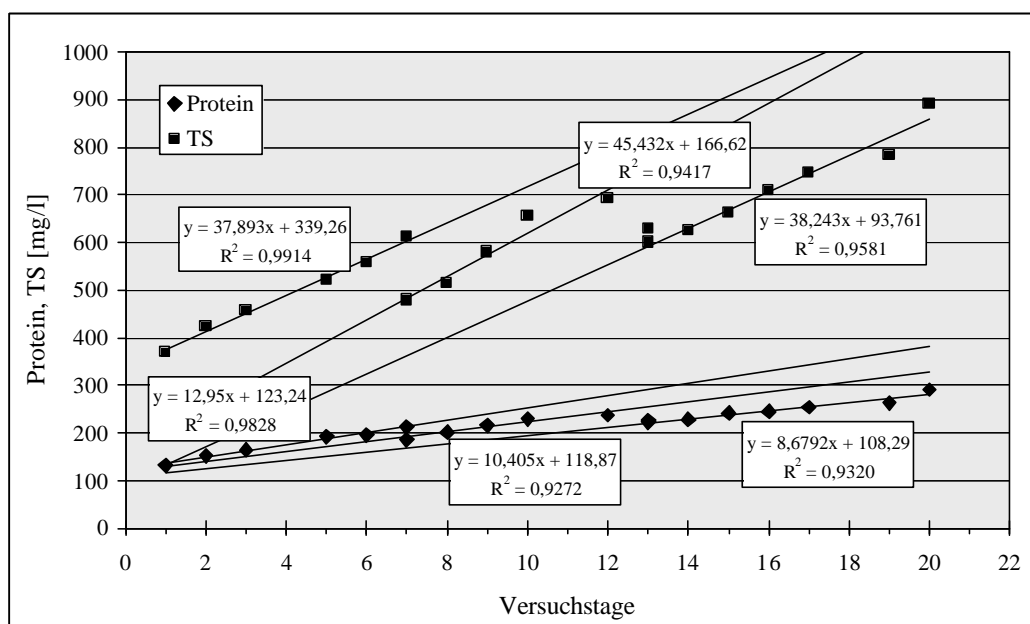


Abb. 3.30: Korrelation zwischen 4-Chlorphenol-Zugabe und Biomassezuwachs im Rührkolben

Der Biomassegehalt wurde als Protein- und TS-Gehalt gemessen. Für jeden Versuchsabschnitt sind die Trendlinien des Biomassezuwachses mit ihren Geradengleichungen angegeben.

Die Biomasseparameter Protein und TS wiesen übereinstimmende Tendenzen auf, die als Folge der Skalierung aber nur anhand der TS-Messwerte in Abb. 3.30 deutlich wurden. Das Biomassewachstum zeigte mit Ausnahmen am 12. und 13. Tag einen linearen Anstieg. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde ab dem 10. Tag eine Verringerung des Wachstums und ab dem 12. Tag sogar ein Verlust an Biomasse verzeichnet. Die Verringerung des Biomassegehaltes trat nach einer hohen 4-CP-Zugabe (2,5 mM) am 10. Tag auf.

Der Ertragskoeffizient wurde aus der Mittelwertbildung der drei Einzeltrendlinien für jeden Biomasseparameter errechnet.

Bezogen auf den Protein-Gehalt ergab sich ein molarer Ertragskoeffizient von

$$Y = 8,4 \text{ g Protein/mol 4-CP.}$$

Bezogen auf den TS-Gehalt ergab sich ein molarer Ertragskoeffizient von

$$Y = 31,9 \text{ g TS/mol 4-CP.}$$



## 4. Diskussion

### 4.1 Beschreibung der Biozöosen von SMR und AIR

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurden die Lebensgemeinschaften der Mikroorganismen in den Versuchsreaktoren beschrieben. Als Grundlage wurden die Gesamtzellzahlen (GZZ) und die Lebendzellzahlen als KBE ermittelt. Routinemäßig wurden die nicht differenzierenden Biomasseparameter Protein- und Trockensubstanz-Gehalt als Bezugsparameter bestimmt. Der Anteil der aktiv an der Umsetzung der Modellschadstoffe beteiligten Bakterien wurde über die Doppelfärbung mit CTC und DAPI-lac von den inaktiven Bakterienzellen unterschieden.

Die Lebendzellzahlen wurden auf selektiven Nährmedien ermittelt, um erste Hinweise auf die Anzahl an Mikroorganismen in der Mikroflora zu erhalten, die zur Umsetzung bestimmter aromatischer Kohlenwasserstoffe befähigt waren. Von den Anreicherungsmedien R2A und 3-CBA wurden insgesamt 173 Reinkulturen isoliert. Die Bakterienisolate wurden zell- und koloniemorphologisch beschrieben und ihr Substratverwertungsspektrum ermittelt. Mittels der stoffwechselphysiologischen Charakterisierung wurden die wichtigsten 3-CBA-abbauenden Bakterien identifiziert.

#### 4.1.1 Gesamt- und Lebendzellzahlen der Biozöosen

Die GZZ wurde über die Acridinorange-Färbung ermittelt und lag im SMR bei 2,7 bis  $5,6 \cdot 10^{10}/\text{ml}$  und damit bis zu einer Zehnerpotenz höher als im AIR, dessen GZZ 0,23 bis  $2,8 \cdot 10^{10}/\text{ml}$  betrug. Vergleichszellzahlen von Lampe (1998), die über die Zählkammermethode ermittelt wurden, lagen für den SMR in stabilen Betriebsphasen über einen Zeitraum von 15 Wochen im Bereich von 0,3 bis  $2,3 \cdot 10^{10}/\text{ml}$ . Im SMR war die GZZ in Relation zu den Biomasseparametern TS- und Protein-Gehalt mit 0,65 und  $1,8 \cdot 10^{10}/\text{mg}$  Protein und mit 2,6 und  $5,6 \cdot 10^{12}/\text{g}$  TS durchschnittlich doppelt so hoch wie im AIR. Der Anteil der Bakterienzellen an der gesamten Biomasse war im SMR höher als im AIR.

Auf dem R2A-Agar wurden die höchsten Koloniezahlen gezählt. Der R2A-Agar eignet sich laut Wernicke et al. (1990) am besten für nährstoffarme Habitate wie die Reaktoren SMR und AIR. Die auf R2A-Agar ermittelten Koloniezahlen des SMR erreichten einen Wert zwischen 2,6 und  $8,8 \cdot 10^9$  KBE/ml und die des AIR zwischen 0,27 und  $3,1 \cdot 10^9/\text{ml}$ . Sie lagen damit in der Größenordnung von  $3 \cdot 10^9$  KBE/ml ( $1 \cdot 10^{12}$  KBE/g TS), die Kutzner (1993) für Belebtschlämme auf Belebtschlamm-Agar angibt, den er als optimales Kultivierungsmedium ansieht. Vergleichszahlen von Wetzel & Dott (1984) für eine hoch belastete Adsorptions-Belebungsanlage zeigten durchschnittlich  $4,8 \cdot 10^8$  KBE/ml auf Nähr-Agar, die niedrig belasteten Belebungsbecken lagen mit Koloniezahlen von nur  $4,8 \cdot 10^7$  KBE/ml noch

darunter. Der SMR und der AIR als nährstoffarme Habitate wiesen wesentlich höhere Lebendzellzahlen auf.

In Relation zum TS- und zum Protein-Gehalt erreichte der SMR einen zwei- bis fünffach höheren Gehalt an auf R2A kultivierbaren Zellen als der AIR. Der Anteil der auf R2A kultivierbaren Bakterien machte zwischen 6,6 und 13,0 % der GZZ im AIR und zwischen 9,0 und 16,3 % der GZZ im SMR aus. Damit wurde ein höherer Anteil an kultivierbaren Zellen nachgewiesen, als der allgemein angegebene Anteil von 1 bis 10 %. Allerdings halten Kämpfer, Dott & Steiof (1997) bis zu 65 % der Bakterien aus dem Belebtschlamm für kultivierbar auf nährstoffarmen Medien wie dem R2A-Agar.

Die auf 3-CBA-Agar gezählten KBE des SMR betragen  $3,1$  bis  $7,0 \cdot 10^8/\text{ml}$  und die des AIR  $0,63$  bis  $5,5 \cdot 10^8/\text{ml}$ . In Relation zum TS- und zum Protein-Gehalt zeigte der SMR einen bis zu doppelt so hohen Gehalt der auf 3-CBA kultivierbaren Zellen wie der AIR. Die KBE auf 3-CBA-Agar im SMR machten 6 bis 12 % der auf R2A-Agar kultivierbaren Zellen aus, im AIR waren es zwischen 9 und 18 %. Der Anteil der auf 3-CBA kultivierbaren Bakterien machte zwischen 1,0 und 1,7 % der GZZ im SMR und zwischen 1,2 und 2,7 % der GZZ im AIR aus. Diese Ergebnisse weisen ein Missverhältnis aus. Bezüglich der Parameter, die sich mehr auf die Lebensgemeinschaft beziehen - die GZZ und die KBE auf R2A als "Gesamtkultivierbare Zellen" - wies der AIR höhere Anteile der auf 3-CBA-kultivierbaren Bakterien auf. Auf das System der Reaktoren bezogene Parameter wie das Volumen sowie der Protein- und der TS-Gehalt zeigten genau das gegenteilige Ergebnis.

Als Fazit aus der Betrachtung der Gesamt- und Lebendzellzahlen der Biozöosen ist ein höherer Anteil aktiver Zellen im SMR abzuleiten, da der Anteil der Bakterien (GZZ und KBE) an der gesamten Biomasse (Protein- und TS-Gehalt) im SMR höher war als im AIR.

#### **4.1.2 Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Zellen**

Biomasseparameter wie der Protein- und der TS-Gehalt sagen alleine nicht viel über die Abbauleistung einer Biozönose aus, da insbesondere der TS-Gehalt in der Abwassertechnik noch andere Bestandteile enthält als Bakterien (Hartmann 1992). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, wie hoch der Anteil an stoffwechselaktiven Bakterienzellen im SMR war.

Zur Bestimmung der stoffwechselaktiven Mikroorganismen im SMR wurde der Redoxfarbstoff 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) eingesetzt, der durch die Dehydrogenasen von stoffwechselaktiven Mikroorganismen zu einem rot fluoreszierenden Formazankristall reduziert wird. Durch die Gegenfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom 4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid-dilactat (DAPI-lac) wurden alle Bakterien der SMR-

und Rührkolben-Proben blau angefärbt. Durch diese Doppelfärbung bestand die Möglichkeit, auf zellulärer Ebene zwischen aktiven und inaktiven Zellen im gleichen Gesichtsfeld des Epifluoreszenzmikroskops zu unterscheiden (Coleman 1980, Porter & Feig 1980, Rodriguez et al. 1992, Schaule et al. 1993).

Bei der angewendeten Methode fiel auf, dass unverdünnte Proben eine höhere CTC-Fluoreszenz zeigten. Im Gegensatz dazu konnten die DAPI-gefärbten Zellen in der höheren Verdünnung etwas besser vom Hintergrund unterschieden werden. Auf Grund des schnellen Fluoreszenzverlustes der CTC-Färbung wurde diese zuerst ausgezählt.

Das Ergebnis der Untersuchungen zeigte, dass das Verhältnis von stoffwechselaktiven Zellen zur Gesamtzellzahl im SMR mit 8,3 bis 11,6 % niedriger war als im Rührkolben mit 12,6 bis 22,0 %. Griebe et al. (1996) halten zwischen 35 und 40 % der Bakterien im Belebtschlamm für potenziell aktiv. Die in der gleichen Arbeit angegebenen Werte variieren allerdings für unterschiedliche Versuchsanordnungen von 12 bis 40 % aktiver Zellen. Ohle (1997) ermittelte in Biofilmen auf Polystyrolkugeln zwischen 25 und 39 % aktive Zellen. Die für den Rührkolben ermittelten Anteile an aktiven Zellen lagen nur leicht unter diesen Vergleichswerten, was in Anbetracht der Wachstumsbedingungen im Rührkolben als gut zu bewerten ist. Die Bakterien des SMR waren hierzu im Vergleich in ihrer Aktivität deutlich gehemmt, was auf Betriebsstörungen des Reaktors hinweist.

Das Verhältnis der GZZ zu den Biomasseparametern TS- und Protein-Gehalt war im SMR mit  $1,0 \cdot 10^{12}$  Zellen/g TS und 3,1 bis  $4,4 \cdot 10^9$  Zellen/mg Protein zudem bis zu dreifach geringer als im Rührkolben. Auf einen relativ niedrigen Zellanteil an der Biomasse des SMR im 4-CP-Betrieb weist auch ein Vergleich mit der im 3-CBA-Betrieb des SMR festgestellten GZZ hin. Im 3-CBA-Betrieb wurde mit 2,6 bis  $5,6 \cdot 10^{12}$  AO-positive Zellen/g TS und 0,65 bis  $1,2 \cdot 10^{10}$  AO-positive Zellen/mg Protein die drei- bis fünffache Zellzahl auf den Biomassegehalt bezogen gezählt. Die Methode zur Anfärbung der GZZ der Bakterien mit Acridinorange (AO) sollte keinen Einfluss auf die ermittelten Zellzahlen haben, da Porter & Feig (1980) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Acridinorange- und der DAPI-Färbung feststellten. Wenn der Anteil der Bakterien an der gesamten Biomasse so deutlich verringert war, lässt sich ein nicht optimaler Reaktorbetrieb davon ableiten. Eigentlich sollten im SMR mit einer kontinuierlichen Nährstoffzufuhr und automatischer Regelung der Prozessparameter bessere Milieubedingungen als im Rührkolben herrschen.

Die aus der CTC-Färbung gewonnenen Hinweise auf nicht optimale Milieubedingungen im SMR stellten sich nachträglich als wahrheitsgemäß heraus. Laut Mitteilung von Schierenbeck gab es Ende Februar 1999 mehrere Störfälle im Reaktorbetrieb, in deren Folge die Zulaufkonzentration gesenkt wurde.

Die Untersuchungen im Rührkolben sollten zusätzlich klären, welchen Einfluss die Substratzugabe auf die Aktivität der Bakterien hatte. Dazu wurden die Proben vor und 5 Minuten nach der Zugabe von 0,5 mM 4-CP entnommen. Hierbei wurde festgestellt, dass die 4-CP-Zugabe einen negativen Einfluss auf die Anfärbbarkeit der Zellen hatte. Sowohl in der CTC- als auch in der DAPI-Färbung wurden deutlich weniger Zellen gezählt. Die Zahl der CTC-gefärbten Zellen verringerte sich um 30 bis 60 %, die der DAPI-gefärbten um 25 bis 50 %. Der Anteil stoffwechselaktiver Zellen sank um maximal 3,4 % von 19,5 auf 16,1 %.

Die Verringerung der Zahl aller fluoreszierenden Zellen kann nur auf einen Einfluss der Substanz 4-Chlorphenol zurückzuführen sein, weil sich innerhalb von fünf Minuten nicht die Gesamtzellzahl ändern kann. Da aber auch das Verhältnis von CTC- zu DAPI-gefärbten Zellen abnahm, musste sich die Substratzugabe zudem negativ auf die Dehydrogenasenaktivität ausgewirkt haben. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist möglicherweise in der batchweisen Versorgung des Rührkolbens mit 4-CP zu suchen. Direkt nach der Substratzugabe könnte die Dehydrogenasenaktivität zurück gehen, da vor allem die Enzyme für den Aromatenabbau benötigt und induziert werden. Eine solche Veränderung im Zellstoffwechsel könnte die normale Folgewirkung einer Stoßbelastung sein, aber auch die Auswirkung einer vorübergehenden Hemmung durch die Substratzugabe.

### **4.1.3 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Bakterienisolate**

Von den Anreicherungsmedien R2A und 3-CBA wurden mit insgesamt 173 Isolaten ausreichend viele Reinkulturen gewonnen, um die Zusammensetzung der Mikroflora der Reaktoren abzubilden. Nach Kölbel-Boelke (1987), Bianchi & Bianchi (1982) und Kämpfer et al. (1991) sind 40 bis 60 Stämme pro Habitat zur Charakterisierung einer Biozönose ausreichend. Diese Zahlen liegen weit unter der von Gayer-Herkert (1992) und Kutzner (1993) geforderten Zahl von 459 Isolaten. Die Autoren errechneten, dass eine Art, die 1 % der Population bildet, nur mit einer 65 %igen Sicherheit unter 100 Isolaten nachgewiesen werden kann. Eine 99 %ige Sicherheit zur Auffindung herrscht erst ab einem 5 %igen Anteil der Art in der Population. Für sämtliche Populationsanalysen gilt bis jetzt, dass auf Grund der Abhängigkeit von Kultivierungseinflüssen keine vollständige Bestandsaufnahme aller Mikroorganismen einer Biozönose möglich ist (Güde 1996, Lemmer 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine deutlich höhere Zahl als 60 Stämme untersucht.

Die 173 Isolate der beiden Vergleichsreaktoren wurden 77 Tests zu physiologisch-biochemischen Eigenschaften in den Vertiefungen von 96er Mikrotiterplatten unterzogen. Die Tests erfolgten in Anlehnung an Dott & Thofern (1980), Kölbel-Boelke (1987) und Kämpfer et al. (1988, 1989, 1991, 1996). Die Mikrotiter-Methode wurde von Kölbel-Boelke (1987) in der Arbeitsgruppe Nehr Korn etabliert und erlaubt einen differenzierten Einblick in die

potenziellen Einzelaktivitäten der Bakterienpopulationen. Mit den miniaturisierten Tests war es möglich, viele verschiedene Bakterienstämme gleichzeitig auf viele Merkmale zu prüfen. Das muss sichergestellt sein, da frisch isolierte Stämme ein etwas anderes Reaktionsmuster zeigen können als über eine längere Zeit kultivierte Stämme (Busse et al. 1996).

Untersucht wurde die Fähigkeit der einzelnen Isolate, bestimmte Kohlen- und Stickstoffquellen zu verwerten und bestimmte Enzyme zu bilden (siehe Anhang A.2). Die Tests wurden durch spezielle Nährböden zur Untersuchung des Aromatenabbaus ergänzt, um die am ursprünglichen Standort ablaufenden Prozesse durch die Tests möglichst genau abzubilden.

Der Nachweis bestimmter Stoffwechsellleistungen erfolgte überwiegend über Trübungs- oder Farbänderungen eines Indikators oder durch Abbauhöfe und nur in wenigen Fällen über ein sichtbares Wachstum der Isolate auf einem Nährmedium. Da 80 % aller Stämme auch ohne Kohlenstoffquelle in oder auf Mineralsalz-Medium wachsen können (Kölbl-Boelke 1987), bedeutet ein bakterielles Wachstum nicht unbedingt eine positive Substratverwertung. Zu falschen Ergebnissen kann allerdings auch ein Nachweis über einen Indikatorumschlag führen, wenn z.B. nicht-fermentative Bakterien verschiedene Zucker ohne Säurebildung oder organische Säuren ohne Alkalisierung verwerten (Kämpfer et al. 1991). Um den Animpffehler niedrig zu halten, wurden die Mikrotiterplatten dreimal beimpft und jeder Test in drei Parallelen ausgeführt.

Die stoffwechselphysiologische Charakterisierung ergab, dass alle Isolate unabhängig vom Isolationsmedium auf jeweils 1 mM 3-Chlorbenzoesäure, Benzoesäure (BA) und 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA) als einziger Kohlenstoffquelle und ein Großteil auf jeweils 0,5 mM Catechol (Cat) und Protocatechuat (PCat) wuchsen. Die Bakterienstämme aus dem SMR und dem AIR, die vom 3-CBA-Agar isoliert wurden, kamen auf allen Aromaten zum Wachstum. Zusammengefasst wurden die aromatischen Kohlenwasserstoffe von mehr SMR- als AIR-Isolaten verwertet.

Das Wachstum auf 3-CBA-Agar wurde in den Konzentrationen 1, 3 und 5 mM getestet. Die Anzahl wachstumsfähiger Isolate war über alle Konzentrationsstufen hinweg sehr hoch. 100 % der SMR- und AIR-Isolate wuchsen auf den Festmedien der Mikrotiterplatten mit 1 mM 3-CBA. Auch die Konzentration von 5 mM konnten noch 88 % der SMR- und 97 % der AIR-Isolate zum Wachstum nutzen.

Auf 1 mM BA und 4-HBA als denkbare Metabolite des 3-CBA-Abbaus zeigten alle Isolate ein Wachstum. Der Ausstrich auf 3 mM Nährböden ergab für 86 % der SMR-Isolate auf BA und 78 % auf 4-HBA ein positives Ergebnis. Für die AIR-Isolate wurden Werte von 75 % auf BA und 72 % auf 4-HBA ermittelt. Von den im Abbauprozess nachfolgenden potenziellen Metaboliten Catechol und Protocatechuat wurde letzteres besser verwertet, wobei die Zahl

positiv reagierender Isolate mit einer Verringerung der Konzentration beider Stoffe in den Nährböden gesteigert werden konnte. Auf 0,5 mM (55 mg/l) Cat-Agar wuchsen 64 % der SMR-Isolate und 43 % der AIR-Isolate. Die Konzentration von 0,5 mM (77 mg/l) Protocatechuat wurde von 100 % aller SMR- und AIR-Isolate zum Wachstum genutzt. Die Bakterienkolonien waren auf PCat deutlich größer als auf Cat. Erkenntnisse zum Abbauweg von 3-CBA ließen sich von diesen Beobachtungen jedoch nicht ableiten. Das demonstrierten die weiteren Untersuchungen (Kap. 3.2) und Kontrollversuche auf reinen Mineralsalz-Nährböden, die ein - wenn auch schwaches - Wachstum von fast allen Isolaten aufwiesen. Die Wachstumsversuche mit Cat und PCat zeigten somit vor allem an, wie empfindlich die Reaktion der Bakterienisolate auf zu hohe Substratkonzentrationen war.

Die Anzahl positiver Enzymreaktionen war mit fast 50 % für beide Reaktoren gleich hoch. Dagegen waren zur Umsetzung von Nitrat zu Nitrit mit 76 % wesentlich mehr AIR-Isolate fähig als SMR-Isolate mit nur 34 %, was größere sauerstoffarme Bereiche in den Belebtschlammflocken des AIR vermuten lässt, in denen Nitrat die Rolle des terminalen Wasserstoff-Akzeptors übernimmt. Die organischen Säuren wurden von den AIR-Isolaten besser verwertet, wobei über 70 % der Isolate AIR/3-CBA diese C-Quellen umsetzten, aber nur 21 % der Isolate AIR/R2A. Der prozentuale Anteil der Isolate SMR/3-CBA war mit 45 % ebenfalls wesentlich höher als der Anteil der Isolate SMR/R2A. Auffällig war, dass überwiegend die Isolate, die sämtliche Aromaten umsetzten, zu den aktivsten Verwertern der organischen Säuren zählten. Die Alkohole wurden nur von ca. 30 % aller Isolate verwertet.

Die Kohlenhydrate wurden von allen Substanzklassen am schlechtesten verwertet. Das Ergebnis ist für die beiden Vergleichsreaktoren, die ohne Kohlenhydratquelle betrieben wurden, nicht ungewöhnlich, wenn sogar bis zu 45 % der Isolate in Belebtschlämmen, die überwiegend mit Kohlenhydraten belastet waren (75 % des CSB), von Takii (1977) als unfähig charakterisiert wurden, auf Glucose wachsen zu können. Die schlechte Umsetzung der Kohlenhydrate könnte zudem mit dem hohen Anteil an Vertretern der Gattung *Alcaligenes* in den Mischkulturen korrelieren, die laut Seiler et al. (1984), Kersters & De Ley (1984) und Wyndham & Starus (1988) Zucker und Zuckeralkohole nicht verwerten.

Die Unterschiede im Substratverwertungsspektrum beider Reaktoren lassen sich auf die unterschiedlichen Milieubedingungen zurückführen. Insbesondere der hohe Betriebsdruck im SMR sorgte für sichtbar kleinere Belebtschlammflocken. Verbunden mit dem wesentlich höheren Sauerstoff-Gehalt im SMR dürfte die unterschiedliche Flockenstruktur Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Biozöosen und folglich auf das Verwertungsspektrum gehabt haben. Anaerobe Bereiche in den Belebtschlammflocken des SMR sind im Gegensatz zum AIR nicht zu erwarten.

Die SMR-Isolate wiesen eine insgesamt höhere Anzahl positiver biochemischer Tests auf, die sich zwangsläufig auch in höheren *in vitro*-Aktivitäten der Isolate widerspiegeln, die sich aus 68 der physiologischen Tests berechneten. Die *in vitro*-Aktivität gibt Aufschluss über die physiologische Gesamtaktivität eines Isolates oder der gesamten Biozönose. Die meisten AIR-Isolate zeigten eine nach Dott & Wetzel (1984) mittlere *in vitro*-Aktivität von 42 und 44 %, die meisten SMR-Isolate eine etwas höhere *in vitro*-Aktivität von 44 bis 47 %. Merklich stoffwechselaktivere Stämme (14 % der Isolate) mit *in vitro*-Aktivitäten von 51 bis 61 % wurden nur aus dem SMR isoliert.

Die Gesamtaktivität als Mittelwert der *in vitro*-Aktivitäten bestätigte, dass aus dem SMR die aktiveren Stämme isoliert wurden. Der SMR wies eine Gesamtaktivität von 37,4 % (3-CBA-Isolate: 45,9 %, R2A-Isolate: 33,1 %) auf, der AIR eine von 35,4 % (3-CBA-Isolate: 43,3 %, R2A-Isolate: 31,8 %). Der Unterschied in der Gesamtaktivität ist zwar nicht gravierend, lässt aber auf eine insgesamt höhere physiologische Leistungsfähigkeit des SMR schließen. Im Vergleich zu den von Dott & Wetzel (1984) angegebenen 13,4 % Gesamtaktivität eines Hochlastbeckens ist die Gesamtaktivität des SMR als sehr hoch einzuschätzen. Die von Dott & Wetzel (1984) durchgeführten Tests wichen von denen dieser Arbeit nur durch die Aromatenverwertungstests ab.

#### 4.1.4 Taxonomie der Bakterienisolate

Zur taxonomischen Einordnung der isolierten Bakterien wurden die aus den Mikrotiteransätzen gewonnenen Erkenntnisse über die physiologischen Fähigkeiten und auch die morphologischen Merkmale genutzt. Dabei wurde in Betracht gezogen, dass eine Bakterienspezies aus verschiedenen Stämmen oder Biotypen mit Variationen im Phänotyp besteht, die auf der Präsenz oder Abwesenheit von auf Plasmiden codierten metabolischen Funktionen beruhen können (Busse et al. 1996). Die taxonomische Einordnung erfolgte über Bestimmungsliteratur (Balows et al. 1992, Bradbury 1984, Brock et al. 1994, Busse & Auling 1992, Holmes et al. 1984, Holmes et al. 1986a,b; Kersters & De Ley 1984, Krieg & Holt 1984, Palleroni 1984 und 1992), da der Aufbau eines taxonomischen Systems mit Referenzstämmen, wie von Kämpfer (1996) und Kappesser (1990) durchgeführt, im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Eine Identifizierung mittels Literatur war nicht in jedem Fall erfolgreich. Als Ergänzung wurde der API-Test 20 NE der Fa. BioMerieux herangezogen.

Die aus der Literatur abgeleiteten Gattungs- und Speziesnamen der Bakterienstämme wurden mit der heute gültigen Nomenklatur im Catalogue of Strains 1998 der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ 1998) und im Internet (2000) abgeglichen. Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden verändern sich die Erkenntnisse

zu den Verwandtschaftsbeziehungen der Mikroorganismen laufend. Das hatte zur Folge, dass ein Großteil der Isolate in neu geschaffene oder andere Spezies eingeordnet wurde.

Auf 3-CBA-Agar (3 mM) wurden wesentlich weniger Spezies isoliert als auf R2A-Agar. Mit nur 5 bzw. 4 verschiedenen Spezies ließ sich auf 3-CBA nur ein relativ geringer Anteil der Mikroflora anreichern, der zum Teil nicht auf R2A-Medium wiederzufinden war. Obwohl fast alle Isolate 3-CBA verwerten konnten, hatte der 3-CBA-Agar eine starke selektive Wirkung auf die Mitglieder der Biozönose. Die 56 Isolate AIR/R2A wurden 26 Spezies und die 60 Isolate SMR/R2A wurden 29 Spezies zugeordnet.

Die vorgefundenen isolierbaren Vertreter der Biozönosen beider Reaktoren entsprachen den regelmäßig in Belebtschlämmen nachgewiesenen Bakteriengattungen (Seiler & Busse 1978, Wetzel & Dott 1984, Kämpfer & Dott 1989, Kämpfer 1996). Bezogen auf die alte Nomenklatur war das Artenspektrum in beiden Reaktoren recht begrenzt. Von den insgesamt 90 Isolaten aus dem SMR wurden nach der alten Nomenklatur 39 % als *Pseudomonas* (neu: *Acidovorax*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Hydrogenophaga*, *Methylobacterium*, *Oligotropha*, *Shewanella*, *Sphingomonas*), 13 % als *Xanthomonas*, 24 % als *Alcaligenes* (*Variovorax*) und 3 % als *Flavobacterium* (*Empedobacter*) eingeordnet. Die restlichen Anteile verteilten sich auf Vertreter der Gattungen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Cardiobacterium*, *Comamonas*, *Pasteurella* und *Xanthobacter* sowie auf nicht identifizierte Isolate (9 %). Von den 83 Isolaten aus dem AIR wurden 37 % als *Pseudomonas*, 28 % als *Alcaligenes*, 5 % als *Xanthomonas* und 11 % als *Flavobacterium* (neu: *Chryseobacterium*, *Myroides*) identifiziert. Die restlichen Anteile entfielen auf die fünf Gattungen *Agrobacterium*, *Alteromonas*, *Kingella*, *Moraxella* und *Xanthobacter* sowie auf nicht identifizierte Isolate (5 %).

Die Vertreter der Gattungen *Alcaligenes* bzw. *Variovorax* und *Pseudomonas* bzw. *Burkholderia* sowie *Xanthomonas* und *Agrobacterium* waren für den Abbau der 3-CBA im SMR und im AIR von besonderer Bedeutung. Sie wuchsen besonders gut auf 3-CBA und den weiteren angebotenen Aromaten und wiesen das breiteste Substratverwertungsspektrum auf. Insbesondere die erstgenannten Gattungen wurden in einer großen Zahl an Veröffentlichungen zum Aromatenabbau als typische Aromatenverwerter beschrieben (Dorn et al. 1974, Dorn & Knackmuss 1978, Fetzner & Lingens 1994, Kämpfer & Dott 1988, Overmeyer & Rehm 1995, Wyndham & Starus 1988, Rast & Springer 1997).

Einen Rückschluss auf die Leistungsfähigkeit der Reaktoren ließ das Auftreten bestimmter Gattungen nicht zu. Auffällig war jedoch, dass die am besten auf 3-CBA wachsenden Bakterienstämme nur im SMR zu finden waren. Diese Isolate wurden über die Sequenzierung ihrer 16S-rRNA und einem anschließenden Datenbankabgleich bereits bekannter Sequenzen der Gattung *Alcaligenes* zugeordnet. Durch die Sequenzierung wurden Bereiche des 16S-rRNA-Gens von *Alcaligenes* sp. nachgewiesen. Die auffälligen Merkmale der Kolonie-



morphologie und die physiologisch-biochemische Charakterisierung mussten zur endgültigen Identifizierung bis auf die Artebene mit einbezogen werden. Auch Busse et al. (1996) gehen davon aus, dass die Analyse der 16S-rRNA allein nicht ausreichend ist für eine Identifizierung auf der Spezies-Ebene. In dieser Arbeit konnte das Isolat nur mit Hilfe der klassischen mikrobiologischen Methoden als *Alcaligenes paradoxus* identifiziert werden. Nach der momentan gültigen Nomenklatur (DSMZ 1998/ 2000) trägt dieses Bakterium den Namen *Variovorax paradoxus*.

In der momentanen Diskussion über die Effizienz der verschiedenen Methoden zur Struktur- und Funktionsanalyse von bakteriellen Lebensgemeinschaften in der Abwasserreinigung werden den klassischen mikrobiologischen Methoden häufig ihre Grenzen vorgehalten. Amann (1996) ist der Meinung, dass die Kenntnisse über die den Abbauleistungen zugrundeliegenden Biozöosen durch die Unzulänglichkeit der Reinkulturtechnik für die Untersuchung komplexer, räumlich heterogener, mikrobieller Lebensgemeinschaften eingeschränkt bleiben. Begründet wird dies auch von Wagner (1996) damit, dass die klassischen Kultivierungsverfahren wegen der unvermeidlichen Selektivität nicht zur quantitativen Populationsanalyse von Umweltproben geeignet seien. Der Anteil der am Abbau beteiligten Bakterien ist wesentlich größer als die allgemein angegebenen 1 bis 10 % an kultivierbaren Zellen. Über die *in situ*-Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonucleotidsonden sollen 70 bis 90 % der mit DAPI anfärbbaren Gesamtzellzahl detektierbar sein, die nach Wagner & Amann (1996) damit auch als physiologisch aktive Bakterien anzusehen sind. Mit R2A erzielten sie nur eine Plattierungseffizienz von 19 %.

Diese Angaben stehen allerdings im Widerspruch zu den Angaben von Kämpfer, Dott & Steiof (1997), die bis zu 65 % der Bakterien aus dem Belebtschlamm als kultivierbar auf nährstoffarmen Medien angeben. Laut Kutzner (1993) erlauben Gensonden den Nachweis einzelner Bakterien, was mittels klassischer Methoden nicht möglich ist - allerdings gibt es Gensonden nur für bereits bekannte Bakterien. Diese mussten also zwangsläufig über klassische Methoden kultiviert worden sein.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich am Beispiel der Identifizierung von *Variovorax paradoxus*, dass auch die molekularbiologischen Methoden alleine nicht immer zum Ziel führen. Die klassischen Methoden haben einen großen Beitrag zum Gesamtbild der mikrobiologischen Situation in den Vergleichsreaktoren geleistet.

## 4.2 Beschreibung des Chloraromatenabbaus

Der Abbau der Modellschadstoffe 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA) und 4-Chlorphenol (4-CP) wurde mit Belebtschlämmen aus dem Suspensions-Membranreaktor, dem Airlift-Schlaufenreaktor, den Rührkolben, einem Fermenter und einer Blasensäule untersucht. Die Experimente wurden sowohl mit den Mischkulturen als auch mit den aus dem SMR isolierten Reinkulturen durchgeführt.

Im Mittelpunkt standen die Untersuchungen des Einflusses der Sauerstoff-Konzentration, des Ringspaltungsmechanismus der aromatischen Kohlenwasserstoffe, des Auftretens von Metaboliten, die den Abbau beeinträchtigen können, des Zeitpunktes der Dechlorierung und der Abbaukinetiken der eingesetzten Schadstoffe. Mittels dieser Untersuchungen wurden die im Reaktor ablaufenden biochemischen Umwandlungsprozesse weitgehend beschrieben. Die gewonnenen Erkenntnisse zum mikrobiellen Abbau der chlorierten Aromaten können einer leichteren Überwachung und einer Optimierung des Anlagenbetriebs dienen. Eine einfache Übertragung der Versuchsergebnisse auf den Abbau von anderen Abwasserinhaltsstoffen im SMR ist allerdings nicht möglich.

### 4.2.1 Einfluss der Sauerstoff-Konzentration

Die Untersuchungen zum Einfluss der  $O_2$ -Konzentration ergaben, dass sich ein erhöhter  $O_2$ -Gehalt im SMR positiv auf die Raum-Zeit-Ausbeute auswirkte. Der erzielte DOC-Umsatzgrad beim Abbau der verwendeten organischen Kohlenstoffquellen stieg im SMR mit zunehmendem  $O_2$ -Gehalt an. In der Blasensäule wurde das gegenteilige Phänomen beobachtet.

Im praktischen Betrieb des SMR zeigte sich im Gegensatz zu den Ausführungen von Bräutigam & Sekoulov (1986) keine Hemmung des biologischen Abbaus durch sehr hohe  $O_2$ -Konzentrationen. Entscheidend für eine Hemmung war nicht der  $O_2$ -Gehalt sondern der Grad der Adaption der Biozönose an bestimmte  $O_2$ -Konzentrationen. In der Blasensäule führten 40 mg/l  $O_2$  zu einer Halbierung der Reaktionsgeschwindigkeit, weil die Bakterien an die niedrige  $O_2$ -Konzentration von ungefähr 8 mg/l adaptiert waren, der sie drei Tage vor den Versuchen ausgesetzt waren.

### 4.2.2 Nachweis der Aromatenringspaltung

Durch die Entstehung eines roten Farbstoffs in der Rothera-Reaktion (Focht & Shelton 1987) wurde 3-Oxoacetyl-CoA als Metabolit nachgewiesen, der mehrere Reaktionsschritte nach der *ortho*-Spaltung von Catechol und Protocatechuat auftritt (Süßmuth 1987, Lidstrom 1990). Dieser qualitative Nachweis belegt das Vorliegen von 3-Oxoacetyl-CoA im Versuchsansatz,

sagt aber nichts darüber aus, in welcher Konzentration 3-Oxoadipyl-CoA auftrat und ob nicht auch noch andere Metabolite vorhanden waren.

Die *ortho*-Spaltung stellte in den untersuchten Biozönosen den hauptsächlich beschriebenen Weg der aromatischen Ringspaltung dar. Über den *ortho*-Weg wurden im SMR und im AIR 3-Chlorbenzoesäure, 4-Chlorphenol sowie Catechol und Protocatechuat als zentrale Metabolite des aeroben Aromatenabbaus gespalten. Für die Biozönosen der beiden Rührkolben ergab sich das gleiche Ergebnis. Die aus dem SMR isolierte Reinkultur *Variovorax paradoxus* baute 3-CBA, 4-CP und Catechol ebenfalls über die *ortho*-Spaltung ab. In Vorversuchen (Lampe 1998) wurden mit Hilfe photometrischer Messungen im Spektralphotometer bei 260 nm Hinweise auf die Bildung der *ortho*-Spaltungsprodukte *cis,cis*-Muconat als Metabolit des Catechol-Abbaus und *cis,cis*-Muconat bzw. Chlor-*cis,cis*-Muconat als Metabolit des 3-CBA-Abbaus durch Enzymrohextrakte des SMR gewonnen.

Eine *meta*-Spaltung des aromatischen Rings beim Abbau von 3-CBA, 4-CP, Catechol und Protocatechuat durch Kulturen aus dem SMR, dem AIR und den Rührkolben war durch den optischen Farbttest nicht nachweisbar. Auch die direkte photometrische Bestimmung von Metaboliten bei bestimmten Wellenlängen im Spektralphotometer durch Enzymrohextrakte aus dem SMR zeigte keinen Abbau von 3-CBA bzw. Catechol und Protocatechuat über die *meta*-Spaltung des aromatischen Rings (Lampe 1998). Der *meta*-Abbauweg scheint daher in den Biozönosen von nur untergeordneter Rolle gewesen zu sein.

### 4.2.3 Nachweis von Metaboliten des Chloraromatenabbaus

Der Abbau der Schadstoffe wurde über die Aufnahme von UV/VIS-Absorptionsspektren mittels UV-Spektroskopie und HPLC verfolgt. Mögliche Metabolite wurden anhand ihrer Absorptionsmaxima nachgewiesen. Bei der UV-Spektroskopie konnten anders als bei der HPLC mangels einer vorgeschalteten Trennung Überlagerungen der Signale verschiedener Metabolite auftreten. Für die Routinekontrolle und die Ermittlung der Abbaudauer war die UV-Spektroskopie jedoch durch die geringe Vorbereitungszeit sehr vorteilhaft. Die Messungen mit der HPLC erforderten eine längere Vorbereitungszeit, waren aber äußerst sensitiv, so dass geringste Konzentrationen der Intermediate detektiert werden konnten. Die Identifizierung der Metabolite sollte über die Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie erfolgen.

Die Untersuchungen zum Nachweis von Metaboliten umfassten die Versuche zur Abbaukinetik mit den Mischkulturen aus dem SMR und den Rührkolben sowie Versuche mit Reinkulturen. Zusätzlich wurden die über Jahre gespeicherten HPLC-Daten mehrerer hundert

Proben der routinemäßigen Betriebskontrollen des SMR und des AIR bezüglich des Auftretens von Metaboliten während des 3-CBA-Abbaus ausgewertet.

#### 4.2.3.1 Nachweis der Metaboliten von 3-Chlorbenzoesäure

In den Vorversuchen mit SMR-Kulturen im Batch-Ansatz wurden mittels UV-Spektroskopie Metabolite detektiert, die ein Absorptionsmaximum bei 260 nm hatten. Ein Absorptionsmaximum bei 260 nm weisen laut Ngai et al. (1990) *cis,cis*-Muconat oder Chlor-*cis,cis*-Muconat auf. Das UV-Spektrum hatte eine große Ähnlichkeit mit dem Referenzspektrum von *cis,cis*-Muconat. In dem UV-Spektrum wich die Peakform nur leicht von *cis,cis*-Muconat ab. Allerdings war kein gemeinsamer Schnittpunkt der Spektren im Verlauf des 3-CBA-Abbaus zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass nicht nur *cis,cis*-Muconat vorlag und dass sich die Spektren verschiedener Metabolite zum Teil überlagerten. Der Nachweis dieser Metabolite war nur für einen kurzen Zeitraum im 3-CBA-Betrieb des SMR möglich. In später folgenden Experimenten wurden entweder keine Intermediate nachgewiesen oder auftretende Peakmaxima waren verschoben. Alle im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Metabolite bzw. Metabolitengemische absorbierten bei anderen Wellenlängen als 260 nm, so dass *cis,cis*-Muconat mittels HPLC und HPLC-MS nicht identifiziert werden konnte.

In den Vorversuchen wurden die Metabolite der Batch-Versuche mit SMR-Kulturen nur dann festgestellt, wenn der Abbau schnell innerhalb von 60 Minuten ablief. Die Zeiten sämtlicher Abbaureihen variierten von 30 bis 180 Minuten und ließen eindeutig auf den Aktivitätszustand der Biomasse schließen. Bei einem verzögerten 3-CBA-Abbau in SMR-Proben von mehr als 60 Minuten wurden nie Metabolite gefunden. Es war lediglich die Abnahme der 3-CBA-Konzentration messbar. Daraus lässt sich ein geschwindigkeitsbestimmender Reaktionsschritt am Anfang des 3-CBA-Abbaus ableiten. Weder eine Ringspaltung von Chlorcatecholen noch die Ringspaltung von nicht substituierten Aromaten stellten demnach die Schlüsselreaktionen des Chloraromatenabbaus in diesen Ansätzen dar, wie es von Schmidt et al. (1983) bzw. Kataeva & Golovleva (1990) beschrieben wurde. Läuft der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt am Anfang des 3-CBA-Abbaus bei einer sehr aktiven Biozönose sehr schnell ab, kann es erst durch diese hohe Umsatzrate an einer weiteren Stelle des Metabolismus zu einer Anreicherung von Intermediaten kommen. Das Auftreten von *cis,cis*-Muconat deutete auf einen Reaktionsschritt nach der Ringspaltung hin. Die Ergebnisse der Abbauprobe in Kap. 3.2.4 verdeutlichten, dass es sich bei dem ersten geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt um die Dechlorierung handelte.

Die Recherche in den gespeicherten HPLC-Daten des 3-CBA-Abbaus ergab nur in wenigen Proben Signale, die auf die Bildung von Metaboliten hindeuteten. In einigen Absorptionsspektren von SMR-Proben wurden Peaks bei 290 nm festgestellt, die auf 3-Carboxy-*cis,cis*-

Muconat als *ortho*-Ringspaltungsprodukt im Abbauweg von Protocatechuat hinweisen. In einigen AIR-Spektren wurden Peaks bei 280 nm erfasst, die keiner Verbindung zugeordnet werden konnten. Außer in diesen Einzelfällen wurden keine Metabolitenpeaks festgestellt. Daraus lässt sich schließen, dass der Abbau der Modellschadstoffe in beiden Reaktoren unter stabilen Betriebsbedingungen mit regelmäßiger Beschickung (ca. alle 10 Minuten) ohne messbare Metabolitenanreicherung ablief.

In fast allen 3-CBA-Abbauversuchen mit den Rührkolben-Kulturen traten Intermediate in einer nur über die HPLC detektierbaren, äußerst geringen Konzentration unmittelbar nach der Substratzugabe auf. Daher sollten diese Intermediate die Folge einer frühzeitigen Dechlorierung sein und in den nachfolgenden Reaktionsschritten vor oder nach der Aromatenring-spaltung angereichert worden sein. Die Metabolitenkonzentration nahm während des Abbaus ab, was darauf hin deutet, dass es sich bei den Metaboliten nicht um Produkte des *meta*-Abbauweges handelte, da sich diese anreichern würden (Knackmuss 1979, Müller et al. 1996). Da sie aber auch noch nach Abbau der 3-CBA nachweisbar waren, stellte die Umsetzung dieser Intermediate den langsamsten Schritt des gesamten 3-CBA-Abbaus dar. Im Unterschied zum SMR war die 3-CBA-Abbaugeschwindigkeit im Rührkolben für eine Metabolitenanreicherung nicht von Bedeutung.

Die Struktur der Intermediate der Rührkolben-Kulturen konnte nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Verbindungen waren in der Massenspektrometrie nicht darstellbar, weil sie möglicherweise nicht ionisierbar waren. Die UV-Spektren wiesen bezüglich des Maximums bei 275 nm eine Ähnlichkeit mit Catechol aus. Die Retentionszeit stimmte von 1,6 bis 1,8 Minuten jedoch nicht überein. Das UV- und das Massenspektrum von Catechol mit dem Molekülion der Masse 109 m/z sind zum Vergleich im Anhang A.4 dargestellt. In Folge der zu geringen Konzentration brachte auch die NMR-Spektroskopie der AG Leibfritz nur wenig Erkenntnisse. Die Struktur des Metaboliten könnte einen Ringschluss aufgewiesen haben und besaß wahrscheinlich eine Carboxylgruppe (Engelmann 2000, pers. Mitteilung).

In den Versuchen mit EDTA zur Hemmung der Muconat-Cycloisomerase zeigte sich eine nur unwesentlich höhere Anreicherung der Metaboliten mit einem Peakmaximum bei 275 nm. Das UV-Spektrum ähnelte zwar in seiner Form dem Spektrum ohne EDTA-Einfluss, hatte aber nicht die gleiche Retentionszeit. Die Untersuchungen der AG Leibfritz mittels NMR-Spektroskopie ergaben in Anwesenheit von EDTA zumindest zwei Metaboliten mit unterschiedlicher Struktur, von denen eine Catechol-verwandt zu sein schien. Es reicherten sich eine aromatische Struktur mit drei benachbarten Substituenten und der gleiche Metabolit an, der im Ansatz ohne EDTA gefunden wurde. Bei der aromatischen Struktur hätte es sich theoretisch um 3-Chlorcatechol handeln können, da das Peakmaximum von 275 nm mit dem von Chatterjee et al. (1981) beschriebenen überein stimmte. Allerdings sprachen die

Ergebnisse der kinetischen Versuche eindeutig dagegen und in keinem der Massenspektren wurden entsprechende Banden von Molekülonen der Masse 144 m/z gefunden.

Im 3-CBA-Betrieb des Rührkolbens wurde ein Metabolitengemisch nachgewiesen, das die Folge eines unvollständigen 3-CBA-Abbaus war. Wie im SMR waren unter stabilen Bedingungen keine Metabolite nachzuweisen. Die abzentrifugierte Probenlösung wies eine ungewöhnliche gelbe Färbung auf. Das Peakmaximum lag wiederum bei 275 nm, nur war die Retentionszeit im Gegensatz zu den Abbauprobversuchen im Batch-Ansatz verschoben. Das Massenspektrum zeigte eine große Zahl von Banden mit einem Hauptfragment der Masse 141 m/z. Das Massenspektrum entsprach jedoch keiner bekannten Verbindung.

Weitere Metaboliten mit einem ähnlichen UV-Spektrum und einem Maximum von 275 nm wurden beim 3-CBA-Abbau durch die aus dem SMR isolierte Reinkultur *Variovorax paradoxus* nachgewiesen. Im Massenspektrum traten jedoch auch andere Banden auf, deren Muster keiner bekannten Substanz zugeordnet werden konnte.

Zusammengefasst traten die am häufigsten nachgewiesenen Metabolite entweder nach Störungen des Abbaus oder in den 3-CBA-Batch-Versuchen der Rührkolben-Kulturen auf. In den Routineanalysen des SMR wurden nur selten Intermediate erfasst. Das stützt die Vermutung, dass der Abbau von 3-CBA im störungsfreien Betrieb des SMR ohne messbare Metabolitanreicherung abläuft. Die Ähnlichkeiten der UV-Spektren dieser Metabolitengemische mit einer maximalen Absorption bei 275 nm lassen vermuten, dass die festgestellten Strukturen über ein ähnliches Grundgerüst verfügen. Die UV-Spektren geben Hinweise auf das Vorhandensein ungesättigter Gruppen, konjugierter Systeme und aromatischer Ringe in den Molekülen (Christen 1978), klären aber nicht über die Substituenten auf. In fast allen Massenspektren erschien ein Fragment mit der Massenzahl 141 m/z. Substanzen mit der Masse 142 abzüglich eines Protons sind *cis,cis*-Muconat, Muconolacton, 4-Oxoadipat-enollacton und 2-Hydroxymuconat-semialdehyd (siehe auch Anhang A.4). Diese Substanzen weisen UV-Spektren auf. Ein Fragment mit der Masse 141 wurde allerdings auch in der Mineralsalzlösung gefunden, welches jedoch keine UV-Aktivität aufwies. Die Fragmentmuster in den Massenspektren der Metabolite zeigten keine der genannten Verbindungen. Die Abweichungen von Massenspektren der Reinsubstanzen waren auch auf die zu niedrigen Konzentrationen der festgestellten Metabolite zurückzuführen. Für eindeutige Muster mit ausgeprägten Molekülonen müsste die Konzentration der zu detektierenden Verbindungen höher sein.

Sämtliche Autoren, die Metaboliten mit Hilfe der UV-Spektroskopie oder der HPLC identifiziert haben, arbeiteten mit Reinkulturen oder definierten Mischkulturen. Die in dieser Arbeit aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Identifikation von einzelnen Metaboliten wurden daher nicht beschrieben. Die Probleme waren unabhängig von der Detektionsmethode, da nur die Verbindungen eindeutig identifiziert werden können, die zuvor über Standards charakterisiert

werden (Oltmanns et al. 1989). Das bedeutet, dass das UV-Spektrum bekannt sein musste, um einen Stoff über die UV-Spektroskopie, die HPLC und auch über die Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie nachweisen zu können. Die Retentionszeit ist in allen chromatografischen Methoden charakteristisch für eine Substanz. In der Massenspektrometrie musste zudem das Fragmentmuster einer unbekannt Substanz mit Referenzmustern übereinstimmen. Bei der Vielzahl mikrobieller Abbauewege war es daher unmöglich, alle potenziellen Metabolite in einer Musterbibliothek aufzunehmen. Erschwerend kam hinzu, dass nicht alle chromophoren Verbindungen, die ein UV-Spektrum aufweisen, in der Massenspektrometrie darstellbar waren und dass die äußerst geringe Konzentration der Intermediate das Auftreten eindeutiger Signale komplizierte.

Je genauer die einzelnen Verbindungen mit einer Methode aufgetrennt und analysiert wurden, desto schwerer waren Abweichungen von der Referenz zu beurteilen. Dies wurde in den Massenspektren von *cis,cis*-Muconat sichtbar. Sowohl im DAD- und MSD-Spektrum wurde *cis,cis*-Muconat in einen Doppelpeak aufgespalten. Der Doppelpeak weist auf eine mögliche thermische Aufspaltung im Massenspektrometer von *cis,cis*-Muconat in Mineralsalz-Medium hin, in dem die Substanz zur besseren Vergleichbarkeit gelöst wurde. In Methanol als Lösungsmittel gab es nur einen Peak. Dieses Verhalten ließ sich nicht vollständig aufklären. Ngai et al. (1983) beschreiben eine spontane Bildung der *cis,trans*- und *trans,trans*-Isomere, Meagher et al. (1990) eine spontane Isomerisierung durch Erhitzen zu *cis,trans*-Muconat und Viliesid & Lilly (1992) eine Umwandlung von *cis,cis*-Muconat in das *cis,trans*-Isomer durch Hitze und Licht. Der Einfluss des Lösungsmittels blieb dabei unklar. Die beiden Teile des Doppelpeaks wiesen fast deckungsgleiche UV- und Massenspektren auf.

In den Reaktor-Proben könnten folglich auch nicht aufklärbare Isomerisationsphänomene die Identifikation von Metaboliten erschweren. Der Umgang mit Mischkulturen verhinderte zudem die Eindeutigkeit von bestimmten Signalen, da diese höchst wahrscheinlich nicht von einer Reinsubstanz erzeugt wurden. Dieses Problem trat wiederum bei allen Detektionsmethoden auf.

Erfolgreich wurde der Nachweis des Auftretens von Metaboliten des 3-CBA-Abbaus im Rahmen dieser Arbeit erbracht. Über die HPLC und die HPLC-MS wurden Intermediate festgestellt, die nur für kurze Zeit oder nur in einem der untersuchten Reaktorsysteme auftraten.

#### 4.2.3.2 Nachweis der Metaboliten von 4-Chlorphenol

In den Abbaueversuchen von 4-CP mit den Mischkulturen aus dem SMR und dem Rührkolben wurden keine Metabolite nachgewiesen, es war lediglich die Abnahme von 4-CP messbar.

Auch die Reinkultur *Variovorax paradoxus* setzte 4-CP ohne sichtbare Metabolitenanreicherung um.

In den Rührkolben im 4-CP-Betrieb traten jedoch an einigen Tagen geringe Konzentrationen an Metaboliten auf. In den UV-Spektren von frisch abzentrifugierten, gelb gefärbten Belebtschlammproben zeigten sich Peaks bei 380 nm. Zumeist fiel das Auftreten mit einem unvollständigen 4-CP-Abbau zusammen. Westmeier & Rehm (1987) führten eine gelbliche Färbung auf die Akkumulation einer halogenaromatischen Verbindung zurück, die mit einem UV-Maximum bei 380 nm die spektralen Eigenschaften von 5-Chlor-2-Hydroxy-muconat-semialdehyd aufwies. Schmidt et al. (1983) und Hartmann et al. (1979) konnten beim Auftreten einer Gelbfärbung, die durch 5-Chlor-2-Hydroxy-muconat-semialdehyd hervorgerufen wurde, die Aktivität der Catechol-2,3-Dioxygenase messen. Hartmann et al. (1979) gaben die Menge des *meta*-Spaltungsproduktes von 4-Chlorcatechol mit weniger als 1 % des verwerteten Substrates an. Auch Rubio et al. (1986) stellten bei 380 nm Metaboliten nach den *meta*-Spaltungen von Chlor- und Methylsalicylaten fest. Es war daher zu vermuten, dass die Biozönose an den Tagen mit einem unvollständigen 4-CP-Abbau Anteile von 4-CP über den *meta*-Abbauweg umsetzte. Bei einem störungsfreien 4-CP-Abbau wurde 4-CP über den ortho-Weg gespalten.

#### **4.2.4 Abbaukinetiken der Chloraromaten**

##### **4.2.4.1 3-Chlorbenzoesäure-Abbaukinetik**

Die Versuche zur Reaktionskinetik klärten zugleich über die Dauer des Abbaus und den Zeitpunkt der Dechlorierung auf. Der 3-CBA-Abbau wurde nach Stoßbelastungen von 0,5 und 1,0 mM 3-CBA (2,0 mM nur im Fermenter) gemessen. Das Biomassewachstum während des Abbaus war zu vernachlässigen. Die kinetischen Parameter wurden über die Linearisierungen nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee und Dixon-Webb berechnet.

Der größte Teil der 3-CBA-Abbaukinetikversuche wurde mit Rührkolben-Proben im Röhrenansatz ausgeführt, um den Abbau in kurzen Intervallen von 5 Minuten zu kontrollieren und das Auftreten von Metaboliten festzustellen. Da die Bakterien auf Grund des hohen Schlammalters im Reaktor in der stationären Phase vorlagen, wurden auch Untersuchungen in einem Fermenter vorgenommen, in dem eine Bakterienkultur in der exponentiellen Wachstumsphase angezüchtet werden sollte. Das sollte einen maximalen Substratumsatz unabhängig von Transportwiderständen in der Grenzschicht der Belebtschlammflocken und in der Flocke selbst gewährleisten. Der Fermenter der AG Rübiger sollte hierfür als Referenzreaktor dienen.



Die Biozönose zeigte im ersten Versuch mit 1 mM 3-CBA eine geringe Abbauaktivität als Folge der hohen Restkonzentration von 550 mg/l 3-CBA, die der kontinuierlich beschickte Fermenter bereits vor der Stoßbelastung aufwies. Zu einer völligen Hemmung kam es jedoch nicht, was sich mit den Ausführungen von Müller et al. (1996) deckt, die von einer leichten Substratinhibition durch 3-CBA erst bei Konzentrationen von 25 mM (= 3.914 mg/l) berichten. Der zweite Versuch zeigte zwar einen verbesserten 3-CBA-Abbau bei einer Substratkonzentration von 2 mM 3-CBA, aber die Abbaudauer war mit 180 Minuten ähnlich lang wie die, die mit Kulturen aus dem SMR und aus dem Rührkolben erreicht wurde. Eine Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase sollte den Schadstoff unabhängig von Transportwiderständen wesentlich schneller umsetzen können. Das Schlammalter war demzufolge im zweiten Versuch zu hoch. Negative Auswirkungen hatte sicherlich auch der im Fermenter festgestellte hohe Chlorid-Gehalt, eine Anreicherung von Metaboliten war in der HPLC nicht zu messen.

Im Rührkolben variierte die Abbaugeschwindigkeit bei gleicher Ausgangskonzentration von 0,5 mM 3-CBA (= 78 mg/l) erheblich. Dies war auf schon kleinste Veränderungen in den Betriebsbedingungen des Rührkolbens zurückzuführen. Da dieses Phänomen auch in Proben aus dem SMR und dem Fermenter beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Milieubedingungen für die Abbaukinetik von entscheidender Bedeutung waren.

Ebenfalls wurde festgestellt, dass die Zugabe von EDTA zu keiner Verzögerung des Abbaus von 3-CBA führte. *Cis,cis*-Muconat wurde nicht akkumuliert, was bedeutet, dass das Enzym Muconat-Cycloisomerase nicht durch EDTA gehemmt wurde. Es kam allerdings zu einer zwischenzeitlichen Anreicherung von Intermediaten in äußerst niedriger Konzentration direkt nach der Substratzugabe in den Ansätzen mit und ohne EDTA. Daraus lässt sich folgern, dass die initialen Reaktionsschritte ungestört vom Stoffwechselhemmstoff EDTA abliefen. Die Wirkung des EDTA könnte durch die Schutzfunktion der extrapolymeren Substanzen (EPS) - die Anlagerung an die Flockenmatrix - gemindert worden sein (Wobus et al. 1995). EDTA hatte jedoch einen Einfluss auf die Struktur der kurzzeitig angereicherten Metabolite, wie bereits in Kap. 4.2.3.1 geschildert wurde.

Sowohl bei kurzen als auch bei längeren Abbauzeiten von 0,5 mM 3-CBA entsprach die freigesetzte Konzentration der Chlorid-Ionen über die gesamte Versuchsdauer genau der abgebauten 3-CBA-Konzentration. Auch bei einer höheren Substratzugabe von 1 mM 3-CBA stieg der Chlorid-Gehalt in einem stöchiometrischen Verhältnis an. Eine äquimolare Chlorid-Freisetzung bei einer kompletten 3-CBA-Degradation beobachteten auch Knackmuss (1979), Hartmann et al. (1979), Wyndham & Starus (1988), Wilderer et al. (1991) und Müller et al. (1996). Da das Substrat gebundene Chlorid komplett als anorganisches Chlorid wieder gefunden wurde, könnten chlorhaltige Intermediate (AOX) nur extrem kurzzeitig und nur in einer so untergeordneten Konzentration auftreten, dass sie in der Chlor-Massenbilanz

unentdeckt bleiben, oder die vorübergehend auftretenden Intermediate waren nicht chloriert (Müller et al. 1996). In Kap. 3.2.3.1 wurde gezeigt, dass die Umsetzung dieser Intermediate der langsamste und damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion der Rührkolben-Kulturen war. Dies bedeutet zudem, dass weder der Transport des Substrates 3-CBA durch die Zellmembran noch der initiale mikrobielle Angriff - die Dehalogenierung - geschwindigkeitslimitierend waren (Müller et al. 1996).

Eine initiale Dechlorierung durch hydrolytische oder oxygenolytische Mechanismen beim Abbau von Chlorbenzoesäuren wurde inzwischen von vielen Autoren beschrieben (Fetzner & Lingens 1994, Müller et al. 1996, Reineke 1989, Reineke et al. 1997, Reineke et al. 2000, Thiele et al. 1987). Das weicht erheblich von der bisherigen Lehrmeinung ab, die besagt, dass Chlorbenzoesäuren im Allgemeinen über den modifizierten *ortho*-Weg über Chlorcatechole als Intermediate abgebaut werden (Müller 1992, Kleinstaub & Babel 1997).

Die kinetischen Parameter des 3-CBA-Abbaus wurden aus den vorliegenden Abbaukurven der Batch-Versuche berechnet. Aus der Auftragung der Substratkonzentration gegen die 3-CBA-Abbauraten (Abb. 3.24) war zu entnehmen, dass der 3-CBA-Abbau im Rührkolben und im Fermenter einer Substratüberschusshemmung nach Haldane (1930) folgte. Eine Substratüberschusshemmung ist daher auch für den 3-CBA-Abbau im SMR zu erwarten.

Die ermittelten kinetischen Parameter wiesen für den Rührkolben eine große Schwankungsbreite auf, was auf die jeweiligen Betriebsbedingungen zurückzuführen war. Die Werte für  $v_{\max}$  differierten für den Abbau von 0,5 mM 3-CBA von 112,4 bis 340,4 mg 3-CBA/l · h. Auf den Biomassegehalt bezogen lag die maximale Umsatzgeschwindigkeit bei 62,8 bis 121,5 mg 3-CBA/g TS · h. Die Werte für  $K_S$  betragen 15,1 bis 24,5 mg/l. Der schnellste Abbau (RK 8) war nach der höchsten Nährstoffzufuhr der Rührkolben mit 3 bis 5 mM 3-CBA pro Tag zu beobachten. Vor den anderen Versuchen wurden dem Rührkolben nur 2 mM 3-CBA pro Tag zugeführt. Die maximalen Umsatzraten von höheren 3-CBA-Ausgangskonzentrationen im Rührkolben (1 mM) und im Fermenter (2 mM) lagen in der gleichen Größenordnung. Die Hemmkonstanten der Substratüberschusshemmung  $K_I$  waren jedoch mit 117,4 (RK 9) bzw. 251 mg/l 3-CBA (Fermenter) deutlich größer.

Müller et al. (1996) ermittelten in Batch-Versuchen eine maximale Umsatzrate von 900 mg 3-CBA/g TS · h bei 10- bis 30-fach höheren Ausgangskonzentrationen von 700 bis 4.270 mg 3-CBA/l und einen Ertrag  $Y = 81,5$  mg TS/mM 3-CBA. Eine leichte Substratinhibition stellten sie erst bei 25 mM (= 3.914 mg/l) 3-CBA-Ausgangskonzentration fest. Foht & Shelton (1987) ermittelten mit einer Reinkultur von *Pseudomonas alcaligenes* einen Ertrag  $Y = 34 \pm 2$  mg TS/mM 3-CBA und eine Sättigungskonstante  $K_S = 28,3$  mg/l ( $\pm 12,5$ ). Der  $K_S$ -Vergleichswert war höher als die Halbwerts-Konstante der Rührkolben-Proben und niedriger als die des Fermenters. Die geringeren Sättigungskonstanten  $K_S$  im Rührkolben sind

die Folge der besseren Milieubedingungen im Vergleich zum Fermenter. Die Milieubedingungen werden durch  $K_S$  stärker berücksichtigt als durch  $v_{\max}$ , da  $K_S$  von den energetischen Zuständen der Reaktanten in der unmittelbaren Nähe der ersten enzymkatalysierten Reaktion abhängig ist (Bergeron 1978). Der niedrigere  $K_S$ -Wert kennzeichnet eine höhere Bindungsstärke zwischen Substrat und Enzym (Michaelis & Menten 1913) und damit eine höhere Umsetzung.

Eine wesentlich geringere Dechlorierungsrate von  $v = 18,9 \text{ mg 3-CBA/l} \cdot \text{h}$  ermittelten Fava et al. (1995) durch eine Reinkultur von *Alcaligenes sp.* CPE3 bei Ausgangskonzentrationen von  $1,28 \text{ mM 3-CBA}$ . Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten für 3-CBA sind trotz der Schwankungen als relativ hoch einzuschätzen.

In den Untersuchungen mit Proben aus dem SMR wurde auch von Lampe (1998) eine große Varianzbreite festgestellt. Die Substratumsätze wurden aus den Abbauzeiten errechnet und variierten an den meisten Versuchstagen von  $33 \text{ bis } 105 \text{ mg 3-CBA/l} \cdot \text{h}$  und erreichten an drei Tagen Höchstwerte von  $268 \text{ mg 3-CBA/l} \cdot \text{h}$ . Eine maximale Stoffumsatzgeschwindigkeit wurde nicht berechnet, aber in Anbetracht der Vergleichsdaten aus dem Rührkolben dürften Werte für  $v_{\max} \approx 67 \text{ bis } 385 \text{ mg 3-CBA/l} \cdot \text{h}$  im SMR erreichbar sein. Auch in diesen Untersuchungen wurden die Schwankungen mit Störfällen im Reaktorbetrieb in Zusammenhang gebracht. Das Potential des SMR könnte bei einem fehlerfreien Betrieb deutlich erhöht werden.

#### 4.2.4.2 4-Chlorphenol-Abbaukinetik

Die Versuche zur 4-CP-Abbaukinetik wurden mit Rührkolben-Proben im Röhrenansatz und mit SMR-Proben im Schüttelkolbenansatz vorgenommen. Sie klärten zugleich über die Dauer des Abbaus und den Zeitpunkt der Dechlorierung auf. Der 4-CP-Abbau wurde nach Stoßbelastungen mit  $0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,8$  und  $1,0 \text{ mM 4-CP}$  gemessen. Die kinetischen Parameter wurden über die Linearisierungen nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee und Dixon-Webb berechnet.

Die Abbaugeschwindigkeit von  $0,5 \text{ mM 4-CP}$  ( $= 64,3 \text{ mg/l}$ ) war im Röhrenansatz mit den Rührkolben-Kulturen und einer SMR-Kultur langsamer als die von 3-CBA. Die Rührkolben-Kulturen benötigten  $60 \text{ bis } 170 \text{ Minuten}$ , die Vergleichskultur aus dem SMR ungefähr  $210 \text{ Minuten}$ . Der Abbau von  $1,0 \text{ mM 4-CP}$  im Rührkolben dauerte  $330 \text{ Minuten}$ . Eine EDTA-Zugabe hatte wie beim 3-CBA-Abbau keinen Einfluss auf die Abbaudauer. Anders als beim 3-CBA-Abbau benötigten die Kulturen jedoch eine Anlaufzeit nach der Substratzugabe, obwohl die Biozönose lange genug an diesen Schadstoff adaptiert gewesen sein sollte.

Der 4-CP-Abbau durch die SMR-Kulturen im Schüttelkolbenansatz zeichnete sich dadurch aus, dass die Abbaugeschwindigkeit mit abnehmender 4-CP-Konzentration deutlich zunahm. Anders als beim 3-CBA-Abbau war eine Substratüberschusshemmung bereits aus den Zeit-Umsatz-Kurven zu erkennen, da die Reaktionsgeschwindigkeiten mit steigenden Anfangskonzentrationen reduziert waren (Hartmann 1992). Eine Verlängerung der lag-Phasen mit zunehmender 4-CP-Konzentration wurde auch von Hollender (1994) festgestellt. Die Auftragungen der 4-CP-Konzentration gegen die Abbaugeschwindigkeit von drei Rührkolben-Kulturen und den SMR-Kulturen (Abb. 3.28, 3.29) wiesen eine ausgeprägte Substratüberschusshemmung nach Haldane (1930) aus. In den Abbildungen dominierte der abfallende Teil der Haldane-Kinetik. Nur im Bereich äußerst niedriger Substratkonzentrationen war ein Ansteigen der Abbauraten festzustellen.

Die kinetischen Parameter des 4-CP-Abbaus wurden mittels Linearisierungen aus den Abbaukurven der Batch-Versuche berechnet. Das Biomassewachstum während des Abbaus wurde zur Berechnung vernachlässigt, da beim Abbau von 0,5 mM 4-CP in den Versuchen zur Ermittlung des Ertragskoeffizienten (Kap. 3.2.4.2.1) nur 4,2 mg Protein bzw. 15,9 mg TS gebildet wurden. Ein so geringes Biomassewachstum konnte im Versuchszeitraum von acht Stunden nicht reproduzierbar bestimmt werden, da der Messfehler der Methoden zur Ermittlung der Biomasseparameter größer ist. Die molaren Ertragskoeffizienten betragen  $Y = 8,4$  g Protein/mol 4-CP bezogen auf den Protein-Gehalt und  $Y = 31,9$  g TS/mol 4-CP bezogen auf den TS-Gehalt. Dieser Ertragskoeffizient war ungefähr achtfach höher als der von Mäkinen et al. (1993) ermittelte Wert für  $Y = 3,86$  g TS/mol Trichlorphenol (TCP) in der Untersuchung der Toxizität von Tri-, Tetra- und Pentachlorphenolen. Auf Grund der geringeren Toxizität von 4-CP im Leuchtbakterientest, für die Wobus (1997) einen siebenfach niedrigeren Wert als für TCP angab, steht der in dieser Arbeit ermittelte Ertrag in einem guten Verhältnis zu dem Vergleichswert von Mäkinen et al. (1993).

Die maximale Reaktionsrate  $v_{\max}$  war im Rührkolben beim Abbau von 0,5 mM 4-CP mit höchstens 69,7 mg 4-CP/l · h bzw. 30,7 mg 4-CP/g TS · h nur halb so hoch wie die, die für den 3-CBA-Abbau ermittelt wurde. Bereits bei Konzentrationen von  $K_S = 2,53$  bzw. 2,74 mg 4-CP/l wurde die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht. Die Hemmkonstante, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit wieder halbmaximal ist, lag mit  $K_I = 36,8$  bis 50,1 mg 4-CP/l im Vergleich zum 3-CBA-Abbau nur etwas niedriger. Bei Verdopplung der Anfangskonzentration auf 1,0 mM 4-CP im Rührkolben, die zu einer fünffachen Abbaudauer führte, wurde  $v_{\max}$  unabhängig von den Bezugsparametern Volumen, Protein oder TS halbiert. Die Hemmkonstante  $K_I$  wurde fast verdoppelt und  $K_S$  stieg um das vierfache.

Die kinetischen Parameter des SMR wichen von denen des Rührkolbens ab. Die maximale Umsatzrate  $v_{\max} = 10,8$  mg 4-CP/g TS · h der SMR-Kultur im Röhrenansatz mit 0,5 mM 4-CP war geringer und erreichte nur ein Drittel des Rührkolbenniveaus. Der Wert für  $K_S =$

13,2 mg/l war deutlich erhöht, was auf eine geringe Affinität zwischen Bakterien und Substrat und damit auf eine geringere Umsetzung hinweist (Michaelis & Menten 1913). Die Hemmkonstante  $K_I$  war mit 51 mg 4-CP/l so hoch wie im Rührkolben.

Die SMR-Schüttelkolbenansätze 1 und 2 wiesen wesentlich niedrigere  $K_S$ - und  $K_I$ -Werte auf. Die Halbierung von  $v_{\max} = 30,6$  auf 17,2 mg 4-CP/l  $\cdot$  h war auf die schrittweise Verringerung der 4-CP-Zulaufkonzentration von 164 mg/l auf 67 mg/l zwischen den beiden Versuchsansätzen zurückzuführen, was einer Reduzierung der Raumbelastung von ca. 0,1 auf 0,05 mM 4-CP/l  $\cdot$  d entsprach. Die Biozönose des SMR passte sich innerhalb weniger Tage an das verringerte Nährstoffangebot an, was in den Abbauprobungen an einer verstärkten Hemmung der Mischkultur zu beobachten war. Die Abbaugeschwindigkeiten aller eingesetzten Substratkonzentrationen verringerten sich merklich. An der Kultur aus dem SMR bestätigte sich, dass eine Biozönose die Fähigkeit zum Abbau einer Substanz durch Verringerung der Substratkonzentration sehr schnell verliert (Hartmann 1992). Zugleich stieg die Hemmkonstante  $K_I$  von 10,7 auf 28,2 mg 4-CP/l. Ein Anstieg der Hemmkonstanten bei gleichzeitiger Verlangsamung von  $v_{\max}$  zeigte sich sowohl bei den Rührkolben- als auch bei den SMR-Kulturen. Ein ähnliches Phänomen wurde von Limbert & Betts (1995) beschrieben. Beim Abbau von Phenol durch eine an 50 mg/l Phenol adaptierte Mischkultur führte das Entfernen einer hemmenden Lösung aus Chloraromaten zu einem Anstieg der  $K_S$  von 33,6 auf 75,9 mg/l und der  $K_I$  von 36,5 auf 105,9 mg/l bei einer gleichzeitigen Verringerung von  $v_{\max}$ .

Im DGMK-Bericht (1991) wurde die maximale Abbaurate mit  $v_{\max} = 68,3$  mg 4-CP/l  $\cdot$  h für die kontinuierliche Fermentation von 4-CP durch *Alcaligenes* sp. A7-2 in einem Perkolationsfermenter mit Trägermaterial angegeben, 4-CP-Konzentrationen bis 160 mg/l wurden abgebaut. Westmeier & Rehm (1987) erzielten mit dem gleichen Bakterienstamm Abbauraten von 38,5 mg 4-CP/l  $\cdot$  h. Wobus (1997) gab eine maximale Eliminationsleistung eines Sequencing-Batch-Biofilm-Reaktors mit 14,4 mg 4-CP/l  $\cdot$  h an. Die für den SMR ermittelten Umsatzraten von  $v_{\max} = 17,2$  bis 30,6 mg 4-CP/l  $\cdot$  h stimmten gut mit den Literaturdaten überein.

Der insgesamt höhere Umsatz der Rührkolben-Kulturen ist auf die enzymatische Adaption an eine höhere Raumbelastung von 1,0 bis 2,0 mM 4-CP/l  $\cdot$  d zurückzuführen. Die Raumbelastung des SMR lag nur bei 0,05 bis 0,1 mM 4-CP/l  $\cdot$  d. Der Einfluss der Zulaufkonzentration als Umweltfaktor ist für den SMR folglich als sehr groß einzuschätzen. In Anbetracht einer zwanzigfach niedrigeren Raumbelastung im SMR ist aber eine deutliche Erhöhung der maximalen Reaktionsrate bei einer Adaption an höhere Zulaufkonzentrationen zu erwarten.

Der Betrieb des Rührkolbens ergab, dass die Erhöhung der 4-CP-Konzentration über ein kritisches Maß sofort zu einer Hemmung des Abbaus und mehrfach zu einer Gelbfärbung des Mediums führte. Die Erhöhung der täglichen Substratzugabe von 1,0 auf 1,1 mM führte mehrmals zu einer Verzögerung des Abbaus um mehr als einen Tag. Ähnliche Phänomene

wurden auch von Schmidt et al. (1983) an definierten Mischkulturen mit *Alcaligenes* sp. A7 und *Pseudomonas* sp. B13 beobachtet, die 4-CP und Phenol in einem synthetischen Abwasser abbauten. Phenol diente dabei als schnell abbaubarer Aromat und potenzieller Induzierer der Chlorphenol-Cooxidation. Eine 4-CP-Konzentration über 1 mM bei gleichzeitiger Phenolzugabe von 5 mM führte zu einer Anreicherung eines "Dead-end-Produktes". Die Gelbfärbung des Mediums und das UV-Maximum von 379 nm deutete laut Schmidt et al. (1983) auf 5-Chlor-2-Hydroxymuconat-semialdehyd aus der *meta*-Ringspaltung von 4-Chlorcatechol hin. Die Autoren wiesen zudem auf die inhärente Toxizität von 4-CP hin, die keine reproduzierbare Bestimmung von Koloniezahlen auf Festmedien erlaubte. Die für eine Mischkultur toxische Konzentration von 4-CP wurde von Hollender (1994) mit 1,75 bis 2,0 mM angegeben.

In allen Untersuchungen lief die Freisetzung von Chlorid über die gesamte Abbaudauer äquimolar zum 4-CP-Abbau ab, was auf einen 4-CP-Abbau durch die SMR-Biozönose ohne Bildung chlorierter Intermediate (AOX) hinweist. Zu einem gleichen Ergebnis kamen Schmidt et al. (1983) und Hollender (1994) beim Abbau von 4-CP durch eine Mischkultur sowie durch Reinkulturen von *Alcaligenes xylooxidans* JH1 und *Comamonas testosteroni* JH5. Die stöchiometrische Freisetzung von Chlorid zeigte den kompletten Abbau von 4-CP an (Schmidt et al. 1983). Durch die lange lag-Phase und die erhebliche Substratüberschuss-hemmung wird jedoch signalisiert, dass die initiale Dehalogenierung anders als beim 3-CBA-Abbau den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt.

#### **4.2.5 Zusammenfassende Bewertung des Chloraromatenabbaus**

Die Bakterien des SMR setzten die Modellschadstoffe 3-Chlorbenzoesäure und 4-Chlorphenol in allen Untersuchungen über die *ortho*-Spaltung des aromatischen Rings um. Diese Reaktion limitierte aber nicht die Reaktionsgeschwindigkeit. Eine *meta*-Spaltung wurde nicht nachgewiesen.

Die Kombination von spektroskopischen Methoden und reaktionskinetischen Versuchsansätzen ermöglichte die Beschreibung der Chloraromatenabbauwege. Für den SMR wird als maßgeblicher Abbauweg von 3-Chlorbenzoesäure und 4-Chlorphenol der Weg über eine initiale Dechlorierung mit anschließender *ortho*-Spaltung des aromatischen Zwischenproduktes postuliert. Bei dem aromatischen Metaboliten handelte es sich wahrscheinlich um Catechol, das sich allerdings in Folge einer schnellen Umsetzung nicht detektieren ließ. Die Dechlorierung war nur beim 4-Chlorphenol-Abbau geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion.

Beim 3-Chlorbenzoesäure-Abbau wurde das Auftreten von nicht-chlorierten Metaboliten in äußerst geringer Konzentration nachgewiesen, deren Umsatz den langsamsten Reaktionsschritt darstellte. Diese Intermediate konnten jedoch mit den angewandten spektroskopischen Methoden auf Grund der vielen potentiellen Stoffwechselprodukte der einzelnen Organismen einer Mischkultur, die sich in ihren Signalen ergänzen oder überlagern und ein Wirkungsgeflecht von ineinander greifenden Abbauschritten (Kuhlmann & Hegemann 1996) bilden, nicht identifiziert werden. Zudem bestand das Problem, dass die meisten der Stoffwechselprodukte nicht in größeren Mengen für analytische Zwecke hergestellt werden (Knorr 1997) und daher keine Referenzspektren erstellt werden konnten.

In Vorversuchen wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie *cis,cis*-Muconat oder Chlor-*cis,cis*-Muconat nachgewiesen. Diese Intermediate traten allerdings nur an wenigen Versuchstagen bei einem äußerst schnellen 3-CBA-Umsatz von 0,5 mM 3-CBA in weniger als 20 Minuten auf. Dabei müssen die initialen Abbauschritte so schnell abgelaufen sein, dass an einer anderen Stelle des Metabolismus Zwischenprodukte angereichert werden konnten. In den folgenden Versuchen mit Kulturen aus dem SMR und dem Rührkolben war der 3-CBA-Abbau zum Teil deutlich langsamer als in den Vorversuchen. Hierin könnte ein Grund bestehen, warum es zu keiner höher konzentrierten Akkumulation von Intermediaten kam.

Eine weitere Möglichkeit dafür, dass *cis,cis*-Muconat zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit nicht festzustellen war, könnte in Veränderungen in der Zusammensetzung der Biozönose liegen. Durch die vielen Änderungen der Milieubedingungen, die Störfälle und das Austauschen der Biomasse zwischen SMR und AIR wurde die Biozönose so sehr verändert, dass sich beispielsweise die besonders gut an die hohen Sauerstoff-Gehalte adaptierten Bakterien wie *Variovorax paradoxus* nicht mehr im System halten konnten. Sie wurden dem SMR mehrfach als Reinkultur zugesetzt. Eine Selektion führt unweigerlich auch dazu, dass sich die maßgeblich beschrittenen Abbauewege verändern. Für den Reaktor als Gesamtsystem geht die Fähigkeit zum Abbau bestimmter Schadstoffe nicht verloren, da Mischkulturen über "angeborene" adaptive Fähigkeiten verfügen (Wilderer et al. 1991).

Eine Vielzahl von Bakterien ist fähig zur vollständigen Mineralisierung von Chloraromaten. Sie nutzen die Chloraromaten als Kohlenstoff- und Energiequelle, wobei der Chlorsubstituent eliminiert und das C-Skelett zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O mineralisiert wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme aus dem SMR und dem AIR waren alle in der Lage auf 3-CBA zu wachsen. Die Dehalogenierung wurde sowohl als erster Schritt der Abbausequenz über eine hydrolytische oder oxygenolytische Abspaltung des Substituenten als auch erst nach mehreren enzymatischen Schritten mit chlorhaltigen Intermediaten beschrieben (Fetzner & Lingens 1994, Reineke 1989, 2000). Die Fähigkeit zum vollständigen Abbau von Chloraromaten kann in einem System wie dem SMR, in dem die Bakterien zurück gehalten werden, durch einen Gentransfer über Plasmide erfolgen. Die Konjugation als Ursache für die Entstehung von

komplementären Abbausequenzen wurden von Vandenberg et al. (1981), Nakatsu & Wyndham (1993), Bosma & Harms (1995), Mergeay et al. (1997) und Reineke & Schlömann (1997) beschrieben. Rast & Springer (1997) berichten zudem davon, dass diese hybriden Organismen nur unter selektiven Bedingungen stabil bleiben, was bedeutet, dass bei Störungen im Betrieb die Eigenschaften wieder verloren gehen können.

Auf eine gute Betriebsstabilität sollte eigentlich hindeuten, dass der Chloraromatenabbau im SMR im Allgemeinen ohne Bildung von chlorierten Intermediaten (AOX) ablief. Das kurzzeitig aufgetretene *cis,cis*-Muconat und die anderen gering konzentrierten Metaboliten wiesen keine Strukturähnlichkeit mit *meta*-Spaltungsprodukten auf. Eine Anreicherung von toxischen "Dead-end-Produkten" sollte unwahrscheinlich sein, da diese vor allem auf dem *meta*-Abbauweg entstehen können (Knackmuss 1979). Entgegen der Erwartung aus den Versuchsergebnissen traten im Betrieb des SMR als auch des Rührkolben jedoch solche toxischen Metabolite auf, was zu massiven Leistungsverlusten führte. Im SMR verfärbte sich die Biomasse schwarz. Die Akkumulation und anschließende Autoxidation von Chlorcatecholen führt zu schwarzen Polymerisationsprodukten und einer Färbung des Mediums (Taeger et al. 1988) mit toxischen Effekten auf die Mikroorganismen durch die Schädigung der *meta*-Spaltungsenzyme wie der Catechol-2,3-Dioxygenase (Müller et al. 1996, Reineke 2000). Im 4-CP-Rührkolben wurde eine gelbe Färbung und das Auftreten von Peaks bei 380 nm in den UV-Spektren beobachtet, die auf 2-Hydroxymuconat-semialdehyd hinweisen (Kojima et al. 1961).

Der 4-CP-Abbau war insgesamt langsamer und schwieriger zu kontrollieren als der 3-CBA-Abbau. Die Unterschiede im Verhalten der Biozönosen diesen beiden Modellschadstoffen gegenüber lassen eine Übertragung von Messergebnissen auf andere Schadstoffe daher nicht ohne Weiteres zu. Der Umgang mit Mischkulturen aus den Reaktoren erschwerte teilweise die Aussagekraft der einzelnen Methoden, weist aber den für eine Optimierung des Reaktorsystems entscheidenden Vorteil auf, die Wechselbeziehungen zwischen den Mikroorganismen und den vielfältigen Milieubedingungen besser erkennen zu können.

Die Milieubedingungen waren für den Abbau der Chloraromaten von entscheidender Bedeutung. Schon kleinste Veränderungen in den Betriebsbedingungen des SMR und des Rührkolbens führten zu einer Verlangsamung der Abbaugeschwindigkeit oder zur Akkumulation toxischer Metabolite. Dies ist nicht erstaunlich, wenn einige beeinflussende Parameter betrachtet werden. Schlegel (1985) und Müller et al. (1996) beschreiben, dass die Aromatenspaltung von Bakterium zu Bakterium stark differiert. Sogar die Wachstumsphasen und -bedingungen können einen Einfluss darauf haben, ob ein Bakterium die Enzyme der *ortho*- oder *meta*-Spaltung bildet. Je nach Induktion der Enzyme kann Catechol von einigen Bakterien *ortho* oder *meta* gespalten werden. So induziert *cis,cis*-Muconat die Catechol-1,2-



Dioxygenase, die Muconat-Cycloisomerase und die Muconolacton-Isomerase (Stanier & Ornston 1973).

Aus den geschilderten Zusammenhängen wird deutlich, dass ohne Kenntnisse der Wechselbeziehungen zwischen den einzelnen Mikroorganismen und den vielfältigen Milieubedingungen eine Biozönose von außen nur als Reinkultur angesehen werden kann. Durch den Einblick in die "black box" der im SMR lebenden Biozönose ergibt sich allerdings ein vielschichtigeres Bild. Nur mit einem besseren Verständnis für die Wechselwirkungen kann ein Reaktor weiter optimiert werden. Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stellen nur einen Ausschnitt aus den tatsächlichen Gegebenheiten im Reaktor dar. In Bezug auf den SMR oder ähnliche Reaktorkonzepte ergab sich aus dieser Arbeit die Frage, welche Umstände in der Biozönose für ein Abweichen vom maßgeblich beschrittenen Abbauweg sorgen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, in welchem Zeitraum vor einer Störsituation erste Anzeichen für eine Beeinträchtigung des Chloraromatenabbaus erkannt werden können. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

### 4.3 Bewertung des Suspensions-Membranreaktors

Mit dem Suspensions-Membranreaktor (SMR) wurde eine produktionsintegrierbare Reaktortechnologie entwickelt, die eine selektive biologische Eliminierung bestimmter Abwasserinhaltsstoffe aus industriellen Mischabwässern ermöglicht. Über integrierte Nanofiltrationsmembranen wurde selektiv die Verweilzeit und damit die Konzentration der abzubauenen Stoffe erhöht, was zu einer Beschleunigung der Abbaugeschwindigkeit durch die spezialisierte Biozönose führte. Im Vergleich zu einem herkömmlichen Airlift-Schlaufenreaktor (AIR) wurde diese Leistungssteigerung insbesondere bei kurzen Verweilzeiten von vier Stunden deutlich. Bei langen Verweilzeiten war der biologische Abbau nur vom Stofftransport im Reaktor abhängig, so dass nur geringe Unterschiede im Abbauverhalten beider Reaktoren feststellbar waren (Schierenbeck 1997).

Die Nanofiltration sorgte durch die Rückhaltung der Abwasserinhaltsstoffe für eine Konzentrationserhöhung im SMR und damit im Vergleich zum konventionellen AIR zu deutlich höheren Umsatzraten bei geringerer Ablaufkonzentration (Schierenbeck 1997). Der Vorteil der selektiven Verweilzeit zeigte sich insbesondere auch beim Einsatz eines Mischabwassers aus 3-CBA und der leicht abbaubaren Kohlenstoffquelle Natriumacetat. Durch die Nanofiltration wurde nicht nur 3-CBA aufkonzentriert, es wurden auch die Bakterien im System zurück gehalten. Dies ist von Bedeutung für die Stämme *Variovorax paradoxus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia pseudomallei* und *Xanthomonas campestris*, die als leistungsfähige 3-CBA-Abbauer aus dem SMR isoliert wurden. Aus dem AIR

wurden hingegen die Mikroorganismen ausgetragen, und es kamen vor allem die Organismen zur Vermehrung, die Natriumacetat gut verwerteten, so dass schließlich nur noch Acetat abgebaut wurde und die 3-CBA-Konzentration bis auf die Zulaufkonzentration anstieg (Schierenbeck 1997).

Insgesamt wies der SMR im Vergleich zum AIR einen höheren Anteil an Bakterien an der gesamten Biomasse auf. Das Verhältnis von kultivierbaren Zellen zur Gesamtzellzahl sowie zum TS- und Protein-Gehalt lag im SMR auf einem höheren Niveau. Zudem besaßen die Bakterien aus dem SMR ein größeres Substratverwertungsspektrum. Die meisten SMR-Isolate zeigten eine etwas höhere *in vitro*-Aktivität als die Isolate aus dem AIR. Die Gesamtaktivität als Mittelwert der *in vitro*-Aktivitäten bestätigte, dass aus dem SMR die aktiveren Stämme isoliert wurden. Desweiteren wurden merklich stoffwechselaktivere Stämme mit *in vitro*-Aktivitäten von 51 bis 61 % nur aus dem SMR isoliert. Alle Untersuchungen zur Charakterisierung der Biozösen deuteten auf eine höhere physiologische Leistungsfähigkeit der Biozönose des SMR hin.

Die Untersuchungen im Institut für Umweltverfahrenstechnik und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass sich die Leistungsfähigkeit des SMR steigern lässt. Eine Erhöhung des Potentials ist jedoch durch die Permeatleistung der eingesetzten Filtrationsmembranen begrenzt, die insbesondere durch den sich auf den Membranen ausbildenden Biofilm stark reduziert wurde. Somit kann erst durch die Entkopplung der Filtration vom Bioreaktor eine weitere Leistungssteigerung des Verfahrens erzielt werden (Schierenbeck 1997). Für eine gleichbleibende Abbauleistung des Reaktors muss zudem sichergestellt sein, dass sich die Milieubedingungen nicht durch Betriebsstörungen verändern. Die enormen Differenzen bezüglich der ermittelten Abbaugeschwindigkeiten deuten auf eine nicht geringe Anfälligkeit des Gesamtsystems gegenüber Störungen jeglicher Art hin. Unabhängig davon wies der SMR eine höhere Betriebsstabilität als der AIR auf.

## 5. Zusammenfassung

Mit dem Suspensions-Membranreaktor (SMR) wurde im interdisziplinären FNK-Forschungsschwerpunkt "Produktionsintegrierter Umweltschutz" an der Universität Bremen eine produktionsintegrierbare Reaktortechnologie untersucht, die eine selektive biologische Eliminierung bestimmter Abwasserinhaltsstoffe aus industriellen Mischabwässern ermöglicht. Die verfahrenstechnischen Ergebnisse zeigten, dass über integrierte Nanofiltrationsmembranen selektiv die Verweilzeit und damit die Konzentration der abzubauenen Stoffe erhöht wurde, was im Vergleich zu einem herkömmlichen Airlift-Schlaufenreaktor (AIR) zu einer Beschleunigung der Abbaugeschwindigkeit führte. Der SMR wurde zu Beginn seiner Entwicklung weitgehend als "black box" betrachtet, die im Abwasser lebenden Mikroorganismen mit ihren vielfältigen Ansprüchen wurden nur am Rande beachtet. Eine Optimierung des Reaktors ist jedoch nur mit einer besseren Kenntnis der spezialisierten Biozönose erreichbar.

Das Ziel der **"Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor"** war daher, einen tieferen Einblick in das Wirkungsgeflecht aus physikalischen, chemischen, biologischen und technologischen Faktoren im Suspensions-Membranreaktor zu gewinnen. In den beiden Schwerpunkten der Arbeit wurden die am Schadstoffabbau beteiligten Mikroorganismen charakterisiert und die im Reaktor ablaufenden biochemischen Umwandlungsprozesse beschrieben.

Als Grundlage zur Beschreibung der Lebensgemeinschaften der Mikroorganismen in den Versuchsreaktoren wurden die Gesamtzellzahlen (GZZ) und die Lebendzellzahlen als KBE ermittelt. Aus den Ergebnissen während des 3-CBA-Betriebs ließ sich ein höherer Anteil aktiver Zellen im SMR ableiten, da der Anteil der Bakterien (GZZ und KBE) an der gesamten Biomasse (Protein- und TS-Gehalt) im SMR höher war als im AIR. Die GZZ war im SMR mit  $2,7$  bis  $5,6 \cdot 10^{10}$ /ml bis zu einer Zehnerpotenz höher als im AIR. Die Lebendzellzahlen des SMR erreichten bis zu  $8,8 \cdot 10^9$  KBE/ml auf R2A-Agar, die des AIR maximal  $3,1 \cdot 10^9$  KBE/ml. Die ermittelten Lebendzellzahlen waren damit etwas höher als Vergleichsdaten. Das Verhältnis von kultivierbaren Zellen zur GZZ lag im SMR mit 9,0 bis 16,3 % auf einem höheren Niveau als der allgemein angegebene Anteil von 1 bis 10 %. Die Untersuchung der Zahl stoffwechselaktiver Zellen fand während des 4-CP-Betriebs des Reaktors statt. Zu diesem Zeitpunkt wies der SMR mit 8,3 bis 11,6 % deutlich weniger aktive Zellen auf als der Rührkolben und als die in der Literatur angegebenen 35 bis 40 %, die im Belebtschlamm physiologisch aktiv sein können. Die Bakterien des SMR waren im 4-CP-Betrieb in ihrer Aktivität deutlich gehemmt, was auf die aufgetretenen Betriebsstörungen des Reaktors hinwies.

Von den Anreicherungsmedien wurden insgesamt 173 Reinkulturen gewonnen, um die Zusammensetzung der Mikroflora der Reaktoren abzubilden. Mittels der stoffwechselphysio-

logischen Tests wurden die wichtigen 3-CBA-abbauenden Bakterien charakterisiert. Die Bakterien aus dem SMR besaßen ein größeres Substratverwertungsspektrum als die Isolate aus dem AIR, wobei alle in dieser Arbeit untersuchten Isolate in der Lage waren auf 3-CBA zu wachsen. Anhand der Gesamtaktivität als Mittelwert der *in vitro*-Aktivitäten zeigte sich, dass aus dem SMR die aktiveren Stämme isoliert wurden. Die stoffwechselaktivsten Stämme mit *in vitro*-Aktivitäten von 51 bis 61 % wurden aus dem SMR isoliert. Alle Untersuchungen zur Charakterisierung der Biozösen deuteten auf eine höhere physiologische Leistungsfähigkeit der Biozönose des SMR im Vergleich zu der des AIR hin.

Die isolierten Bakterien beider Reaktoren entsprachen den regelmäßig in Belebtschlämmen nachgewiesenen Bakteriengattungen. Die Spezies *Variovorax paradoxus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia pseudomallei* und *Xanthomonas campestris* waren maßgeblich am Abbau der 3-CBA im SMR beteiligt. Sie wuchsen besonders gut auf 3-CBA und den weiteren Aromaten und wiesen das breiteste Substratverwertungsspektrum auf. Die am besten auf 3-CBA wachsenden Bakterien waren nur im SMR zu finden. Diese Isolate wurden über die physiologisch-biochemische Charakterisierung, die auffälligen Merkmale der Koloniemorphologie und die Sequenzierung ihrer 16S-rRNA als *Variovorax paradoxus* identifiziert.

Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit wurden zur Beschreibung der Abbauege der Modellschadstoffe 3-Chlorbenzoesäure (3-CBA) und 4-Chlorphenol (4-CP) Untersuchungen zum Mechanismus der Aromatenspaltung, zum Auftreten von Metaboliten, zur Abbaukinetik und zum Zeitpunkt der Dechlorierung durchgeführt.

Die Bakterien des SMR und des AIR setzten die Modellschadstoffe 3-Chlorbenzoesäure und 4-Chlorphenol sowie Catechol und Protocatechuat als zentrale Metabolite des aeroben Aromatenabbaus vor allem über die *ortho*-Spaltung des aromatischen Rings um. Für die Biozösen der beiden Rührkolben ergab sich das gleiche Ergebnis. Die Reinkultur *Variovorax paradoxus* aus dem SMR zeigte ebenfalls eine *ortho*-Spaltung von 3-CBA, 4-CP und Catechol. In photometrischen Messungen im Spektralphotometer bei 260 nm wurden kurzzeitig die *ortho*-Spaltungsprodukte *cis,cis*-Muconat oder Chlor-*cis,cis*-Muconat als Metaboliten des 3-CBA-Abbaus durch Enzymrohextrakte des SMR erfasst. Eine *meta*-Spaltung wurde in den Experimenten nicht nachgewiesen. Die aromatische Ringspaltung war für die Reaktionsgeschwindigkeit nicht limitierend.

Die Kombination von spektroskopischen Methoden und reaktionskinetischen Versuchsansätzen ermöglichte die Beschreibung der Chloraromatenabbauege. Für den SMR wird als maßgeblicher Abbaueweg von 3-Chlorbenzoesäure und 4-Chlorphenol der Weg über eine initiale Dechlorierung mit anschließender *ortho*-Spaltung eines aromatischen Zwischenproduktes postuliert. Bei dem aromatischen Metaboliten handelte es sich wahrscheinlich um

Catechol, das sich allerdings in Folge einer schnellen Umsetzung nicht detektieren ließ. Die Dechlorierung war nur beim 4-Chlorphenol-Abbau geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion. Beim 3-CBA-Abbau stellte die Umsetzung der nicht-chlorierten Intermediate den langsamsten Schritt der Gesamtreaktion dar. Die Kinetik des Chloraromatenabbaus beider Modellschadstoffe folgte einer Substratüberschusshemmung.

Der Chloraromatenabbau lief im SMR überwiegend ohne Bildung von chlorierten Intermediaten ab, was auf eine gute Betriebsstabilität hindeuten sollte. Das kurzzeitig aufgetretene *cis,cis*-Muconat und die anderen gering konzentrierten Metaboliten wiesen keine Strukturähnlichkeit mit *meta*-Spaltungsprodukten auf. Eine Anreicherung von toxischen "Dead-end-Produkten" sollte unwahrscheinlich sein, da diese vor allem auf dem *meta*-Abbauweg entstehen können. Allerdings führten schon kleinste Veränderungen in den Betriebsbedingungen des SMR und des Rührkolbens zu einer Verlangsamung der Abbaugeschwindigkeit oder zur Akkumulation von Metaboliten. Die Milieubedingungen waren für den Abbau der Chloraromaten von entscheidender Bedeutung. Für eine gleichbleibende Abbauleistung des Reaktors muss daher sichergestellt sein, dass sich die Milieubedingungen trotz automatischer Steuerung nicht durch Betriebsstörungen verändern. Die enormen Differenzen der ermittelten Abbaugeschwindigkeiten deuten auf eine nicht geringe Anfälligkeit des Gesamtsystems gegenüber Störungen hin. Unabhängig davon wies der SMR eine höhere Betriebsstabilität als der AIR auf.

Der 4-CP-Abbau war insgesamt langsamer und schwieriger zu kontrollieren als der 3-CBA-Abbau. Die Unterschiede im Verhalten der Biozöten diesen beiden Modellschadstoffen gegenüber lassen eine Übertragung von Messergebnissen auf andere Schadstoffe daher nicht ohne Weiteres zu. Der Umgang mit Mischkulturen aus den Reaktoren erschwerte teilweise die Aussagekraft der einzelnen Methoden, weist aber den für eine Optimierung des Reaktorsystems entscheidenden Vorteil auf, die Wechselbeziehungen zwischen den Mikroorganismen und den vielfältigen Milieubedingungen besser erkennen zu können.

## 6. Literatur

**Amann, R. (1996):** *In situ*-Identifizierung von Mikroorganismen mit rRNS-gerichteten Oligonukleotidsonden. *Biospektrum* 1/96, 27-31.

**Analytikum (1974):** Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.

**Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H. (1992):** The Prokaryotes Vol. 1-4. Springer-Verlag, Heidelberg, New York.

**Banks, C. J. & Walker, I. (1976):** Sonication of Activated Sludge Flocs and the Recovery of their Bacteria on Solid Media. *J. Gen. Microbiology* 98, 363-368.

**Bergeron, P. (1978):** Untersuchungen zur Kinetik der Nitrifikation. *Karlsruher Berichte zur Ingenieurbiologie*, H. 12.

**Bianchi, M.A.G. & Bianchi, A.J.M. (1982):** Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurements. *Microb. Ecol.* 8, 61-69.

**Bleich, U. (1993):** Vergleichende Untersuchungen über Biomasse- und Aktivitätsparameter sowie die Eigenschaften bakterieller Exopolymere in industriellen und kommunalen biologischen Kläranlagen. *Fortschritt-Berichte VDI, Reihe 15, Nr. 103.* VDI-Verlag, Düsseldorf.

**Bosma, T. & Harms, H. (1995):** Bioverfügbarkeit organischer Verunreinigungen. *EAWAG News* 40 D, 28-31.

**Bradbury, J.F. (1984):** Genus II. *Xanthomonas*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds. of Vol. 1): *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Williams & Wilkins, Baltimore.

**Bräutigam, H.-J. & Sekoulov, I. (1986):** Die Membran-Fließbett-Technologie. *Forum Mikrobiologie* 9, S. 269-272.

**Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (1994):** *Biology of Microorganisms.* 7. Aufl., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

**Busse, H.-J. & Auling, G. (1984):** The Genera *Alcaligenes* and "*Achromobacter*". In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H.: *The Prokaryotes* Vol. 1-4. Springer-Verlag, Heidelberg, New York.

**Busse, H.-J., Denner, E.B.M. & Lubitz, W. (1996):** Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnol.* 47, 3-38.

**Chatterjee, D.K., Kellogg, S.T., Hamada, S. & Chakrabarty, A.M. (1981):** Plasmid Specifying Total Degradation of 3-Chlorobenzoate by a Modified *ortho* Pathway. *J. Bacteriol.* 146, No. 2, 639-646.

**Christen, H.R. (1978):** *Chemie.* Verlag Moritz Diesterweg, Otto Salle Verlag, Frankfurt am Main, Berlin, München; Verlag Sauerländer, Aarau, Frankfurt am Main, Salzburg.

**Coleman, A.W. (1980):** Enhanced detection of bacteria in natural environments by fluorochrome staining of DNA. *Limnol. Oceanogr.* 25, 948-951.

- Daley, R.J. (1979):** Direct Epifluorescence Enumeration of Native Aquatic Bacteria: Uses, Limitations, and Comparative Accuracy. In: Native Aquatic Bacteria: Enumeration, Activity, and Ecology. ASTM Special Technical Publication 695, J.W. Costerton, Univ. of Calgary, and R.R. Colwell, Univ. of Maryland (eds.)
- DGMK (1991):** Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen und Kohlenwasserstoffverbindungen. DGMK-Forschungsbericht 461-01.
- Dorn, E. & Knackmuss, H.-J. (1978):** Chemical Structure and Biodegradability of Halogenated Aromatic Compounds. Two Catechol-1,2-Dioxygenases from a 3-Chlorobenzoate-grown Pseudomonad. *Biochem. J.* 174, 73-84.
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. & Knackmuss, H.-J. (1974):** Isolation and Characterization of a 3-Chlorobenzoate Degrading Pseudomonad. *Arch. Microbiol.* 99, 61-70.
- Dott, W. & Thofern, E. (1980):** Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 2. Mitteilung: Anwendung miniaturisierter Systeme zur Identifizierung und Biotypisierung von Bakterien unter Verwendung der Vielpunktbeimpfungsmethode. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. B* 170, 99-107.
- Dott, W. & Trampisch, H.J. (1981):** Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 3. Mitteilung: Datentechnische Erfassung der Identifizierungsmerkmale und numerisch taxonomische Auswertung. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B*, 173, 273-284.
- Dott, W. & Trampisch, H.J. (1983):** Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 5. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen an zwei Schnellsandfiltern. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B*, 177, 141-155.
- Dott, W. & Wetzel, A. (1984):** Mikrobiologische Untersuchungen einer zweistufigen Adsorptions-Belebungsanlage. 2. Mitteilung: In-vitro-Aktivitäten der isolierten Bakterien. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* 17, 182-185.
- DSMZ (1998):** Catalogue of Strains. 6. Edition. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
- Engelmann, J. (2000):** Persönliche Mitteilungen zur Durchführung der NMR-Spektroskopie. Wissenschaftlicher Angestellter der AG Leibfritz, Organische Chemie, Instrumentelle Analytik, Uni Bremen, FB2.
- Fava, F., Armenante, P.M., Kafkewitz, D. & Marchetti, L. (1995):** Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 171-177.
- Fetzner, S. & Lingens, F. (1994):** Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. *Microb. Rev.* 58, No. 4, 641-685.
- Focht, D.D. & Shelton, D. (1987):** Growth Kinetics of *Pseudomonas alcaligenes* C-0 Relative to Inoculation and 3-Chlorobenzoate Metabolism in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, No. 8, 1846-1849.
- Frølund, B., Griebe, T. & Nielsen, P.H. (1995):** Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 755-761.

- Gayer-Herkert, G. (1992):** Molekularbiologische Methoden für den Nachweis von Mikroorganismen in Mischpopulationen - Literaturstudie. *BioEngineering* 5+6/92, 8. Jg., 55-64.
- Gottschalk, G. (1986):** *Bacterial Metabolism*. Springer Verlag, N.Y., Berlin, Heidelberg.
- Griebe, T., Schaule, G., Secker, J. & Flemming, H.-C. (1996):** Bestimmung der stoffwechselaktiven Bakterien im Belebtschlamm. In: *Ökologie der Abwasserorganismen*. Hrsg. Lemmer, H, Griebe, T. & Flemming, H-C., Springer Verlag.
- Güde, H. (1996):** Wechselbeziehungen Bakterien-Protozoen - Ein Beitrag zur ökosystemaren Betrachtungsweise der biologischen Abwasserreinigung. In: *Ökologie der Abwasserorganismen*. Hrsg. Lemmer, H, Griebe, T. & Flemming, H-C., Springer Verlag.
- Haldane, J.B.S. (1930):** *Enzymes*. Longmans, Green & Co., London.
- Hartmann, J., Reineke, W. & Knackmuss, H.-J. (1979):** Metabolism of 3-Chloro-, 4-Chloro-, and 3,5-Dichlorobenzoate by a Pseudomonad. *Appl. Env. Microb.* Vol. 37 (3), 421-428.
- Hartmann, L. (1992):** *Biologische Abwasserreinigung*. 3. Aufl., Springer Verlag.
- Hegemann, G.D. (1966):** Synthesis of the Enzymes of the Mandelate Pathway by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 91, No. 3, 1140-1154.
- Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B. (1984):** *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 2. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. (1977):** Use of Nucleopore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, No. 5, 1225-1228.
- Hollender, J. (1994):** Mikrobieller Abbau von Chlor- und Methylphenolen im Gemisch unter aeroben und denitrifizierenden Bedingungen - Regulation und Interaktion in einer Mischkultur - Dissertation, TU Berlin.
- Holmes, B., Owen, R.J. & McMeekin, T.A. (1984):** Genus *Flavobacterium*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds. of Vol. 1): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Holmes, B., Pinning, C.A. & Dawson, C.A. (1986a):** A Probability Matrix for the Identification of Gram-negative, Aerobic, Non-fermentative Bacteria that grow on Nutrient Agar. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1827-1842.
- Holmes, B., Dawson, C.A. & Pinning, C.A. (1986b):** A revised Probability Matrix for the Identification of Gram-negative, Aerobic, Rod-shaped, Fermentative Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 132, 3113-3135.
- Ibelgaufts, H. (1990):** *Gentechnologie von A bis Z*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Kämpfer, P. & Dott, W. (1988):** Systematisierung der mikrobiologischen Untersuchung von Boden und Wasser. In: *Altlasten 2*, Thomé-Kozmiensky, K.J. (Hrsg.), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik GmbH.



- Kämpfer, P. & Dott, W. (1989):** Numerische Identifizierung aquatischer Mikroorganismen mittels automatisierter Methoden am Beispiel von Bakterien aus dem belebten Schlamm. Zbl. Bakt. Hyg. B 187, 216-229.
- Kämpfer, P. (1996):** Klassische Methoden zur Charakterisierung von Abwasserbakterien - Grenzen und Möglichkeiten. In: Ökologie der Abwasserorganismen. Hrsg. Lemmer, H., Griebe, T. & Flemming, H-C., Springer Verlag.
- Kämpfer, P., Dott, W. & Steiof, M. (1997):** Notwendigkeit und Praxisrelevanz der physiologischen Charakterisierung von Biozönosen kontaminierter Standorte. In: Knorr, C. & von Schell, T.: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Kämpfer, P., Steiof, M. & Dott, W. (1991):** Microbiological Characterization of a Fuel-Oil Contaminated Site Including Numerical Identificaton of Heterotrophic Water and Soil Bacteria. Microb. Ecol. 21, 227-251.
- Kappesser, S. (1990):** Populationsanalysen, Nährstoffansprüche und Physiologie der Belebtschlamm-Mikroflora sowie "Spezieller" Bakterienkulturen für die aerobe Abwasserbehandlung. Dissertation, TH-Darmstadt.
- Kataeva, I.A. & Golovleva, L.A. (1990):** Catechol 2,3-Dioxygenases from *Pseudomonas aeruginosa* 2x. In: Methods in Enzymology. Vol. 188, Hydrocarbons and Methylotrophy. Ed. Lidstrom, M.E., Academic Press, San Diego, New York.
- Kerstens, K. & De Ley, J. (1984):** Genus *Alcaligenes*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds. of Vol. 1): Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kienzler, M. (2000):** persönliche Mitteilungen zur Durchführung der HPLC-MS. Wissenschaftlicher Mitarbeiter der AG Jastorff, Bioorganische Chemie, Uni Bremen, FB2.
- Klamka, A. (1995):** Untersuchungen zum Metabolismus von umweltrelevanten Chemikalien mit charge-transfer-Potential durch eine Mischkultur unter besonderer Berücksichtigung des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes Fluoranthen sowie seiner Brom-, Chlor- und Nitro-Analoga. Dissertation, Uni Bremen, FB2.
- Kleinsteuber, S., Hoffmann, D., Müller, R.H. & Babel, W. (1997):** Nachweis von Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase-Genen in Umweltisolaten durch PCR und Oligonucleotidsonden. Poster VAAM-Workshop Leizig, 4. und 5.12.97.
- Knackmuss, H.-J. (1979):** Halogenierte und sulfonierte Aromaten - Eine Herausforderung für Aromaten abbauende Bakterien. Forum Mikrobiologie 6/79, 311-317.
- Knorr, C. (1997):** Die mikrobielle Umsetzung von Schadstoffen. In: Knorr, C. & von Schell, T.: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Kojima, Y., Itada, N., & Hayaishi, O. (1961):** Metapyrocatechase: a new catechol-cleaving enzyme. J. Biol. Chem. Vol. 236, No. 8, 2223-2228.
- Kölbel-Boelke, J (1987):** Diversität und *in vitro*-Aktivitäten heterotropher Bakteriengemeinschaften in einem pleistozänen, sandig-kiesigen Grundwasserleiter. Dissertation, Uni Bremen, FB2.

- Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds. of Vol. 1) (1984):** Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kuhlmann, A. & Hegemann, W. (1996):** Mikrobiologische Untersuchungen zum Abbau von Monochlornitrobenzolen in batch-Kultur. *gwf Wasser/Abwasser* 137, Nr. 10, 548-556.
- Kutzner, H.J. (1993):** Nachweis von Mikroorganismen in Abwasser und Belebtschlamm mittels klassischer und molekularer Verfahren. In: Umweltbundesamt Symposium-Band zur Fachtagung: "Überwachungsmethoden Gentechnik: Nachweisverfahren für Mikroorganismen, Viren und Gene in der Umwelt." in Berlin, 25.-26.03.93, 79-124.
- Lampe, E. (1998):** Untersuchungen zum Abbau von 3-Chlorbenzoesäure in einem Suspensions-Membranreaktor. Diplomarbeit, Uni Bremen, FB2.
- Lemmer, H. (1996):** Mikrobiologie und Ökologie – Was haben sie der Abwassertechnik zu bieten? In: Ökologie der Abwasserorganismen. Hrsg. Lemmer, H, Griebe, T. & Flemming, H-C., Springer Verlag
- Lidstrom, M.E. (ed) (1990):** Methods in Enzymology. Vol. 188, Hydrocarbons and Methylotrophy. Ed. Lidstrom, M.E., Academic Press, San Diego, New York.
- Limbert, E.S.B. & Betts, W.B. (1995):** Kinetics of bio-oxidation of a medium comprising phenol and a mixture of organic contaminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 43, 165-170.
- Mäkinen, P.M., Theno, T.J., Ferguson, J.F., Ongerth, J.E. & Puhakka, A. (1993):** Chlorophenol Toxicity Removal and Monitoring in Aerobic Treatment: Recovery from Process Upsets. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 27, No. 7, 1434-1439.
- Meagher, R.B., Ngai, K.-L. & Ornston, L.N. (1990):** Muconate Cycloisomerase. In: Methods in Enzymology. Vol. 188, Hydrocarbons and Methylotrophy. Ed. Lidstrom, M.E., Academic Press, San Diego, New York.
- Mergeay, M. et al. (1997):** Die durch Plasmide vermittelte Ausbreitung von Genen aus der Perspektive der biotechnischen Sanierung. In: Knorr, C. & von Schell, T.: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Metrohm (1995):** Gebrauchsanweisung 8.732.1001 Metrohm AG, 9101 Herigau, Schweiz.
- Meyer-Reil, L.-A. (1987):** Bakterien in Sedimenten der Kieler Bucht: Zahl, Biomasse und Abbau von organischem Material. Habilitation, Universität Kiel, Institut für Meereskunde.
- Michaelis, L. und Menten, M.L. (1913):** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49, 333-369.
- Molecular Probes (1996):** Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA.
- Mortimer, C.E. (1987):** Chemie. Das Basiswissen der Chemie. 5. Aufl. Thieme Verlag.
- Müller, R. & Lingens, F. (1986):** Mikrobieller Abbau halogener Kohlenwasserstoffe: Ein Beitrag zur Lösung vieler Umweltprobleme? VCH Verlag Weinheim.

- Müller, R. (1992):** Mechanismen der enzymatischen Dehalogenierung. In: Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Hrsg. Weigert, B.: Biologischer Abbau von Chlorkohlenwasserstoffen. Kolloquium TU Berlin 21.-22.11.91.
- Müller, R., Deckwer, W.-D. & Hecht, V. (1996):** Degradation of Chloro- and Methyl-Substituted Benzoic Acids by a Genetically Modified Microorganism. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 528-537.
- Nakatsu, C.H. & Wyndham, R.C. (1993):** Cloning and Expression of the Transposable Chlorobenzoate-3,4-Dioxygenase Genes of *Alcaligenes* sp. Strain BR60. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, No. 11, 3625-3633.
- Nehrkorn, A. (1968):** Grundwasserkeimzahlen bei Anwendung nährstoffarmer Substrate. *Gesundh. Ing.* 89: 88.
- Ngai, K.-L., Neidle, E.L. & Ornston, L.N. (1990):** Catechol and Chlorocatechol 1,2-Dioxygenases. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 188, Hydrocarbons and Methylotrophy. Ed. Lidstrom, M.E., Academic Press, San Diego, New York.
- Ngai, K.-L., Ornston, L.N. & Kallen, R.G. (1983):** Enzymes of the  $\beta$ -Ketoadipate Pathway in *Pseudomonas putida*: Kinetic and Magnetic Resonance Studies of the *cis,cis*-Muconate Cycloisomerase Catalyzed Reaction.
- Ohle, M. (1997):** Untersuchungen zur Prozessführung und Biofilmentwicklung eines Schwimmkorn-Biofilters zur kommunalen Abwasserreinigung. Diplomarbeit, Uni Bremen, FB2.
- Oltmanns, R.H., Müller, R., Otto, M.K. & Lingens, F. (1989):** Evidence for a New Pathway in the Bacterial Degradation of 4-Fluorobenzoate. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, No. 10, 2499-2504.
- Overmeyer, C. & Rehm, H.-J. (1995):** Biodegradation of 2-chloroethanol by freely suspended and adsorbed immobilized *Pseudomonas putida* US2 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 43, 143-149.
- Pagga, U. (1987):** Biologischer Abbau von Stoffen bei geringen Konzentrationen. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* 20, S. 101-107.
- Palleroni, N.J. (1984):** Family I. *Pseudomonadaceae*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Eds. of Vol. 1): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Palleroni, N.J. (1992):** Introduction to the Family *Pseudomonadaceae*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H.: *The Prokaryotes* Vol. 1-4., 3071-3085. Springer-Verlag, Heidelberg, New York.
- Pierce (1997):** Testbeschreibung 23225: BCA\* Protein Assay Reagent.
- Porter, K.G. & Feig, Y.S. (1980):** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
- Räbiger, N. (1995):** Grenzwertorientierter Stand der Technik - Chance für den produktions-integrierten Umweltschutz. Vortrag: Colloquium Produktionsintegrierter Umweltschutz. 11.-13.09.1995, Bremen. GVC-VDI.

- Rast, H.G. & Springer, W. (1997):** Mobilität von Genen für den Abbau halogenierter Aromaten in Klärfloren. In: Knorr, C. & von Schell, T.: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Rautenbach, R. (1990):** Separation potential of Nanofiltration Membranes. *Desalination* 77, 73-84.
- Reasoner, D.J. & Geldreich, E.E. (1985):** A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, No. 1, 1-7.
- Reineke, W. & Schlömann, M. (1997):** Grundlegende Aspekte des bakteriellen Abbaus von Chloraromaten. In: Knorr, C. & von Schell, T.: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Vieweg Verlag, Braunschweig.
- Reineke, W. (1989):** Der Abbau von chlorierten Aromaten durch Bakterien: Biochemie, Stammentwicklung und Einsatz zur Boden- und Abwasserbehandlung. *Forum Mikrobiologie* 9/89, 402-411.
- Reineke, W., Pieper, D.H. & Schlömann, M. (2000):** Mikrobieller Abbau von Chloraromaten. *BIOforum* 1-2, 21-24.
- Rippen, G. (1991):** Handbuch der Umweltchemikalien. Ecomed, Landsberg/Lech.
- Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. & Ridgway, H.F. (1992):** Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, No. 6.
- Rombaux, S. (1995):** Biologische industrielle Abwasserreinigung - Mikrobiologische Betrachtung der Milieubedingungen und der Reaktionskinetik eines Suspensions-Membranreaktors. Diplomarbeit, Uni Bremen, FB2.
- Römpp (1989):** Chemie Lexikon. 9. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Rosenwinkel, K.-H. (1999):** Membranverfahren in der industriellen Abwasserbehandlung. Verfahrenstechnik der Abwasser- und Schlammbehandlung - additive und prozessintegrierte Maßnahmen. Preprints / 4. GVC-Abwasser-Kongreß 06. - 08.09.1999, Bremen. GVC, VDI-Gesellschaft Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen. Fuck Verlag
- Rubio, M.A., Engesser, K.-H. & Knackmuss, H.-J. (1986):** Microbial metabolism of chlorosalicylates: accelerated evolution by natural genetic exchange. *Arch. Microbiol.* 145, 116-122.
- Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E.F. (1989):** Molecular cloning. Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Schaule, G., Flemming, H.-C. & Ridgway, H.F. (1993):** Use of 5-Cyano-2,3-Ditolylyl Tetrazolium Chloride for Quantifying Planktonic and Sessile Respiring Bacteria in Drinking Water. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 59, No. 11, 3850-3857.
- Schierenbeck, A. (1997):** Entwicklung eines Verfahrens zur selektiven biologischen Eliminierung schwer abbaubarer Stoffe aus Abwassergemischen mittels Suspensions-Membranreaktor. Abschlussbericht des Forschungsvorhabens 02WA9440/1, Rübiger, N., Uni Bremen, Institut für Umweltverfahrenstechnik.

- Schlegel, H.G. (1985):** Allgemeine Mikrobiologie. 6. Aufl., Thieme Verlag.
- Schmidt, E., Hellwig, M. & Knackmuss, H.-J. (1983):** Degradation of Chlorophenols by a Defined Mixed Microbial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, No.5, 1038-1044.
- Seiler, H. & Busse, M. (1978):** Die Floraanalyse in biologischen Kläranlagen und deren Aussage. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* 3, 111-117.
- Seiler, H., Blaim, H. & Busse, M. (1984):** Ecological studies on bacterial populations in activated sludge aerated with pure oxygen. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* 17, 82-86.
- Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1954):** The mechanism of formation of  $\beta$ -keto adipic acid by bacteria. *J. Biol. Chem.* Vol. 210, 821-836.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J & Klenk, D.C. (1985):** Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. In: *Analytical Biochemistry* 150, 76-85.
- Spiecker, C. & Haasis, H.-D. (1999):** Betriebswirtschaftliche Entscheidungsinstrumente im produktionsintegrierten Umweltschutz. *Impulse aus der Forschung*, Nr.27, 1/99, Uni Bremen.
- Stanier, R. Y. & Ornston, L. N. (1973):** The  $\beta$ -Keto adipate Pathway. *Adv. Microbiol. Phys.* 9, 89-151.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. & Springer, W. (1987):** Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Tabor, H. & Tabor, C.W. (1970):** Methods in Enzymology. Vol. XVII, Part. A, Academic Press, New York.
- Taeger, K., Knackmuss, H.-J. & Schmidt, E. (1988):** Biodegradability of mixtures of chlor- and methylsubstituted aromatics: Simultaneous degradation of 3-CBA and 3-MBA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 603-608.
- Takii, S. (1977):** Bacterial characteristics of activated sludge treating carbohydrate wastes. *Water Research* 11, 85-89.
- Thiele, J., Müller, R. & Lingens, F. (1987):** Initial characterisation of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3. *FEMS Microbiol. Letters* 41, 115-119.
- Unger, K.K. (1989):** Handbuch der HPLC. Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker. Merck. GIT Verlag.
- Vandenbergh, P.A., Olsen, R.H. & Colaruotolo, J.F. (1981):** Isolation and Genetic Characterization of Bacteria That Degrade Chloroaromatic Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, No. 4
- Viliesid, F. & Lilly, M.D. (1992):** Influence of dissolved oxygen tension on the synthesis of catechol 1,2-dioxygenase by *Pseudomonas putida*. *Enz. Microb. Technol.* Vol. 14, 561-565.
- Wagner, M. & Amann, R. (1996):** Die Anwendung von in situ-Hybridisierungssonden zur Aufklärung von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Biozönosen. in der Abwasserreinigung. In: *Ökologie der Abwasserorganismen*. Hrsg. Lemmer, H., Griebe, T. & Flemming, H-C., Springer Verlag.

- Wagner, M. (1996):** Die Anwendung von Gensonden zur Aufklärung mikrobieller Populationsstrukturen in der Abwasserreinigung. Korrespondenz Abwasser 12/96, 43. Jg., 2086-2087.
- Wellens, H. (1990):** Zur biologischen Abbaubarkeit mono- und disubstituierter Benzoderivate. Z. Wasser-Abwasser-Forsch. 23, S. 85-98.
- Wernicke, F., Kämpfer, P. & Dott, W. (1990):** Einfluß des Isolationsmediums und der Isolationsbedingungen auf die Erfassung des bakteriellen Artenspektrums im Trinkwasser. Zbl. Hyg. 190, 26-38.
- Westmeier, F. & Rehm, H.J. (1987):** Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptiv immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 78-83.
- Wetzel, A. & Dott, W. (1984):** Mikrobiologische Untersuchungen einer zweistufigen Adsorptions-Belebungsanlage. 1. Mitteilung: Qualitative und quantitative Erfassung der aeroben und fakultativ anaeroben chemoheterotrophen Bakterienpopulationen. Z. Wasser-Abwasser-Forsch. 17, 121-126.
- WHG (Wasserhaushaltsgesetz) (1986):** Bundesgesetzblatt Teil I, 1529-1544.
- Wiesmann, U. (1991):** Submers-Bioreaktoren zur Behandlung von Abwässern mit schwerabbaubaren Schadstoffen. gwf Wasser/Abwasser 132, Nr. 3, 161-169.
- Wilderer, P.A., Rubio, M.A. & Davids, L. (1991):** Impact of the Addition of Pure Cultures on the Performance of Mixed Culture Reactors. Water Research Vol. 25, No. 11, 1307-1313.
- Wobus, A. (1997):** Untersuchungen zur Elimination von Chlorphenolen in Membranbiofilmreaktoren - Vergleich zwischen kontinuierlichem und Sequencing-Batch-Betrieb. Dissertation, TU Dresden.
- Wobus, A., Ulrich, S. & Röske, I. (1995):** Degradation of chlorophenols by biofilms on semipermeable membranes in two types of fixed-bed reactors. Wat. Sci. Tech., Vol. 32, No 8, 205-212.
- Wyndham, R.C. & Starus N.A. (1988):** Chlorbenzoate catabolism and interactions between *Alcaligenes* and *Pseudomonas* species from Bloody Run Creek. Arch. Microbiol. 150, 230-236.
- Yu, W., Dodds, W.K., Banks, M.K., Skalsky, J. & Strauss, E.A. (1995):** Optimal Staining and Sample Storage Time for Direct Microscopic Enumeration of Total and Active Bacteria in Soil with Two Fluorescent Dyes. Appl. Environ. Microbiol. 61, No. 9.

---

## Anhang

### A.1 Rezepte für Nährböden

#### DEV-(N)-Agar

10 g Fleischextrakt  
10 g Pepton (Fleisch)  
5 g NaCl  
15 g Agar  
1 l Aqua bidest., pH 7,3

#### P-Agar nach Nehr Korn (1968)

1,0 g Pepton (Fleisch)  
0,1 g Glucose  
0,1 g  $K_2HPO_4$   
0,02 g  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$   
13,0 g Agar  
1 l Leitungswasser, pH 7,2

#### R2A-Agar nach Reasoner & Geldreich (1985)

0,5 g Hefeextrakt  
0,5 g Proteose-Pepton  
0,5 g Casein-Pepton, HCl-Hydrolysat, salzfrei  
0,5 g D(+)-Glucose  
0,5 g lösliche Stärke  
0,3 g Natrium-Pyruvat  
0,3 g  $K_2PO_4$   
0,1 g  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$   
1 l Aqua bidest., pH  $7,2 \pm 0,2$

### A.2 Mikrotiter-Methode zur stoffwechselphysiologischen Charakterisierung der Bakterienisolate

Die 173 Isolate der beiden Vergleichsreaktoren wurden nach der kolonie- und zellmorphologischen Charakterisierung 77 miniaturisierten physiologisch-biochemischen Tests in den Vertiefungen von 96er Mikrotiterplatten unterzogen. Die Untersuchungen wurden in Anlehnung an Kölbel-Boelke (1987) und Kämpfer et al. (1988, 1989, 1991) durchgeführt.

## A.2.1 Arbeitsgang zum Ansetzen der Mikrotiterkulturen

1. Ausstreichen der Bakterienstämme auf P-Agar (dicker Ausstrich).
2. Kolonien in sterilem Leitungswasser (1,5 ml) suspendieren, zwei Tage aushungern.
3. 200 µl Bakteriensuspension in jede Vertiefung der Masterplate füllen (Ausgangsplatte für alle Beimpfungen im Versuch, drei Parallelen anlegen).
4. Beimpfung:
  - a) Flüssige Testmedien: Leere Mikrotiterplatten werden 3 mal mit dem Beimpfungsgerät oder einem Handinokkulator aus den Suspensionen der Masterplate beimpft (in jeder Vertiefung muß ein Tropfen Suspension zu sehen sein). Dann werden jeweils 150 µl des zu testenden Mediums in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gefüllt.
  - b) Feste Testmedien: Der zu testende Nährboden wird vor Versuchsbeginn entsprechend der Anweisung entweder im Deckel der Mikrotiterplatten gegossen oder in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gefüllt (150 µl). Ausgehend von den Masterplates wird der feste Nährboden einmal mit einem Beimpfungsgerät oder Handinokkulator beimpft.
5. Abdeckung der Platten: Bei einigen Tests müssen die Mikrotiterplatten mit einer nicht-toxischen selbstklebenden Folie (verhindert Entweichen flüchtiger, andere Vertiefungen der Mikrotiterplatte beeinflussende Stoffwechselprodukte) abgedeckt werden oder mit sterilem Flüssigparaffin (100 µl/ Vertiefung) bzw. sterilem Paraffingemisch (50 % flüssig/ 50 % fest) überschichtet werden.
6. Inkubation: 20°C, falls bei Kölbel-Boelke (1987) nicht anders angegeben.
7. Inkubationszeit: 1 Tag bis max. 4 Wochen.
8. Auswertung: Wie bei Kölbel-Boelke (1987) angegeben.

## A.2.2 Durchgeführte Tests

### 1. Verwertung von Kohlenhydraten

#### 1.1 Monosaccharide

Glucose oxidativ	GLU-O
Glucose fermentativ	GLU-F
Fructose	FRU
Galactose	GAL
Mannose	MNE
Arabinose	ARA
Xylose	XYL

#### 1.2 Disaccharide

Lactose oxidativ	LAC-O
Lactose fermentativ	LAC-F
Maltose	MAL
Saccharose	SAC
Cellobiose	CEL

#### 1.3 Trisaccharide

Raffinose	RAF
Melzitose	MEL



1.4 Polysaccharide

Glycogen	GLY
Inulin	INU
Stärke	AMD
Zellulose	ZEL
Xylan	XYA

1.5 Zuckeralkohole

Mannit	MAN
--------	-----

1.6 Aminierte Kohlenhydrate

N-Acetyl-Glucosamin	NAC
---------------------	-----

1.7 Glycoside

Salicin	SALI
---------	------

2. Verwertung von Alkoholen (unter Säurebildung)

Glycerin	GLE
Ethanol	ETOH

3. Verwertung organischer Säuren als einzige C-Quelle

Citrat	CIT
Glutamat	GLA
Acetat	ACE
Malonat	MLO
Formiat	FOR
Lactat	LAT
Propionat	PRO
Tartrat	TAT
Succinat	SUC
Gluconat	GNT
Oxalat	OXA

4. Wachstum auf Aromaten

1,0 mM 3-Chlorbenzoesäure	3-CBA 1
5,0 mM 3-Chlorbenzoesäure	3-CBA 5
1,0 mM Benzoesäure	BA
1,0 mM 4-Hydroxybenzoesäure	4-HBA
0,5 mM Catechol	Cat
0,5 mM Protocatechuat	PCat

5. Spezifische Enzymaktivität

Arginindehydrolase	ADH
Ornithindecaboxylase	ODC
Lysindecaboxylase	LDC
Phenylalanindecaminase	PA
Cytochromoxydase	OXI
Katalase	KAT

Urease	URE
Phosphatase	PO4
Desoxyribonuclease	DNA
Esculinglucosidase	ESC
Hippurat-Hydrolase	HIP
$\beta$ -Galactosidase	ONPG
<u>6. Proteolytische Aktivität</u>	
Gelatine-Hydrolyse	GEL
Casein-Hydrolyse	CAS
<u>7. Lipolytische Aktivität</u>	
Tween 20	T20
Tween 40	T40
Tween 60	T60
Tween 80	T80
<u>8. Bildung von Stoffwechselprodukten</u>	
Acetoin-Bildung (Voges-Proskauer)	VP
Stabile Säurebildung (Methylrot)	MT
<u>9. Wachstum unter veränderten physikalischen und chemischen Kulturbedingungen</u>	
<u>9.1 Wachstum bei verschiedenen Temperaturen</u>	
4°C	4°C
14°C	14°C
20°C	20°C
30°C	30°C
37°C	37°C
45°C	45°C
54°C	54°C
<u>9.2 Wachstum bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen</u>	
5,0 % NaCl	5%
7,5 % NaCl	7,5%
10,0 % NaCl	10%
<u>9.3 Wachstum mit Penicillin</u>	PENC
<u>9.4 Wachstum mit KCN</u>	KCN
<u>10. Verwertung anorganischer Stickstoffverbindungen</u>	
$\text{NO}_3^- - \text{NO}_2^-$	NIT-1
$\text{NO}_3^- - \text{N}_2$	NIT-2
$\text{NO}_2^- - \text{N}_2$	NIT-3
Kontrollmedium	NIT-K
Stickstofffreies Medium	NFR

## A.3 Arbeitsschritte zur Sequenzierung der isolierten Bakterien

### A.3.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) als *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von Nucleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz (Ibelgaufits 1990) wurde unter den optimierten Bedingungen nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Vor der PCR wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Bakterienmasse einer Kolonie von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl Wasser in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurde 1 µl dieses Lysats (entspricht ca. 100 ng genomischer DNA der Bakterien) in einen PCR-Standardansatz eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im "Trio-Thermoblock" (Biometra) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

Tabelle A.3.1 enthält die verwendeten Primer mit ihren Bindungsstellen aus konservierten Abschnitten der 16S rDNA, die Position in Bezug auf die 16S rDNA-Sequenz von *E. coli* und die Ausrichtung in der PCR (16S = Vorwärtsprimer, 16R = Rückwärtsprimer) sowie die dazugehörigen Nucleotid-Sequenzen. Die Basenabfolge ist vom 5'-Anfang zum 3'-Ende aufgelistet.

Tab. A.3.1: Auflistung der PCR-Primer mit ihren jeweils spezifischen Bindungsstellen

Allgemeine PCR-Primer	Nukleotid-Sequenz
16S 8 (Bruce et al. 1992)	AGA GTT TGA TC(C/A) TGG CTC AG
16S 515	GTG CCA GCA GCC GCG GTA
16R 541	TCA AGC TTA CCG CGG CGG CTG CTG G
16R 926	CCG TCA ATT CAT TTG AGT
16R 1099	TTC TGC AGC GGG ACT TAA CCC AAC
16R 1538	AAG GAG GTG ATC CAG CCG

#### Bestandteile des PCR-Reaktionsansatzes:

- ca. 100 ng genomische Bakterien-DNA
- 50 pmol "forward"-Primer
- 50 pmol "reverse"-Primer
- dNTP-Gemisch: je 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- 0,5 U Taq-Polymerase
- 1 x PCR-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,3  
(sterilfiltriert) 50 mM KCl  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,01% Gelatine

Der Reaktionsansatz wurde vor der Durchführung der PCR mit 50µl Mineralöl überschichtet. Der Ansatz wurde im Wasserbad des Thermocyclers zunächst für eine Minute auf 95°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zu teilen und so ein Oligonucleotid-

Annealing zu ermöglichen. Ein Richtwert für die Schmelztemperatur der verwendeten PCR-Primer ergibt sich durch die Summe der Multiplikation der Anzahl von G und C mit 4°C und der Anzahl von A und T mit 2°C (Sambrook et al. 1989). Die optimalen Annealing-Temperaturen wurden ausgehend von diesen Richtwerten empirisch ermittelt. Diese Hybridisierung dauerte zwei Minuten bei 55°C, bei der je ein Primer an einen Einzelstrangabschnitt bindet und an diesem der komplementäre Strang gebildet wird. Für die eigentliche Verdoppelung der DNA sorgt die Taq-Polymerase für drei Minuten bei 73°C. Pro Zyklus verdoppelt sich die DNA bis durch den ständigen Verbrauch der Nukleotide und der Primer sich das Verhältnis von Matrize zu Material verschiebt und eine Verringerung der PCR-Ausbeute eintritt, die noch durch die abnehmende Funktion der Taq-Polymerase verstärkt wird. Um möglichst viele vollständig synthetisierte Nucleotidstränge zu erhalten, wurde der letzte Polymerisierungsschritt auf zehn Minuten verlängert.

Als Ergebnis wurde ein Abschnitt aus der genomischen DNA des Bakteriums mit zwei Primern amplifiziert. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung des Reaktionsansatzes in einem 1,5 %igen Agarosegel. Als negative Kontrolle diente stets ein PCR-Ansatz ohne DNA.

### **A.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA wurde nach Sambrook et al. (1989) in einem horizontalen Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden eine Minigelapparatur (Gibco BRL) mit einem Gelvolumen von 25 ml und eine Midigelapparatur (Gibco BRL) mit einem Gelvolumen von 60 ml verwendet.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Gelelektrophorese sind im Folgenden aufgeführt:

- 1.) Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels in TAE-Puffer.
- 2.) Auffüllen der Gelkammer bis an die Oberkante des Gels mit TAE-Laufpuffer und Beladen der Geltaschen mit den DNA-Proben und einem angemessenen DNA-Molekulargewichtsmarker (Lambda/Hind III bzw. pBR 322/AluI).
- 3.) Geleinlauf der Proben bei einer Spannung von ca. 1 V/cm, Überschichten des Gels mit TAE-Puffer und Durchführung der Elektrophorese bei einer Spannung von ca. 3 V/cm.
- 4.) Färbung des Gels in Ethidiumbromid (0,5 µg/ml TAE-Puffer) für 15 min und Aufnahme mit Rotfilter auf dem UV-Transilluminator (366 nm) mit der Polaroidkamera bzw. dem E.A.S.Y.-Geldokumentationssystem der Firma Herolab zur Dokumentation der erhaltenen Banden.

#### Bestandteile des TAE-Puffers:

- 400 mM Tris-HCl
- 200 mM Na-Acetat
- 10 mM EDTA
- pH 7,8

Nach dem Gellauf wurde die deutlich sichtbare DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und über die Extraktion mit einem Kit der Firma Qiagen aufgereinigt und ein Abschnitt der 16S rDNA sequenziert.

### A.3.3 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Die Präparation der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels des "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben:

- 1.) Ausschneiden der zu extrahierenden DNA als Gelblöckchen minimaler Größe mittels Skalpell.
- 2.) Gewichtsbestimmung der Gelblöckchen und Zugabe von 300 µl Puffer QX1/100 mg Gel für Gele < 2 % Agarose (600 µl Puffer QX1/100 mg Gel für Gele > 2 % Agarose).
- 3.) Inkubation bei 50°C für 10 min bis zur vollständigen Auflösung der Agarose (vortexen) und Zugabe von 100 µl Isopropanol/100 mg Gel (erforderlicher pH-Wert der Mischung < 7,5; anderenfalls pH-Wert mittels 10 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,0 korrigieren).
- 4.) QIAquick-Säule in ein 2 ml-Sammelgefäß stecken, mit dem Ansatz beladen und bei 12.000 g für 1 min zentrifugieren.
- 5.) Verwerfen des Eluats; zum Waschen 750 µl Puffer PE auf die Säule geben und erneut zentrifugieren.
- 6.) Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers Sammelgefäß entleeren und zentrifugieren.
- 7.) Sammelgefäß in ein sauberes 1,5 ml-Eppendorf-Cup stecken und DNA durch Zugabe von 30 µl Aqua bidest und wiederholte Zentrifugation eluieren.

#### Rezepte der verwendeten Puffer:

Puffer QX1: 3 M NaCl  
 4 M NaClO<sub>4</sub>  
 10 mM Tris-HCl, pH 7,0  
 10 mM Natriumthiosulfat

Puffer PE: Konzentrat (Qiagen) gelöst in Ethanol 96 %

### A.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung des DNA-Fragments wurde von der Fa. GAG Genom Analytik GmbH im UFT Bremen durchgeführt.

Die DNA-Sequenz war 621 Basenpaare lang und bestand aus 156 A, 140 C, 210 G und 113 T. Der Datenbankabgleich (NCBI BLASTS Search Results) ergab eine 99,5 %ige Identifizierung eines 620 Basenpaar langen Bereich des *Alcaligenes sp.*-Gens für die 16S rRNA (1454 bp). Die Sequenz ist unten angegeben:

```
GCATGCCTTA CACATGCAAG TCGAACGGCA GCACGGGAGC AATCCTGGTG GCGAGTGGCG
AACGGGTGAG TAATACATCG GAACGTGCC TGTTCGTGGGG GATAACTAGT CGAAAGATTA
GCTAATACCG CATAACGACT GAGGGTGAAA GCGGGGGACC GYAAGGCCTC GCGCGATAGG
AGCGGCCGAT GTCTGATTAG CTAGTTGGTG GGGTAAAGGC CCACCAAGGC GACGATCAGT
AGCTGGTCTG AGAGGACGAT CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG
GAGGCAGCAG TGGGGAATTT TGGACAATGG GGGCAACCCT GATCCAGCAA TGCCGCGTGT
GTGAAGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTTGTCCGGA AAGAAATCCC TTGCCCTAAT
ACGGCGGGGG GATGACGGTA CCGGAAGAAT AAGCACCGGC TAACTACGTG CCAGCA?CCG
CGGTAATACG TAGGGTGC GA GCGTTAATCG GAATTACTGG GCGTAAAGCG TGCGCAGGCG
GTTTTGTAAG ACAGGCGTGA AATCCCCGAG CTCAACTTGG GAATGGCGCT TGTGACTGCA
AGGCTAGAGT ATGTCAGAGG G
```

## A.4 Ergebnisse des Metabolitennachweises

### Molekülmassen ausgewählter Substanzen:

3-Chlorbenzoesäure	M = 156,57
4-Chlorphenol	M = 128,57
Benzoesäure	M = 122,12
4-Hydroxybenzoesäure	M = 138,12
Catechol	M = 110,11
3-Chlorcatechol	M = 144,11
Protocatechuat	M = 154,10
Na-EDTA	M = 292,20
<i>cis,cis</i> -Muconat	M = 142,11
3-Carboxy- <i>cis,cis</i> -muconat	M = 186,12
2-Hydroxy- <i>cis,cis</i> -muconat-semialdehyd	M = 142,11
2-Hydroxy-4-carboxy- <i>cis,cis</i> -muconat-semialdehyd	M = 186,12

### Bestandteile der Mineralsalzlösung:

<u>Bestandteile der Mineralsalzlösung:</u>		<u>Masse der Ionen</u>	
350 mg/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	M = 177,99	(142,0/ 46,0/ 96,0)
100 mg/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	M = 136,09	(41,0/ 95,0)
100 mg/l	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	M = 132,14	(36,0/ 96,0)
20 mg/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	M = 246,45	(120,4/ 24,0/ 96,0)
5 mg/l	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	M = 236,83	(164,8/ 40,0/ 62,0)
1 mg/l	$(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	M = 392,10	(284,1/ 56,0)

### Massenspektrometrische Untersuchung des 3. 3-CBA-Abbaus nach 60 Minuten

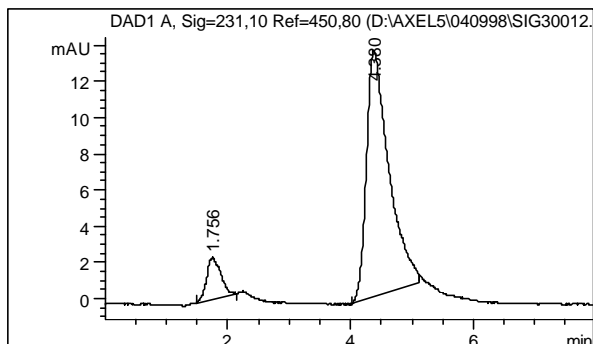


Abb. A.4.1a: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, Peaks von Metabolit und 3-CBA

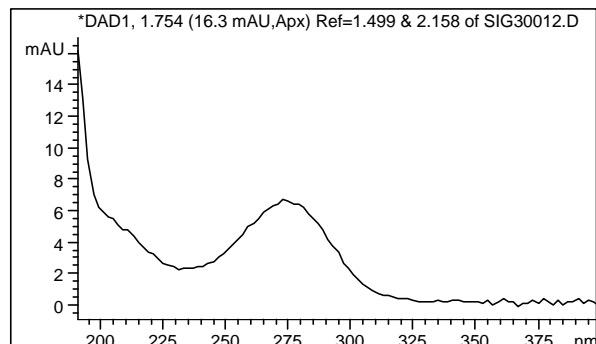


Abb. A.4.1b: 3. 3-CBA-Abbau 60 Minuten, UV-Spektrum des Metaboliten-peaks

## Massenspektrometrische Untersuchung des Mineralsalz-Mediums

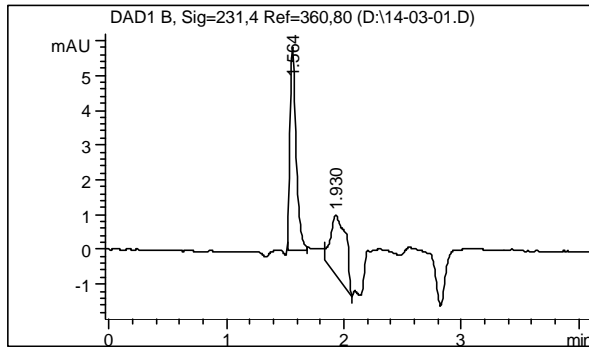


Abb. A.4.2a: Mineralsalz-Medium,  
DAD-Spektrum

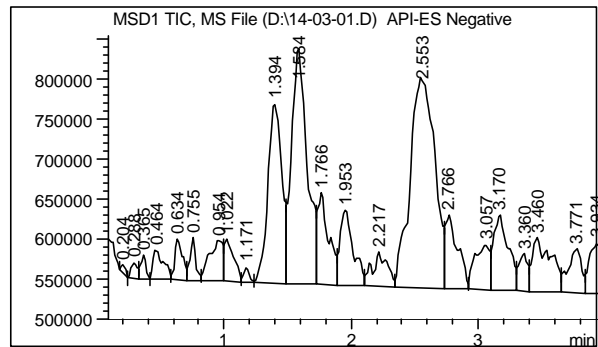


Abb. A.4.2b: Mineralsalz-Medium,  
MSD-Spektrum

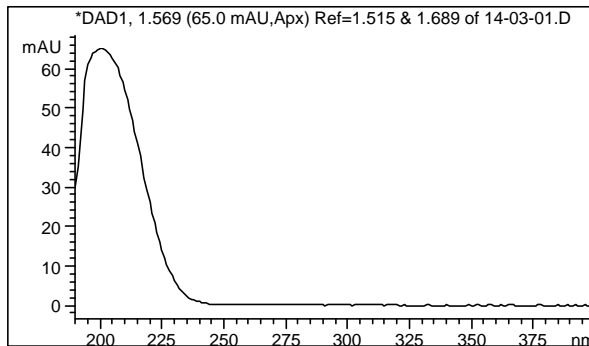


Abb. A.4.2c: Mineralsalz-Medium, UV-  
Spektrum des Peaks nach  
1,569 Minuten

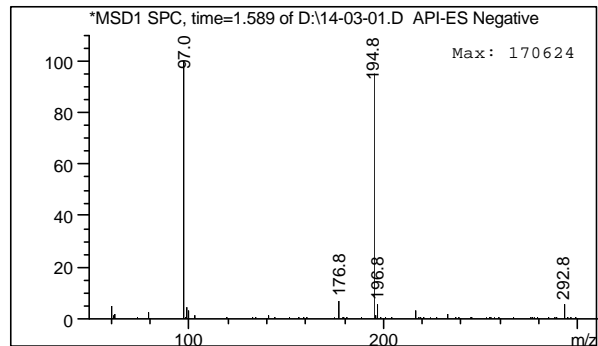


Abb. A.4.2d: Mineralsalz-Medium, Massen-  
spektrum des Peaks nach  
1,589 Minuten

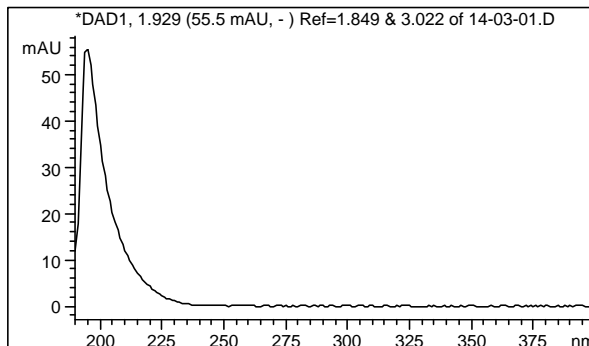


Abb. A.4.2e: Mineralsalz-Medium, UV-  
Spektrum des Peaks nach  
1,929 Minuten

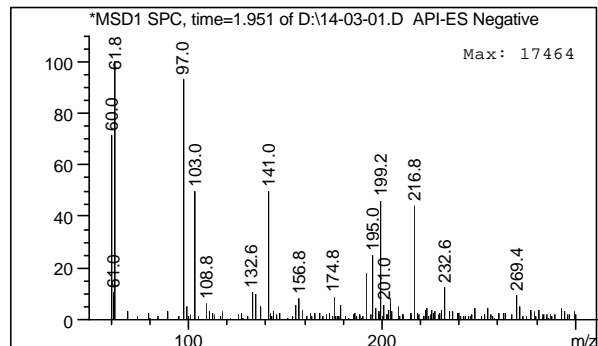


Abb. A.4.2f: Mineralsalz-Medium, Massen-  
spektrum des Peaks nach  
1,951 Minuten

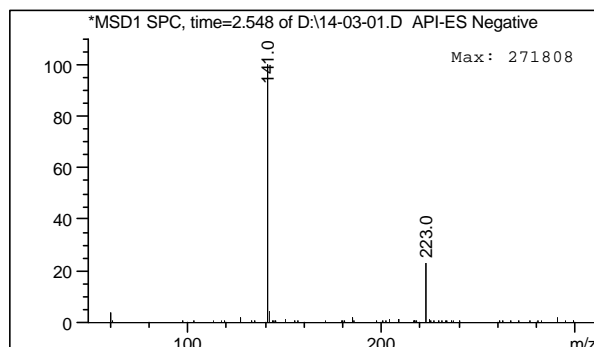


Abb. A.4.2g: Mineralsalz-Medium, Massenspektrum des Peaks nach 2,548 Minuten

### Massenspektrometrische Untersuchung von Catechol

Die in dieser Arbeit am häufigsten nachgewiesenen Metabolite traten entweder nach Störfällen auf oder in den Batch-Versuchen zum 3-CBA-Abbau der Rührkolben-Kulturen. Die UV-Spektren wiesen bezüglich des Maximums bei 275 nm eine Ähnlichkeit mit Catechol aus. Das UV- und das Massenspektrum von Catechol mit dem Molekülion der Masse 109 m/z sind in den Abbildungen 3.19a,b dargestellt.

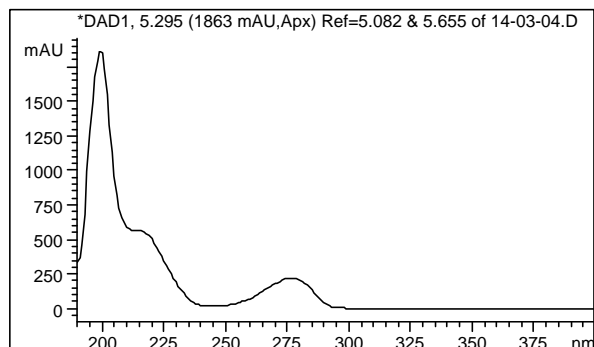


Abb. A.4.3a: UV-Spektrum von Catechol

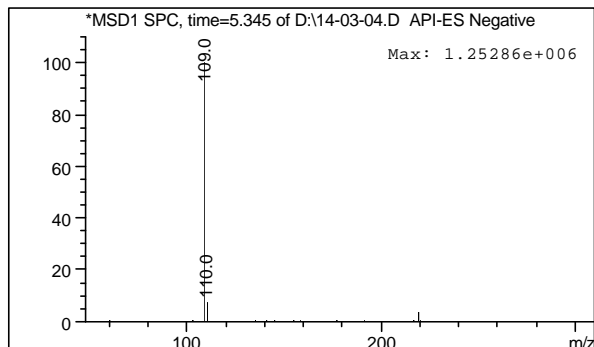


Abb. A.4.3b: Massenspektrum von Catechol