

Dissertation 18/2006

**Cometabolischer Abbau von Methyl-*tertiär*-butylether (MTBE)
durch verschiedene alkanverwertende Bakterienspezies
– Vom Labor zum Feldversuch –**

Kathleen Haase

ISSN 1860-0387

Thema

**Cometabolischer Abbau von Methyl-*tertiär*-butylether (MTBE) durch
verschiedene alkanverwertende Bakterienspezies
- Vom Labor zum Feldversuch -**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Kathleen Haase
geb. am 23.11.1976 in Dresden

Tag der Einreichung: 15.12.2006

Tag der Verteidigung: 02.07.2007

Gutachter/Gutachterin:

1. PD Dr. M. Martienssen
2. Prof. Dr. J. R. Andreesen
3. PD Dr. St. Schmidt

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. D. H. Nies

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Cometabolischer Abbau von Methyl-*tertiär*-butylether (MTBE) durch
verschiedene alkanverwertende Bakterienspezies
– Vom Labor zum Feldversuch –**

selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Dresden, den 10. 12. 2006

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Haase, K.; Wendlandt, K.-D.; Gräber, A. , and Stottmeister, U. (2006) Cometabolic Degradation of MTBE using Methane-, Propane-, and Butane- Utilizing Enrichment Cultures and *Rhodococcus* sp. BU3, Engineering Life Science 6: 1-7

Martienssen, M.; Kukla, S.; Balcke, G. U.; Rohwerder, T.; Haase, K., and Schirmer, M. (2004). Enhanced Natural Attenuation of MTBE: Comparison of different technologies in field experiments at the Leuna site (Germany). Second European Conference on MTBE Barcelona (2004), Conference Proceedings: 60-64

Haase, K.; Wendlandt, K.-D., and Stottmeister, U. (2005): Cometabolic Degradation of MTBE by different species of bacteria. 1st International Conference on Environmental Science and Technology, New Orleans. 23 - 26 Jan. 2005, Abstrakt-Band: 59

Haase, K., and Wendlandt, K.-D. (2006): Cometabolic Degradation of methyl *tert*-butyl ether by a new strain *Rhodococcus* sp. BU3. VAAM-Jahrestagung 2006 Jena, 19. - 22. März 2006, Tagungsband: 129

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Mai 2004 bis Juni 2006 am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH , Department Bioremediation, in Leipzig unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Stottmeister und Frau Dr. K.-D. Wendlandt durchgeführt.

Danksagung:

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Stottmeister und Frau Dr. K.-D. Wendlandt für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Betreuung und Bereitschaft zur förderlichen Diskussion danken. Besonders danke ich Frau PD Dr. Martienssen für die Übernahme der universitären Betreuung und die konstruktiven Diskussionen.

Mein Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Departments Bioremediation des Helmholtz Zentrums für Umweltforschung GmbH für jegliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Frau Dr. K.-D. Wendlandt ein Dankeschön für die Durchsicht des Manuskriptes. Ausdrücklich danke ich Frau E. Knaak für die sehr gute Zusammenarbeit, ihren unermüdlichen Einsatz bei der Durchführung der Fermentationen und ihren moralischen Beistand. Vielen Dank auch an Frau K. Ethner, Frau G. Mirschel und Frau I. Mäusezahl für ihre fachliche Hilfe und den moralischen Beistand. Für die Unterstützung bei der Auswertung der Versuchsdaten gilt mein Dank Herrn Dipl.-Ing. M. Jechorek.

Ein spezieller Dank geht an Herrn Prof. Dr. M. Schirmer für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und die moralische Unterstützung.

Herrn Dipl. Chem. R. Rockmann danke ich für die zahlreichen ideenfördernden Diskussionsabende und fachlichen Hinweise.

Für die Durchführung der kleintechnischen Säulenexperimente im Rahmen ihrer Diplomarbeit danke ich Frau Dipl. Ing. A. Gräber.

Danke auch an Frau Dr. G. Neumann, Herrn Dipl. Biochem. R. Kindler, Frau Dipl. Biol. N. Kabelitz, Frau Dipl. Biol. I. Duldhardt, Frau Dipl. Biol. J. Fischer, Frau Dipl. Biol. C. Hoffmann-Jäniche und allen anderen Diplomanden und Doktoranden der Departments Bioremediation und Isobiogeochemie des Helmholtz Zentrums für Umweltforschung GmbH für die schöne Zeit. Weiterhin danke ich für den technischen Beistand: Herrn D. Halm, Herrn H.-J. Rost und Herrn G. Militisch sowie für die Durchführung und Betreuung des Feldversuches Frau PD. Dr. Martienssen, Herrn S. Kukla und allen Mitarbeitern des Departments Hydrogeologie, die am METLEN- Projekt mitgearbeitet haben.

Vielen Dank an Frau Dr. Breuer und ihre Mitarbeiter für die Durchführung der PCR zur Aufklärung des Enzymsystemes des Stammes BU3. Ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Andreesen und Frau Dr. Lechner der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Mikrobiologie für ihre Unterstützung.

Für die Finanzierung des Projektes danke ich dem Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH.

Ausdrücklich bedanke ich mich bei meiner Familie für die moralische Unterstützung und die zahllosen Aufmunterungen. Mein besonderer Dank gilt ihnen für ihre Hilfe während der letzten Monate, die es mir erlaubten trotz meiner neuen Stelle und dem damit verbundenen Umzug diese Arbeit fertigzustellen.

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Chemikalienverzeichnis.....	XI
Geräteverzeichnis.....	XII
Softwareverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	1
2 Aufgabenstellung	10
3 Material und Methoden.....	11
3.1 Eingesetzte Mikroorganismen und Umweltproben	11
3.2 Medien, Kohlenstoffquellen und Stammlösungen	12
3.3 Kultivierungsmethoden und Wachstumsuntersuchungen.....	13
3.3.1 Anreicherung der Umweltproben	13
3.3.2 Anzucht der Kulturen im 1 l – Schüttelkolben.....	13
3.3.3 Untersuchung des Wachstumes der Kulturen	14
3.3.4 Kultivierung der Kulturen in 300 ml -, 5 l - und 50 l-Fermenter	14
3.3.5 Aktivierung der Monooxygenase der Kulturen.....	15
3.4 MTBE-Abbauversuche im Labor- und kleintechnischen Maßstab	15
3.4.1 MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen	15
3.4.2 MTBE-Abbauversuche in Laborsäulen.....	19
3.4.3 MTBE-Abbauversuche in kleintechnischen Säulen	20
3.5 Feldversuch - cometabolischer MTBE-Abbau zur Implementierung des ENA-Konzeptes am Projektstandort Leuna	22
3.6 Analytische, mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	26
3.6.1 Analytische Methoden	26
3.6.2 Mikro- und Molekularbiologische Arbeitstechniken.....	28
4 Ergebnisse	32
4.1 Auswahl und Charakterisierung der verwendeten Misch- und Reinkulturen	32
4.1.1 Auswahl der methanotrophen Reinkulturen	32
4.1.2 Charakterisierung der eingesetzten Anreicherungskulturen und Isolierung von Reinkulturen	32
4.1.3 Charakterisierung und Identifizierung der Stämme BU3, B12 und K152	34
4.2 Wachstumsuntersuchungen der selektierten Anreicherungs- und Reinkulturen	37

Inhaltsverzeichnis

4.2.1	Wachstumsversuche der methanverwertenden Kulturen	37
4.2.2	Wachstumsversuche der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen.....	39
4.2.3	Wachstumsversuche der Stämme B12, K152 und BU3	40
4.2.4	Upscaling der Wachstumsprozesse der Stämme BU3, K152 und B12	43
4.3	Cometabolischer MTBE-Abbau unter Verwendung der ausgewählten methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen	49
4.3.1	Untersuchungen des cometabolischen MTBE-Abbaues an ruhenden Zellen.....	49
4.3.1.1	Cometabolischer MTBE- und TBA-Abbau methanverwertender Anreicherungs- und Reinkulturen.....	50
4.3.1.2	Cometabolischer MTBE-Abbau der propan- und butan- verwertenden Anreicherungskulturen	54
4.3.1.3	Einfluss der Kulturen auf die Effizienz des cometabolischen MTBE-Abbaues	54
4.3.1.4	Cometabolischer MTBE-Abbau der Stämme BU3, B12 und K152	56
4.3.1.5	Batch-Langzeit-MTBE-Abbauversuche der Stämme K152 und BU3.....	61
4.3.2	Untersuchung des cometabolischen MTBE-Abbaues in Säulensystemen	63
4.4	Untersuchungen zum Enzymsystem des Stammes BU3	71
4.5	Feldversuch.....	72
4.5.1	Prinzip des Feldversuches.....	72
4.5.2	Projektphase I : Prozess Biostimulation	75
4.5.3	Projektphase II: Biostimulation mit zusätzlicher Zugabe von Wasserstoffperoxid (200 ml 50 % H ₂ O ₂ / m ³ Grundwasser).....	76
4.5.4	Projektphase III: Bioaugmentation	76
5	Diskussion.....	81
5.1	Auswahl und Charakterisierung der verwendeten Misch- und Reinkulturen	81
5.2	Wachstumsuntersuchungen	82
5.3	Cometabolischer MTBE-Abbau unter Verwendung ausgewählter methan-, propan- und butanverwertender Anreicherungs- und Reinkulturen	87
5.3.1	MTBE-Abbau der methanverwertenden Kulturen	87
5.3.2	MTBE-Abbau der propan- und butanverwertenden Kulturen - enzymatische Untersuchungen	88
5.3.3	Einfluß der Begleitflora auf den cometabolischen MTBE-Abbau.....	90
5.3.3	Effizienz des MTBE-Abbaues der Stämme B12, K152 und BU3	91
5.3.4	Batch-Langzeit-Abbauversuche der Stämme K152 und BU3	93

Inhaltsverzeichnis

5.3.5	Cometabolischer MTBE-Abbauversuche in Säulensystemen	94
5.4	Aufklärung des MTBE-Abbauweges durch den Stamm BU3.....	96
5.5	Feldversuch zum cometabolischen MTBE-Abbau des Stammes BU3 unter Anwendung des ENA-Konzeptes am Projektstandort Leuna	97
6	Fazit und Ausblick.....	102
7	Zusammenfassung	104
8	Literaturverzeichnis	108
	Anhang.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Strukturformel von Methyl- <i>tertiär</i> -butylether (MTBE).....	2
Abb. 2:	Oxidativer Abbauweg von MTBE (modifiziert nach (Francois et al. 2003; Steffan et al. 1997; Rohwerder et al. 2006; Smith et al. 2003b)).	4
Abb. 3:	cometabolische Stoffumwandlungen-Reaktionen der beteiligten Oxygenasen (Chang et al. 1995)	8
Abb. 4:	schematische Darstellung der Laborsäule (A: Dosierventil für Zugabe von Wachstumssubstrat/ MTBE, B: Kunststoffsäule, C: Tygonschlauchverbindung, D: Kolbenpumpe, E: Probenahmeventil, B1: Dichtungsringe, B2: Deckel mit Ansatzstutzen, B3: Lochplatte, B4: Kunststoffzylinder, B5: Boden mit Ansatzstutzen und Siebplatte)	20
Abb. 5:	Schematischer Aufbau der kleintechnischen Säulen S 1 und S 2. (B: kleintechnische Säule, B1: Spinne, D: Kolbenpumpe, E: Probenahme-/ Dosierventil, F: Begasungssäule mit gewickelten Silikonschlauch, G: Lanzensystem)	21
Abb. 6:	MTBE-Verteilung am Projektstandort Leuna (MTBE-Konzentrationen in [µg/l], Lage Altwerk Leuna: Y = 200 m, X= 500 m, (Martienssen et al. 2004))	23
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Konditionierungseinheit und des anschließenden Abstromstreifens (1: Exfiltrationsbrunnen (EB), 2: Infiltrationsbrunnen (IB), 3-6: Probenahmebrunnen Saf 56, Saf 57, Saf 58 und Saf 59). (modifiziert nach (Schirmer 2000)).	23
Abb. 8:	Mikroskopische Aufnahmen der Stämme B12 (A), K152 (B) und BU3 (C), (Phasenkontrast, 1000-fache Vergrößerung. Anzucht der Stämme 3 - 4 Tage, NMS-Medium, Wachstumssubstrat Propan, T= 30°C)	34
Abb. 9:	Mikroskopische Aufnahme des morphogenetischen Zellzykluses des Stammes BU3 (Phasenkontrast, 1000-fache Vergrößerung, Anzucht NMS-Medium, Wachstumssubstrat 1-Propanol, T= 30°C).....	34
Abb. 10:	Taxonomischer Stammbaum der Stämme B12, BU3, K152 (erstellt mit Phylip 3.6 (DNAist, Fitch, Consense), grafische Darstellung: Treeview).	36
Abb. 11:	Wachstumskurve der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C mit paralleler Bestimmung der sMMO-Aktivität (T= 30°C, Wachstumssubstrate Methan bzw. Methanol, Versuch mit Methanol nach 24 h abgebrochen)	38
Abb. 12:	Einfluss verschiedener 1-Propanolkonzentrationen auf das Wachstum der Stämme BU3, K152 und B12 (T= 30°C, NMS-Medium).	41
Abb. 13:	Aktivität der Monooxygenase des Stammes BU3 bestimmt über die Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und den Kurzzeit-MTBE-Abbautests T= 30°C, NMS-Medium, Wachstums-substrat: 1-Propanol).	42
Abb. 14:	Fermentation des Stammes BU3 im 5 l Fermenter mit 1-Propanol als Wachstumssubstrat (T= 30°C; pH = 7,5; r= 400 rpm; Luftbegasung = 2 l/ min)	44
Abb. 15:	Bestimmung der Enzymaktivität der Kultur BU3 während der Fermentation im 5 l-Fermenter mit 1-Propanol als Wachstums-substrat (T= 30°C; pH = 7,5; r= 400 rpm; Luftbegasung = 2 l/ min)	45
Abb. 16:	Zweistufige Fermentation des Stammes BU3 im 5 l-Fermenter mit 2-Propanol als Wachstumssubstrat (T= 30°C; pH = 7,5; r= 400 rpm; Luftbegasung = 2 l/ min)	46

Abb. 17:	Maximale Enzymaktivität der Kultur BU3 während der zweiten Stufe der Fermentation im 5 l-Fermenter mit 2-Propanol als Wachstumssubstrat (T= 30°C, pH= 7,5, r= 400 rpm, Luftbegasung: 2 l/min)	47
Abb. 18:	Cometabolischer MTBE-Abbau des Stammes BU3 in An- und Abwesenheit des Wachstumssubstrates Propan (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, c_{MTBE} = 30 mg/l, Wachstumssubstrat: 20 % Propan-Luftgemisch)	49
Abb. 19:	Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C an ruhenden Zellen mit paralleler Bestimmung der sMMO-Aktivität (c_{MTBE} = 30 mg/l, Wachstumssubstrat Methan, T= 30°C).....	51
Abb. 20:	Abhängigkeit der MTBE-Abbauraten von der sMMO-Aktivität der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C (T= 20°C, Abbauversuche nach Schema A, Wachstumssubstrat Methan, c_{MTBE} = 30 mg/l, verwendete Software: Table Curve 2 D).....	51
Abb. 21:	MTBE- bzw. TBA-Abbauraten der Anreicherungskultur Ks C sowie der Reinkultur Ks C-1 und der heterotrophen Begleitflora der Kultur Ks C. (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C).....	52
Abb. 22:	Cometabolischer MTBE-Abbau der isolierten methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, Wachstumssubstrate Methan, Propan bzw. Butan)	55
Abb. 23:	MTBE-Abbauraten der Anreicherungskulturen (AK) und der aus diesen isolierten Reinkulturen (RK) (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, Wachstumssubstrat Propan, c_{MTBE} = 40 mg/l)	56
Abb. 24:	Zeitlicher Verlauf des Abbaues von MTBE und TBA des Stammes BU3. (Abbauversuch nach Schema A, T= 20°C, c_{MTBE} = 45 mg/l, Wachstumssubstrat 1-Propanol).....	56
Abb. 25:	Einfluss unterschiedlicher MTBE-Konzentrationen (c_{MTBE} = 30-350 mg/l) auf den cometabolischen MTBE-Abbau der Kultur BU3 (Abbauversuche nach Schema B, T= 20°C, Wachstumssubstrat: 1-Propanol).....	59
Abb. 26:	Sauerstoffgrenzkonzentration für den MTBE-Abbau des Stammes BU3 (Abbauversuche nach Schema B 2, T= 20°C, Wachstumssubstrat 1-Propanol).....	60
Abb. 27:	Maximale Aktivierung der Monooxygenase-Aktivität der Kultur K152 durch Zugabe von 1-Propanol (Abbauversuche nach Schema A-1 unter Zusatz verschiedener 1-Propanol-Konzentrationen, T= 20°C)	61
Abb. 28:	Batch-Langzeit-Abbauversuche des Stammes K152 (Abbauversuche nach Schema B-2, T= 20°C. Die Pfeile markieren die Dosierung von 0,8 mmol 1-Propanol bzw. MTBE in verschiedenen Konzentrationen)	62
Abb. 29:	Zeitlicher Verlauf des cometabolischen MTBE-Abbaues des Stammes BU3 in den Laborsäulen (Anzucht der Kultur auf 1-Propanol, zweistufiger Wachstumsprozess bei 30°C; BTS-Konzentration Versuchsbeginn: 350 mg/l, Abbauversuch: T= 20°C).....	63
Abb. 30:	Koloniemorphologie der Plattenaustriebe der mikrobiologischen Untersuchungen der Laborsäulenversuche. Ausbildung eines Konsortiums aus dem Stamm BU3 (A) und einer heterotrophen Begleitflora (B). (Binokular-Aufnahme).....	64
Abb. 31:	Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 in der kleintechnischen Säule S 1 (T= 22°C, Anzucht der Kultur im 5 l-Fermenter, Wachstumssubstrat 1-Propanol; Pfeile symbolisieren die Dosierung von Wachstumssubstrat oder cometabolischen Substrat bzw. Begasung der Säule mit dem Propan/Luftgemisch oder Luft.	66

Abbildungsverzeichnis

Abb. 32:	Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 in der kleintechnischen Säule S 2 (T= 22°C, Inokulumkultur aus Schüttelkolben; Wachstumssubstrat 1-Propanol, Pfeile symbolisieren die Dosierung von Wachstumssubstrat oder cometabolischem Substrat bzw. Begasung der Säule mit Luft)	67
Abb. 33:	Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues der Kultur BU3 in der kleintechnischen Säule S 2 nach Anzucht auf 2-Propanol (T= 22°C, Wachstumssubstrat des Inokulums 2-Propanol, Pfeile symbolisieren die Dosierung von MTBE bzw. Begasung der Säule mit Luft)	69
Abb. 33:	Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues des Konsortiums B12-K152 in der kleintechnischen Säule S 2 (Wachstumssubstrat 1-Propanol, T= 22°C, Pfeile symbolisieren die Dosierung von Wachstumssubstrat bzw. eine Begasung der Säule mit Luft; Neubeimpfung der Säule nach 20 Tagen mit einer aktiven Kultur des Stammes K152	70
Abb. 34:	Ergebnisse der PCRs: (A) Nachweis der Expression des Cytochroms P450: Primer EDHB_rev, EDHB_for : (Slot 1,6: Marker, Slot 2-3: BU3, Slot 4-5: Positivkontrolle: <i>Nocardia</i> ENV 759); (B) Nachweis der Expression der Isobutyryl-CoA Mutase (ICM): Primer ICMA_f, ICMA_r: (Slot 7: Marker, Slot 8-9: BU3) ; Die weißen Pfeile markieren die Lage der zu erwartenden Banden.	72
Abb. 35:	Vergleich des Wachstumes des Stammes BU3 und der autochthonen Bakterien des Standortes Leuna auf den Wachstumssubstraten 1- bzw. 2-Propanol (T= 30°C, NMS-Medium, C ₁ - bzw. 2-Propanol = 1,6 g/l)	74
Abb. 36:	MTBE-Abbau entlang des Abstromstreifens der Rinne während der Projektphase III (Bioaugmentation) (Jan. 06- Mai 06)	77
Abb. 37:	Anzahl der 2-propanolverwertende Bakterien und der prozentuale Anteile der injizierten Kultur BU3 im Konditionierungsbauwerk und dem sich anschließenden Abstromstreifens in der Projektphase III	79
Abb. 38:	PCR der Grundwasseranreicherungen der Probenahmebrunnen mit den spezifischen Primern für den Stamm BU3 (BU3dn, BU3rd): (Slot 1: 1 kb Marker; Slot 2: EB; Slot 3: IB; Slot 4: Saf 56; Slot 5: Saf 57; Slot 6: Saf 58; Slot 7: Saf 59; Slot 8: Positivkontrolle (BU3); Slot 9: Negativkontrolle	80
Abb. 39:	Mikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung des Stammes BU3 in einer Mischkultur mit der stammspezifischen FISH-Sonde (A: Sonde für den Stammes BU3; B: DAPI Färbung, Formamidkonzentration 20%, 1000-fache Vergrößerung).....	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Literaturstudien zum MTBE-Abbau durch Rein- und Mischkulturen bei Verwendung von MTBE als einzige Kohlenstoffquelle oder als cometabolisches Substrat.....	6
Tab. 2:	Studien zum biologischen MTBE-Abbau im Feldversuch.....	7
Tab. 3:	Untersuchte methanotrophe Reinkulturen der Stammsammlung des Departments Bioremediation der UFZ Leipzig-Halle GmbH	11
Tab. 4:	Verwendete Kohlenstoffquellen mit den in der Regel eingesetzten Konzentrationen	12
Tab. 5:	Versuchsbedingungen der Fermentation der Stämme B12, K152, BU3 und des Konsortiums B12-K152	14
Tab. 6:	Übersicht der verwendeten Monooxygenase-Inhibitoren und Wachstumssubstrate für die Hemmversuche des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 (Wachstumssubstrate: Propan und 1-Propanol)	17
Tab. 7:	Parameter der Batch-Langzeit-MTBE-Abbauversuche der Stämme K152 und BU3	18
Tab. 8:	Parameter der dargestellten MTBE-Abbauversuche der Stämme BU3, K152, B12 und des Konsortiums B12-K152 in den Laborsäulen	20
Tab. 9:	Parameter der dargestellten MTBE-Abbauversuche des Stammes BU3 und des Konsortiums B12-K152 in den kleintechnischen Säulen.....	22
Tab. 10:	Zugeführte Substrate und Mikroorganismen während der drei Projektphasen des Feldversuches zum cometabolischen MTBE-Abbau am Projektstandort Leuna.....	24
Tab. 11:	Sequenzen der verwendeten Primer und der Oligonukleotidsonde der molekularbiologischen Untersuchungen der Stämme BU3, B12 und K152	29
Tab. 12:	Temperaturprogramme der durchgeführten PCR's der Untersuchungen der Stämme BU3, B12 und K152.....	30
Tab. 13:	Isolierte methanverwertende Anreicherungskulturen	32
Tab. 14:	Isolierte propan- und butanverwertende Anreicherungskulturen	33
Tab. 15:	Mikro- und makromorphologische Charakterisierung der isolierten methan-, propan- und butanverwertenden Reinkulturen	33
Tab. 16:	Mikro-, Makromorphologie, biochemische Charakterisierung und Identifizierung der Stämme K152, B12 und BU3.....	35
Tab. 17:	Maximale Wachstumsraten, sMMO-Aktivitäten und der Zeitpunkt der max. sMMO-Aktivitäten der methanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen (kupferfreies NMS-Medium, Wachstumssubstrat Methan, T= 30°C).....	37
Tab. 18:	Maximale Wachstumsraten der Stämme BU3, K152 und B12 bei Anzucht auf verschiedenen Kulturmedien (Wachstumssubstrat: 1,6 g/l 1-Propanol, T= 30°C).....	39
Tab. 19:	Maximale Wachstumsraten der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen bei Anzucht auf NMS-Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Propan, Butan (50% iges Alkan-Luftgemisch), 1-Propanol bzw. 2-Butanol c= 1,6 g/l, T= 30°C)	39
Tab. 20:	Maximale Wachstumsraten der Stämme B12, BU3 und K152 bei Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Propan bzw. Butan (50% iges Alkan-Luftgemisch), 1-Propanol, 2-Propanol bzw. 2-Butanol (c= 1,6 g/l), MTBE, TBA und HIBA (c= 30 mg/l), T= 30°C, NMS-Medium).	40

Tabellenverzeichnis

Tab. 21:	Maximale Wachstumsraten der Stämme B12, K152 und BU3 bei Verwendung von Natriumnitrat (850 mg/l NaNO_3) bzw. Ammoniumsulfat (400 mg/l NH_4SO_4) als Stickstoffquelle (Kohlenstoffquelle: 1,6 g/l 1- Propanol, $T = 30^\circ\text{C}$).....	41
Tab. 22:	Erntezeitpunkte und maximale Enzymaktivitäten der Stämme BU3, K152 und B12 ($T = 30^\circ\text{C}$, NMS-Medium, Wachstumssubstrat : 50% Propan-Luftgemisch, 1,6 g/l 1-Propanol, 1,6 g/l 2-Propanol, 1,0 g/l Natriumacetat)	42
Tab. 23:	Parameter der Wachstumsversuche des Stammes BU3 im 100 ml-Schüttelkolben, 300 ml-, 5 l- und 50 l-Fermenter	43
Tab. 24:	Parameter der Wachstumsprozesse der Stämme K152 und B12 im 100 ml-Schüttelkolben, 300 ml-Fermenter und des Konsortiums B12-K152 im 5 l-Fermenter.....	48
Tab. 25:	Maximale MTBE-Abbauraten der methanverwertenden Anreicherungskulturen (Abbauversuche nach Schema A, $T = 20^\circ\text{C}$; Wachstumssubstrat Methan)	50
Tab. 26:	Maximale MTBE-Abbauraten der untersuchten methanotrophen Reinkulturen (Abbauversuche nach Schema A, $T = 20^\circ\text{C}$, Versuchsdauer 120 h, $c_{\text{MTBE}} = 30 \text{ mg/l}$).....	53
Tab.27:	Maximale MTBE-Abbauraten der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen nach Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Abbauversuche nach Schema A, $T = 20^\circ\text{C}$, $c_{\text{MTBE}} = 30 \text{ mg/l}$).....	54
Tab. 28:	Maximale MTBE-Abbauraten der Reinkulturen B12, K152 und BU3 nach Anzucht auf verschiedenen Wachstumssubstraten (Abbauversuche nach Schema A, $T = 20^\circ\text{C}$, Anzucht der Kulturen bis zur maximalen Enzymaktivität).....	58
Tab. 29:	MTBE-Abbau der Stämme BU3, K152 und B12 bei 12°C und 20°C (MTBE-Abbauversuche nach Schema A; Wachstumssubstrat: 1-Propanol)	58
Tab. 30:	MTBE-Abbauversuche der Kulturen B12, K152 und BU3 in den Laborsäulen (Wachstumssubstrat 1-Propanol, $T = 20^\circ\text{C}$, c_{MTBE} der ersten Versuchsphase 40 - 45 mg/l)	65
Tab. 31:	Profil der Hemmung des MTBE- und TBA-Abbaues des Stammes BU3 durch verschiedene Monooxygenase-Inhibitoren (Abbauversuche nach Schema B-Variante 1, $T = 20^\circ\text{C}$, Wachstumssubstrate Propan und 1-Propanol).....	71
Tab. 32:	Übersicht der Laborergebnisse der MTBE-Abbaupotenziale und der Wachstumsraten der drei Stämme B12, K152 und BU3	73
Tab. 33:	Parameter des unbehandelten Grundwasserleiters des Projektstandortes Leuna im Untersuchungszeitraum Oktober 2004 – Mai 2006.....	75
Tab. 34:	Parameter der Projektphase III (Bioaugmentation) des Feldversuches (dargestellt sind gemittelte Werte der Projektphase III (Januar 2006 - Mai 2006)).....	78
Tab. 35:	Vergleich des MTBE-Abbauverhaltens der Stämme <i>Nocardia</i> ENV425, <i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001 und des Stammes BU3	89
Tab. 36:	Durchschnittliche MTBE-Abbauraten der Stämme B12, K152 und BU3 in den Labor- und kleintechnischen Säulen ($T = 20^\circ\text{C}$; Anzucht der Kulturen bis zur maximalen Enzymaktivität).....	106

Abkürzungsverzeichnis:

→	siehe
$\mu_{\max}$	maximale Wachstumsrate
Abb.	Abbildung
ABT	1-Aminobenzotriazol
AK	Anreicherungskultur
AN-NMS	Ammoniumsalz-Medium
ATU	Allylthioharnstoff
BTS	Biotrockenmasse
$C_{[\text{Substrat}]}$	[Substrat] Konzentration
d	Durchmesser
dest. Wasser	destilliertes Wasser
DNA	Desoxynukleotidsäure
EB, IB	Probenahmebrunnen des Konditionierungsbauwerkes am Standort Leuna (Exfiltration-, Infiltrationsbrunnen)
ENA-Konzept	Enhanced Natural Attenuation Konzept
ETBE	Ethyl- <i>tertiär</i> -butylether
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GC	Gaschromatograph
GW 9, GW 7	Grundwasserbrunnen 9 und 7
GW-Fluss	Grundwasserfluss
HIBA	2-Hydroxy-Isobuttersäure
HS-GC	Headspace-Gaschromatographie
HS-GC-MS	Headspace-Gaschromatographie mit Massenspektrometer
HS-Röhrchen	Headspace-Röhrchen
i.R.	in der Regel
ICM	Isobutyryl-CoA Mutase
k. A.	keine Angaben
Kapt.	Kapitel
KBE	koloniebildende Einheiten
K_{oc}	auf Kohlenstoff normierter Verteilungskoeffizient
Konz.	Konzentration
l	Länge
max.	maximal

Abkürzungsverzeichnis

METLEN	<u>M</u> ETHyl <u>t</u> ertiärbutylether (MTBE) – Leuna als Referenzstandort zur Implementierung des „ <u>E</u> nhanced-Natural-Attenuation“ Ansatzes
MPN	(Most probably number) Methode zur Bestimmung der höchsten Verdünnung, bei der ein mikrobielles Wachstum auftritt.
MTBE	Methyl- <i>tertiär</i> -butylether
NAD ⁺	Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NMS-Medium	Nitratsalzmedium
O ₂	molekularer Sauerstoff
PCR	Polymerasekettenreaktion
r	Rührerdrehzahl
RK	Reinkultur
rpm	Umdrehung pro Minute
Saf 56, Saf 57, Saf 58, Saf 59	Probenahmebrunnen im Abstromstreifen des Grundwasserleiters am Projektstandort Leuna
SDS	Natriumdodecylsulfat
sMMO	lösliche Methan-Monooxygenase
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBA	<i>Tertiär</i> butanol
TBF	<i>Tertiär</i> -butylformiat
TCE	Trichlorethylen
UFZ Leipzig-Halle GmbH	Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH
US-EPA	(US-environmental protection agency) Amerikanische Umweltschutzbehörde
V	Volumen
v/v	(by volume) Volumenprozent
$\alpha_{BTS}^{Substrat}$	Substratverbrauchswert pro Biomassekonzentration

Chemikalienverzeichnis:

Aceton, Natriumacetat	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Acetylen	Linde Gas Deutschland, Pullach, BRD
Agarose (High Strength Analytical Grade)	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Allylthioharnstoff, 1-Aminobenzotriazol	Sigma Aldrich Chemie, Berlin, BRD
API 20 NE	Bio Mérieux, Marcy-C'Etoile, Frankreich
BIOLOG Microlog-GN, -GP	Merlin-Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostik mbH, BRD
DAPI	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
diverse Chemikalien zur Nährmedien-herstellung	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
DNA-Extraktionskit „DNeasy“	Qiagen GmbH, Hilden, BRD
Ethidiumbromid	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Methan, Propan, Butan	Linde Gas Deutschland, Pullach, BRD
Methanol, 1-Propanol, 2-Propanol, 2-Butanol	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Methimazol, Hexin	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
MTBE, TBA, HIBA	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Naphtalin, o-Dianisidin	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
PCR Reagenzien (PCR-Puffer, MgCl ₂ , dNTP-Mix, Hot Start Taq Polymerase)	Qiagen GmbH, Hilden, BRD
photometrische Küvettentest für CSB (LCK 514), Nitrat (LCK 340)	Dr. Lange GmbH, BRD
Propan-Luft-Gemisch (1,25% Propan in synthetischer Luft)	Linde Gas Deutschland, Pullach, BRD
Seramis®, Blähton	Hagebaumarkt
Vanadat-Molybdat-Reagenz (VM-Reagenz)	Merck kGaA, Darmstadt, BRD
Zellulose-Azetat Filter, 0,2 µm Porenweite	Sartorius, BRD

Geräteverzeichnis

Geräteverzeichnis:

1 l-Schüttelkolben mit Ansatzstutzen	Glasgerätebau Ochs GmbH, BRD
300 ml-, 5l- und 50 l- Fermenter	B. Braun Biotech International, Melsungen, BRD
Binokular SMZ-2T	Nikon GmbH, Düsseldorf, BRD
Butylgummistopfen	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Digitalkamera DXM1200F	Nikon GmbH, Düsseldorf, BRD
Durchflussregler	Wager M+R GmbH, BRD
Gaschromatograph Serie HP6890	Hewlett Packard, Waldbronn, BRD
gasdichte Spritzen	SGE-International PTY Ltd. Australien
UV-Geldokumentationkammer	Eppendorf, Hamburg, BRD
Gelelektrophorese	Eppendorf, Hamburg, BRD
Headspaceröhrchen (20 ml)	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Headspacesampler (HP 7694)	Hewlett Packard, Waldbronn, BRD
Kolbenpumpe (Typ Gamma 4)	ProMinent, Heidelberg, BRD
Kühlzentrifuge (Typ 3K18)	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, BRD
Laborverbrauchsmaterial (Pipetten, Kanülen, Petrischalen usw.)	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Zubehör für Begasungsaufsätze der Schüttelkolben (Oliven, Filter, Deckel)	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Pharma-Fix Septen, Aluminiumbördelkappen	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Phasenkontrastmikroskop Optiphot	Nikon GmbH, Düsseldorf, BRD
Sauerstoffauszehrzelle	Biolytik, Bochum, BRD
Sauerstoffmesselektrode LDO HQ20	Hach Lange GmbH, Düsseldorf, BRD
Serumflaschen (100 ml)	Glasgerätebau Ochs GmbH, BRD
Silikon/PTFE-Septen	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Silikonschlauch	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
Spekol 1100	Analytika Jena, BRD
Spektralphotometer CADAS 100	Dr. Lange GmbH, BRD
Thermocycler (Typ: Mastercycler)	Eppendorf, Hamburg, BRD
Schlauchmaterial (Tygon, Viton)	VWR GmbH, Darmstadt, BRD
GC- HP5 Kapillarsäule (5% Diphenyl-Dimethyl-Siloxan Copolymer)	Hewlett Packard, Waldbronn, BRD
Laborsäulen	Eigenbau, TU-Dresden, Fakultät Angewandte Mikrobiologie
kleintechnische Säulen	Eigenbau, UFZ Leipzig-Halle GmbH

Softwareverzeichnis:

Eclipse Net (Version 1.20.0)	Nikon GmbH, Düsseldorf, BRD
Oxylab (Version 1.92)	Biolytik, Bochum, BRD
Phylip (Version 3.65)	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
EMBL-Datenbank	Online Datenbank und Datenbank-Suchprogramm (BLAST): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
TREEVIEW (Version 1.6.6)	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
ARB-Software	http://www.arb-home.de/ . ARB läuft über eine UNIX platform bzw. LINUX-Betriebssystem
ClustalW (Version 1.7)	www.ebi.ac.uk/clustalw/

1 Einleitung

„Methyl-*tertiär*-butylether (MTBE) - Wundermittel oder Problem ?“ (Braids 2001)

Ein Meilenstein in der Geschichte der Kraftstoffindustrie wurde erzielt als MTBE erstmalig Ende der 70-iger Jahre in den USA und 1985 in Deutschland als Benzinadditiv im Austausch gegen die bis dahin verwendeten giftigen Alkyl-Bleiverbindungen eingesetzt wurde (Schirmer 1999a). Als sauerstoffhaltiger Oktanzahlerhöher verbesserte MTBE die Benzinqualität durch eine Erhöhung der Klopfestigkeit desselben. Außerdem wurde durch den erhöhten Sauerstoffgehalt eine vollständigere Verbrennung des Kraftstoffes erreicht und somit die Freisetzung von Umweltschadstoffen und die Ozonbildung verringert. In den folgenden Jahren stieg der MTBE-Verbrauch extrem an (EPA 1998). Im Jahre 2004 lag der weltweite Verbrauch von MTBE bei 20 Millionen Tonnen/ Jahr, wovon 60% in den USA und 15% in Europa verwendet wurden (Arp et al. 2004). In Deutschland wurden 1998 538 Millionen Liter MTBE dem Benzin zugemischt (0,4% (v/v) für Normal-Benzin, 3,0% (v/v) für Super-Benzin und 10,2% (v/v) für Super-Plus) (Sur et al. 2003; Effenberger et al. 2001). Aufgrund seiner geringen Produktionskosten, seiner guten Mischbarkeit und der hohen Verbrennungswerte ist MTBE das mit Abstand am häufigsten eingesetzte Benzinadditiv mit einem Marktanteil von 80% (Braids 2001).

Als Anfang der 80-iger Jahre MTBE zum ersten Mal in Trinkwasserbrunnen nachgewiesen wurde, sahen weder Wissenschaft noch Politik einen akuten Handlungsbedarf (Mc Kinnon et al. 1984). Erst der zunehmende Nachweis von MTBE in Grundwasser- und Trinkwasserproben führte zu der Erkenntnis, dass durch den weit verbreiteten Einsatz des Ethers im Benzin, dieser durch Leckagen an unterirdischen Tanklagern und Rohrleitungssystemen sowie durch Unfälle beim Benzintransport über den Wasserkreislauf ins Grundwasser gelangt. Seine hohe Wasserlöslichkeit, schlechte Adsorbierbarkeit im Boden und mikrobielle Persistenz waren Ursache für die entstehenden großflächigen Verschmutzungen (Raloff 2000; Schirmer et al. 1999a). Der bis dahin wohl spektakulärste MTBE-Schadensfall war das Auftreten von MTBE-Konzentrationen bis zu 600 µg/l in den Rohwasserbrunnen der Stadt Santa Monica (Kalifornien, USA) infolge der Leckage an einer einzelnen Tankstelle im Jahre 1996. Diese Kontamination führte zur Schließung der Hälfte der städtischen Trinkwasserbrunnen (Happel et al. 1998). Infolge der zunehmenden Detektion von MTBE in Trinkwasser- und Grundwasserproben gab die U.S. Umweltschutzbehörde (USEPA) eine Trinkwasserrichtlinie heraus, die empfahl, dass MTBE im Trinkwasser eine Konzentration von 20 - 40 µg/l nicht überschreiten sollte (USEPA 1994).

Einleitung

Gleichzeitig wurde der Ether als unregulierte Chemikalie in die Liste potentieller Trinkwassergefährdungen aufgenommen (USEPA 1994).

Auch in Deutschland entwickelt sich MTBE zu einem Problem, obwohl von offizieller Seite die Meinung vertreten wird, dass die Verwendung von MTBE im Benzin kein akutes Umweltrisiko darstellt, da Tankstellen und Pipelines einen höheren technischen Standard als in den USA aufweisen (Pahlke et al. 2000). Jedoch belegen Altlastenstandorte in Münchenbernsdorf/Thüringen (aufgegebene Militärbasis der Sowjet-Armee,

$c_{\text{MTBE}} \leq 2 \text{ mg/l}$ (Pahlke et al. 2000)) und in Leuna/Sachsen-Anhalt (ehemalige Chemiewerke Leuna, $c_{\text{MTBE}} \leq 185 \text{ mg/l}$ (Effenberger et al. 2001)), dass auch in Deutschland größere Mengen des Ethers ins Grundwasser gelangt sind. Erhöhte MTBE-Konzentrationen traten auch bei Grundwassermessungen des Bayrischen Landesamtes für Wasserwirtschaft (Stockerl et al. 2000) und des Landesamtes für Umweltschutz Baden-Württemberg (2000) in der Nähe von Raffinerien und Tankstellen auf. Um das Verhalten der Grundwasserkontaminante MTBE besser einschätzen zu können, müssen vor allem ihre Eigenschaften näher betrachtet werden.

MTBE ist eine leichtflüchtige, sauerstoffhaltige Kohlenwasserstoffverbindung, die zur Stoffklasse der polaren Ether gehört (Abb. 1).

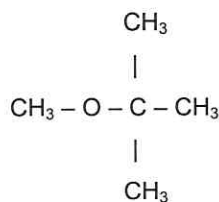


Abb. 1: Strukturformel von Methyl-*tertiär*-butylether (MTBE)

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von MTBE sind bei Squillace et al. (1997) im Detail beschrieben. Eine für die Kontaminationen im Grundwasserbereich relevante Eigenschaft ist die hohe Wasserlöslichkeit von 32,2 - 54,4 g/l bei 25°C (USEPA 1994). Aufgrund seines geringen Siedepunktes (53,6 - 55,2°C) und seines hohen Dampfdruckes (32,6 kPa) (USEPA 1994) wird MTBE zu den leicht flüchtigen Chemikalien gezählt. Der auf den organischen Kohlenstoff normierte Verteilungskoeffizient (K_{oc}), als Maß für die Adsorbierbarkeit des Stoffes im Boden, lässt mit 11 cm³/g auf eine minimale Sorption an Bodenpartikeln und eine damit vernachlässigbare Retardation schließen (Squillace et al. 1997). Folglich bewegt sich MTBE im Aquifer annähernd mit der Fließgeschwindigkeit des Grundwassers. Die stabile tertiäre Etherstruktur des Schadstoffes ist unter anderem Ursache für die hohe Resistenz der Substanz gegenüber mikrobiellen Angriffen (Salanitro et al. 1994).

Die für den Menschen auffälligsten Eigenschaften von MTBE sind dessen unangenehmer terpentinartiger Geruch und Geschmack, die bereits bei Konzentrationen von 0,25 - 0,68 µg/l wahrnehmbar sind (Keller et al. 1998). Daraus schlussfolgernd führen bereits geringe Konzentrationen des Ethers zu einer Beeinträchtigung der Trinkwasserqualität.

Neben den physikalischen und chemischen Eigenschaften einer Substanz spielt die Toxizität dieser eine wichtige Rolle bei der Betrachtung des Gefährdungspotenzials des Schadstoffes. Über die toxische Wirkung von MTBE wird derzeit kontrovers diskutiert, da bisher nur unzureichende Untersuchungsergebnisse vorliegen. Es existieren Studien zur toxischen Wirkung auf Bakterien, Pflanzen und Säuger (Werner et al. 2001; An et al. 2002; Ahmed 2001). Während eine Hemmung des Bakterienwachstums bei Konzentrationen von > 7,4 mg/l MTBE festgestellt wurde (Werner et al. 2001), trat bei Pflanzen eine Reduktion des Wachstums und der Samenkeimung erst bei Konzentrationen von > 18 mg MTBE/kg Trockengewicht Boden auf (An et al. 2002). Die akute Toxizität von MTBE auf Säuger ist sehr gering (Tesseraux et al. 1999). Andererseits zeigten Langzeituntersuchungen bei Ratten und Mäusen Nierentumore und neurotoxische Schädigungen ab

MTBE-Konzentrationen > 1440 mg/m³ (Tesseraux et al. 1999). Für den Menschen ist laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization 1998) unter den bestehenden Belastungsbedingungen mit hoher Wahrscheinlichkeit kein akutes Gesundheitsrisiko zu erwarten. Als Grenzfall zwischen Nichteinstufung und Einstufung wurde MTBE mit der Karzinogenitätskategorie 3 bewertet (Tesseraux et al. 1999). Trotz dieser Einschätzung sollte das Problem MTBE als Grundwasserkontaminante nicht unbeachtet bleiben.

Der Abbau von MTBE in der Atmosphäre durch Hydroxyl-Radikale liegt bei Halbwertszeiten von drei bis sechs Tagen (Stupp et al. 2004) und in Oberflächengewässern bei ca. 14 Tagen (Fayolle et al. 2003; Reuter et al. 1998). Im Grundwasser hingegen wurden Halbwertszeiten von mindestens zwei Jahren (Fayolle et al. 2001), meist jedoch zwischen 10 und 15 Jahren nachgewiesen (Wilson et al. 2000; Landmeyer et al. 2001; Schirmer et al. 1998). Ursache dafür sind fehlende Stofftransportvorgänge zwischen der Luft-Wasser-Grenzschicht und die hohe biologische Resistenz des Ethers. Die geringen natürlichen Abbau- und Rückhalteprozesse für MTBE im Grundwasserbereich machen eine aktive Sanierung der kontaminierten Bereiche notwendig. Als Verfahren werden bisher hauptsächlich konventionelle Techniken („*Pump and Treat*“-Verfahren: Aktivkohleadsorption, Luftbegasung, „*Soil Vapor Extraction*“) angewendet, die detailliert in den Arbeiten von Symons et al. (2003) beschrieben wurden. Weitere Verfahren sind *in-situ* Verfahren zu denen chemische und biologische Sanierungstechnologien, beschrieben in Kelley et al. (2003) und Wilson et al. (2003), gezählt werden. All diesen Verfahren ist gemeinsam, dass sie nur mit hohem Kostenaufwand effektive Ergebnisse erzielen können. Bei einigen dieser Verfahren (z.B. Aktivkohleadsorption) findet außerdem lediglich eine Verlagerung des

Einleitung

Schadstoffes in andere Umweltbereiche und keine nachhaltige Eliminierung statt. Kostengünstigere Alternativen könnten Konzepte wie Natural Attenuation und Enhanced-Natural-Attenuation (ENA) darstellen (Schirmer 2000). Bei dem ENA-Konzept werden natürliche Rückhalte- und Abbauprozesse des Grundwasserleiters unter Verwendung verschiedener Verfahren stimuliert und somit wird eine Beschleunigung des natürlichen MTBE-Abbaues erreicht. Als biologische Verfahren kommen hierbei die Biostimulation, welche die Dosierung von Nährstoffen, Elektronendonatoren und -akzeptoren beinhaltet und die Bioaugmentation zum Einsatz. Bei der Bioaugmentation werden neben Nährstoffen, Elektronendonatoren und -akzeptoren außerdem noch Mikroorganismen zugesetzt. Grundvoraussetzung für diese Verfahren ist das Vorhandensein von speziellen Mikroorganismen und Milieubedingungen, die einen MTBE-Abbau ermöglichen. Verschiedene Laborstudien (Tab. 1 und 2) der letzten Jahre haben gezeigt, dass mikrobielle Sanierungsverfahren prinzipiell Erfolg versprechend sind.

Neben Studien zum anaeroben Abbau von MTBE unter Verwendung der Elektronenakzeptoren Nitrat (Bradley et al. 2001b), Sulfat (Somsamak et al. 2001), Eisen (Finneran et al. 2001), Mangan und Wasserstoff (methanogene Bedingungen) (Yeh et al. 1994) kommt für Sanierungskonzepte vorrangig der aerobe MTBE-Abbau zum Einsatz. Dieser Abbau läuft über den in Abb. 2 dargestellten Stoffwechselweg ab.

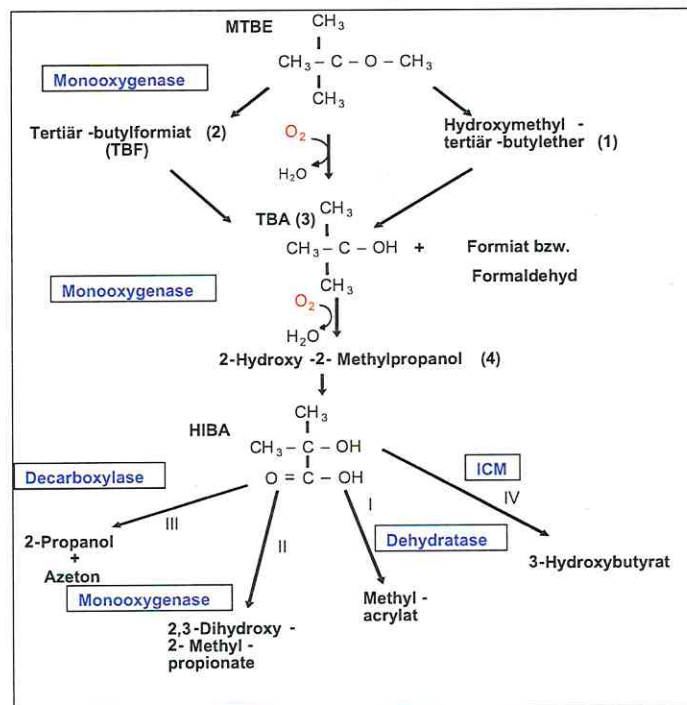


Abb. 2: Oxidativer Abbaupfad von MTBE (modifiziert nach (Francois et al. 2003; Steffan et al. 1997; Rohwerder et al. 2006; Smith et al. 2003b)).

Die Oxidation von MTBE zu *Tertiär*-Butanol (TBA), katalysiert durch eine Monooxygenase, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des MTBE-Abbaues. Es wird die Bildung von Hydroxymethyl-*tertiär*-butylether (1)¹ angenommen, der instabil ist und zu Formaldehyd und TBA zerfällt (Smith et al. 2003b). In anderen Studien wurde die Bildung von *Tertiär*-butylformiat (TBF) (2) beobachtet, welches spontan zu Formiat und TBA umgesetzt wird (Francois et al. 2003; Steffan et al. 1997). Eine Monooxygenase katalysiert auch den Abbau von TBA über 2-Methyl-2-hydroxy-1-propanol (3) zu Hydroxy-Isobuttersäure (HIBA) (4) bzw. Hydroxy-Isobutyrat (Steffan et al. 1997). Die weitere Metabolisierung von HIBA ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Steffan et al. (1997) zeigten drei mögliche Stoffwechselwege des HIBA-Abbaues: (I) Dehydrierung zu Methylacrylat, (II) Hydroxylierung zu 2,3 Dihydroxy-2-methylpropionat und (III) die Decarboxylierung zu 2-Propanol und Azeton. Rohwerder et al. (2006) wiesen in ihren Untersuchungen zum Abbau von MTBE und ETBE durch das β -Proteobakterium L10 einen neuen Abbauweg (IV) von HIBA durch eine Isobutyryl-CoA Mutase (ICM) zu 3-Hydroxybutyrat nach.

Der aerobe MTBE-Abbau wurde in mehreren Laborversuchen mit Reinkulturen unter Verwendung von MTBE als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nachgewiesen (Tab. 1). Des Weiteren konnte auch der wachstumsunabhängige Abbau von MTBE (cometabolischer Abbau) durch Misch- und Reinkulturen beobachtet werden (Tab. 1). In den letzten Jahren wurden in Feldversuchen erste Erfahrungen zur Sanierung von MTBE-Schadensfällen mit verschiedenen Sanierungstechniken gewonnen. Eine Auswahl der durchgeführten Feldversuche bietet Tab. 2.

¹ Die Nummern verweisen auf die entsprechenden Verbindungen in Abb. 2

Tab. 1: Literaturstudien zum MTBE-Abbau durch Rein- und Mischkulturen bei Verwendung von MTBE als einzige Kohlenstoffquelle oder als cometabolisches Substrat

Kultur	Kohlenstoff- quelle	Versuchsbedingung		MTBE-Abbaurrate [mg MTBE/g BTS*h]	TBA-Bildung	Quelle
		Maßstab	Temperatur			
Anreicherungskultur MC 100	MTBE	k. A.	k. A.	34	ja, max 40%	(Salanitro et al. 1994)
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	MTBE	k. A.	k. A.	50	k. A.	(Deeb et al. 2001)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	MTBE	k. A.	30°C	84	ja	(Francois et al. 2003)
<i>Nocardia</i> ENV 425	Propan	5 ml	13°C/28°C	1,8 /10,4	ja	
<i>Pseudomonas putida</i> CAM	Kampher	5 ml	28°C	1,1	ja	(Steffan et al. 1997)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB 5	Isoalkane	k. A.	k. A.	44,9	ja	(Hyman et al. 1998)
<i>Pseudomonas mendochina</i>	n-Isoalkane	k. A.	k. A.	10,6	k. A.	(Hyman et al. 1999)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	n-Isoalkane	k. A.	k. A.	15	k. A.	
Filamentöser Pilz- <i>Graphium</i> sp.	Butane	100 ml	24°C	0,92	ja	(Hardison et al. 1997)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pentane	22 ml	30°C	10,4	k. A.	(Garnier et al. 1999)
<i>Pseudomonas mendochina</i> KR-1	n-Pentane	10 ml	30°C	9,8	ja	(Smith et al. 2003a)
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB 5	1-Propanol	25 ml	30°C	1,3	k. A.	(Smith et al. 2003b)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP2007 (früher <i>Gordonia terrae</i>)	Ethanol	k. A.	k. A.	30	ja	(Hernandez-Perez et al. 2001)

Tab. 2: Studien zum biologischen MTBE-Abbau im Feldversuch

Technologie	Elektronen-akzeptor	Versuchsdauer	MTBE-Abbau	Sanierungserfolg	Quelle
Natural Attenuation	Sauerstoff	8 Jahre	0,0012 d ⁻¹	MTBE-Abbau über Biodegradation	(Schirmer et al. 1989, Schirmer et al. 1999b)
Natural Attenuation	Sauerstoff	2 Jahre	0,001 d ⁻¹	MTBE-Abbau in der Nähe der Kontaminationsquelle	(Borden et al. 1997)
Natural Attenuation	Sauerstoff	5 Jahre	0	kein MTBE-Abbau über Biodegradation	(Landmeyer et al. 1998)
Natural Attenuation	Sulfat	k. A.	0	kein MTBE-Abbau über Biodegradation	(Amerson et al. 2003)
aktive Sanierung (Biobarriere) in Kombination mit der Bioaugmentation	Sauerstoff	4 Monate	0,0288 – 0,0027 d ⁻¹	cometabolischer MTBE-Abbau mit propanoxidierenden Bakterien	(Steffan et al. 2001)
aktive Sanierung (Airsparging) in Kombination mit der Biostimulation/ Bioaugmentation	Sauerstoff	10 Monate	k. A.	MTBE-Abbau mit Biostimulation und Bioaugmentation nachgewiesen	(Salanitro et al. 2000)

Einleitung

In den Untersuchungen zum MTBE-Abbau mit Kulturen (Tab. 1 - oberer Teil), welche MTBE als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzten, wurden nur sehr geringe Wachstumsraten ($0,01 \text{ d}^{-1}$) und geringe Biomasseausbeuten ($0,21 - 0,28 \text{ g Zellen/ g MTBE}$) festgestellt (Salanitro et al. 1994). Den sehr hohen Abbauraten dieser Versuche ($34 \text{ mg MTBE/g BTS} \cdot \text{h}$) stehen sehr lange Akklimationsphasen und geringe Wachstumsgeschwindigkeiten entgegen. Bei dem wachstumsunabhängigen Prozess, des Cometabolismus, erfolgt die Transformation von MTBE in Gegenwart anderer Wachstumssubstrate (Arp et al. 2001), wie Alkanen oder Alkoholen. Das Wachstumssubstrat dient zur Induktion und Regenerierung des initialen Enzymsystemes, z.B. der Monooxygenase, welches gleichzeitig auch die Metabolisierung des cometabolischen Substrates (MTBE) katalysiert (Abb. 3). Während bei der Oxidation des Wachstumssubstrates eine Regeneration der Reduktionsäquivalente erfolgt, ist dies bei der Umsetzung des cometabolischen Substrates nicht der Fall. Die Konzentration des Wachstumssubstrates muß so gewählt werden, dass der Erhaltungsstoffwechsel zur Enzymregenerierung und der Umsetzung des cometabolischen Substrates gewährleistet wird, aber keine bzw. nur geringe kompetitive Hemmung des MTBE-Abbaues auftritt. Eine kompetitive Hemmung des MTBE-Abbaues tritt auf, wenn die Konzentration des Wachstumssubstrates zu hoch ist (Fritsche 1998; Chang et al. 1995), weil dann vorzugsweise dieses Substrat umgesetzt wird. Beim cometabolischen Abbau von Schadstoff können toxische Zwischenprodukte, sogenannte „dead end“ Metaboliten, gebildet werden, die u.a. zur Schädigung der Mikroorganismen bzw. deren Enzymsysteme führen (Chang et al. 1995).

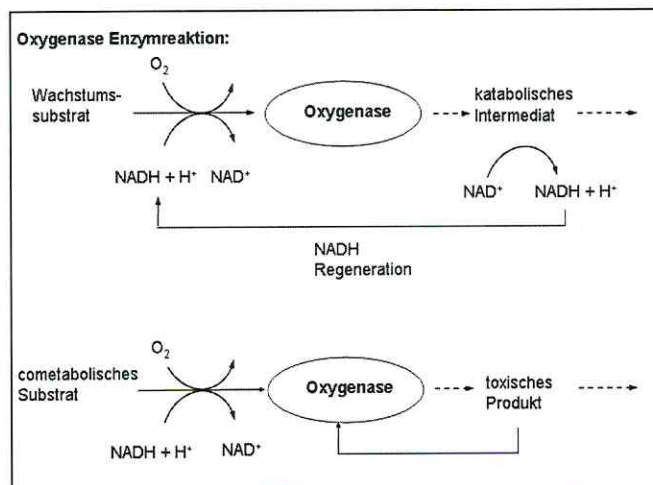


Abb. 3: cometabolische Stoffumwandlung - Reaktionen der beteiligten Oxygenase (Chang et al. 1995)

Die in den Studien zum cometabolischen MTBE-Abbau verwendeten Reinkulturen sind in den meisten Fällen charakterisiert durch ihre Fähigkeit Alkane zu verwerten (Tab. 1). Propan (Steffan et al. 1997), Butan (Liu et al. 2001), vor allem aber langkettige n-Alkane haben sich bisher als geeignete Wachstumssubstrate erwiesen, da diese als Benzinbestandteile an kontaminierten Standorten im Aquifer simultan vorlagen (Fiorenza et al. 2002). Zudem konnten auch Alkohole (Smith et al. 2003b) und andere Ether (ETBE) (Hernandez-Perez et al. 2001) als Wachstumssubstrate eingesetzt werden. Die erzielten MTBE-Abbauraten, der in der Literatur beschriebenen cometabolisch MTBE-abbauenden Mikroorganismen, variieren sehr stark in Abhängigkeit der eingesetzten Kultur, des verwendeten Wachstumssubstrates und der Temperatur der Abbauprobe (Tab. 1). Mit steigender Kettenlänge des Wachstumssubstrates wurden die durchschnittlichen MTBE-Abbauraten erhöht. Viele in der Literatur dargestellten Abbauprobe erfolgten bei 28°C - 30°C (Smith et al. 2003b; Steffan et al. 1997) und sind somit für eine *in-situ*-Grundwassersanierung nicht aussagekräftig. Die Verwendung von Methan als Wachstumssubstrat für den cometabolischen MTBE-Abbau ist bisher kaum untersucht worden (Schirmer et al. 2002; Zittwitz et al. 2001). In fast allen Studien wurde festgestellt, dass mit diesem Wachstumssubstrat ein cometabolischer MTBE-Abbau nicht möglich ist. Nur im Patent von Zittwitz et al. (2001) wurde beobachtet, dass durch eine Methanstimulation in einem 5 l-Fermenter mit aktivem Schlamm einer Pflanzenkläranlage MTBE abgebaut werden kann. Da diese Versuche ohne vertiefende mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt wurden, gibt es bisher keine direkten Nachweise, dass methanotrophe Bakterien in der Lage sind, MTBE cometabolisch abzubauen.

Die dargestellten Laboruntersuchungen und der weit verbreitete Einsatz von MTBE in der Kraftstoffindustrie machen deutlich, dass auf dem Gebiet der MTBE-Sanierung durch alternative Sanierungstechnologien sowie bei den Grundlagen des biologischen MTBE-Abbaues Forschungsbedarf besteht. Daraus leitet sich die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ab.

Aufgabenstellung

2 Aufgabenstellung

Bisher werden in Deutschland zur Sanierung von MTBE kontaminierten Standorten hauptsächlich Methoden angewendet, bei denen mit aktiven (energieverbrauchenden) Techniken der kontaminierte Bereich gereinigt wird. Alternative Konzepte wie Enhanced-Natural-Attenuation (ENA) werden als Sanierungsmethode noch nicht praktiziert.

Das interdisziplinäre technisch orientierte Verbundvorhaben METLEN (Methyl-*tertiär*-butyl-ETHER (MTBE)-LEUNA als Referenzstandort zur Implementierung des „Enhanced-Natural-Attenuation“ Ansatzes) hat das Ziel, solche kostengünstigen und praxisnahen Methoden für die refraktäre Substanz MTBE zu entwickeln (Schirmer 2000). Neben verschiedenen anderen Sanierungsansätzen soll dabei auch der Prozess des Cometabolismus angewendet werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Grundlagen des cometabolischen MTBE-Abbaues unter Nutzung alkanverwertender Bakterien sowie die Entwicklung eines Verfahrensvorschlages für einen Sanierungsansatz zum cometabolischen MTBE-Abbau im Rahmen des METLEN-Projektes.

Zur Lösung dieser Aufgaben wurden folgende Strategien gewählt:

- Anreicherung und Selektion methan-, propan- und butanverwertender Bakterien mit hohem cometabolischen MTBE-Abbaupotenzial
- Untersuchung des Wachstums und der Enzymaktivität der selektierten Bakterien in verschiedenen Maßstäben (100 ml, 300 ml, 5 l, 50 l) in Abhängigkeit grundwasserrelevanter Milieubedingungen
- Entwicklung von Methoden zur Gewinnung hochaktiver Biomasse der MTBE-abbauenden Kulturen im kleintechnischen Maßstab (50 l)
- Optimierung des cometabolischen MTBE-Abbaues der isolierten Bakterien in verschiedenen Volumina (5 ml, 100 ml, 2 l)

Dabei sollen im Gegensatz zu bisherigen Literaturstudien, die vorrangig höherwertige flüssige Alkane als Kohlenstoffquellen einsetzen, Methan, Propan, Butan und Alkohole als Wachstumssubstrate verwendet werden.

Anhand der Ergebnisse der Laboruntersuchungen ist ein Verfahrensvorschlag zur Anwendung des cometabolischen MTBE-Abbaues im Sinne des ENA-Konzeptes zu erstellen und dieser in einem Feldversuch am Standort Leuna zu testen. Hierbei sind die Sanierungsansätze Biostimulation und Bioaugmentation zu untersuchen. Es soll ein Monitoringprogramm etabliert werden, das einen Nachweis der MTBE-abbauenden Mikroorganismen sowie des MTBE-Abbaues im Feld umfasst.

3 Material und Methoden

3.1 Eingesetzte Mikroorganismen und Umweltproben

Neun sMMO-exprimierende methanotrophe Bakterien, die im Department Bioremediation des Umweltforschungszentrums (UFZ) Leipzig-Halle GmbH isoliert vorlagen, wurden für die Untersuchungen ausgewählt (Tab. 3).

Tab. 3: Untersuchte methanotrophe Reinkulturen der Stammsammlung des Departments Bioremediation des UFZ Leipzig-Halle GmbH

Stammbezeichnung	Spezies
GB 14	<i>Methylocystis spec.</i>
GB 18	<i>Methylosinus trichosporium</i>
GB 19	<i>Methylosinus sporium</i>
GB 20	<i>Methylocystis spec.</i>
GBP 15	<i>Methylosinus trichosporium</i>
GBP 17	<i>Methylocystis minimus</i>
GBP 31	<i>Methylosinus sporium</i>
Ms 9	<i>Methylosinus spec.</i>
Ms 20	<i>Methylosinus spec.</i>

Als Ausgangsmaterial für Anreicherungskulturen mit Methan, Propan und Butan als Wachstumssubstrate kamen die Umweltproben (Charakterisierung → Anhang Tab. A-1)

- Klärschlamm des Belebtschlammbeckens der Kläranlage Leipzig-Rosental, BRD
- Blähschlamm des Absetzbeckens der Kläranlage Halle-Lettin, BRD und
- MTBE kontaminiertes Grundwasser der Grundwasserbrunnen GW 9 und GW 7 des METLEN-Projektareals am Industriestandort Leuna, BRD

zum Einsatz.

Aus diesen Anreicherungskulturen wurden vier methan-, zwei propanverwertende Reinkulturen (B12 und K152) und der butanverwertende Stamm BU3 über Ausstrichverfahren isoliert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit MTBE cometabolisch abzubauen untersucht.

Die eingesetzten Anreicherungs- und Reinkulturen sind in den Stammsammlungen der Departments Bioremediation und Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle GmbH hinterlegt. Die Stämme wurden als Glycerintiefkühlkulturen (Masterkulturen) bei -20°C aufbewahrt. Von den Masterkulturen wurden Plattenaustriebe auf kupferfreiem NMS-Medium angelegt, die bis zu drei Monate bei 4°C lagerfähig waren und als Inokulummaterial für die Vorkulturen der Untersuchungen dienten.

Material und Methoden

3.2 Medien, Kohlenstoffquellen und Stammlösungen

Die Kultivierung der methanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen erfolgte aufgrund der Kupfersensitivität der sMMO (Morton et al. 2000) in einem kupferfreien Nitratsalzmedium (kupferfreies NMS) nach Higgins et al. (1981) mit folgender Zusammensetzung:

850 mg/l NaNO_3 ; 170 mg/l K_2SO_4 ; 37 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 70 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$;
530 mg/l KH_2PO_4 ; 860 mg/l Na_2HPO_4 ; 0,574 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,446 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;
0,124 mg/l H_3BO_3 ; 0,096 mg/l $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,096 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 0,166 mg/l KI ;
11,2 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1 ml/l H_2SO_4 (1 mmol)

Zur Kultivierung der propan- und butanverwertenden Kulturen wurden neben diesem Medium, Nitratsalzmedium (NMS) und Medium nach Starostina verwendet.

Die Zusammensetzung des NMS-Mediums entsprach dem kupferfreien NMS-Medium unter Zusatz von 0,25 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Bei dem Medium nach Starostina wurde dem kupferfreien NMS-Medium neben Kupfer noch Hefeextrakt (0,1 g/l) und Pepton (0,01 g/l) hinzugefügt (Starostina 2000).

Die Sterilfiltration aller eingesetzten Kohlenstoffquellen (→ Tab. 4) erfolgte über Zellulose-Azetat-Spitzenvorsatzfilter mit einer Porenweite von 0,2 μm .

Für die Fermentationen im 5-Liter und 50-Liter-Fermenter kam ein speziell optimiertes Fermentermedium nach Wendlandt et al. (1981) zum Einsatz. Das Medium war wie folgt zusammengesetzt:

0,028 ml/l H_3PO_4 (80%); 35 mg/l KH_2PO_4 ; 25 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,79 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$;
1,38 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,68 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,32 mg/l ZnCl_2 ; 0,04 mg/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$;
0,11 mg/l $\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,19 mg/l $(\text{Al})_2 (\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$; 0,88 mg/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$;
0,04 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 1,29 mg/l H_3BO_3 ; 0,08 mg/l $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; 1,7 g/l NaNO_3

Tab. 4: Verwendete Kohlenstoffquellen mit den in der Regel eingesetzten Konzentrationen

Kohlenstoffquelle	eingesetzte Konzentration
Methan	50% Methan - Luftgemisch
Propan	50% Propan - Luftgemisch
Butan	50% Butan - Luftgemisch
Methanol	1,6 g/l
1-Propanol	
2-Propanol	
2-Butanol	
MTBE	40 mg/l
TBA, HIBA	30 mg/l
Natriumazetat	1,0 g/l
Azeton	1,6 g/l

Stammlösungen für die Substanzen MTBE und TBA wurden in Konzentrationen von 500 mg/l, 1 g/l und 10 g/l MTBE bzw. TBA mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte in gasdichten mit Butylgummistopfen verschlossenen Maßkolben bei 4°C. Mithilfe gasdichter Spritzen wurden die Stammlösungen aus den Maßkolben entnommen und direkt in die gasdicht verschlossenen Versuchsansätze dosiert.

3.3 Kultivierungsmethoden und Wachstumsuntersuchungen

3.3.1 Anreicherung der Umweltproben

Die Vorbehandlung der Umweltproben für die Anreicherungskulturen (→ Kapt. 3.1) erfolgte durch Verdünnen des Klär- und Blähschlammes im Verhältnis 1:2 und 1:5 mit kupferfreiem NMS-Medium bzw. durch Aufkonzentrierung der Grundwasserproben mittels Filtration (Zellulose-Azetat Filter; 0,2 µm Porenweite). Anschließend wurden die Proben in 1 Liter-gasdichten Schüttelkolben mit speziellen Begasungsaufsätzen (→ Anhang Abb. A-1) unter Zusatz der jeweiligen Kohlenstoffquelle (Methan, Propan bzw. Butan) bei 30°C für sechs Wochen auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert. In dreitägigen Intervallen erfolgte eine Belüftung und Neubegasung der Kolben sowie in wöchentlichen Abständen eine Verdünnung mit NMS- bzw. kupferfreiem NMS-Medium.

3.3.2 Anzucht der Kulturen im 1 l – Schüttelkolben

Die Anzucht der Anreicherung- und Reinkulturen für die Wachstums- und MTBE-Abbauversuche erfolgte in 1 Liter-Schüttelkolben mit Begasungsaufsatz und Ansatzstutzen in jeweils 100 – 250 ml Kulturmedium für 12 – 30 Stunden bis zu einer BTS-Konzentration > 0,3 g/l. Zur Begasung der Kolben mit dem Alkan-Luft-Gemisch wurden zunächst 50% Vakuum auf die Kolben gegeben, welches anschließend mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle (Methan, Propan bzw. Butan (sterilfiltriert)) aufgefüllt wurde. Flüssige Kohlenstoffquellen (sterilfiltriert) wurden dem Medium direkt in entsprechender Konzentration (→ Tab. 4) zugesetzt. Die Kultivierungsbedingungen bei der Anzucht waren eine Temperatur von 30°C und ein pH-Wert von 6,8.

Eine Ausnahme bildeten die psychrophilen methanotrophen Reinkulturen Ms 9, Ms 20, GBP 17, GBP 15 und GBP 31, die bei 20°C inkubiert wurden. Nach Ernte der Kulturen, die aus einem Waschschrift und dem Resuspendieren der Bakterien in NMS-Medium bzw. kupferfreiem NMS-Medium bestand, wurden die Kulturen als Inokulummaterial für MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen eingesetzt oder zur Aktivierung der Monooxygenase (→ Kapt. 3.3.5) verwendet.

Material und Methoden

3.3.3 Untersuchung des Wachstumes der Kulturen

Als Inokulum-Kultur für die Wachstumsuntersuchungen diente jeweils eine Zwölf-Stunden-Kultur. Durch den Vergleich der maximalen Wachstumsraten nach Anzucht der Kulturen auf verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie bei den Temperaturen 12°C und 20°C war es möglich, Aussagen zu treffen über die Effektivität des Wachstumes der Kulturen hinsichtlich dieser Parameter. Als Stickstoffquelle wurde neben Nitrat Ammonium getestet. Dazu wurde die Konzentration des Nitratstickstoffes im NMS-Medium durch 600 mg/l Ammoniumsulfat ersetzt.

Zur Bestimmung des Erntezeitpunktes der Kulturen mit maximaler Enzymaktivität erfolgten Wachstumsversuche, bei denen in stündlichen Intervallen die Monooxygenase-Aktivität gemessen wurde. Dazu kamen die indirekten Methoden des Kurzzeit-MTBE-Abbautests (→ Kapt. 3.4.1) und die Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit (→ Kapt. 3.6.1) zum Einsatz. Für die Bestimmung der sMMO-Aktivität der methanverwertenden Kulturen wurde der sMMO-Tests angewendet (→ Kapt. 3.6.2).

3.3.4 Kultivierung der Kulturen in 300 ml-, 5 l- und 50 l-Fermenter

Zur Gewinnung des Inokulummaterial für die Säulenversuche und den Feldversuch wurden die Stämme in 300 ml, 5 l, und 50 l-Rührfermentern kultiviert. Der Aufbau und die Betriebsweise der Fermenter wurden in der Arbeit von Helm (2002) detailliert beschrieben. Die spezifischen Versuchsbedingungen für die Fermentationen der Kulturen B12, K152 und BU3 sind in der Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5 :Versuchsbedingungen der Fermentation der Stämme B12, K152, BU3 und des Konsortiums B12-K152

Konsortiums B12-K152				
Fermentationen	300 ml-Fermenter	5 l-Fermenter		50 l-Fermenter
eingesetzte Kulturen	BU3, B12, K152	BU3, Konsortium B12-K152	BU3	BU3
Methode	fed - Batch	fed - Batch	2 stufige fed - Batch Fermentation	
Temperatur	30°C			
pH-Wert	6,8			
Luftzufuhr	0,5 l/min	2 l/min		20 l/min
Rührerdrehzahl	500 rpm	400 rpm		200 rpm
Kohlenstoffquelle	1-Propanol	1-Propanol	2-Propanol	2-Propanol
Fermentationsziel	Gewinnung hoher Biomassekonzentrationen		Gewinnung hoher Biomassekonzentrationen mit hohen Enzymaktivitäten	

Im 5 l- und 50 l-Fermenter wurde die neu etablierte Methode der zweistufigen Fermentation angewendet.

Diese umfasst drei Schritte:

- Anzucht der Kultur bis zu einer hohen Biomassekonzentration
- Verdünnen der Kultur mit Fermentermedium i.R. im Verhältnis 1:1
- Fermentation für weitere 4 bis 6 Stunden bis zum Erreichen der maximalen Enzymaktivität der Kultur

Im 50 l-Fermenter wurde die Effektivität dieser Methode erhöht, indem die erste Stufe (Anzucht auf hohe Biomassekonzentrationen) zeitgleich im 5 l-Fermenter erfolgte.

3.3.5 Aktivierung der Monooxygenase der Kulturen

Zur maximalen Aktivierung des Enzymsystemes der Stämme wurde folgende Methodik angewendet:

- Anzucht der Kultur unter dem Gesichtspunkt einer hohen Biomasseproduktion für 24 Stunden bei 30°C
- Ernte der Kultur (Zentrifugation, Waschschrift)
- Resuspendieren der Bakterien in frischem NMS-Medium mit dem entsprechenden Wachstumssubstrat
- Aktivierungsschritt: erneute Inkubation bei 30°C für zwei Stunden bei Verwendung von Propan oder Butan als Wachstumssubstrate bzw. sechs Stunden beim Einsatz von 1- bzw. 2-Propanol, 2-Butanol, Azeton oder Natriumazetat

3.4 MTBE-Abbauversuche im Labor- und kleintechnischen Maßstab

Der MTBE-Abbau der methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen und Reinkulturen wurde in Abbauversuchen an ruhenden Zellen untersucht. Das cometabolische MTBE-Abbaupotenzial der isolierten Reinkulturen B12, K152 und BU3 und des Konsortiums B12-K152 wurde zusätzlich in Laborsäulen (100 ml) und kleintechnischen Säulen (2 l) getestet.

3.4.1 MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen

Schema A: MTBE- und TBA-Abbauversuche in 20 ml Headspace-Röhrchen

Die Abbauversuche an ruhenden Zellen fanden in 20 ml Headspace-Röhrchen (HS-Röhrchen) nach folgender Methode (modifiziert nach Steffan et al. (1997)) statt:

- Ansatz von Versuchsserien von jeweils vier bis sechs HS-Röhrchen und drei Blindwerten
- Beimpfung der HS-Röhrchen mit 4,5 ml aktiver Bakteriensuspension (Anzucht → Kapitel 3.3.1) bzw. Wasser bei den Blindwerten
- Zugabe von MTBE- bzw. TBA mit einer Endkonzentration von 30 mg/l - 50 mg/l

Material und Methoden

- gasdichtes Verschließen der Röhrchen mit Pharma-Fix-Septen und Aluminiumbördelkappen
- Inkubation bei 12°C bzw. 20°C auf dem Schüttler (250 U/min)
- Probenahme i.R. aller 24 Stunden durch Einfrieren je eines HS-Röhrchen bis zur gaschromatographischen Analyse
- Berechnung der MTBE-Abbauraten innerhalb der Probenahmeintervalle und Normierung auf 1 g BTS pro Stunde

Variante A-1: Kurzzeit-MTBE-Abbautests zur Bestimmung der Enzymaktivität

- Ansatz von zwei HS-Röhrchen mit je 2 ml aktiver Bakteriensuspension und MTBE mit einer Endkonzentration von 30 mg/l
- HS-Röhrchen 1: Lagerung bei - 20°C (Startwert)
- HS-Röhrchen 2: Inkubation 24 Stunden bei 20°C
- Normierung der MTBE-Abbauraten auf 1 g BTS pro Stunde

Variante A-2: Bestimmung der Propanolkonzentration zur maximalen Aktivierung der Monooxygenase

- Aliquotierung 200 ml einer Bakterienkultur mit inaktiver Monooxygenase bzw. geringer Monooxygenase-Aktivität in HS-Röhrchen
- Zusatz verschiedener Konzentrationen von 1- bzw. 2-Propanol im Bereich von 4 – 200 mg/l
- Bestimmung der Aktivität der Monooxygenase entsprechend des Abbautestes Variante A-1
- Gewinnung Monooxygenase inaktiver Kulturen:
Stamm K152: Anzucht auf Nähragar
Stämme B12, BU3: Verwendung fünf Tage alter 4°C Flüssigkulturen mit geringer Monooxygenase-Aktivität

Schema B: Abbauprobversuche in Serumflaschen

In den Abbauprobversuchen nach Schema A musste die Probenzahl bereits zu Beginn des Versuches festgelegt werden, wodurch die Flexibilität der Probenahme beschränkt war. Zur Optimierung dieser Methode wurden Abbauprobversuche in Serumflaschen nach folgendem Versuchsprinzip angesetzt:

- Beimpfung einer 120 ml-Serumflaschen mit 50 ml aktiver Bakteriensuspension
- Zugabe von MTBE bzw. TBA mit Endkonzentrationen von 30 - 50 mg/l

Material und Methoden

- gasdichtes Verschließen der Serumflaschen mit Pharma-Fix-Septen und Aluminiumbördelkappen
- Inkubation der Serumflaschen bei 12°C bzw. 20°C auf dem Schüttler (250 U/min)
- Probenahme i.R. aller 24 Stunden durch Entnahme von 2 ml Bakteriensuspension mittels gasdichter Spritze und Injektion dieser Flüssigkeit in verschlossene 20 ml HS-Röhrchen
- Einfrieren der HS-Röhrchen bis zur gaschromatographischen Analyse
- Berechnung der MTBE-Abbauraten innerhalb der Probenahmeintervalle und Normierung auf 1 g BTS pro Stunde

Die durchgeführte Validierung dieser Methode ergab, dass bis zu 15 Proben genommen werden konnten, die zu 95% mit den Vergleichsmessungen nach Schema A übereinstimmten.

Variante B-1: MTBE- und TBA-Abbauversuche zur Bestimmung der Hemmwirkung verschiedener Monooxygenase-Inhibitoren

- Ansatz je zwei Serumflaschen entsprechend des Schemas B
- Nach Verschließen der Serumflaschen Zugabe des Wachstumssubstrates (→ Versuche Kapt. 4.3.1) bzw. des Inhibitors (→ Versuche Kapt. 4.4) mittels gasdichter Spritze zu einem der Ansätze
- Weiterbehandlung der Ansätze entsprechend des Schemas B (Inkubationstemperatur 20°C)
- Vergleich der Abbauergebnisse der zwei Ansätze

Im Fall einer Hemmung der Monooxygenase wurde in dem Ansatz mit Inhibitor kein MTBE- bzw. TBA-Abbau nachgewiesen.

Die verwendeten Inhibitoren und Wachstumssubstrate sind in der Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Monooxygenase-Inhibitoren und Wachstumssubstrate für die Hemmversuche des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 (Wachstumssubstrate: Propan und 1-Propanol)

Inhibitor	Konzentration	Referenz
Acetylen	40 µmol	(Hamamura et al. 2001)
Methimazol	10 mmol	(Francois et al. 2003)
1-Aminobenzotriazol (ABT)	0,1 mmol	(Steffan et al. 1997)
Hexin	4,5 µmol	(Hamamura et al. 2001)
Allylthioharnstoff (ATU)	200 µmol – 2 mmol	
Wachstumssubstrat	Konzentration	Referenz
Propan bzw. Methan	20% Alkan-Luftgemisch	(Beck 2000)

Material und Methoden

Variante B-2: Bestimmung der minimalen Sauerstoffgrenzkonzentration für den cometabolischen MTBE-Abbau

- Beimpfung eines 1 l-gasdichten Schüttelkolben mit Ansatzstutzen und integrierter
- Sauerstoffmesselektrode LDO HQ20 mit 150 ml einer aktiven Bakterienkultur
- Begasung der Schüttelkolben mit einem 50%-Stickstoff-Luftgemisch zur Reduzierung der Gelöstsauerstoffkonzentration des Ansatzes
- Zusatz von MTBE mit einer Endkonzentration von 70 mg/l
- Inkubation der Schüttelkolben bei 20°C auf einem Schüttler (250 rpm)
- Probenahme und Berechnung der MTBE-Abbauraten erfolgte analog des Schemas B

Das Messprinzip Sauerstoffmesselektrode beruht auf der Fluoreszenzauslöschung (luminescent dissolved oxygen), somit war eine Strömung der Flüssigkeiten nicht erforderlich (Hach 2005).

Variante B- 3: BATCH-Langzeit-MTBE-Abbauversuche

- Beimpfung der 1 l-gasdichten Schüttelkolben mit Ansatzstutzen mit 150 ml einer aktiven Bakterienkultur und MTBE mit einer Endkonzentration von 40 mg/l
- Inkubation der Schüttelkolben bei 20°C auf einem Schüttler (250 rpm) unter den Bedingungen der Tab. 7
- Probenahme über die Ansatzstutzen entsprechend des Schemas B
- Berechnung der MTBE-Abbauraten innerhalb der Probenahmeintervalle und Normierung auf 1 g BTS pro Tag

Tab. 7: Parameter der Batch-Langzeit-MTBE-Abbauversuche der Stämme K152 und BU3

Parameter	Kultur K152	Kultur BU3
Anzucht der Kultur (Wachstumssubstrat)	1-Propanol	1-Propanol
BTS-Konz. des Inokulums	0,2 g/l	0,3 g/l
Laufzeit des Abbaues	109 Tage	115 Tage
Reaktivierung des Enzymsystemes durch Dosierung von 1-Propanol (0,8 mmol) [nach x Tagen]	[36, 41]	[35, 68, 99]
Dosierung von MTBE [nach x Tagen]	[2, 6, 19, 22, 31, 41] 30 - 40 mg/l MTBE [44, 77, 100] 80 - 90 mg/l MTBE	[2, 4, 11, 16] 30 - 40 mg/l MTBE [24, 58, 79, 110] 80 - 90 mg/l MTBE

3.4.2 MTBE-Abbauversuche in Laborsäulen

Als Laborsäulen wurden Kunststoffsäulen² (d= 53 mm, l= 100 mm, V= 220 ml) benutzt

(→ Anhang Abb. A-2), die mit einer Kolbenpumpe über Tygonschläuche (d= 3 mm) zu einem geschlossenen Kreislauf verbunden waren. Eine Lochplatte im oberen Teil der Säule ermöglichte eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension über den gesamten Säulenquerschnitt. Die am Boden der Säule eingebaute Siebplatte verhinderte eine Ausspülung des Trägermaterials. Als Trägermaterial kam das Tongranulat Seramis® mit einer Korngröße von 3,2 bis 5,0 mm zum Einsatz. Zu Versuchsbeginn wurden die mit Trägermaterial gefüllten Säulen mit einer aktiven Bakterienkultur (Anzucht → Kapt. 3.3.2) und MTBE ($C_{\text{MTBE}} = 45 \text{ mg/l}$) beimpft und in den Säulenkreislauf integriert. Der durchschnittliche Volumenstrom lag bei 2,5 l/h. Die sich daraus ergebende Verweilzeit spielte aufgrund der Kreislaufführung des Systemes nur eine untergeordnete Rolle. Für die Probenahme wurden Ventile aus Glas T-Stücken mit Silikon/PTFE Septen konstruiert und in den Säulenkreislauf eingebaut. In regelmäßigen Abständen, i.R. aller 24 Stunden, erfolgte die Entnahme von 2 ml Bakteriensuspension mittels gasdichter Spritze. Die Probe wurde direkt in verschlossene HS-Röhrchen überführt. Das obere Probenventil diente der Dosierung geringer Konzentrationen des Wachstumssubstrates (0,8 mmol Propanol bzw. 0,2 mmol Propan) oder von MTBE (20 - 120 mg/l). Die Versuche in den Laborsäulen erfolgten über einen Zeitraum von 1 - 3 Monaten bei Raumtemperatur ohne zusätzliche Sauerstoffbegasung. Die berechneten MTBE-Abbauraten in den Labor- und später auch in den kleintechnischen Säulenversuchen (Kapt.3.4.3) wurden auf die eingesetzten Ausgangsbiomassen bezogen und auf 1 g BTS pro Tag normiert. Inaktive Zellen in den Systemen und Zellauswaschungen blieben unberücksichtigt. Die Parameter der Einzelversuche sind in Tab. 8 dargestellt.

² Leihgabe der TU Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie

Material und Methoden

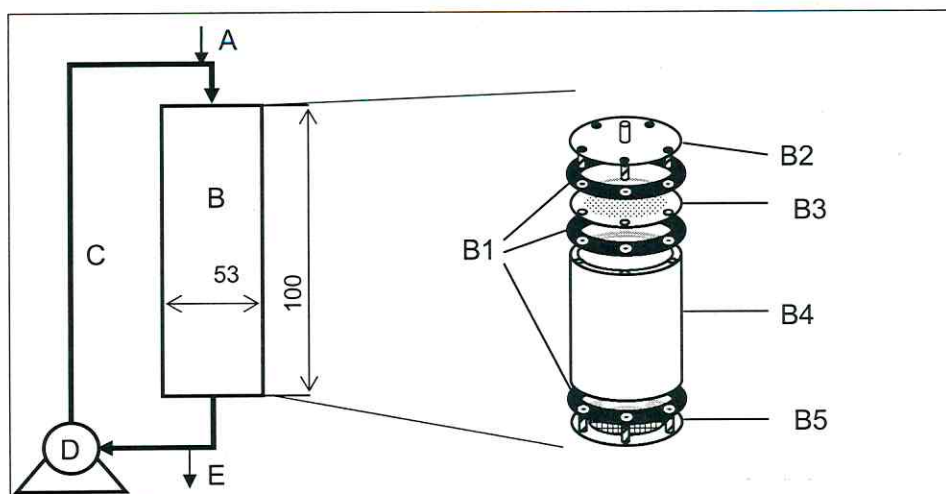


Abb. 4: schematische Darstellung der Laborsäule (A: Dosierventil für Zugabe von Wachstumssubstrat/ MTBE, B: Kunststoffsäule, C: Tygongschlauchverbindung, D: Kolbenpumpe, E: Probenahmeventil, B1: Dichtungsringe, B2: Deckel mit Ansatzstutzen, B3: Lochplatte, B4: Kunststoffzylinder, B5: Boden mit Ansatzstutzen und Siebplatte)

Tab. 8: Parameter der dargestellten MTBE-Abbauversuche der Stämme BU3, K152, B12 und des Konsortiums B12-K152 in den Laborsäulen

Kultur/ Parameter	BU3	K152	B12	Konsortium K152-B12
Anzucht der Kultur (Wachstumssubstrat)	1-Propanol, 2-stufige Anzucht	1-Propanol		
BTS-Konz. des Inokulums	0,35 g/l	0,50 g/l	0,60 g/l	0,40 g/l
Laufzeit des Abbauversuches	71 Tage	41 Tage	30 Tage	20 Tage
Reaktivierung des Enzymsystemes (Dosierung von Wachstumssubstrat) [nach x Tagen]	0,8 mmol 1-Propanol [12] 0,2 mmol Propan [38]	0,8 mmol 1-Propanol [26] 0,2 mmol Propan [17]	0,2 mmol Propan [16]	0,8 mmol 1-Propanol [4, 10, 14,]
Dosierung von MTBE ¹ [nach x Tagen]	[15, 22, 39, 51]	[9, 16, 20, 36]	[16,28]	keine

Anmerkung: ¹ dosierte MTBE-Konzentration war abhängig vom Versuchsverlauf (→ Kapt. 4.3.2)

3.4.3 MTBE-Abbauversuche in den kleintechnischen Säulen

Die kleintechnischen Säulen S 1 und S 2 (Abb. 6) wurden bereits in dem Forschungsprojekt des UFZ Leipzig-Halle GmbH zur „Cometabolischen Degradation von TCE in Wässern und Böden mittels methanotropher Bakterien“ von Beck (2000) in Betrieb genommen und sind dort detailliert beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde das vorhandene Begasungssystem der Säule S 1

durch eine blasenfreie Begasungseinheit ersetzt. Diese bestand aus einer Glassäule ($d=60\text{ mm}$, $l=400\text{ mm}$) mit einem Glasgestell, das mit einem Silikonschlauch umwickelt war und in den Säulenkreislauf integriert wurde. Der Silikonschlauch war an einem Ende mit einem Blindstopfen versehen und wurde über einen Durchflussregler mit Luft bzw. einem Propan-Luftgemisch (1,25% Propan in synthetischer Luft) von $0,02\text{ l/min}$ beaufschlagt. So wurde die Bakteriensuspension durch Diffusionsprozesse mit Sauerstoff bzw. dem Propan-Luftgemisch angereichert.

Beide Säulen wurden zu zwei Drittel mit dem Trägermaterial, einem Gemisch aus Seramis® und Blähton (Verhältnis 1:1), gefüllt. Zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterienkultur in der Säule wurde ein Lanzensystem bzw. eine Spinne in den Säulenkreislauf integriert. Das Lanzensystem bestand aus 10 ml Plastpipetten mit seitlichen Einschnitten. Bei der Spinne handelt es sich hingegen um ein spiralförmiges gelochtes Schlauchsystem.

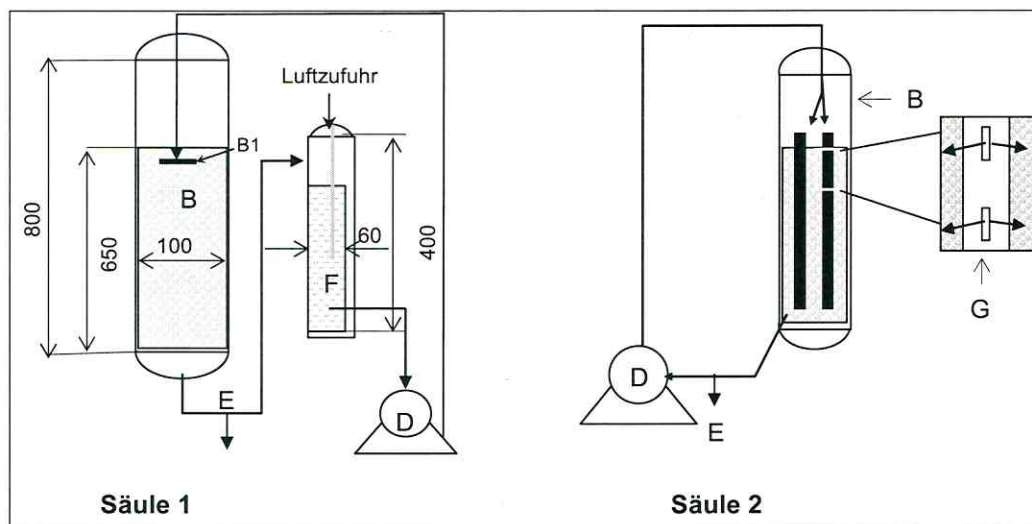


Abb. 5: Schematischer Aufbau der kleintechnischen Säulen S 1 und S 2. (B: kleintechnische Säule, B1: Spinne, D: Kolbenpumpe, E: Probenahme-/ Dosierventil, F: Begasungssäule mit gewickelten Silikonschlauch, G: Lanzensystem)

Die Beimpfung der Säulen erfolgte jeweils mit 2 l Bakterienkultur (BTS zwischen $0,2\text{ g/l}$ und $1,9\text{ g/l}$ je nach Versuchsansatz, → Tab. 9). Die Suspension in den Säulen wurde mittels Kolbenpumpe über ein Schlauchsystem (Viton®-Schläuche) im Kreislauf geführt (Volumenstrom $4,5\text{ l/h}$). Die Probenahmen und Dosierungen von Wachstumssubstrat und MTBE erfolgten identisch zu den Laborsäulenversuchen. Die Parameter der einzelnen Versuche sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Material und Methoden

Tab. 9: Parameter der dargestellten MTBE-Abbauversuche des Stammes BU3 und des Konsortiums B12-K152 in den kleintechnischen Säulen

Kultur/ Parameter	BU3			Konsortium K152-B12
Säule	S 1	S 2	S 2	S 2
Anzucht der Kultur (Wachstumssubstrat)	1-Propanol		2-Propanol	1-Propanol
Anzüchtungsmethode	5 l-Fermenter	Schüttelkolben	5 l-Fermenter	
BTS-Konz. des Inokulums	2,0 g/l	0,2 g/l	0,8 g/l	1,3 g/l
Laufzeit des Abbaues	55 Tage	78 Tage	25 Tage	25 Tage
Reaktivierung des Enzymsystems (Dosierung von Wachstumssubstrat) [nach x Tagen]	0,8 mmol 1-Propanol [S1: 12; S2: 31] 0,2 mmol Propan [S1 30-32; S2: 38]		nicht erfolgt	0,8 mmol 1-Propanol [3,13] 0,2 mmol Propan [38]
Begasung [nach x Tagen]	Luft [55]	Luft [65]	Luft [16-17]	Luft [5-7]
Dosierung von MTBE ¹ [nach x Tagen]	[16, 35]	[12, 21, 36]	[12, 17]	keine
Bemerkung	-	-	-	Neubeimpfung mit K152 nach 20 Tagen

Anmerkung: ¹ dosierte MTBE-Konzentration war abhängig vom Versuchsverlauf (→ Kapt. 4.3.2)

3.5 Feldversuch - cometabolischer MTBE-Abbau zur Implementierung des ENA-Konzeptes am Projektstandort Leuna

Der Chemiestandort Leuna (Sachsen-Anhalt, BRD) besitzt seit mehr als hundert Jahren eine überregionale Bedeutung in der Petrochemie, wobei von 1980 bis 1996 die Produktion von MTBE einen hohen Stellenwert besaß (Martienssen et al. 2006). Sowohl durch Kriegseinwirkungen als auch durch Leckagen und Havarien gelangten Mineralöle und MTBE ins Grundwasser. Während die Mineralöle durch natürliche Rückhalte- und Abbauprozesse retardiert wurden, hat das Areal des mit MTBE-kontaminierten Grundwassers inzwischen eine Ausdehnung von ca. 900 000 m². Die MTBE-Fahne mit Konzentrationen zwischen 100 µg/l und 100 mg/l erstreckt sich gegenwärtig vom Expositionsort (Altwerk Leuna) über zwei Kilometer in Richtung Saale (siehe Abb. 6) (Schirmer 2000). Aus der unmittelbar vorliegenden bzw. absehbaren Gefährdung verschiedener Schutzgüter, vor allem der Trinkwasseraufbereitungsanlage des nahe gelegenen Wasserwerkes, ergibt sich die Notwendigkeit für eine kurzfristige Sanierung des MTBE-Schadens (Schirmer 2000).

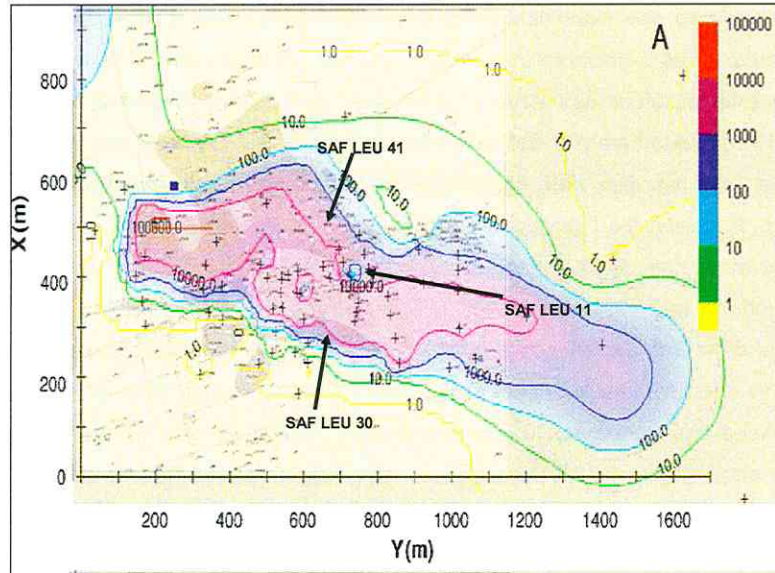


Abb. 6: MTBE-Verteilung am Projektstandort Leuna (MTBE-Konzentrationen in $\mu\text{g/l}$, Lage Altwerk Leuna: $Y = 200 \text{ m}$, $X = 500 \text{ m}$, (Martenssen et al. 2004))

Das am Projektstandort errichtete Konditionierungsbauwerk (Abb. 7, Foto $\rightarrow$ Anhang Abb. A-4, A-5) dient der Zumischung von Stoffen und Mikroorganismen zum schadstoffhaltigen Grundwasser, welches nach dem Verlassen der Konditionierungseinheit wieder zurück in den Grundwasserleiter strömt.

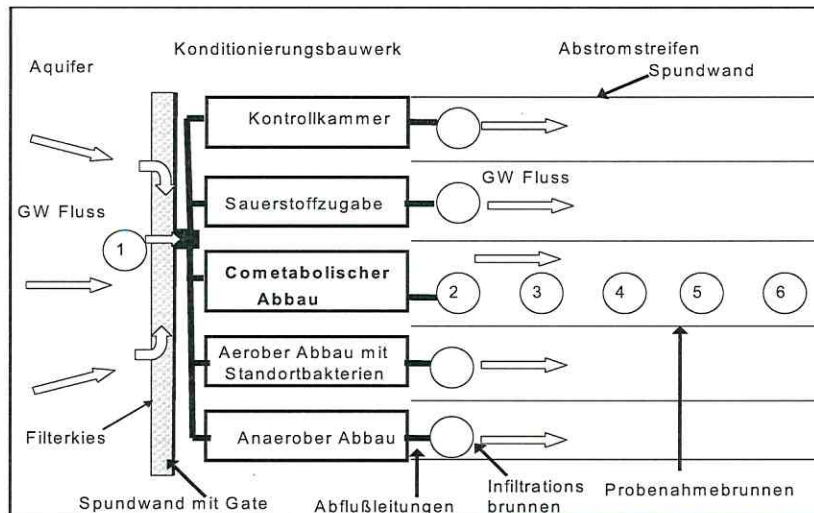


Abb. 7: Schematische Darstellung der Konditionierungseinheit und des anschließenden Abstromstreifens (1: Exfiltrationsbrunnen (EB), 2: Infiltrationsbrunnen (IB), 3-6: Probenahmebrunnen Saf 56, Saf 57, Saf 58 und Saf 59). (modifiziert nach (Schirmer 2000)).

Material und Methoden

Die Technologie des Konditionierungsbauwerkes wurde von Teutsch et al. (1999) als Patent angemeldet. Das Verfahren nutzt die Hydraulik der Grundwasserströmung aus, um ohne externe Energiezufuhr das Grundwasser über eine Filterkieswand in die Reaktorkammer zu leiten. Die Reaktorkammer befindet sich unterhalb der Geländeoberkante und ist von oben begehbar. Es wurden fünf verschiedene Reaktorkammern mit separaten Abstromstreifen angelegt, in denen die Erprobung verschiedener Techniken zur *in-situ*-Remediation von MTBE entsprechend des ENA-Konzeptes erfolgte (siehe Abb. 7). In der Reaktorkammer zur Untersuchung des cometabolischen MTBE-Abbaues wurde Sauerstoff, Phosphat, 1- bzw. 2-Propanol dem Grundwasser zugeführt, welches anschließend über den Infiltrationsbrunnen (IB) zurück in den Grundwasserleiter floß. Dieser diente als Reaktionsraum, in dem alle für den MTBE-Abbau notwendigen Substanzen gemischt vorlagen. Die Injektion von Mikroorganismen erfolgte ebenfalls in der Reaktorkammer. Als Trägermaterial für das Konditionierungsbauwerk wurde gebrannter Blähton verwendet (Martienssen et al. 2004). Weitere detaillierte Ausführungen zum Konditionierungsbauwerk sind in den Arbeiten von Schirmer (2000) und Martienssen et al. (2006) beschrieben. Der Gesamtkomplex des Konditionierungsbauwerkes und des dazugehörigen Abstromstreifens wird als Rinne bezeichnet.

Während des Untersuchungszeitraumes Oktober 2004 - Mai 2006 wurde die Rinne zum cometabolischen MTBE-Abbau unter drei verschiedenen Bedingungen gefahren (Tab. 10).

In den Projektphasen I und II wurde mittels des Prozesses der Biostimulation das Wachstum der autochthonen 1-propanolverwertenden Bakterien gefördert und das MTBE-Abbaupotenzial dieser Kulturen bestimmt. Dabei erfolgte in der Projektphase II eine zusätzliche Dosierung von Wasserstoffperoxid. Der Prozess der Bioaugmentation wurde in der Projektphase III durch die zusätzliche Beimpfung der Rinne mit 100 l einer aktiven Kultur des Stammes BU3 ($c_{BTS} = 7,9 \text{ g/l}$) im Dezember 2005 und der Umstellung des Wachstumssubstrates von 1-Propanol auf 2-Propanol erprobt.

Tab. 10: zugeführte Substrate und Mikroorganismen während der drei Projektphasen des Feldversuches zum cometabolischen MTBE-Abbau am Projektstandort Leuna

Projektphase (Zeitraum)	Konditionen (Konz.) [g bzw. l /m ³ Grundwasser]
I (Okt. 04 – Apr. 05)	Kaliumhydrogenphosphat [27 g/m ³], Sauerstoff [30 l/m ³], 1-Propanol [50 ml/m ³]
II (Mai 05 – Dez. 05)	Kaliumhydrogenphosphat [27 g/m ³], Sauerstoff [30 l/m ³], Wasserstoffperoxid [200 ml 50%iges H ₂ O ₂ /m ³], 1-Propanol [50 ml/m ³]
Dez. 05	einmalige Beimpfung mit 100 l einer aktiven Kultur des Stammes BU3 ($c_{BTS} = 7,9 \text{ g/l}$, Monooxygenase-Aktivität: 2,0 mg MTBE/g BTS*h)
III (Jan. 06 – Mai 06)	Kaliumhydrogenphosphat [27 g/m ³], Sauerstoff [30 l/m ³], Wasserstoffperoxid [200 ml 50%iges H ₂ O ₂ /m ³], 2-Propanol [50 ml/m ³],

Die Beprobung der Rinne erfolgte monatlich über sechs Probenahmebrunnen (siehe Abb. 7). Es wurden jeweils zwei Grundwasserproben des Konditionierungsbauwerkes (EB, IB) und vier Proben des Abstromstreifen (Saf 56 - Saf 59) entnommen. Der Probenahmebrunnen (EB) (→ Abb. 7: Nr. 1)³ befand sich vor dem Konditionierungsbauwerk und stellte somit die im unbehandelten Grundwasser vorherrschenden Bedingungen dar. Als zweiter Probenahmebrunnen wurde der Infiltrationsbrunnen (IB) (→ Abb. 7: Nr. 2)³ am Ende des Konditionierungsbauwerkes genutzt, durch welchen das Grundwasser mit Nährstoffen und Sauerstoff angereichert in den Grundwasserleiter zurückfloss. Im Abstromstreifen, dem eigentlichen Reaktionsraum, wurden über eine Gesamtstrecke von 75 m aller 15 m Probenahmebrunnen installiert (Saf 56- Saf 59) (→ Abb. 7: Nr. 3-6)³.

Die Wasserproben wurden bis zur Bearbeitung, die innerhalb von 24 Stunden stattfand, bei 4°C gelagert. Die Ermittlung der Parameter Gelöstsauerstoffkonzentration, pH-Wert, Temperatur des Grundwassers und Redoxpotenzial erfolgte vor Ort.⁴ Die Konzentration von

1- bzw. 2-Propanol, MTBE und TBA wurde mittels Headspace-Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (HS-GC-FID) (→ Kapt. 3.6.1) gemessen. Parallel dazu erfolgte eine Verifizierung der Konzentrationen dieser Substanzen mithilfe der Headspace-Gaschromatographie mit Massenspektrometer (HS-GC-MS) (Martienssen et al. 2006) (Ergebnisse nicht dargestellt). Die mikrobiellen Untersuchungen der Proben umfassten die Bestimmung der heterotrophen- sowie 1- bzw. 2-propanolverwertenden Bakterien mittels der MPN-Methode und Ausplattierungen (→ Kapt. 3.6.2). Dabei konnte durch die Verwendung verschiedener Nährmedien (Nähragar, NMS-Medium mit 1- bzw. 2-Propanol als Wachstumssubstrat) selektiv die Lebendzellzahlen der verschiedenen autochthonen Bakterien des Standortes bestimmt werden, die anschließend in MTBE-Abbauversuchen nach dem Schema A (→ Kapt. 3.4.1) auf ihr Potenzial, MTBE cometabolisch abzubauen, getestet wurden. In der Versuchsphase III (Bioaugmentation → Kapt. 4.5.4) erfolgte ein qualitativer und halbquantitativer Nachweis des Stammes BU3 in den Proben. Durch die Ableitung der BU3 stammspezifischen Primer „BU3dn“ und „BU3up“ wurden makromorphologisch dem Stamm BU3 identische Kolonien der Ausplattierungen als Stamm Bu3 verifiziert. Des Weiteren wurden Anreicherungskulturen aus 5 ml Grundwasserprobe des jeweiligen Probenahmebrunnens und 25 ml NMS-Medium mit 1- bzw. 2-Propanol als Wachstumssubstrat angesetzt (Anreicherungszeit 7-10 Tage, 30°C). Mithilfe der stammspezifischen PCR (Primer BU3dn, BU3up) konnte der Stamm BU3 in diesen Kulturen qualitativ nachgewiesen werden.

³ Die Nummern verweisen auf die dargestellten Probenahmebrunnen in Abb. 7

⁴ Die Bestimmung erfolgte im Department Hydrogeologie des UFZ Leipzig-Halle GmbH.

Material und Methoden

Als Vorbereitung für ein effektiveres Monitoring wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mittels stammspezifischer FISH-Sonde für den Stamm BU3 (→ Kapt. 3.6.2) etabliert.

3.6 Analytische, mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

3.6.1 Analytische Methoden

Folgende Parameter wurden analytisch erfasst:

BTS-Konzentration, sMMO-Aktivität, Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit, CSB, Konzentration von Nitrat, Phosphat, MTBE, TBA, 1- bzw. 2-Propanol

Zur Bestimmung der BTS-Konzentration wurden Extinktionsmessungen mit dem Spekol 1100 gegen destilliertes Wasser bei 600 nm durchgeführt. Die BTS der Kulturen konnte anhand von Kalibrierkurven, die auf gravimetrischen Vergleichsmessungen basierten, errechnet werden. (Formeln: → Anhang Tab. A-2).

Die sMMO-Aktivität der methanverwertenden Kulturen wurde mittels sMMO-Test gemessen. Dabei wurde die Naphtholbildungsrate (nmol Naphthol gebildet pro mg BTS und Stunde) bei der Oxidation von Naphthalin zu Naphthol nach einer Methode von Brusseau et al. (1990) ermittelt. Jeweils 1 ml Bakteriensuspension wurde mit 1 ml gesättigter Naphthalinlösung versetzt und eine Stunde bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (5 min 1400 rpm) wurde der Überstand mit 100 µl einer 0,2%igen sterilfiltrierten o-Dianisidinlösung gemischt und sofort spektrophotometrisch am CADAS 100 bei 525 nm vermessen. Die Berechnung der sMMO-Aktivität erfolgte mittels der Formel:

$$\text{sMMO - Aktivität [nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}] = \frac{\text{Extinktion}_{525 \text{ nm}}}{38000 \text{ nmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{Küvettenstärke [cm]} \cdot 1 \text{ h} \cdot \text{BTS [mg l}^{-1}]}$$

Die Monooxygenase-Aktivität der propan- und butanverwertenden Kulturen wurde durch die indirekten Methoden der Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und dem neu entwickelten Kurzzeit-MTBE-Abbautest (→ Kapt. 3.4.1) analysiert.

Zur Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit als Maß der Enzymaktivität der Kultur kam eine Sauerstoffauszehrzelle zum Einsatz. Diese wurde mit 2 ml Bakteriensuspension gefüllt und gasdicht verschlossen. Nach Zugabe von 500 µl 1-Propanol ($c_{1\text{-Propanol}} = 160 \text{ mg/l}$) als Wachstumssubstrat konnte die Sauerstoffauszehrung mittels der an der Zelle angeschlossenen digitalen Auswertesoftware (Oxylab 1.92) verfolgt werden.

Die Berechnung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit in [mg O₂/mg BTS*min] erfolgte nach der folgenden Formel:

$$rO_2 = \left(\frac{C_{O_2} * Y}{A_0} \right) \div (X * t)$$

- rO₂ ... Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit [mg O₂/g BTS *min]
X ... Konzentration der Biomasse [g/l]
C(O₂) Sauerstoffsättigungskonzentration bei der entsprechenden Temperatur [mg/l]
(T= 21°C: 8,99 mg O₂/l; T= 25°C: 8,38 mg O₂/l)
t Messzeit [min]
A₀ Referenzwert bei vollständiger Sauerstoffzehrung
Y gemessene Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit

Der Referenzwert (A₀), welcher der vollständigen Sauerstoffzehrung entspricht, wurde durch Einspritzen von 100 µl gesättigter Natriumsulfatlösung bestimmt.

Die chemischen Parameter CSB und Nitrat wurden mit photometrischen Küvettentests der Firma Dr. Lange unter Verwendung des Spektralphotometer CADAS 100 ermittelt.

Zur Messung der Phosphatkonzentration wurde 1 ml Zentrifugat mit 5 ml Vanadat-Molybdat-Reagenz (VM-Reagenz) versetzt und mit dest. Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Nach zehnmündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde im Spekol 1100 die Extinktion bei 435 nm gegen einen Blindwert aus 5 ml VM-Reagenz und 20 ml dest. Wasser gemessen. Die Berechnung der Phosphatkonzentration in [mg/l] erfolgte mittels der dargestellten Formel.

$$PO_4 - P = 127,202 \times E_{435nm}$$

$$(r^2 = 0,999)$$

Die Konzentrationsbestimmung von MTBE, TBA, 1- bzw. 2- Propanol wurde mithilfe des Gaschromatographen HP-6890, der mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Headspace-Sampler (HP-7694) ausgestattet war, durchgeführt. Als Trennsäule diente eine HP-5-Kapillarsäule (5%-Diphenyl-Dimethylsiloxan-Copolymer; Hewlett Packard;

30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Als Analysenprogramm wurden folgende Einstellungen gewählt:

Headspace-Sampler: Ofentemperatur: 80°C, Temperatur der Probenschleife: 90°C, Transferleitungstemperatur: 100°C, Äquilibrierungszeit der HS-Röhrchen: 60 min, Druckaufbau in den HS-Röhrchen: 0,2 min, Füllzeit der Probenschleife: 0,2 min, Äquilibrierungszeit der Probenschleife: 0,05 min, Injektionszeit: 1 min, Stickstoff: 1,35 bar, Helium: 0,43 bar;

GC-Temperaturprogramm: Initial: 3 min bei 35°C, Rate 1: 10°C/min bis 200°C, Halten: 5 min bei 200°C, Rate 2: 30°C/min bis 260°C, Halten: 3,5 min bei 260°C;

Material und Methoden

Trärgas: Helium, 1,1 ml/min (konstanter Fluss), Injektortemperatur: 250°C, Splitverhältnis: 120:1, Detektortemperatur: 250°C, Make-up Gas: Stickstoff, 20 ml/min, Brenngas: Wasserstoff 40 ml/min, Luft 400 ml/min.

Die Kalibrierung des GC erfolgte für die Probenvolumina 2 ml und 5 ml. Das Temperaturprogramm der HS-GC-MS zur Verifizierung der Analysenergebnisse des Feldversuches (→ Kapt. 3.6) ist detailliert bei Martienssen et al. (2006) beschrieben.

3.6.2 Mikro- und Molekularbiologische Arbeitstechniken

Es wurden folgende Arbeitstechniken angewendet:

- Mikroskopie,
- biochemische Untersuchung der Stämme,
- Bestimmung des Anteiles der heterotrophen Begleitflora der methanverwertenden Anreicherungskulturen,
- Reinisolierung, PCR zur Sequenzierung und für erste Enzymcharakterisierungen.

Bei der Mikroskopie der Kulturen kam das Phasenkontrastmikroskop Optiphot 2 bei 1000-facher Vergrößerung mit Digitalkamera DXM 1200F und Bildbearbeitungssoftware Eclipse Net (Version 1.20.0) zum Einsatz. Makromorphologische Untersuchungen wurden mit dem Binokular SMZ-2T bei 1 - 10 facher Vergrößerung vorgenommen.

Für die Untersuchungen des GRAM-Verhaltens sowie der Nachweise der Oxidase und Katalase wurden die mikrobiologischen Standardmethoden angewendet (Bast 1999). Die physiologische Charakterisierung der Kulturen erfolgte unter Verwendung der miniaturisierten Testsysteme API 20 NE und BIOLOG-MicroLog-System-GN für Gram-negative Bakterien bzw. Gram-positive Bakterien (BIOLOG-MicroLog System BP). Das Prinzip dieser Testsysteme beruht auf positiven Nachweisreaktionen (Trübung des Agars oder Farbumschlag von Indikatoren), die gekoppelt sind an eine Metabolisierung der zu untersuchenden Substrate. Insgesamt wurden 109 verschiedene Kohlenstoffquellen getestet (→ Anhang, Tab. A-3).

Die Bestimmung des Anteiles der heterotrophen Begleitflora der methanverwertenden Anreicherungskulturen erfolgte über parallele Ausplattierung verschiedener Verdünnungen der Kulturen auf kupferfreiem NMS-Medium (Wachstumssubstrat Methan) und Nähragar. Anhand des Vergleiches der ausgezählten KBE/Platte konnte der Anteil der heterotrophen Begleitflora (gebildete KBE auf Nähragarplatte) berechnet werden.

Zur Isolierung von Reinkulturen aus den Anreicherungskulturen wurden fraktionierte Ausstriche und mehrfach Passagierungen der gewonnenen Einzelkolonien eingesetzt.

Material und Methoden

Das Probenmaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen der isolierten Reinkulturen B12, K152 und BU3 wurde von frisch gewachsenen NMS-Agarplatten gewonnen.

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit dem DNA-Extraktionskit „DNeasy“.

Die durchgeführten PCRs umfassten:

- die Amplifizierung der 16S-rRNA in Vorbereitung der Sequenzierung der Stämme (Primer: f27, r1492 (Lane1991))
- die Amplifizierung eines 865 bp großen Genfragmentes der genomischen DNA des Stammes BU3 zum qualitativen Nachweis des Stammes im Feldversuch (Primer: BU3up, BU3dn)
- Identifizierung des Gencluster eth RABCD des Enzyms Cytochrom P450 (Primer: EDHB_for, EDHB_rev (Chauvaux et al. 2001))
- Identifizierung der Untereinheit der Isobutyryl-Coenzyme A-Mutase (ICM) ; (EC 5.4.99.13) (Primer: ICMA_f, ICMA_r (Rohwerder et al. 2006))⁵.
- Die verwendeten Primer und PCR-Programme sind in der Tab. 11 und 12 dargestellt.

Tab. 11: Sequenzen der verwendeten Primer und der Oligonukleotidsonde der molekularbiologischen Untersuchungen der Stämme BU3, B12 und K152

Primer	PCR-Programm	Sequenzen	Referenz
f 27	16 s	5'- aga gtt tga tcm tgg ctc ag -3	(Lane 1991)
r 1492		5'- tac ggy tac ctt gtt acg act t-3'	(Lane 1991)
BU3up	BU3	5'- ggt cta ata ccg gat agg acc tcg gga-3'	vorliegende Arbeit
BU3dn		5'- gga aac ccc atc tct ggg gcg -3'	vorliegende Arbeit
EDHB_for	EDH B	5' -agg agg aat cta tga cac tg -3'	(Chauvaux et al. 2001)
EDHB_rev		5' -ggc atc ggc atc act tcg ggt ag -3'	(Chauvaux et al. 2001)
ICMA_f	ICMA	5'-atg acc tgg ctt gag ccg ca-3'	(Rohwerder et al. 2006)
ICMA_r		5'-gcg aga cgc cgg tct tct ga-3'	(Rohwerder et al. 2006)
BU3-Cy3	FISH-Sonde	Cy3-5'-gca tcc cga ggt cct atc-3'	vorliegende Arbeit

Die PCRs wurden als 50 µl Ansätze bestehend aus jeweils 5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl dNTP-Mix (c= 200 µmol), je 1 µl der entsprechenden Primer (c= 10 pmol), 1 µl - 2 µl MgCl₂ (c= 2,5 mmol), 1 - 2 µl genomische DNA der Probe und 0,5 - 1 µl (2,5 U - 5 U) Hot Start Taq Polymerase angesetzt und in einem Thermocycler mit folgenden Temperaturprogrammen (→ Tab. 12) inkubiert.

⁵ PCR's wurden im Department Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle GmbH durchgeführt.

Material und Methoden

Tab. 12: Temperaturprogramme der durchgeführten PCR's der Untersuchungen der Stämme BU3, B12 und K152

Schritt /Programm	16S-rRNA	BU3	EDH B*	ICM A
Start (T [°C]/ Zeit [min])	95/3	96/2	95/5	95/5
Denaturierung (T [°C]/ Zeit [min])	93/1	94/1	94/1	94/1
Annealing (T [°C]/ Zeit [min])	54/1,5	59/1	64/1	60/1
Extension (T [°C]/ Zeit [min])	72/1	72/1	72/1	72/1
Zyklen	30	25	29	29
Extension (T [°C]/ Zeit [min])	72/7	72/7	72/10	72/10

Anmerkung: * Angaben zum PCR-Programm von (Breuer 2006)

Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte in einem 1% bzw. 1,2% Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei 121 V für 15 - 20 min und Anfärbung im Ethidiumbromid-Bad (4 µg/ml) für 15 min konnten diese unter UV-Licht in der Geldokumentationskammer ausgewertet werden.

Die spezifischen Primer „BU3dn“ und „BU3up“ für den Stamm BU3 wurden von der Firma GATC abgeleitet. Die Validierung der Primer (Ergebnisse nicht dargestellt) und die Etablierung des PCR-Programmes (→ Tab. 12) erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Als Referenzstämme zur Prüfung der Spezifität der PCR wurden die Stämme *Nocardia* ENV 425 (Steffan et al. 1997), B12 (vorliegende Arbeit), *Rhodococcus aetherovorans* und *Rhodococcus rhodochrous* (Stammsammlung des Department Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle GmbH) sowie 2 Umweltisolate vom Projektstandort Metlen verwendet.

Zur Entwicklung des phylogenetischen Stammbaumes der Stämme B12, K152 und BU3 kam die Phylogenie-Software Phylip 3.6 (Page 1996) zum Einsatz. Die bidirektional sequenzierten 16S-rRNA Genabschnitte der Stämme B12, K52 und BU3 wurden zum Blast gegen die EMBL-Datenbank eingesetzt. Nach einem multiplen Aligment ähnlicher Sequenzen mit der Software ClustalW (2006), wurden die in Phylip 3.6 integrierten Programme SEQBOOT (Gewichtsanalyse), DNAAist, FITCH und CONSENSE angewendet. Die Darstellung des Stammbaumes erfolgte mittels der Software TREEVIEW.

Die aus den Sequenzdaten des Stammes BU3 mit der Software ARB entwickelte stammspezifische FISH-Sonde wurde mit dem Fluorophor CY3 markiert. Die Synthese und Markierung der Sonde erfolgte durch die Firma MWG.

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde nach folgender Methode durchgeführt:

- Fixierung der Zellen mit frischer 4% Paraformaldehydlösung in 130 mmol NaCl/ 10 mmol NaPO₄ (pH 7,2 - 7,4) für 3 Stunden bei Raumtemperatur
- Auftragen 100 µl fixierter Probe auf einen Objektträger
- Entwässerung der Probe mit 50%, 80% und 100%igem Ethanol (je 3 min)
- Hybridisierung der Probe 3 Stunden bei 47°C:
 - Zugabe des Hybridisierungspuffer (20 mmol Tris, 0,9 mol/l NaCl, 0,01% SDS, pH 7,4), der Sonde und Formamid
- Waschen der hybridisierten Probe (Waschpuffer: 20 mmol Tris, 0,9 mol/l NaCl, 0,01% SDS, pH 7,4; je 15 min) bei 50°C
- Gegenfärbung mit DAPI (Endkonzentration 10 µl/ml)
- mikroskopische Auswertung: Cy3-Filter: Anregungswellenlänge 510 - 560 nm, DAPI-Filter: Anregungswellenlänge: 400-418 nm

Zur Untersuchung der Selektivität der Sonde erfolgte eine Variation der Formamidkonzentrationen (15%, 20%, 40%) bei konstanter Temperatur. Als Vergleichsstämme wurden die Bakterien *Mycobacterium mageritense* B12 (vorliegende Arbeit), *Rhodococcus aetherovorans* und *Rhodococcus rhodochrous* (Stammsammlung des Departments Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle GmbH) eingesetzt.

Ergebnisse

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl und Charakterisierung der verwendeten Misch- und Reinkulturen

4.1.1 Auswahl der methanotrophen Reinkulturen

Die methanotrophen Reinkulturen der Stammsammlung des Departments Bioremediation des UFZ Leipzig-Halle GmbH (→ Kapt. 3.1) wurden unter den Gesichtspunkten der Expression der sMMO ausgewählt. Die Verwendung der Stämme GBP 15, GBP 17, GBP 31, Ms 9 und Ms 20 erfolgte im Hinblick auf die im Grundwasser vorherrschenden Temperaturen.

4.1.2 Charakterisierung der eingesetzten Anreicherungskulturen und Isolierung von Reinkulturen

Die Umweltproben Klärschlamm und Blähschlamm zeichneten sich durch eine hohe Organismenvielfalt aus, während die Mikroorganismen der Grundwasserproben den Vorteil aufwiesen bereits an den Schadstoff MTBE adaptiert zu sein.

Nach der im Kapt. 3.3.1 beschriebenen Anreicherung wurden sieben methan-, fünf propan- und drei butanverwertende Mischkulturen isoliert, die MTBE cometabolisch mit unterschiedlichen Effizienzen abbauten (→ Tab. 13 und 14).

Tab. 13: Isolierte methanverwertende Anreicherungskulturen

Tab. 15: Isolierte methanverwertende Anreicherungskulturen							
Parameter	Methanverwertende Anreicherungskulturen						
	Ks B	Ks C	Ks D	Ks E	Ks F	GW 39	GW 7
Herkunft	Klärschlamm der Kläranlage Leipzig-Rosental					Grundwasserproben vom Standort Leuna	
Wachstumssubstrat	Methan						
durchschnittliche sMMO-Aktivität [nmol/mg*h]	56,5	70,0	62,8	88,2	94,2	95,9	60,1
MTBE-Abbau ¹ [mg MTBE/g BTS*h]	0,8	2,1	1,7	1,9	2,1	1,4	1,4

Anmerkung: ¹ MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen nach Schema A (Aktivierung der Kulturen durch Anzucht auf Methan).

Ergebnisse

Tab. 14: Isolierte propan- und butanverwertende Anreicherungskulturen

Parameter	Propanverwertende Anreicherungskulturen					Butanverwertende Anreicherungskulturen		
	Ks 1:2	Ks 1:5	KV 3.2	G 7	Bs D	Buti A	Buti B	Buti KS
Herkunft	Klärschlamm			Grundwasser	Blähschlamm			Klärschlamm
Wachstumssubstrat	Propan					Butan		
dominante Bakterien	Stäbchen				Diplokokken	Kurzstäbchen, Hyphen		Stäbchen
MTBE-Abbau ¹ [mg MTBE/g BTS*h]	2,8	4,5	3,3	1,0	6,6	4,2	3,3	2,0

Anmerkung: ¹ MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen nach Schema A (Aktivierung der Kulturen durch Anzucht auf Propan bzw. Butan).

Aus diesen Anreicherungskulturen konnten vier methanotrophe Reinkulturen, fünf propan- und drei butanverwertende Stämme isoliert werden. Von diesen isolierten Stämmen, dargestellt in Tab. 15, erwiesen sich die Stämme B12, K152 und BU3 als am besten geeignet für die Zielstellung des Projektes.

Tab. 15: Mikro- und makromorphologische Charakterisierung der isolierten methan-, propan- und butanverwertenden Reinkulturen

Butan-verwertenden Kulturen					
Kultur	isoliert aus	verwertende Kohlenstoff- quelle	Makromorphologie	Mikro- morphologie/ Größe (l x b [µm])	MTBE- Abbau [mg MTBE/g BTS*h]
GW 7-1	GW Leuna	Methan	weiße Kolonien, glatter Rand	Stäbchen (1,0-1,9 x 0,5-0,6)	0,7
GW 39-2			weiße unregelmäßige Kolonien; glatter Rand	Kurzstäbchen (1,2-1,4 x 0,6-0,7)	0
Ks C-1	Klär- schlamm		orange Kolonien; glatter Rand	dicke Stäbchen (1,5-1,8 x 0,6-0,9)	0,9
Ks F-1			beige Kolonien; glatter Rand	Stäbchen (1,4-1,7 x 0,7-0,8)	0,6
K152		Propan	beige flache Kolonien; glatter Rand	Stäbchen (1,5-1,9 x 0,5-0,7)	4,2
K153	beige Kolonien; glatter Rand		Stäbchen (2,5-2,8 x 0,6-0,7)	1,1	
B12	Bläh- schlamm	Propan	weiße Kolonien; glatter Rand	Stäbchen (1,3-1,7 x 0,6-0,8)	1,7
BU3		Butan	orange - rote Kolonien; unregelmäßiger Rand	Kurzstäbchen, Hyphen	7,2
Bu B2			weiße unregelmäßige Kolonien, körnige Oberfläche	Kokken	1,2

Anmerkung: Kultivierungsbedingung für mikro- und makromorphologische Untersuchung waren: Inkubation auf NMS-Medium für 3 - 4 Tage (B12, K152, K153, BU3, Bu B2) bzw. auf kupferfreiem NMS-Medium für 7 - 10 Tage (GW 7-1, GW 39-2, Ks C 1, Ks F 1), T= 30°C. MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen nach Schema A (Aktivierung durch Anzucht auf Methan, Propan bzw. Butan).

Ergebnisse

4.1.3 Charakterisierung und Identifizierung der Stämme BU3, B12 und K152

Bei der Charakterisierung und Identifizierung der drei Stämme BU3, B12 und K152 wurde neben den klassischen Methoden (morphologische und physiologische Merkmale) besonderer Wert auf molekularbiologische Techniken gelegt. Die morphologischen Eigenschaften sind in Abb. 8 und Tab. 15 dargestellt.

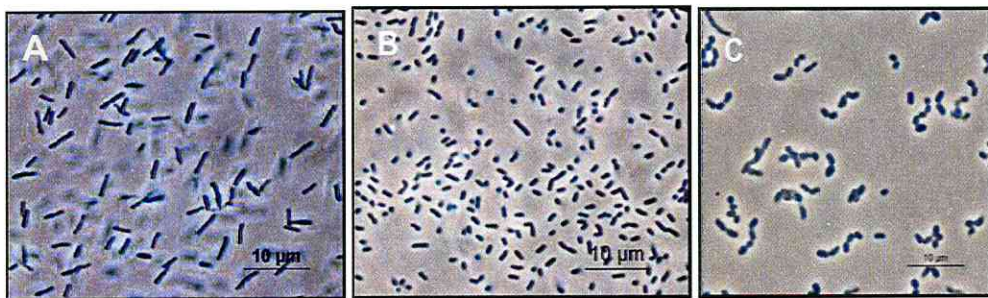


Abb. 8: Mikroskopische Aufnahmen der Stämme B12 (A), K152 (B) und BU3 (C), (Phasenkontrast, 1000-fache Vergrößerung. Anzucht der Stämme 3 - 4 Tage, NMS-Medium, Wachstumssubstrat Propan, T= 30°C)

Bei dem Stamm BU3 konnte während des Wachstumes ein morphogenetischer Zellzyklus nachgewiesen werden. Bei diesem entwickelten sich aus Kurzstäbchen (Abb. 9-A) Hyphen (Abb. 9-B), die sich zum Teil verzweigten (Abb. 9-C). Durch eine sich anschließende Fragmentation wurde die nächste Generation der Kurzstäbchen gebildet.

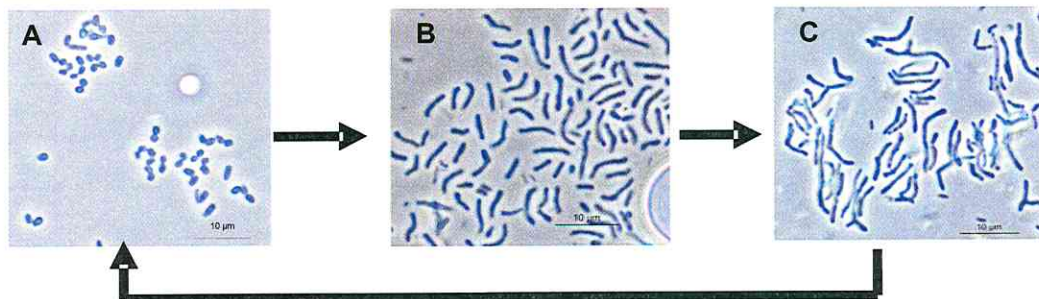


Abb. 9: Mikroskopische Aufnahme des morphogenetischen Zellzyklus des Stammes BU3 (Phasenkontrast, 1000-fache Vergrößerung, Anzucht NMS-Medium, Wachstumssubstrat 1-Propanol, T= 30°C).

Ergebnisse

Mithilfe der miniaturisierten Testsysteme (BIOLOG-Microlog, API-System), der Bestimmung des Gram-Verhaltens und dem Nachweis der Enzyme Oxidase und Katalase erfolgte eine biochemische Charakterisierung der drei Stämme und eine Identifizierung auf Gattungsebene (→ Tab. 16).

Tab. 16: Mikro-, Makromorphologie, biochemische Charakterisierung und Identifizierung der Stämme K152, B12 und BU3

Merkmale	K152	B12	BU3
Herkunft	Klärschlamm	Blähschlamm	
Kolonieform	oval, flach	rund-oval, konvex	rund
Koloniefarbe	beige	weiß	orange - rot
Koloniegröße	0,5 - 1,0 cm	0,1 - 0,5 cm	0,8 - 1,5 cm
Kolonierand	glatt	glatt	unregelmäßig
Bakterienform	Kurzstäbchen	Stäbchen	Kurzstäbchen, Hyphen
GRAM	negativ	positiv	positiv
Oxidase	negativ	negativ	negativ
Katalase	positiv	positiv	positiv
Kohlenstoffverwertungsspektrum	(→ Anhang Tab. A-3)		
Identifizierung mit BIOLOG-/API- Testsystemen	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp.
Identifizierung mittels 16S-rRNA Sequenzierung	β-Proteobacterium	<i>Mycobacterium mageritense</i>	<i>Rhodococcus ruber</i>

Anmerkung: Die mikro- und makromorphologische Untersuchung erfolgte nach Inkubation der Stämme auf NMS-Medium (Wachstumssubstrat Propan) bei 30°C für 3 - 4 Tage.

Die Anwendung molekularbiologischer Techniken, wie der 16S-rRNA Sequenzierung, ermöglichte die Identifizierung der Stämme und die Erstellung eines taxonomischen Stammbaumes (Abb. 10). Der Stamm BU3 wurde als *Rhodococcus ruber* und der Stamm B12 als *Mycobacterium mageritense* identifiziert. Der Stamm K152 wurde der Klasse der *Burkholderiales* zugeordnet mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zum Bakterium *Ideonella dechloratans*.

Ergebnisse

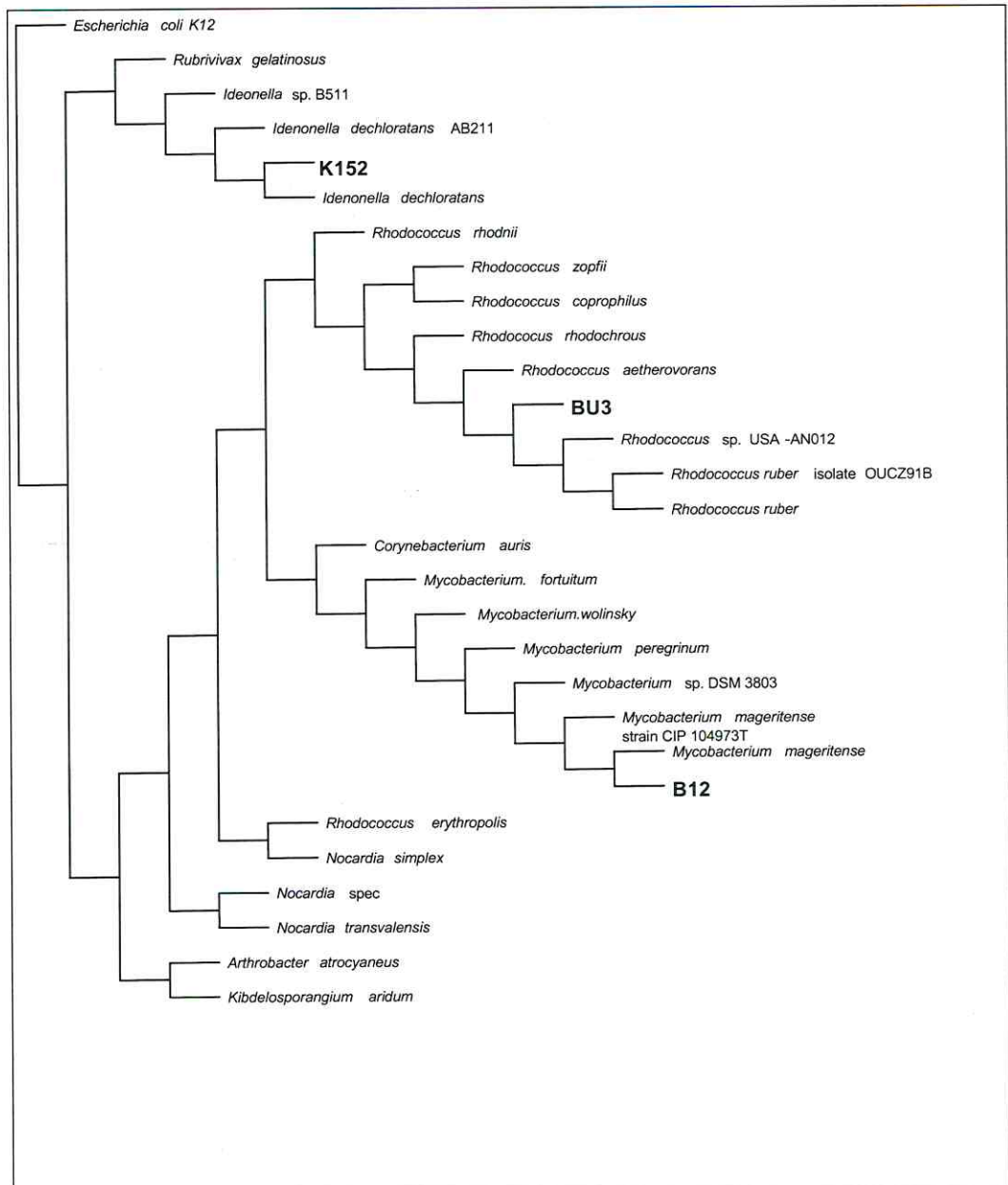


Abb. 10: Taxonomischer Stammbaum der Stämme B12, BU3, K152 (erstellt mit Phylip 3.6 (DNAist, Fitch, Consense), grafische Darstellung: Treeview).

4.2 Wachstumsuntersuchungen der selektierten Anreicherungs- und Reinkulturen

4.2.1 Wachstumsversuche der methanverwertenden Kulturen

In folgenden Versuchen wurde das Wachstum der selektierten methanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen hinsichtlich der Parameter Wachstumsraten und der Expression hoher sMMO-Aktivitäten untersucht. Die maximalen sMMO-Aktivitäten der Kulturen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase gemessen (Tab. 17).

Tab. 17: Maximale Wachstumsraten, sMMO-Aktivitäten und der Zeitpunkt der max. sMMO-Aktivität der methanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen (kupferfreies NMS-Medium, Wachstumssubstrat Methan, T= 30°C)

Kultur	max. Wachstums- rate [h ⁻¹]	Zeitpunkt der maximalen sMMO-Aktivität [h]	max. sMMO-Aktivität [nmol /mg*h]
methanotrophe Reinkulturen			
GB 14	0,06	18	140,6
GB 18	0,04	16	140,1
GB 19	0,02	3	30,0
GB 20	0,06	4	25,8
GBP 15	0,03	30	90,0
GBP 17	0,02	30	139,6
GBP 31	0,02	14	187,6
Ms 9	0,02	7	190,2
Ms 20	0,02	6	194,3
methanverwertende Anreicherungskulturen			
GW 39	0,04	24	101,7
GW 7	0,02	3	64,2
Ks C	0,03	30	67,9
Ks F	0,04	17	96,0

Anmerkung: Kulturen GBP 15, GBP 17, GBP 31, Ms 9, Ms 20 wurden bei 20°C inkubiert.

Die Kultur Ks C (Abb. 11) wuchs auf Methan mit einer maximalen Rate von 0,03 h⁻¹ und erreichte nach 30 Stunden ihre maximale sMMO-Aktivität (67,9 nmol/mg*h).

Ergebnisse

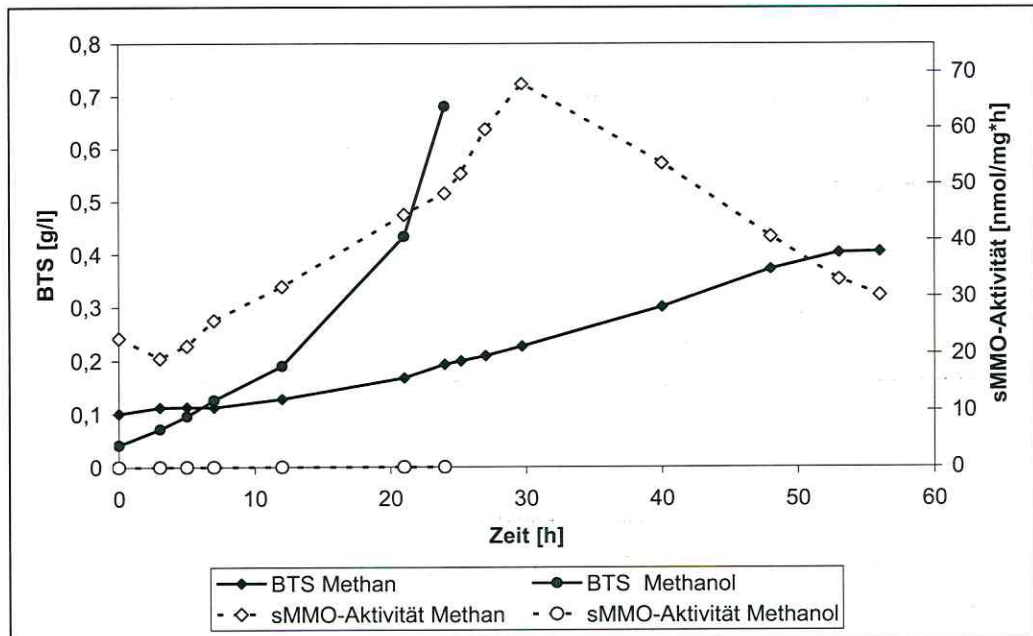


Abb. 11: Wachstumskurve der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C mit paralleler Bestimmung der sMMO-Aktivität ($T = 30^{\circ}\text{C}$, Wachstumssubstrate Methan bzw. Methanol, Versuch mit Methanol nach 24 h abgebrochen)

Die maximalen Wachstumsraten der methanverwertenden Anreicherungskulturen (Tab. 17 unterer Teil) lagen in den Schüttelkolbenversuchen in Größenordnungen von $0,02\text{ h}^{-1}$ - $0,04\text{ h}^{-1}$ und unterschieden sich somit kaum von denen der methanotrophen Reinkulturen.

Bei Wachstumsversuchen unter Verwendung von Methanol ($c_{\text{Methanol}} = 1,6\text{ g/l}$) als Kohlenstoffquelle wurde eine Vervierfachung der maximalen Wachstumsrate von $0,03\text{ h}^{-1}$ (methan-gewachsene Zellen) auf $0,12\text{ h}^{-1}$ (methanolgewachsene Zellen) gemessen (Abb. 11). Es konnte jedoch während des gesamten Versuchszeitraumes keine sMMO-Aktivität nachgewiesen werden. In Untersuchungen der Abhängigkeit der Stabilität der sMMO von verschiedenen Substanzen wurde beobachtet, dass bei der Zugabe von $1,6\text{ g/l}$ Methanol die sMMO-Aktivität der Kultur Ks C innerhalb von 2 Stunden von $179\text{ nmol/mg}\cdot\text{h}$ auf $30\text{ nmol/mg}\cdot\text{h}$ sank, während bei der Kontrollprobe (ohne Zugabe von Methanol) nur eine Verringerung der sMMO-Aktivität auf $95\text{ nmol/mg}\cdot\text{h}$ festgestellt wurde ($\rightarrow$ Anhang Tab. A-4). Die ausgewählten methanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen ($\rightarrow$ Kapt. 4.1.1 und Kapt. 4.1.2) waren nicht in der Lage, MTBE oder TBA als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten.

4.2.2 Wachstumsversuche der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen

Für die Wachstumsuntersuchungen der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen war im Gegensatz zu den methanverwertenden Kulturen eine Auswahl des Kulturmediums erforderlich. Der Vergleich der maximalen Wachstumsraten auf den zur Verfügung stehenden Kulturmedien (→ Kapt. 3.2) zeigte, dass das NMS-Medium am besten geeignet war (Tab. 18). Von einer Verwendung des Mediums nach Starostina wurde aufgrund der Komplexität der Substanzen Hefeextrakt und Pepton und dem daraus entstehenden verringerten Selektionsdruck der Wachstumssubstrate (Alkane, Alkohole) abgesehen.

Tab. 18: Maximale Wachstumsraten der Stämme BU3, K152 und B12 bei Anzucht auf verschiedenen Kulturmedien (Wachstumssubstrat: 1,6 g/l 1-Propanol, T= 30°C)

Kulturmedien	maximale Wachstumsrate [h ⁻¹]		
	BU3	K152	B12
kupferfreies NMS-Medium	0,08	0,06	0,05
NMS-Medium	0,20	0,16	0,10
Medium nach Starostina	0,19	0,16	0,11

Eine Erhöhung der maximalen Wachstumsraten der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen von 1,7-fach bis 2,5-fach wurde bei der Verwendung von Alkoholen als Wachstumssubstrat im Vergleich zu Alkanen beobachtet (Tab. 19).

Tab. 19: Maximale Wachstumsraten der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen bei Anzucht auf NMS-Medium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Wachstumssubstrat Propan, Butan (50% Alkan-Luftgemisch), 1-Propanol bzw. 2-Butanol (c= 1,6 g/l), T= 30°C)

Anreicherungskultur	maximale Wachstumsraten [h ⁻¹]			
	Propan	Butan	1-Propanol	2-Butanol
Ks 1:2	0,05	k. A.	0,11	k. A.
Ks 1:5	0,07		0,12	
Kv 3.2	0,04		0,10	
Bs D	0,04		0,10	
Bs B	0,06		0,11	
Buti Ks	k. A.	0,07	k. A.	0,08
Buti A		0,06		0,12
Buti B		0,04		0,10

Eine Verwertung von MTBE oder TBA als Wachstumssubstrat wurde wie bei den methanverwertenden Kulturen nicht nachgewiesen.

Ergebnisse

4.2.3 Wachstumsversuche der Stämme B12, K152 und BU3

Bei den Wachstumsversuchen der drei isolierten Reinkulturen B12, K152, BU3 wurde neben der Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen besonderer Wert auf das Upscaling des Wachstumsprozesses in verschiedene Maßstäbe (100 ml; 300 ml; 5 l und 50 l) gelegt.

Des Weiteren war die Gewinnung von Kulturen mit maximaler Enzymaktivität Hauptaufgabe der Untersuchungen.

Die Wachstumsversuche der drei Stämme auf verschiedenen Kohlenstoffquellen ergaben ähnliche Ergebnisse (Tab. 18) wie bei den propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen. Der Stamm BU3 wuchs 2,9-mal schneller auf 1-Propanol ($\mu_{\max} = 0,16 \text{ h}^{-1}$) als auf Propan ($\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$).

Eine zusammenfassende Übersicht der Resultate ist in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Maximale Wachstumsraten der Stämme B12, BU3 und K 152 bei Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Propan bzw. Butan (50% iges Alkan-Luftgemisch), 1-Propanol, 2-Propanol bzw. 2-Butanol ($c = 1,6 \text{ g/l}$), MTBE, TBA und HIBA ($c = 30 \text{ mg/l}$), $T = 30^\circ\text{C}$, NMS-Medium).

Wachstumssubstrate	maximale Wachstumsraten [h^{-1}]		
	BU3	B12	K152
Propan	0,07	0,06	0,06
Butan	0,06	0,05	0,11
1-Propanol	0,20	0,10	0,16
2-Butanol	0,18	0,14	0,08
2-Propanol	0,17	k. A.	k. A.
MTBE, TBA, HIBA	0	0	0

Die optimale Konzentration des Wachstumssubstrates 1- bzw. 2-Propanol lag bei $1,6 \text{ g/l}$ (1-Propanol → Abb. 12), (Ergebnisse 2-Propanol nicht dargestellt).

Für den Stamm BU3 wurde zusätzlich 2-Propanol als Kohlenstoffquelle ausgewählt, welches zwar niedrigere Wachstumsraten im Vergleich zu 1-Propanol aufwies (→ Tab. 20), aber von den autochthonen Bakterien des Projektstandortes Leuna schlechter verwertet wurde (→ Kapt. 4.5.1) und somit in Bezug auf den Feldversuch einen Vorteil aufwies.

Ergebnisse

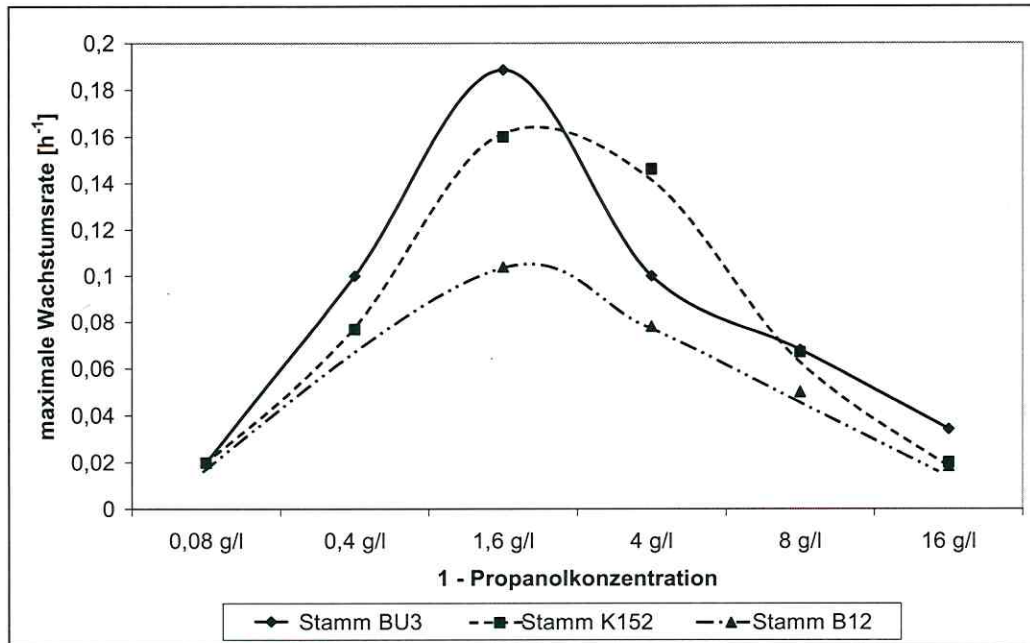


Abb. 12: Einfluss verschiedener 1-Propanolkonzentrationen auf das Wachstum der Stämme BU3, K152 und B12 (T= 30°C, NMS-Medium).

Weiterhin wurde gezeigt, dass neben Nitrat auch Ammonium als Stickstoffquelle eingesetzt werden konnte, ohne dass ein negativer Einfluss auf die maximalen Wachstumsraten der Kulturen zu verzeichnen war (Tab. 21).

Tab. 21: Maximale Wachstumsraten der Stämme B12, K152 und BU3 bei Verwendung von Natriumnitrat (850 mg/l NaNO₃) bzw. Ammoniumsulfat (600 mg/l NH₄SO₄) als Stickstoffquelle (Kohlenstoffquelle: 1,6 g/l 1- Propanol, T= 30°C).

Kulturmedium/ Stickstoffquelle	maximale Wachstumsrate [h ⁻¹]		
	BU3	K152	B12
NMS-Medium/ Nitrat	0,20	0,17	0,13
AN-NMS-Medium/ Ammonium	0,20	0,16	0,12

Die Ernte aktiver Kulturen mit hoher Monooxygenase-Aktivität bildete die Grundvoraussetzung für einen effektiven cometabolischen MTBE-Abbau. Während die Bestimmung der substrat-abhängigen Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit mehrfach in der Literatur als Maß für Monooxygenase-Aktivität beschrieben wurde (Arp 1999; Beck 2000; Goswami et al. 1999), wurde der Kurzzeit-MTBE-Abbautest zunächst validiert (→ Abb. 13).

Ergebnisse

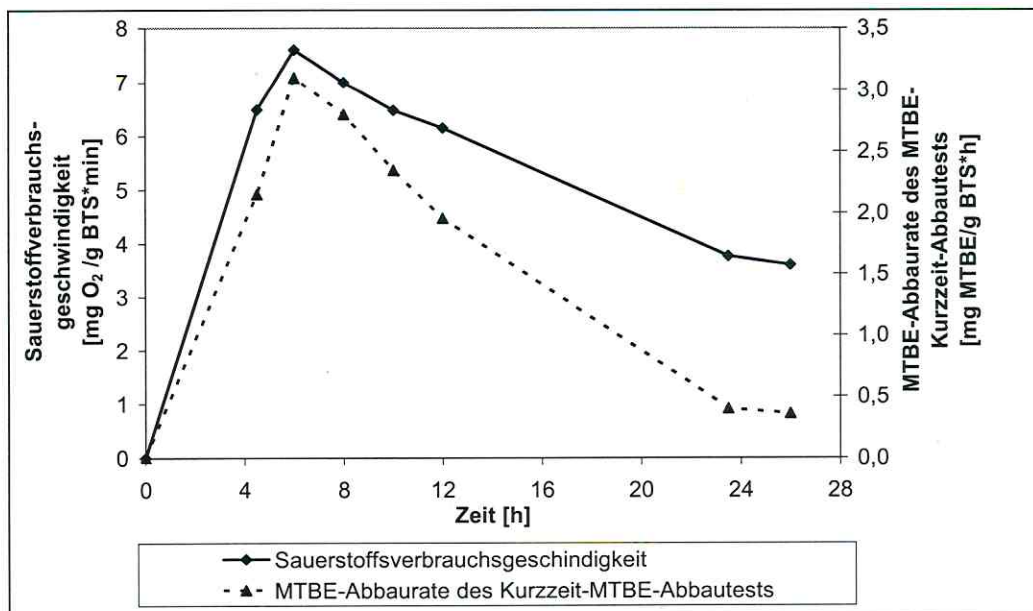


Abb. 13: Aktivität der Monooxygenase des Stammes BU3 bestimmt über die Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und den Kurzzeit-MTBE-Abbautests T= 30°C, NMS-Medium, Wachstumssubstrat: 1-Propanol).

Der parallele Verlauf der Kurven der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und des Kurzzeit-MTBE-Abbautests (Abb.13) belegten, dass beide Methoden zur indirekten Messung der Monooxygenase-Aktivität anwendbar sind. Der Begriff der Enzymaktivität im Zusammenhang mit propan- und butanverwertenden Kulturen wurde definiert als Aktivität der Monooxygenase, bestimmt über die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit oder den Kurzzeit-MTBE-Abbautest. Die Ergebnisse der Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes der Kulturen BU3, B12 und K152 mit maximaler Enzymaktivität nach Anzucht auf Propan, 1-Propanol und Natriumacetat sind in Tab. 22 dargestellt.

Tab. 22: Erntezeitpunkte und maximale Enzymaktivitäten der Stämme BU3, K152 und B12 (T= 30°C, NMS-Medium, Wachstumssubstrat : 50% Propan-Luftgemisch, 1,6 g/l 1- bzw. 2-Propanol, 1,0 g/l Natriumacetat).

Wachstums-substrat	optimale Erntezeitpunkt der Kulturen in [h] mit maximaler Enzymaktivität in [mg MTBE/ g BTS*h]					
	BU3		K152		B12	
	Ernte-zeitpunkt	Enzym-aktivität	Ernte-zeitpunkt	Enzym-aktivität	Ernte-zeitpunkt	Enzym-aktivität
Propan	2	7,1	2	4,0	2	1,5
1-Propanol	6	3,1	6	2,0	6	1,0
2-Propanol	6	2,3	6	1,0	k. A.	k. A.
Natrium-acetat	6	1,7	keine Enzymaktivität		6	0,5

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass nach Anzucht auf Propan die maximale Enzymaktivität bereits nach zwei Stunden und mit höheren Werten erreicht wurde als nach Anzucht auf Propanol und Natriumacetat.

4.2.4 Upscaling der Wachstumsprozesse der Stämme BU3, K152 und B12

Ziel des Upscalings der Wachstumsprozesse der Kulturen war es, ausreichend aktive Biomasse der Kultur mit hohen Enzymaktivitäten für die MTBE-Abbauversuche in den kleintechnischen Säulen und im Feldversuch zur Verfügung zu stellen. Alle Fermentationen wurden als *fed-Batch* Prozesse unter Verwendung der Wachstumssubstrate 1- bzw. 2-Propanol durchgeführt. Propan als Wachstumssubstrat besaß durch höhere maximale Enzymaktivitäten und kürzere Aktivierungszeiten Vorteile gegenüber Propanol, konnte aber aufgrund fehlender sicherheitstechnischer Voraussetzungen bei den Fermentationen nicht eingesetzt werden. Das Upscaling der Wachstumsprozesse wird am Beispiel des Stammes BU3 beschrieben (Tab. 23, Abb. 14-17).

Tab. 23: Parameter der Wachstumsversuche des Stammes BU3 im 100 ml- Schüttelkolben, 300 ml-, 5 l- und 50 l- Fermenter

Parameter	100 ml-Schüttelkolben		300 ml-Fermenter	5 l-Fermenter		50 l-Fermenter
	1-Propanol	2-Propanol	1-Propanol	1-Propanol	2-Propanol	
$\mu_{\max}$ [h ⁻¹]	0,20	0,17	0,20	0,19	0,17	0,12
max. erreichte BTS-Konzentration X [g/l]	1,0	0,7	2,5	4,8 **	3,0 *	9,6
Versuchsdauer	24 h	24-30 h	30 h	30 h	30 h	5 Tage ***
$a_X^{1-\text{Propanol}}$ [g 1-Propanol/g BTS]	2,8	k. A.	3,1	2,0	2,2	2,16
$a_X^{\text{Nitrat-N}}$ [mg Nitrat-N/g BTS]	115,2	k. A.	116,3	114,4	112,8	112,6
a_X^{Phosphat} [mg Phosphor/g BTS]	k. A.	k. A.	k. A.	19,0	k. A.	16,2
Zeitpunkt der maximalen Enzymaktivität	6 h	6 h	6 h	6 h	5,5 h	5 - 6 h

Anmerkung: * Fermentation wurde nach Erreichen von 3 g/l BTS-Konzentration abgebrochen und die Kultur für die MTBE-Abbauversuche in kleintechnischen Säulen verwendet.

** inklusive des Verdünnungsschritt nach 12 h im Verhältnis 1:1;

*** Die Fermentation lief jeweils 8-10 h, anschließend wurde die Kultur im Verhältnis 1:1 verdünnt

Im 1 l-Schüttelkolben konnte der Stamm BU3 mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,2 h⁻¹ (Wachstumssubstrat 1-Propanol) bis zu einer BTS-Konzentration von 1 g/l angezogen werden. Durch eine gezielte Überwachung der Messparameter (Online-Messungen der Gelöstsauerstoffkonzentration und des pH-Wertes) sowie einer Regulierung der Sauerstoffkonzentration über Begasungsmenge und Rührergeschwindigkeit wurde im

Ergebnisse

300 ml-Fermenter die Biomassekonzentration zum Versuchsende auf 2,5 g/l gesteigert. Der berechnete Substratverbrauchswert, bezogen auf 1-Propanol, betrug 3,05 g_{1-Propanol}/g BTS. Als Inokulumkultur für die Fermentationen im 5 l-Fermenter wurden im Schüttelkolben angezogene Kulturen des Stammes BU3 verwendet. Der zeitliche Verlauf einer solchen Fermentation ist in Abb. 14 dargestellt.

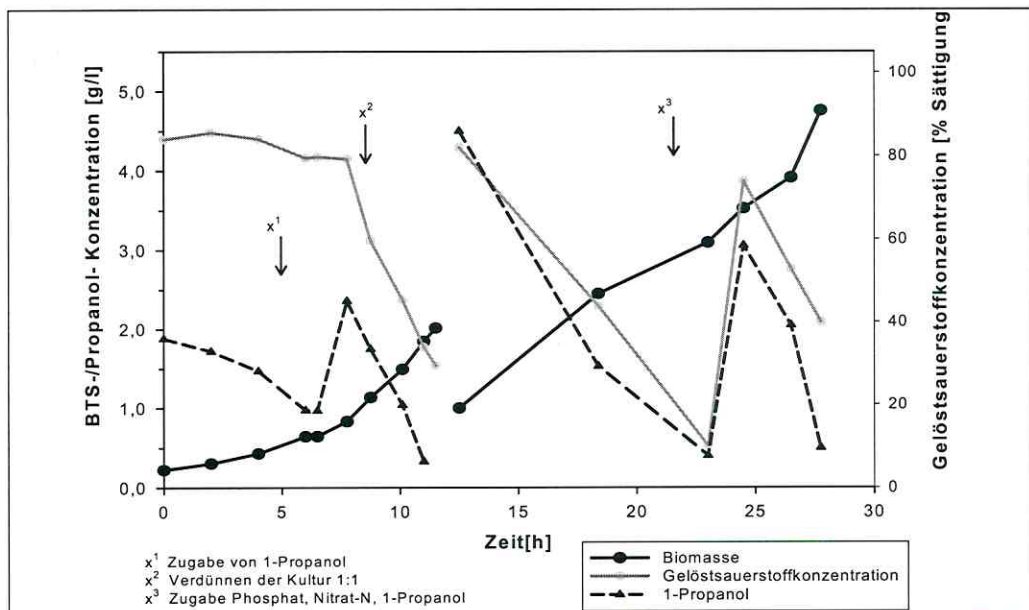


Abb. 14: Fermentation des Stammes BU3 im 5 l Fermenter mit 1-Propanol als Wachstumssubstrat (T= 30°C; pH = 7,5; r= 400 rpm; Luftbegasung = 2 l/ min)

In den ersten elf Stunden der Fermentation wuchs die Kultur mit einer maximalen Wachstumsrate von 0,19 h⁻¹. Die Verbrauchswerte für 1-Propanol lagen im Gegensatz zur Fermentation im 300 ml-Fermenter (3,1 g_{1-Propanol}/g BTS) bei 2,0 g_{1-Propanol}/g BTS. Das deutet daraufhin, dass in den 300 ml-Fermentern die Versuchsbedingungen noch nicht optimal eingestellt waren (z.B. Rührerdrehzahl, Eintrag von Sauerstoff). Nach elf Stunden wurde die Kultur 1:1 mit Fermentermedium verdünnt und das entnommene Aliquot als Impfmateriel für die MTBE-Abbauversuche in den kleintechnischen Säulen eingesetzt (siehe Kapitel 4.3.2). Die maximale Enzymaktivität, ermittelt über die Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit, wurde nach sechs Stunden mit 5,2 mg O₂/g BTS*min bei einer BTS-Konzentration von 0,65 g/l gemessen (→ Abb. 15). Nach elf Stunden wies die Enzymaktivität (5,15 mg O₂/g BTS*min) immer noch hohe Werte auf, parallel dazu war die BTS-Konzentration auf 1,9 g/l gestiegen, woraufhin die Kultur geerntet wurde. Die zeitverzögerte Auswertung der Kurzzeit-MTBE-

Ergebnisse

Abbauteests zeigte jedoch, dass zu diesem Zeitpunkt die Enzymaktivität der Kultur bereits wieder gesunken war. Beim Vergleich der zwei indirekten Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde im vorliegenden Fall eine zeitliche Verschiebung des Maximums der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit festgestellt (→ Abb. 15).

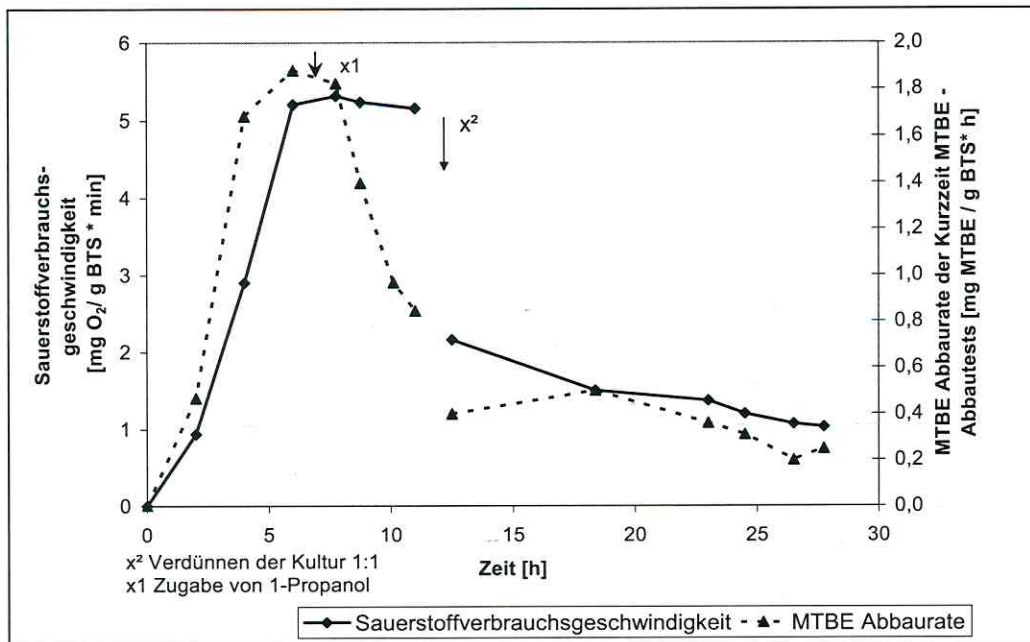


Abb. 15: Bestimmung der Enzymaktivität der Kultur BU3 während der Fermentation im 5 l-Fermenter mit 1-Propanol als Wachstumssubstrat (T= 30°C; pH = 7,5; r= 400 rpm; Luftbegasung = 2 l/ min)

In weiteren Versuchen mit dem Stamm BU3 wurde die Methode der zweistufigen Fermentation etabliert. Gleichzeitig konnten mit dieser Methode Kulturen mit großer Biomassekonzentration u. hoher Enzymaktivität gewonnen werden. Die gemessenen Parameter dieser Fermentation sind in Tab. 24 und Abb. 16 dargestellt.

Ergebnisse

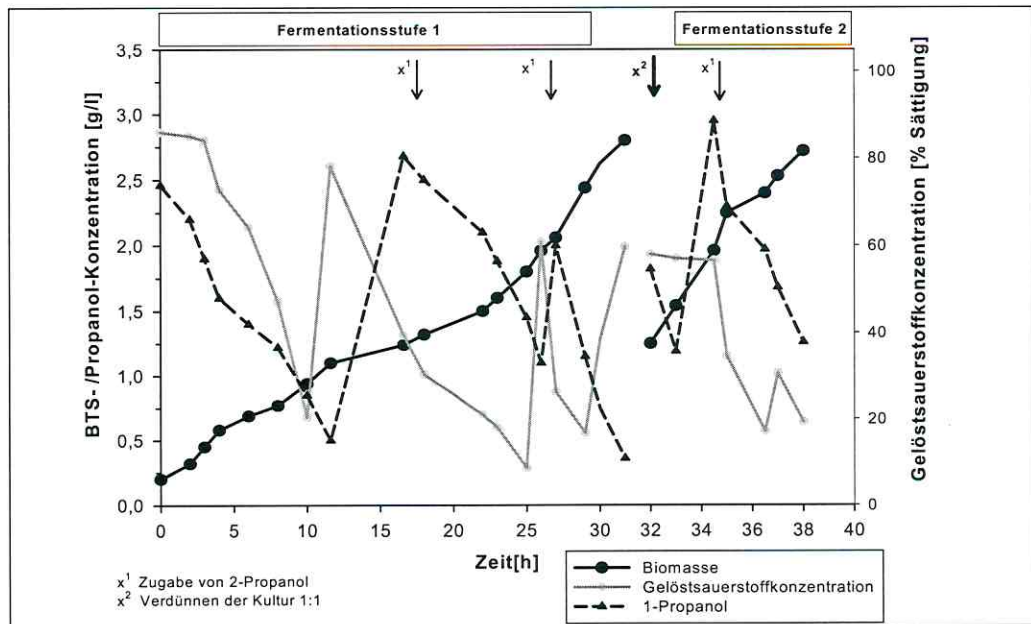


Abb. 16: Zweistufige Fermentation des Stammes BU3 im 5 l-Fermenter mit 2-Propanol als Wachstums-
substrat ($T = 30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,5$; $r = 400 \text{ rpm}$; Luftbegasung = 2 l/min ; $C_{2\text{-Propanol}} = 1,6 \text{ g/l}$)

In der ersten Stufe der Fermentation lag die maximale Wachstumsrate des Stammes BU3 bei $0,17 \text{ h}^{-1}$. Nach Erreichen einer Biomassekonzentration von $3,0 \text{ g/l}$ nach 29 Stunden wurde die Kultur im Verhältnis 1:1 mit Fermentermedium verdünnt. In der zweiten Stufe der Fermentation erfolgte die Aktivierung der Monooxygenase, die zwischen der 30. und 38. Stunde parallel mittels Kurzzeit-MTBE-Abbautests und der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit bestimmt wurde ($\rightarrow$ Abb. 17). Nach sechs Stunden wurde eine maximale Enzymaktivität von $6,2 \text{ mg O}_2/\text{g BTS}\cdot\text{min}$ bzw. $2,1 \text{ mg MTBE/g BTS}\cdot\text{h}$ gemessen.

Ergebnisse

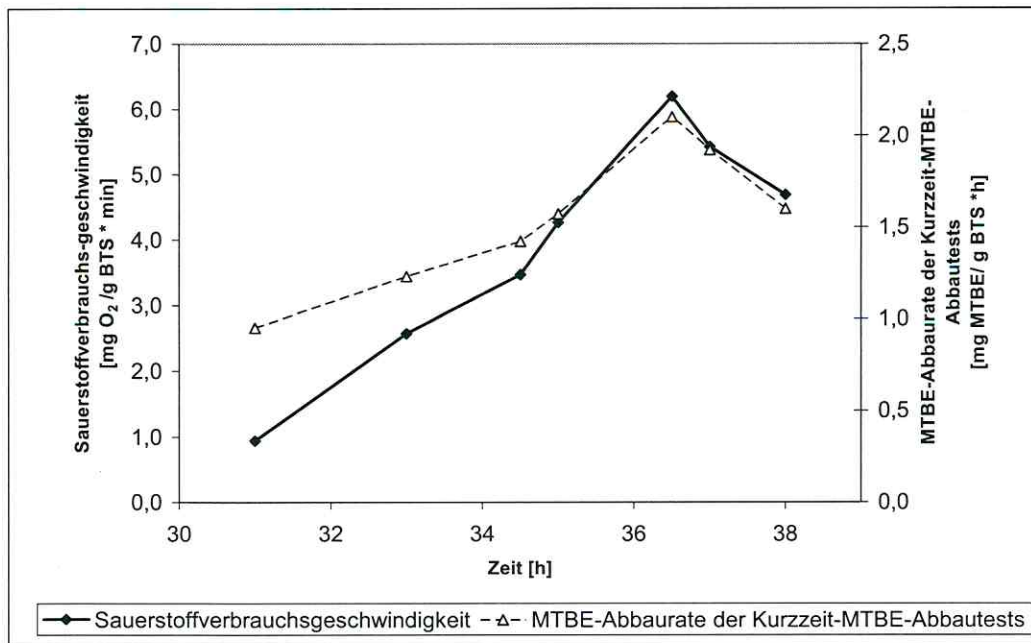


Abb. 17: Maximale Enzymaktivität der Kultur BU3 während der zweiten Stufe der Fermentation im 5 l-Fermenter mit 2-Propanol als Wachstumssubstrat ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$, $r = 400 \text{ rpm}$, Luftbegasung: 2 l/min)

Die zweistufige Fermentationsmethode kam auch bei der Anzucht des Stammes BU3 im 50 l-Fermenter zum Einsatz. Dabei konnte durch die parallele Verwendung des 5 l-Fermenters, in dem die erste Stufe der Fermentation (Anzucht auf hohe Biomassekonzentrationen) durchgeführt wurde, die Effizienz der Methode erhöht werden. Die während der Fermentation im 50 l-Fermenter bestimmten Substratverbrauchswerte für Nitrat und 2-Propanol stimmten zu 99,8% und 98,2% mit den Ergebnissen der Fermentation im 5 l-Fermenter überein. Die Biomasseausbeute im 50 l-Fermenter bezogen auf das Wachstumssubstrat 2-Propanol betrug 46,3%. Insgesamt wurden bei diesem Versuch 100 l einer Kultur des Stammes BU3 mit einer Biomassekonzentration von $7,9 \text{ g/l}$ und einer Enzymaktivität von $2,0 \text{ mg MTBE/g BTS} \cdot \text{h}$ produziert.

Neben dem Upscaling des Wachstumsprozesses des Stammes BU3 erfolgten identische Versuche mit den Stämmen K152 und B12 im 1 l-Schüttelkolben und im 300 ml-Fermenter sowie einem künstlichen Konsortium aus beiden Stämmen im Verhältnis 2:1 (B12:K152) im 5 l-Maßstab (Tab. 24).

Ergebnisse

Tab. 24: Parameter der Wachstumsprozesse der Stämme K152 und B12 im 100 ml-Schüttelkolben, 300 ml-Fermenter und des Konsortiums B12-K152 im 5 l- Fermenter.

Parameter	100 ml-Schüttelkolben		300 ml-Fermenter		5 l-Fermenter
Kultur	B12	K152	B12	K152	Konsortium B12-K152
Wachstumssubstrat	1-Propanol				
$\mu_{\max}$ [h^{-1}]	0,10	0,16	0,11	0,15	0,07
max. erreichte BTS-Konzentration X [g/l]	0,5	0,7	0,8	1,0	1,5
Versuchsdauer [h]	48	24	48	30	30
$a_X^{1\text{-Propanol}}$ [g 1-Propanol/g BTS]	k. A.	k. A.	5,2	5,6	6,1
$a_X^{\text{Nitrat-N}}$ [mg Nitrat-N/g BTS]	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	159,8
Zeitpunkt der maximalen Enzymaktivität	6 h	6 h	6 h	6 h	13 h

Bei der Fermentation im 5 l-Fermenter galt es nachzuweisen, ob das künstlich gebildete Konsortium aus den zwei Stämmen K152 und B12 Vorteile hinsichtlich des Wachstumsprozesses gegenüber den Reinkulturen besitzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten überraschenderweise eine negative Wechselwirkung zwischen den zwei Stämmen des Konsortiums. Die ermittelten Prozessparameter, dargestellt in der Tab. 24, ergaben, dass die maximale Wachstumsrate des Konsortiums mit $0,07 \text{ h}^{-1}$ geringer war als die der Einzelstämme B12 ($\mu_{\max} = 0,11 \text{ h}^{-1}$) und K152 ($\mu_{\max} = 0,16 \text{ h}^{-1}$)

(zeitlicher Verlauf → Anhang Abb. A-6). Die maximale Enzymaktivität des Konsortiums wurde erst nach dreizehn Stunden gemessen, während für die Einzelstämme bereits eine sechsstündige Anzucht der Kulturen ausreichend war.

4.3 Cometabolischer MTBE-Abbau unter Verwendung der ausgewählten methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen

In den durchgeführten Experimenten wurde das MTBE-Abbaupotenzial der isolierten methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Dazu wurde zunächst der MTBE-Abbau an ruhenden Zellen verfolgt. Diese Resultate dienen als Grundlage für komplexere Systeme (Säulenversuche im Labor- und kleintechnischen Maßstab, Feldversuch).

4.3.1 Untersuchungen des cometabolischen MTBE-Abbaues an ruhenden Zellen

Voraussetzung dafür war der Einsatz von aktiven Kulturen mit maximaler Enzymaktivität, deren Gewinnung im Kapt. 4.2 dargestellt wurde. Diese wurden mit dem cometabolischen Substrat MTBE in An-/ Abwesenheit des Wachstumssubstrates inkubiert. In den Ansätzen mit dem Wachstumssubstrat trat eine Konkurrenz zwischen dem Wachstumssubstrat und dem cometabolischen Substrat auf, die zur kompetitiven Hemmung des cometabolischen Abbaues führte, wie am Beispiel des Stammes BU3 in Abb. 18 nachgewiesen wurde.

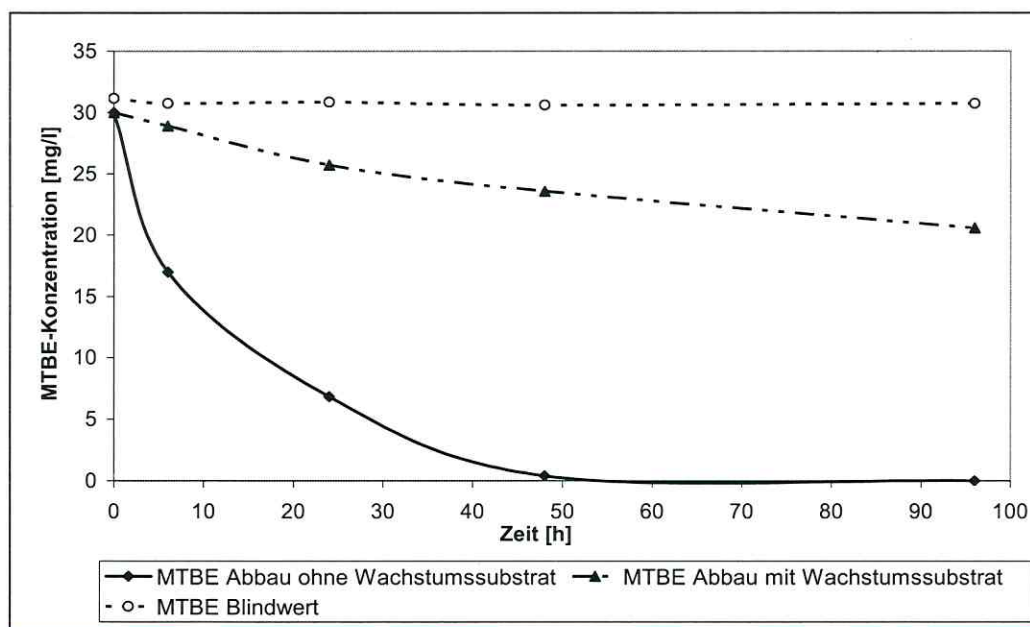


Abb. 18: Cometabolischer MTBE-Abbau des Stammes BU3 in An- und Abwesenheit des Wachstumssubstrates Propan. (Abbauversuche nach Schema A, $T = 20^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{MTBE}} = 30 \text{ mg/l}$, Wachstumssubstrat: 20 % Propan-Luftgemisch)

Ergebnisse

Im Ansatz 1 (ohne Wachstumssubstrat) betrug die maximale MTBE-Abbaurrate 6,6 mg MTBE/g BTS*h, während im Ansatz 2 (Wachstumssubstrat: 20%iges Propan–Luftgemisch) MTBE nur mit einer Rate von 0,5 mg MTBE/g BTS*h abgebaut wurde. Die Zunahme der Biomassekonzentration um 0,28 g/l im Ansatz 2 zeigte, dass der Stamm BU3 Propan als Wachstumssubstrat vorrangig metabolisierte. Im Ansatz 1 hingegen wurde über den gesamten Versuchszeitraum eine konstante Biomassekonzentration von 0,33 g/l gemessen.

4.3.1.1 Cometabolischer MTBE- und TBA-Abbau methanverwertender Anreicherungs- und Reinkulturen

Die isolierten methanverwertenden Anreicherungskulturen bauten MTBE cometabolisch nur in den ersten 60 Stunden des Versuchszeitraumes mit Raten zwischen 1,4 und 2,1 mg MTBE/g BTS*h ab (Tab. 25). In dieser Zeitspanne wurden ca. 50% der eingesetzten MTBE-Konzentration umgesetzt (Abb.19).

Tab. 25: Maximale MTBE-Abbauraten der methanverwertenden Anreicherungskulturen (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C; Wachstumssubstrat Methan)

methanverwertende Anreicherungskultur	sMMO-Aktivität zu Versuchsbeginn [nmol/mg*h]	max. MTBE-Abbaurrate [mg MTBE/ g BTS*h]
Ks C	70,5	2,1
Ks D	70,4	1,7
GW 7	99,2	1,4
GW 39	65,9	1,4
Ks F	98,2	1,8
Ks E	89,9	2,0

Der zeitliche Verlauf des cometabolischen MTBE-Abbaues durch methanverwertende Anreicherungskulturen ist am Beispiel der Kultur Ks C in Abb. 19 dargestellt.

Ergebnisse

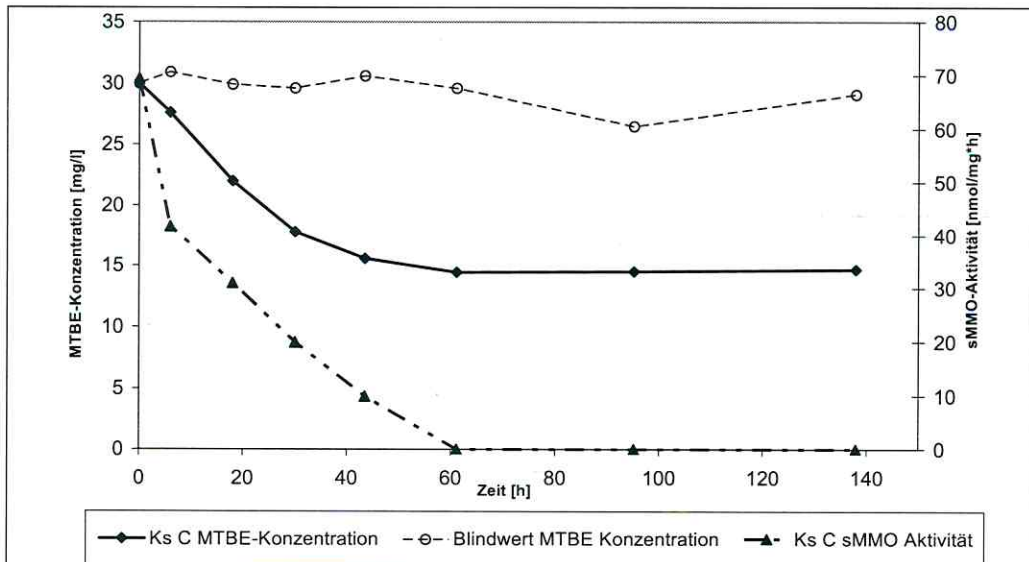


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C an ruhenden Zellen mit paralleler Bestimmung der sMMO-Aktivität ($c_{\text{MTBE}} = 30 \text{ mg/l}$, Wachstumssubstrat Methan, $T = 30^\circ\text{C}$)

Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen sMMO-Aktivität und MTBE-Abbaurrate ermittelt werden, der durch eine nichtlineare Regressionsanalyse unter Verwendung der HILL-Gleichung (Bisswanger 1979) mathematisch dargestellt wurde (Abb. 20).

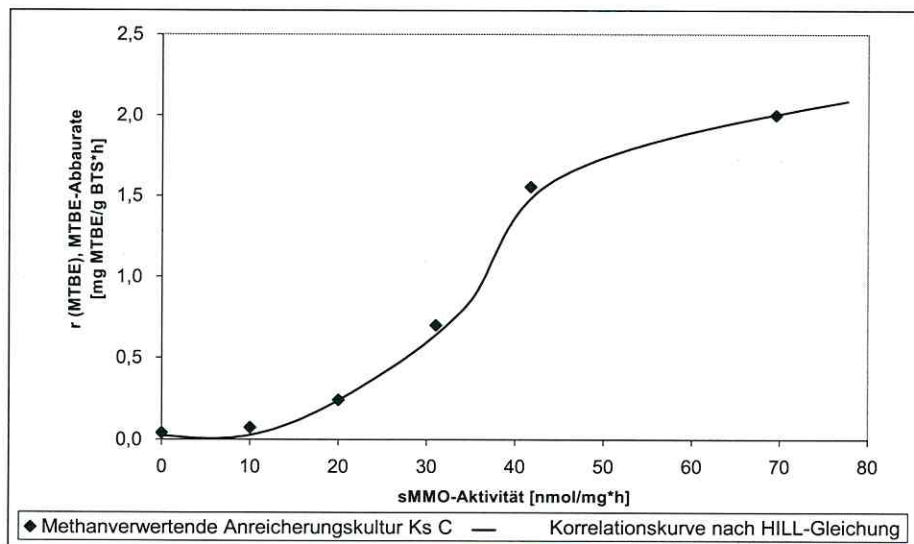


Abb. 20: Abhängigkeit der MTBE-Abbauraten von der sMMO-Aktivität der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C ($T = 20^\circ\text{C}$, Abbauprobe nach Schema A, Wachstumssubstrat Methan, $c_{\text{MTBE}} = 30 \text{ mg/l}$, verwendete Software: Table Curve 2 D)

Ergebnisse

$$r_{MTBE} = \frac{r_{\max} \times sMMO^n}{(k^n + sMMO^n)}$$

r_{MTBE} = MTBE-Abbauraten [mg MTBE/g BTS*h]

$sMMO$ = sMMO-Aktivität [nmol/mg*h]

$r_{\max}$ = 2,48 mg MTBE/g BTS*h

n (Hill-Koeffizient) = 3

k (Substratkonzentration an der 50% Sättigung erreicht sind) = 41,29

Neben dem Abbau von MTBE wurde auch TBA als Metabolit der MTBE-Oxidation durch die methanverwertenden Anreicherungskulturen abgebaut. Die maximalen Abbauraten der Kulturen für TBA (K_s C: 1,7 mg TBA/g BTS*h) waren stets geringer als die Raten des MTBE-Abbaues (K_s C: 2,1 mg MTBE/g BTS*h). Trotzdem konnte keine intermediäre TBA-Akkumulation in den Abbauversuchen der methanotrophen Anreicherungskulturen festgestellt werden. Hierbei spielte die heterotrophe Begleitflora der Anreicherungskulturen, deren Anteil bei 20% – 50% (K_s C: 35%) der Gesamtbakterien lag, eine wesentliche Rolle. Die heterotrophe Begleitflora der Kultur K_s C konnte TBA cometabolisch mit Raten von 0,8 mg TBA/g BTS*h abbauen und besaßen gleichzeitig einen positiven Einfluss auf den MTBE-Abbau der methanotrophen Bakterien, obwohl sie selbst nicht in der Lage waren, MTBE als einzige Kohlenstoffquelle oder cometabolisch abzubauen (Abb. 21).

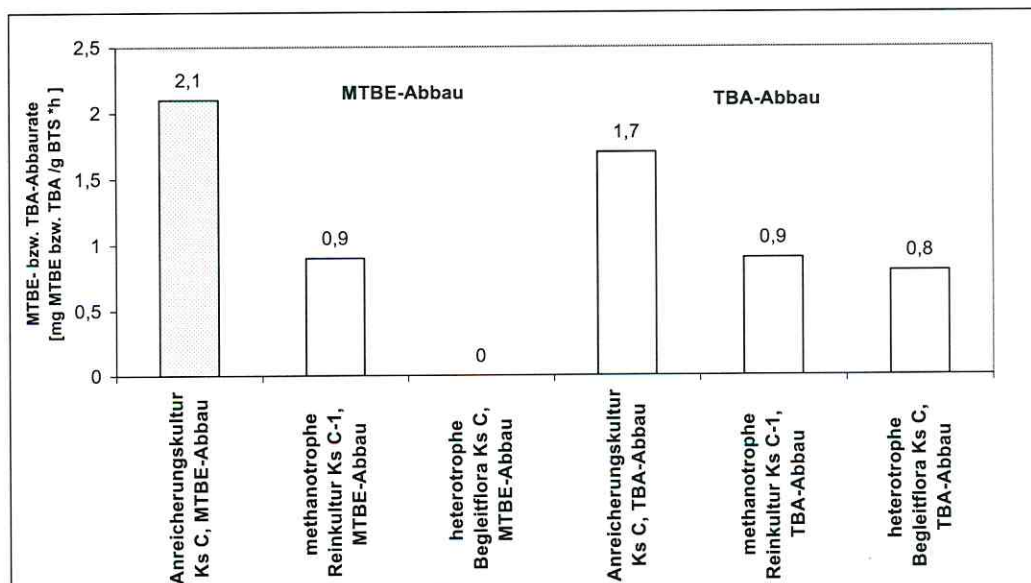


Abb. 21: MTBE- bzw. TBA-Abbauraten der Anreicherungskultur K_s C sowie der Reinkultur K_s C-1 und der heterotrophen Begleitflora der Kultur K_s C. (Abbauversuche nach Schema A, $T = 20^\circ\text{C}$)

Ergebnisse

Die aus der Stammsammlung des Departments Bioremediation ausgewählten methanotrophen Reinkulturen waren trotz hoher sMMO-Aktivitäten nicht in der Lage, MTBE cometabolisch abzubauen (Tab. 26). Hingegen besaßen vier aus den methanverwertenden Anreicherungskulturen isolierte methanotrophe Stämme ein MTBE-Degradationspotenzial (Tab. 26). MTBE wurde von diesen Stämmen mit Raten im Bereich von 0,2 - 0,9 mg MTBE/g BTS*h abgebaut, was einer 33%igen (Stamm Ks F-1) bzw. 50%igen (Stamm GW 7-1) Effizienz der Abbauraten der jeweiligen methanverwertenden Anreicherungskultur entsprach.

Tab. 26: Maximale MTBE-Abbauraten der untersuchten methanotrophen Reinkulturen (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, Versuchsdauer 120 h, $c_{\text{MTBE}} = 30 \text{ mg/l}$)

Stamm	sMMO-Aktivität zum Versuchsbeginn [nmol/g BTS* min]	maximale MTBE-Abbaurrate [mg MTBE/ g BTS*h]	
Methanotrophe Reinkulturen der Stammsammlung des Departments Bioremediation			
GB 14	149,0	0	
GB 18	145,2	0	
GBP 15	90,3	0	
GBP 17	139,5	0	
GBP 31	180,0	0	
Ms 9	187,4	0	
Ms 20	191,2	0	
Reinkulturen isoliert aus den selektierten methanverwertenden Anreicherungskulturen			
Stamm	isoliert aus	sMMO-Aktivität zum Versuchsbeginn [nmol/g BTS* min]	gemittelte maximale MTBE-Abbaurrate [mg MTBE/ g BTS*h]
GW 7-1	GW 7	165,0	0,7
GW 39-1	GW 39	79,2	0,2
GW 39-2	GW 39	96,1	0
Ks C-1	Ks C	98,6	0,9
Ks F-1	Ks F	103,5	0,6

Ergebnisse

4.3.1.2 Cometabolischer MTBE-Abbau der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen

Die untersuchten propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen bauten MTBE mit höheren maximalen Raten ab als die methanverwertenden Kulturen (siehe Tab. 27).

Tab.27: Maximale MTBE-Abbauraten der propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen nach Anzucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, $C_{MTBE} = 30 \text{ mg/l}$)

Wachstums- substrat	maximale MTBE-Abbauraten [mg MTBE/g BTS*h]							
	Ks 1:2	Ks 1:5	Kv 3.2	Bs D	G 7	Buti A	Buti B	Buti Ks
Propan	2,8	4,5	3,3	6,6	1,9	4,2	k. A.	k. A.
Butan	2,4	1,0	0	0,6	k. A.	4,2	3,3	2,0
1-Propanol	1,4	1,8	1,2	4,0	0,8	2,0	0	1,3
2-Butanol	0	1,5	0	2,4	k. A.	1,0	0	0,6
Natriumacetat	0	0	0	2,3	0	1,01	2,2	2,3
Aceton	0	0	0	0,9	0	1,3	2,0	1,2

Der Vergleich der MTBE-Degradationsraten dieser Anreicherungskulturen zeigte, dass auf Alkanen gewachsene Kulturen MTBE mit höheren Raten abbauen als bei der Verwendung von Alkoholen. Die Kulturen Bs D, Buti A, Buti B und Buti Ks konnten neben Alkanen und Alkoholen auch Natriumacetat und Aceton als Wachstumssubstrat für den cometabolischen MTBE-Abbau nutzen.

4.3.1.3 Einfluss der Kulturen auf die Effizienz des cometabolischen MTBE-Abbaues

Durchgeführte Vergleichsuntersuchungen des cometabolischen MTBE-Abbaues mit den methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen zeigten, dass die Effizienz der Kulturen MTBE abzubauen stark variiert (Abb. 22). Die isolierten methanverwertenden Anreicherungskulturen (maximale MTBE-Abbauraten 2,1 mg MTBE/g BTS*h) besaßen im Vergleich zu den propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen (maximale MTBE-Abbauraten 6,6 mg MTBE/g BTS*h) ein geringeres MTBE-Abbaupotenzial.

Ergebnisse

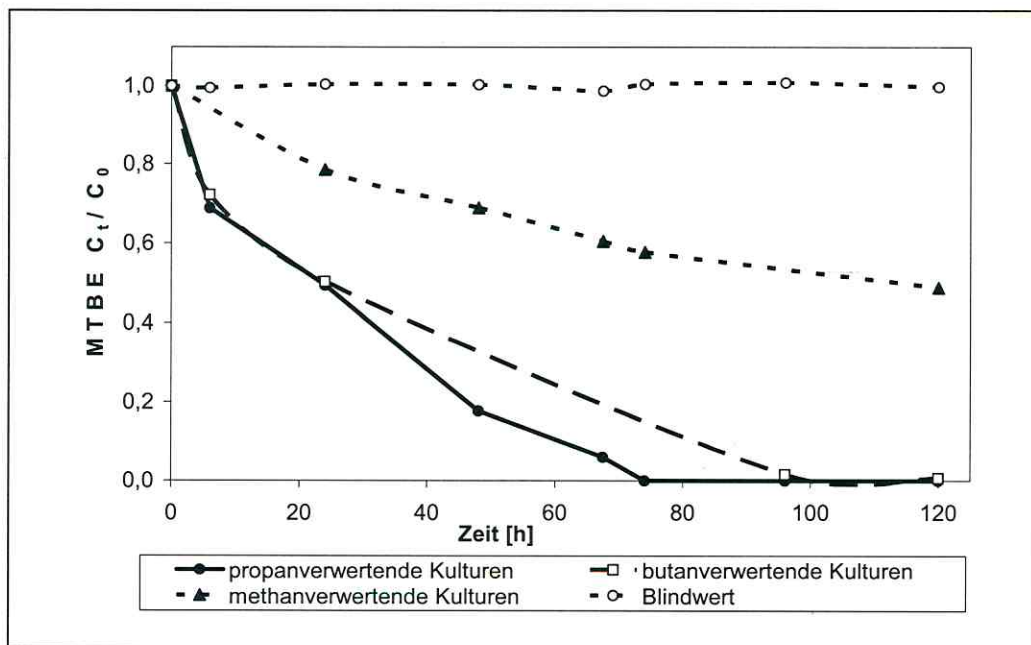


Abb.22: Cometabolischer MTBE-Abbau der isolierten methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, Wachstumssubstrate Methan, Propan bzw. Butan)

Auch unter den propanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen gab es starke Schwankungen hinsichtlich der Effizienz MTBE cometabolisch abzubauen. Dabei spielte neben den eingesetzten Wachstumssubstraten die heterotrophe Begleitflora der Kulturen eine wichtige Rolle. Aus dem Vergleich der Abbauraten der Anreicherungskulturen (Tab. 27) und der isolierten Reinkulturen (Tab. 28) nach Anzucht auf der gleichen Kohlenstoffquelle ergaben sich stimulierende bis inhibierende Einflüsse der heterotrophen Begleitflora auf den MTBE-Abbau (→ Abb. 23).

Ergebnisse

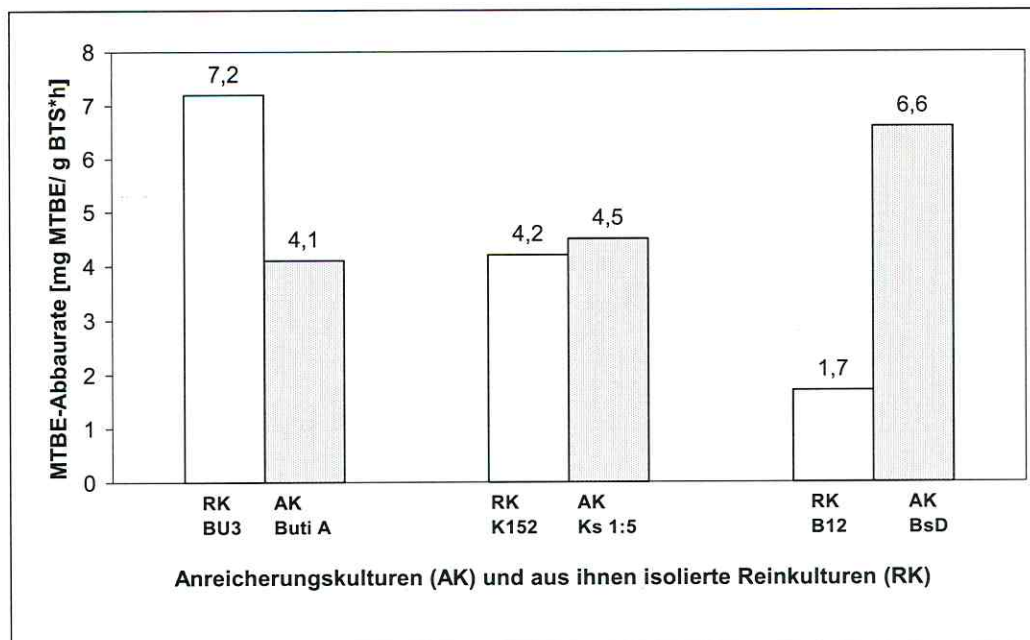


Abb. 23: MTBE-Abbauraten der Anreicherungskulturen (AK) und der aus diesen isolierten Reinkulturen (RK). (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C, Wachstumssubstrat Propan, $c_{\text{MTBE}} = 40 \text{ mg/l}$)

Am Beispiel der Kulturen B12 und BsD wurde eine höhere Abbauleistung der Anreicherungskultur BsD (maximalen Raten 6,6 mg MTBE/g BTS*h) im Vergleich zur Reinkultur B12 (1,7 mg MTBE/g BTS*h) beobachtet. Neben diesem positiven Einfluss der heterotrophen Begleitflora der Anreicherungskultur auf den MTBE-Abbau wurde bei den Kulturen Buti A (4,1 mg MTBE/g BTS*h) und BU3 (7,2 mg MTBE/g BTS*h) ein negativer Einfluss der Begleitflora nachgewiesen. Die MTBE-Abbauraten der Anreicherungskultur Ks 1:5 (4,5 mg MTBE/ g BTS*h) und der Reinkultur K152 (4,2 mg MTBE/g BTS*h) lagen im gleichen Bereich. Bei diesen zwei Kulturen konnte kein signifikanter Einfluss der heterotrophen Begleitflora auf den MTBE-Abbau des Stammes K152 festgestellt werden.

4.3.1.4 Cometabolischer MTBE-Abbau der Stämme BU3, B12 und K152

Charakteristisch für den cometabolischen MTBE-Abbau der Stämme BU3, B12 und K152 war ein konsekutiver Abbau von TBA. Dies bedeutet, dass während des MTBE-Abbaues TBA akkumuliert wurde. Der TBA-Abbau begann erst, als die MTBE-Konzentration im Ansatz unter 5 mg/l gesunken war, was ca. 90% der vorgelegten MTBE-Konzentration entsprach (Abb. 22).

Ergebnisse

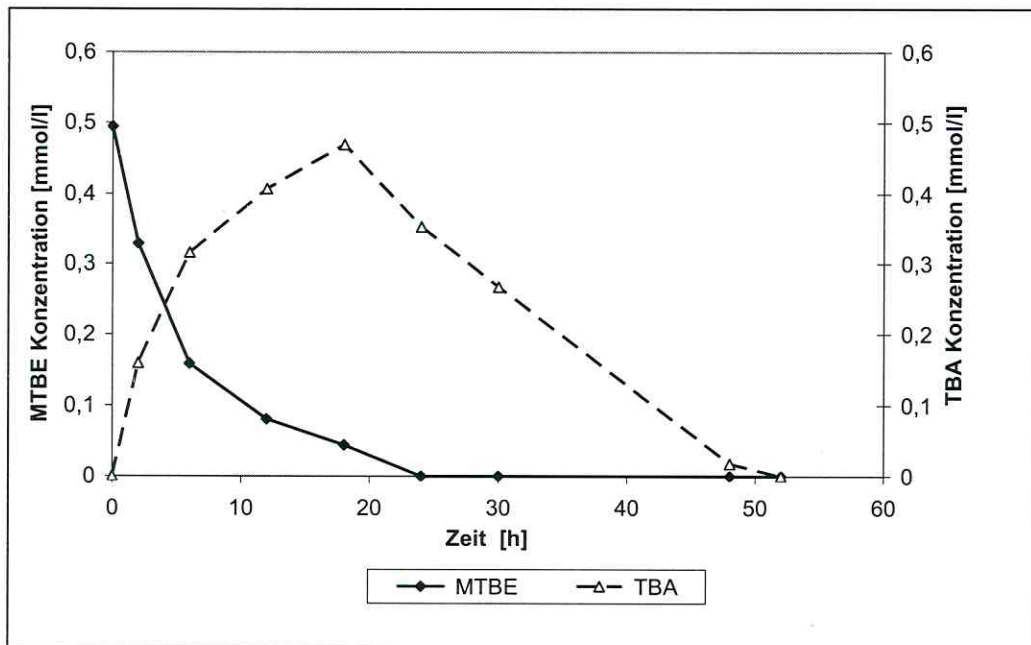


Abb. 24: Zeitlicher Verlauf des Abbaues von MTBE und TBA des Stammes BU3. (Abbauversuch nach Schema A, $T = 20^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{MTBE}} = 45 \text{ mg/l}$, Wachstumssubstrat 1-Propanol)

Die molaren Verhältnisse der abgebauten MTBE-Konzentration und der gebildeten TBA-Konzentration ließen erkennen, dass während der ersten Stunden eine stöchiometrische Akkumulation von TBA stattfand (Abb. 24).

In MTBE-Abbauversuchen mit den drei Stämmen B12, BU3 und K152 wurden verschiedene Kohlenstoffquellen, hinsichtlich der Fähigkeiten der drei Stämme nach Anzucht auf diesen MTBE abzubauen, getestet (Tab. 28). Wie bereits bei den Anreicherungskulturen gezeigt, bauten die Stämme nach Anzucht auf Alkanen MTBE mit höheren Raten ab als nach Anzucht auf Alkoholen. Neben Alkanen und Alkoholen konnten die Stämme BU3 und B12 auch Natriumacetat, Aceton und Hefeextrakt + Pepton als Wachstumssubstrat für den cometabolischen MTBE-Abbau nutzen.

Ergebnisse

Tab. 28: Maximale MTBE-Abbauraten der Reinkulturen B12, K152 und BU3 nach Anzucht auf verschiedenen Wachstumssubstraten. (Abbauversuche nach Schema A, T= 20°C; Anzucht der Kulturen bis zur maximalen Enzymaktivität)

Wachstumssubstrat	maximale MTBE-Abbauraten [mg MTBE/ g BTS *h]		
	B12	K152	BU3
Propan	1,7	4,2	7,9
Butan	0,5	1,4	5,4
1-Propanol	1,1	1,9	3,1
2-Propanol	k. A.	k. A.	2,3
2-Butanol	0,7	0,5	2,7
Natriumacetat	2,0	0	1,7
Hefeextrakt + Pepton	1,0	0	1,3
Aceton	0,5	0	1,3

In MTBE-Abbauversuchen bei 12°C wurde beobachtet, dass die drei Stämme auch bei diesen grundwasserrelevanten Temperaturen MTBE abbauten. Bei den Kulturen B12 und BU3 führte eine Verringerung der Temperatur von 20°C auf 12°C zu einer Halbierung der MTBE-Abbauraten. Der Stamm K152 zeigte im Gegensatz dazu auch bei 12°C hohe MTBE-Abbauraten (Tab. 29).

Tab. 29: MTBE-Abbau der Stämme BU3, K152 und B12 bei 12°C und 20°C. (MTBE-Abbauversuche nach Schema A; Wachstumssubstrat: 1-Propanol)

Abbautemperatur	maximale MTBE-Abbauraten [mg MTBE/g BTS*h]		
	BU3	K152	B12
12°C	1,6	1,7	0,6
20°C	3,1	1,9	1,1

In weiteren Experimenten wurden verschiedene MTBE-Konzentrationen eingesetzt, um eine Hemmung des MTBE-Abbaues bei hohen Konzentrationen des cometabolischen Substrates zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 dargestellt.

Ergebnisse

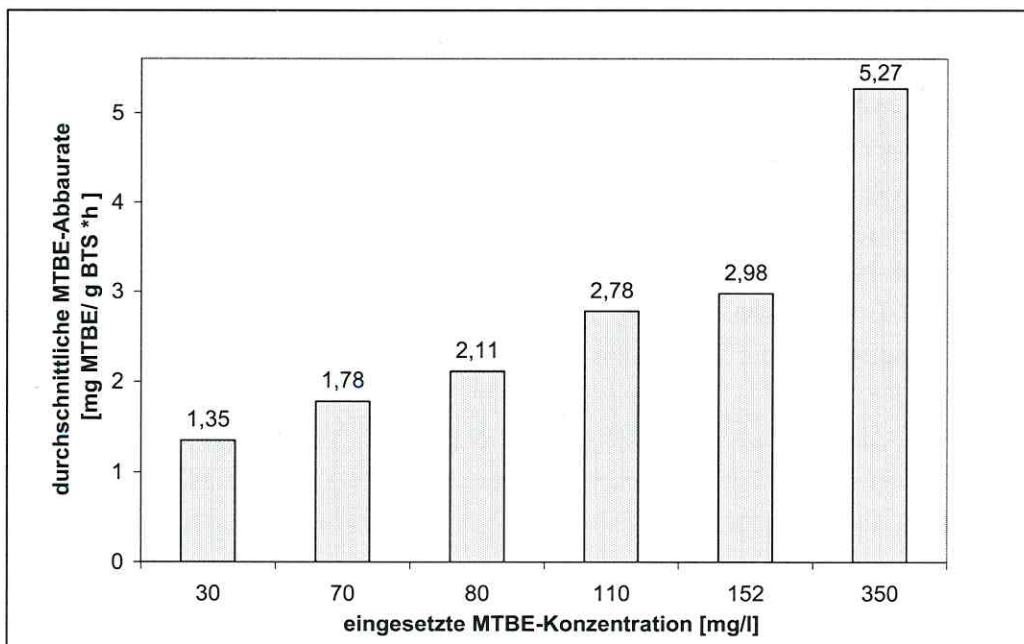


Abb. 25: Einfluss unterschiedlicher MTBE-Konzentrationen (30-350 mg/l) auf den cometabolischen MTBE-Abbau der Kultur BU3 (Abbauversuche nach Schema B, T= 20°C, Wachstumssubstrat: 1-Propanol)

Entgegen der allgemeinen Auffassung, dass geringe Schadstoffkonzentrationen zu höheren Abbauraten führen (Stran et al. 1990; Broholm et al. 1993), wurde in den vorliegenden Versuchsreihen gezeigt, dass mit steigender MTBE-Konzentration die durchschnittliche MTBE-Abbaurrate zunimmt. Bei einer maximal eingesetzten MTBE-Konzentration von 350 mg/l, das entsprach ca. dem 10-fachen der am Projektstandort Leuna vorkommenden MTBE-Konzentration, wurden nach Anzucht der Kultur auf 1-Propanol durchschnittliche MTBE-Abbauraten von 5,27 mg MTBE/g BTS*h gemessen. Als durchschnittliche Abbaurrate wurde der MTBE-Abbau zwischen Versuchsstart (t_{Start}) und vollständigem Abbau (t_{Ende}) definiert. In allen Ansätzen erfolgten ein vollständiger Abbau des eingesetzten MTBE's und eine intermediäre TBA-Akkumulation. Der Stamm BU3 baute 350 mg/l MTBE innerhalb von 2,5 Tagen ab. Die akkumulierte TBA-Konzentration von 182 mg/l zeigte keinen inhibierenden Effekt auf den Stamm BU3 und wurde nach Absinken der MTBE-Konzentration unter 5 mg/l weiter degradiert. Eine wichtige Voraussetzung für den effizienten cometabolischen MTBE-Abbau ist die im Medium vorliegende Gelöstsauerstoffkonzentration. Bei den bisher beschriebenen Abbauversuchen an ruhenden Zellen in 20 ml HS-Röhrchen und in 120 ml Serumflaschen waren aufgrund der großen Gasphase über der Flüssigphase (HS-Röhrchen 75% Gasphase,

Ergebnisse

Serumflaschen 58% Gasphase) auch bei längeren Versuchszeiten keine Sauerstofflimitationen zu erwarten. Erst in den Säulenversuchen (→ Kapt. 4.3.3) und im Feldversuch (→ Kapt. 4.4.4) konnten Sauerstofflimitationen auftreten, da bei diesen Versuchssystemen das Verhältnis Gas-Flüssigkeitsphase zu fast 90% in Richtung der Flüssigkeitsphase verschoben wurde. Die immobilisiert am Trägermaterial der Säule vorliegenden Bakterien wurden nur über das NMS-Medium mit Sauerstoff versorgt. Die Anreicherung des NMS-Mediums mit Sauerstoff erfolgte indirekt über Diffusion durch das Schlauchsystem und durch den sich im oberen Bereich der Säule bildenden Gasraum, der auf die bei den Probenahmen entnommene Flüssigkeit zurückzuführen war. Eine zusätzliche Anreicherung des NMS-Medium mit Sauerstoff erfolgte nicht.

MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen nach Schema B 2 (→ Kapt. 3.4.1) mit der Kultur BU3 ergaben, dass die unteren Sauerstoffgrenzkonzentrationen, bei welchen noch ein MTBE-Abbau nachgewiesen wurde, im Bereich von 0,4 - 0,6 mg/l Gelöstsauerstoff lagen (Abb. 26).

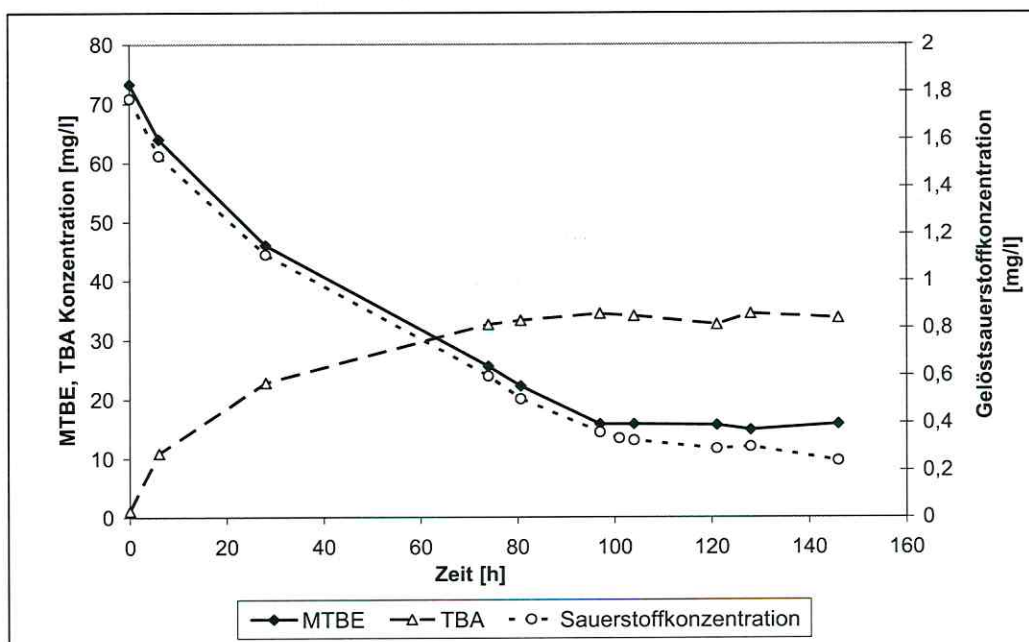


Abb. 26: Sauerstoffgrenzkonzentration für den MTBE-Abbau des Stammes BU3 (Abbauversuche nach Schema B-2, T= 20°C, Wachstumssubstrat 1-Propanol)

Untersuchungen zur Aktivierung der Monooxygenase der Kultur K152 zeigten, dass diese durch die Zugabe von 50 mg/l 1-Propanol maximal aktiviert wurde (Abb. 27).

Ergebnisse

1-Propanol-Konzentrationen von ≥ 100 mg/l führten zu einer vollständigen kompetitiven Hemmung des cometabolischen MTBE-Abbaues der Kultur.

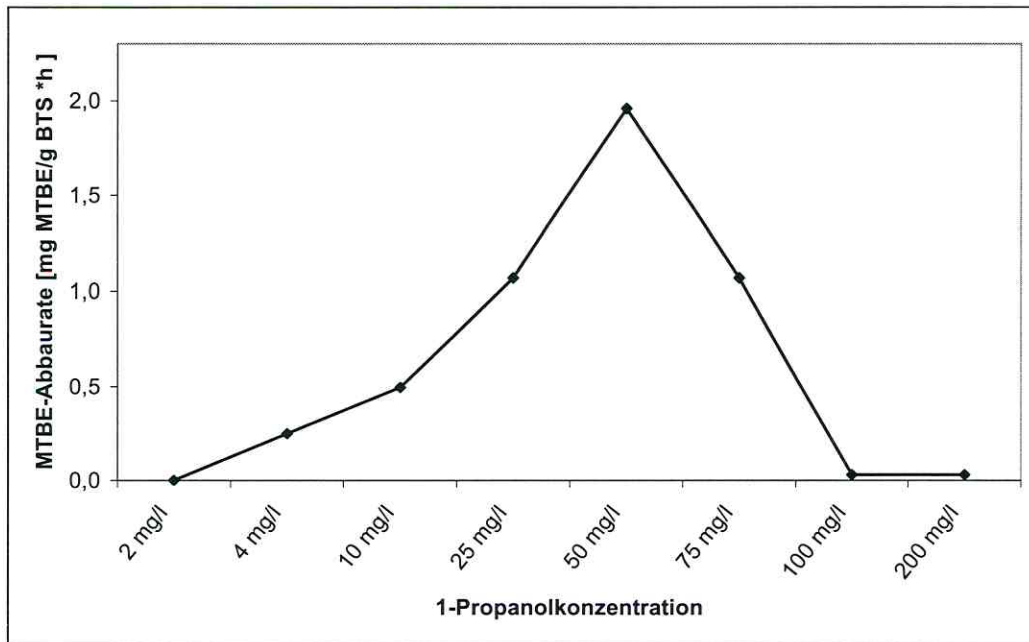


Abb 27: Maximale Aktivierung der Monooxygenase-Aktivität der Kultur K152 durch Zugabe von 1-Propanol (Abbauversuche nach Schema A-1 unter Zusatz verschiedener 1-Propanol- Konzentrationen, T= 20°C)

Bei der Untersuchung zur Aktivierung der Monooxygenase der Stämme B12 und BU3 wurde ein vergleichbarer Versuchsaufbau angewendet. Es war experimentell nicht möglich, Monooxygenase inaktive Kulturen dieser zwei Stämme anzuziehen. Aus diesem Grund wurden 4°C- Flüssigkulturen der Stämme BU3 und B12 als Ausgangsmaterial verwendet. Die maximale Aktivierung der Enzymaktivität erfolgte bei der Dosierung von 40 mg/l 1- bzw. 2-Propanol für BU3 bzw. 55 mg/l 1-Propanol für B12.

4.3.1.5 Batch-Langzeit-MTBE-Abbauversuche der Stämme K152 und BU3

Beim Übergang auf komplexere Laborsysteme erwies es sich als relevant, Grundkenntnisse zur Stabilität des Enzymsystemes der Stämme und Möglichkeiten zur Regenerierung des Abbaupotenziales zu besitzen. Dazu wurden Batch-Langzeit-Abbauversuche im 1 l-Schüttelkolben mit seitlichem Ansatzstutzen mit der Kultur K152 und BU3 (Ergebnisse BU3 nicht dargestellt) durchgeführt (siehe Abb. 28).

Ergebnisse

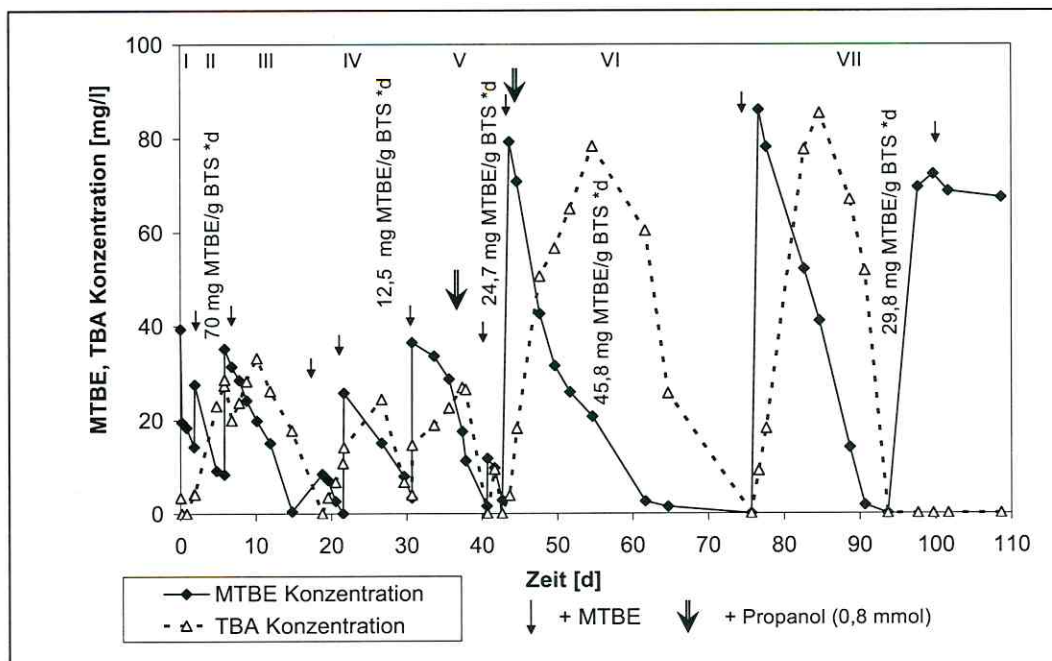


Abb. 28: Batch-Langzeit-Abbauversuche des Stammes K152 (Abbauversuche nach Schema B-2, T = 20°C. Die Pfeile markieren die Dosierung von 0,8 mmol 1-Propanol bzw. MTBE in verschiedenen Konzentrationen)

In den Abbauversuchen, dargestellt am Beispiel des Stammes K152, wurde ein konsekutiver TBA-Abbau beobachtet, der deutlich durch seine zeitliche Verschiebung gegenüber dem MTBE-Abbau zu erkennen war (Abb. 28). Im Verlauf der einzelnen Versuchphasen nahm die durchschnittliche MTBE-Abbaurrate kontinuierlich ab.

Eine Dosierung von 50 mg/l 1-Propanol (0,8 mmol) nach 36 Tagen führte zur Erhöhung der MTBE-Abbaurrate von 7,9 mg MTBE/g BTS *d auf 24,7 mg MTBE/g BTS *d. Eine Regenerierung des Enzymsystemes war nach 36 und 41 Tagen notwendig, wobei als Zeitpunkt für die Regenerierung ein Absinken der durchschnittlichen MTBE-Abbaurrate unter 10 mg MTBE/g BTS *d definiert wurde. Die durchschnittlichen MTBE-Abbauraten lagen in den Bereichen der Ergebnisse der Abbauversuche an ruhenden Zellen nach Schema A. Auch der positive Einfluss hoher MTBE-Konzentrationen (Versuchsphase 6 und 7) auf die Abbauraten konnte analog zu den Resultaten der Abbauversuche an ruhenden Zellen (→ Abb. 25) verifiziert werden. Nach 110 Tagen wurde der MTBE-Abbauversuch abgebrochen. Parallel durchgeführte Messungen der BTS zeigten, dass während des gesamten Versuches kein Wachstum der Kultur zu verzeichnen war.

Die Ergebnisse der Batch-Langzeit-Abbauversuche bildeten die Grundlagen für die Abbauversuche in den Säulensystemen in Bezug auf Enzymstabilitäten und Möglichkeiten zur Regenerierung der Abbauleistung.

4.3.2 Untersuchung des cometabolischen MTBE-Abbaues in Säulensystemen

Die im Kreislauf betriebenen Laborsäulen wurden zu Beginn der Versuche mit aktiven Bakterienkulturen (→ Kapt. 3.3.5) der Stämme B12, K152 bzw. BU3 beimpft. Innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgte eine 99%ige Immobilisierung der Bakterien am Trägermaterial (Seramis®), sodass als Bezugswert für die Berechnung der MTBE-Abbauraten die eingesetzte Ausgangsbiomassekonzentration herangezogen werden konnte. Die Immobilisierung der Bakterien wurde durch Messung der BTS-Konzentration im Ausfluss der Säule nachgewiesen, welche sich z.B. bei dem Stamm BU3 innerhalb von 15 Stunden von 350 mg/l auf 3 mg/l verringerte. Der zeitliche Verlauf des MTBE-Abbaues in den Laborsäulen des Stammes BU3 ist in Abb. 29 dargestellt.

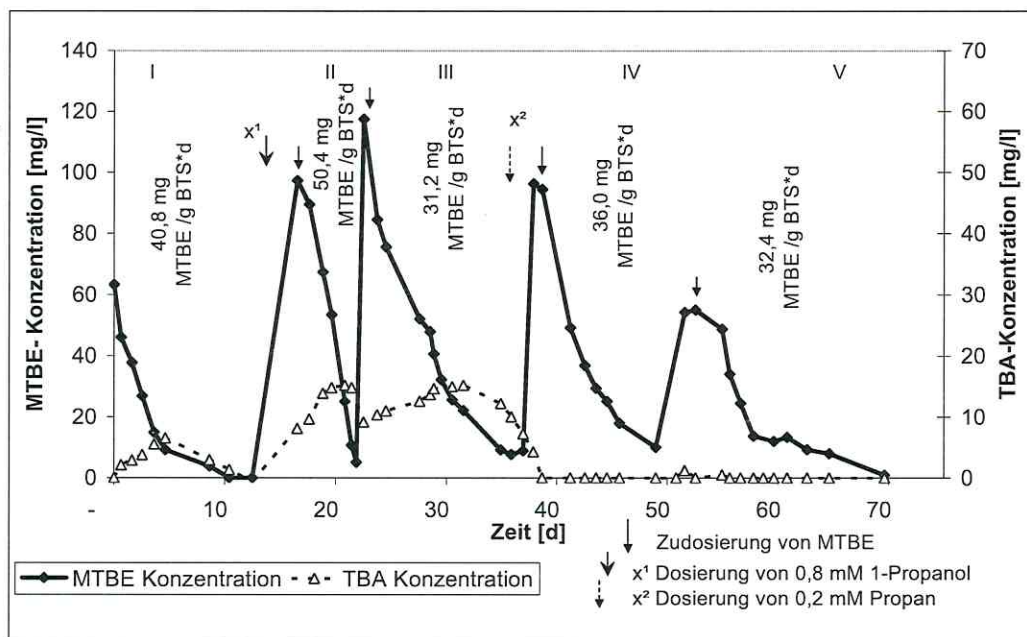


Abb. 29: Zeitlicher Verlauf des cometabolischen MTBE-Abbaues des Stammes BU3 in den Laborsäulen (Anzucht der Kultur auf 1-Propanol, zweistufigen Wachstumsprozess bei 30°C; BTS-Konzentration Versuchsbeginn: 350 mg/l, Abbauversuch: T= 20°C)

Ergebnisse

In den ersten 8 Tagen baute die Kultur MTBE mit durchschnittlichen Raten von 40,8 mg MTBE/ g BTS*d ab. Durch die Dosierung von 0,8 mmol 1-Propanol (Versuchsphase II) konnte die MTBE-Abbaurrate der Kultur auf 50,4 mg MTBE/ g BTS*d erhöht werden. Die Zugabe von 0,2 mmol Propan zu Beginn der vierten Versuchsphase bewirkte eine Erhöhung der MTBE-Abbaurrate um 15 %. Im Gegensatz zu den Abbauprobungen an ruhenden Zellen (→ Kapt. 4.3.1) wurde bei diesen Versuchen keine stöchiometrische TBA-Akkumulation nachgewiesen. Nur in den ersten 40 Tagen konnte ein leichter Anstieg der TBA-Konzentration beobachtet werden. Parallel durchgeführte mikrobiologische Untersuchungen (Plattenausstriche) zeigten, dass in der Säule aufgrund der unsterilen Arbeitsweise sich ein natürliches Konsortium ausbildete (Abb. 30).

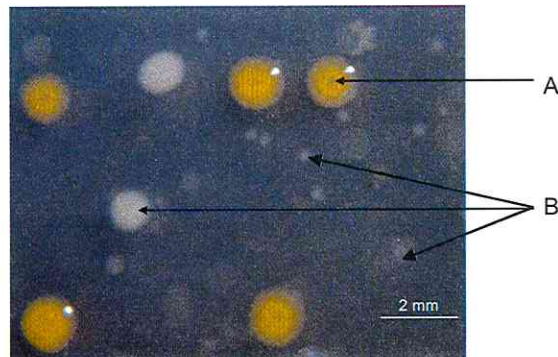


Abb. 30: Koloniemorphologie der Plattenausstriche der mikrobiologischen Untersuchungen der Laborsäulenversuche. Ausbildung eines Konsortiums aus dem Stamm BU3 (A) und einer heterotrophen Begleitflora (B). (Binokularaufnahme, 1 fach-Vergrößerung)

Bei den MTBE-Abbauprobungen des Stammes BU3 in den Laborsäulen wurde eine maximale MTBE-Abbaurrate von 50,4 mg MTBE/g BTS*d (2,1 mg MTBE/g BTS*h) gemessen. Dies entsprach einem 68%igen MTBE-Abbaupotenzial der Versuche an ruhenden Zellen (3,1 mg MTBE/g BTS*h). Die erzielten Ergebnisse des MTBE-Abbaues der Stämme K152, BU3 und B12 in den Laborsäulen sind in Tab. 30 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 30: MTBE-Abbauversuche der Kulturen B12, K152 und BU3 in den Laborsäulen (Wachstumssubstrat 1-Propanol, T= 20°C, c_{MTBE} der ersten Versuchsphase 40 - 45 mg/l)

Parameter / Kultur	B12	K152	BU3	
Wachstumssubstrat der Anzucht	1-Propanol			2-Propanol
durchschnittliche MTBE-Abbauraten in der ersten Versuchsphase [x Tage] [mg MTBE/ g BTS *d]	23,7 [15]	26,5 [14]	40,8 [10]	33,3 [13]
TBA-Akkumulation	keine	über gesamten Zeitraum (TBA _{akkumuliert} /MTBE _{abgebaut} = 0,16)	nur in den ersten 36 Tagen	nur in den ersten 25 Tagen
Effizienz des Abbaues im Vergleich zu Abbauversuchen an ruhenden Zellen*	89%	58%	68%	60%

Anmerkung: * Zur Berechnung wurden die höchsten erreichten durchschnittlichen MTBE-Abbauraten verwendet.

Nach den Versuchen in Laborsäulen erfolgte ein Upscaling der Versuche in den kleintechnischen Maßstab (2 l). Der Aufbau der kleintechnischen Säulen wurde im Kapt. 3.4.3 beschrieben. Die ersten Versuche in diesen Säulen erfolgten mit den Stamm BU3 nach Anzucht auf 1-Propanol (Abb. 29). In beiden Säulen konnte nach 72 Stunden eine vollständige Immobilisierung der Bakterien auf dem Trägermaterial beobachtet werden.

Ergebnisse

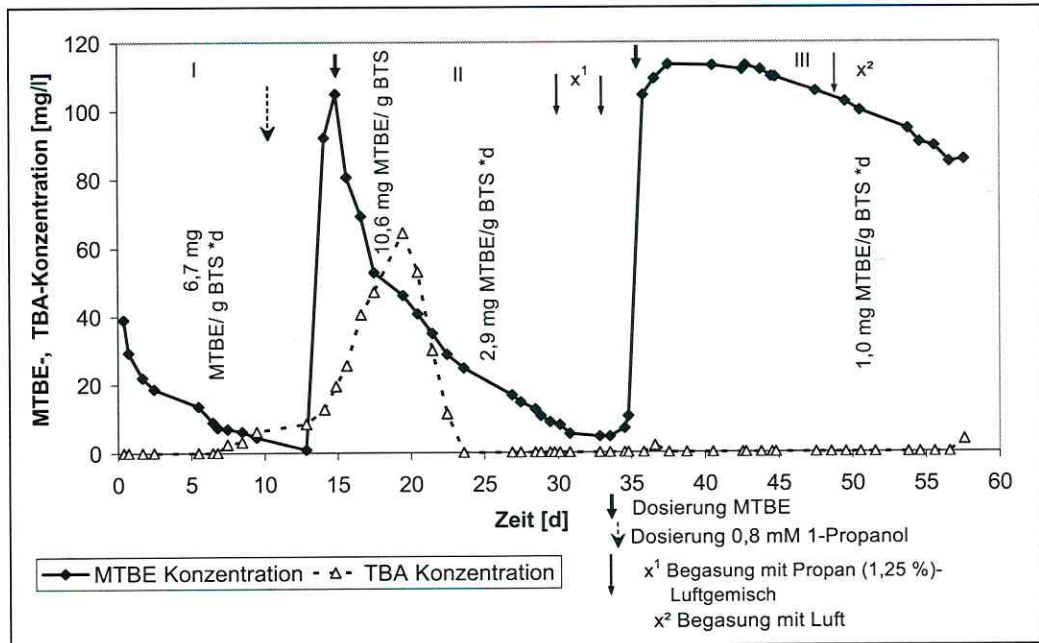


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 in der kleintechnischen Säule S 1 (T= 22°C, Anzucht der Kultur im 5 l-Fermenter, Wachstumssubstrat 1-Propanol; Pfeile symbolisieren die Dosierung von Wachstumssubstrat oder cometabolischen Substrat bzw. Begasung der Säule mit dem Propan/Luftgemisch oder Luft.

Die Säule S 1 mit integriertem Begasungssystem wurde mit einem Inokulum des Stammes BU3 aus dem 5 l-Fermenter (→ Kapt. 4.2.4) mit einer BTS-Konzentration von 2,0 g/l beimpft. Die Kultur besaß zu Versuchsbeginn nicht die maximale Enzymaktivität, worauf die verhältnismäßig geringe durchschnittliche MTBE-Abbaurate von 6,7 mg MTBE/ g BTS*d in der ersten Versuchsphase (13 Tage) zurückzuführen war (Abb. 31). Die Monooxygenase-Aktivität der Kultur lag zu Versuchsbeginn bei 0,8 mg MTBE/g BTS*h (→ Kapt. 4.2.4, Abb. 15). Nach Reaktivierung des Systems nach 15 Tagen mit 0,8 mmol Propanol und der gleichzeitigen Zugabe von MTBE erhöhte sich die MTBE-Abbaurate in der zweiten Versuchsphase (15 Tage) auf 10,6 mg MTBE/g BTS*d. Gegen Ende der zweiten Versuchsphase erfolgte eine fünftägige indirekte blasenfreie Begasung des Systemes mit einem Propan-Luftgemisch (1,25% Propan in synthetischer Luft) über eine Zeitspanne von jeweils sechs Stunden. Weder die angestrebte Regenerierung der Enzymaktivität durch Propan noch die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im System führten zu einer signifikanten Erhöhung der MTBE-Abbaurate in der dritten Versuchsphase (20 Tage).

Ergebnisse

Mögliche Ursachen dafür waren die geringe Propankonzentration im verwendeten Begasungsgemisch (1,25% Propan in synthetischer Luft) und die zu kurzen Begasungszeiten (jeweils sechs Stunden). Beide Parameter konnten aus sicherheitstechnischen Gründen nicht erhöht werden.

Um bei der Ursachenanalyse eine Sauerstofflimitation im System auszuschließen, wurde das Begasungssystem auf eine Luftbegasung von 10 Stunden/Tag umgestellt. Dadurch wurde im System eine Gelöstsauerstoffkonzentrationen von 1,5 mg/l erreicht. Diese Maßnahme trug jedoch nicht zur Lösung des Problems bei. Vielmehr führte die blasenfreie Luftbegasung der Säule zu einer starken Verpilzung der Begasungssäule, was den Abbruch des Versuches nach 58 Tagen zur Folge hatte.

Die parallel betriebene kleintechnische Säule S2 wurde mit einer im Schüttelkolben auf 1-Propanol angezogenen Kultur des Stammes BU3 beimpft. Infolge der benötigten Volumina (2,5 l) war die BTS-Konzentration auf 0,23 g/l limitiert. Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit, als Maß für die Monooxygenase-Aktivität, betrug zu Versuchsbeginn 2,9 mg MTBE/g BTS*h bzw. 6,8 mg O₂/g BTS*min. Dies entsprach 92% der maximalen Enzymaktivität des Stammes (→ Kapt. 4.2.3). In der Abb. 32 ist der zeitliche Verlauf des MTBE-Abbaues in der Säule S 2 dargestellt.

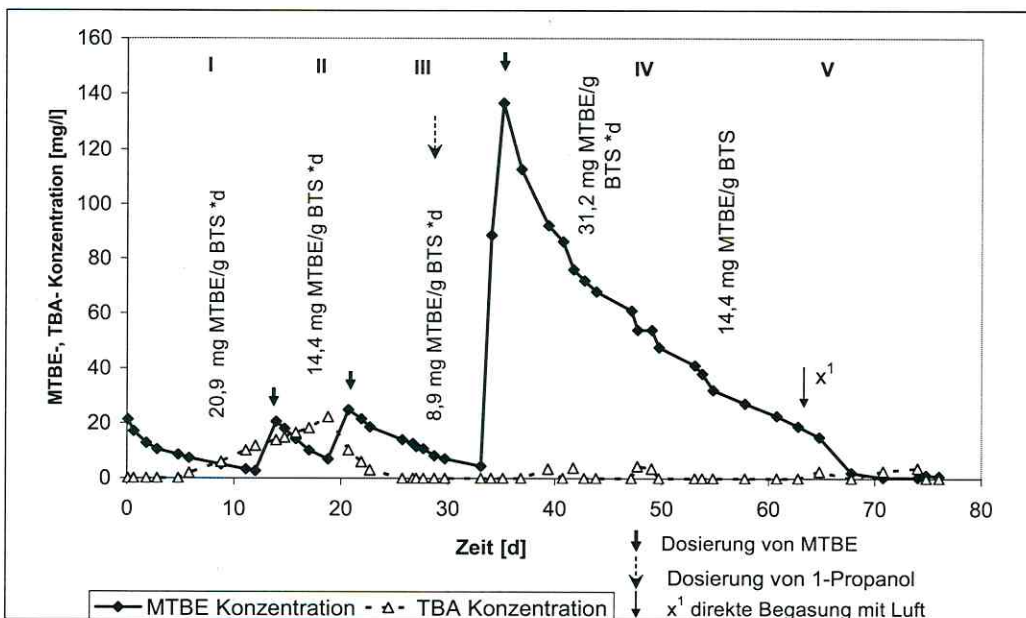


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 in der kleintechnischen Säule S 2 (T= 22°C, Inokulumkultur aus Schüttelkolben; Wachstumssubstrat 1-Propanol, Pfeile symbolisieren die Dosierung von Wachstumssubstrat oder cometabolischem Substrat bzw. Begasung der Säule mit Luft)

Ergebnisse

Die durchschnittliche MTBE-Abbaurrate in der ersten Versuchsphase (12 Tage) lag bei 20,9 mg MTBE/ g BTS*d, was einer Verdreifachung der Abbaurrate der Säule S 1 entsprach. Durch eine Dosierung von 0,8 mmol 1-Propanol nach 33 Tagen konnten die abnehmenden durchschnittlichen MTBE-Abbauraten der zweiten und dritten Versuchsphase (5 bzw. 12 Tage) erhöht werden. In den parallel durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen wurde in der zweiten Versuchsphase die Ausbildung eines natürlichen Konsortiums nachgewiesen. Dieses war wahrscheinlich für den schnellen TBA-Abbau (20,6 mg TBA/g BTS *d) verantwortlich. Die Gelöstsauerstoffkonzentration am Säulenablauf betrug nach 65 Tagen noch 1,5 mg/l Sauerstoff. Diese Konzentration war für den cometabolischen MTBE-Abbau des Stammes BU3 ausreichend (Sauerstoffgrenzkonzentration 0,4 – 0,6 mg/l, → Kapt. 4.3.1.4, Abb. 26).

Die dargestellten MTBE-Abbauversuche in den kleintechnischen Säulen zeigten, dass die Anzucht des Inokulums eine wichtige Rolle für die Effizienz des MTBE-Abbaues spielte. Hohe Biomassekonzentrationen (Anzucht der Kultur im 5 l-Fermenter, Abbauversuche in der Säule S 1) konnten die hohen Enzymaktivitäten in der Säule S 2 (Anzucht in Schüttelkolben) nicht ersetzen. In der Säule S2 wurde trotz geringerer eingesetzter Biomassekonzentration dreifach höhere MTBE-Abbauraten erzielt.

Ziel weiterer Säulenversuche mit diesem Stamm war zum einen die Verbesserung der Vorkultur hinsichtlich Biomassekonzentration und Enzymaktivität und zum anderen die Umstellung des Wachstumssubstrates von 1-Propanol auf 2-Propanol.

Die Anzucht des Stammes BU3 für diese Versuche erfolgte im 5 l-Fermenter mittels zweistufiger Fermentation (→ Kapt. 4.2.4, Abb. 16). Die Enzymaktivität der geernteten Kultur BU3 lag bei 95% der maximalen Enzymaktivität des Stammes bei Anzucht auf 2-Propanol. Der zeitliche Verlauf des Abbauversuches ist in Abb. 33 dargestellt.

Ergebnisse

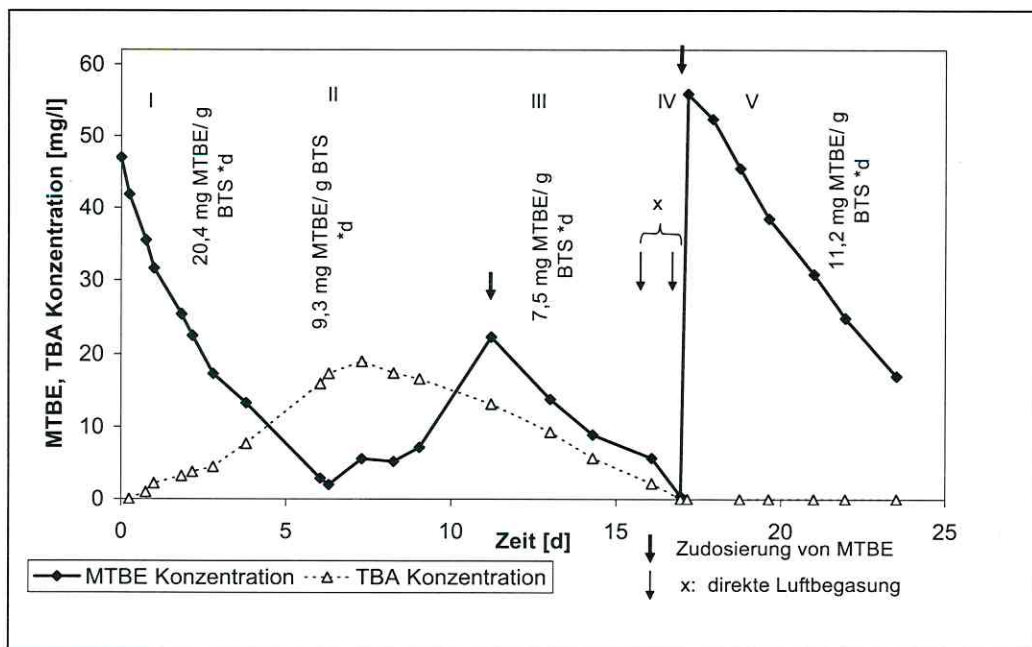


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues der Kultur BU3 in der kleintechnischen Säule S 2 nach Anzucht auf 2-Propanol ($T = 22^{\circ}\text{C}$, Wachstumssubstrat des Inokulums 2-Propanol, Pfeile symbolisieren die Dosierung von MTBE bzw. Begasung der Säule mit Luft)

Die durchschnittliche MTBE-Abbaurrate der ersten Versuchsphase (3 Tage) lag bei 20,4 mg MTBE/g BTS*d. Sie entsprach damit 37% der maximalen Abbaurrate des Stammes bei den Versuchen an ruhenden Zellen (2,3 mg MTBE/g BTS*h) und 61% der durchschnittlichen Abbaurrate (33,3 mg MTBE/g BTS *d) der Laborsäulenversuche (Anzucht auf 2-Propanol). Eine TBA-Akkumulation wurde wiederum nur in den ersten zwei Versuchsphasen beobachtet. Der TBA-Abbau am Ende der zweiten Versuchsphase und die fehlende Akkumulation in den späteren Versuchsphasen war, wie schon in den Laborsäulen-Versuchen ($\rightarrow$ Kapt. 4.3.2, Abb. 29, 30) festgestellt wurde, auf die Ausbildung eines natürlichen Konsortiums zurückzuführen. Diese konnte in den parallel durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen nachgewiesen werden. In der vierten Versuchsphase wurde die Säule für 24 Stunden direkt mit 0,02 l/min Luft begast, um den Einfluss von Sauerstoff auf den cometabolischen MTBE-Abbau zu testen. Nach einer erneuten Dosierung von 56 mg/l MTBE wurde in der fünften Versuchsphase (6 Tage) eine Erhöhung der MTBE-Abbaurrate von 7,5 mg MTBE/g BTS*d (Versuchsphase III) auf 11,2 mg MTBE/g BTS*d ermittelt.

Ergebnisse

Im MTBE-Abbauversuch des künstlichen Konsortiums der Stämme B12 und K152 sollte untersucht werden, ob die im Vergleich zum Stamm BU3 geringeren MTBE-Abbauraten (→ Kapt. 4.1.3.4, Tab. 28) der Einzelstämme B12 und K152 durch die Bildung des Konsortiums erhöht werden konnten.

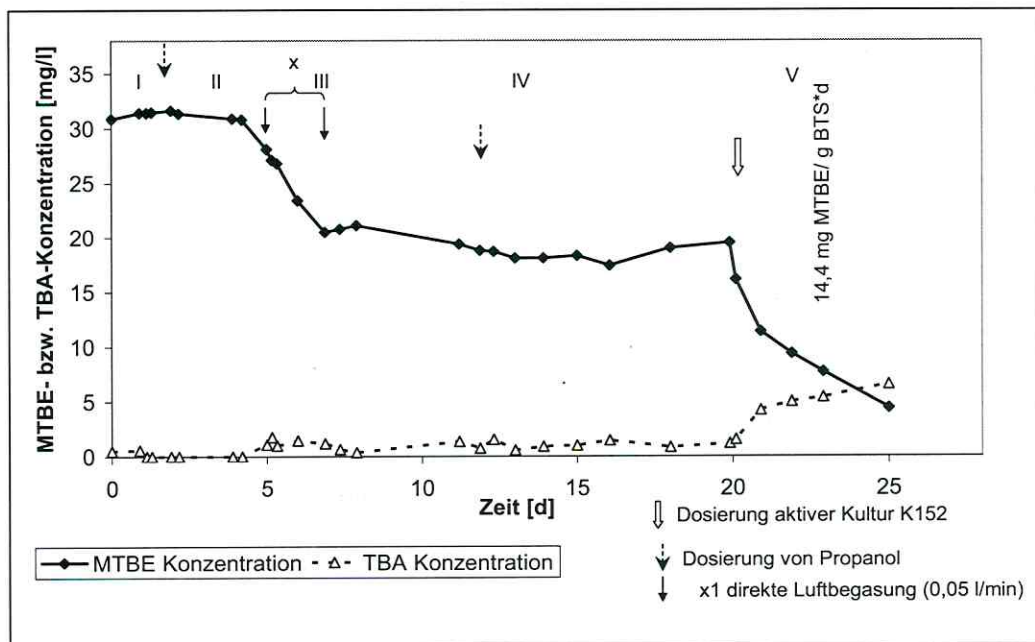


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf des MTBE-Abbaues des Konsortiums B12-K152 in der kleintechnischen Säule S 2 (Wachstumssubstrat 1-Propanol, T= 22°C, Pfeile symbolisieren Dosierung von Wachstumssubstrat bzw. eine Begasung der Säule mit Luft; Neubeimpfung der Säule nach 20 Tagen mit einer aktiven Kultur des Stammes K152)

In der ersten und zweiten Versuchsphase (2 bzw. 3 Tage) wurde trotz Reaktivierung des Systems mit 0,8 mmol 1-Propanol kein signifikanter MTBE-Abbau beobachtet. Auch eine direkte Begasung der Säule mit Luft führte nicht zu einem MTBE-Abbau in der Säule. Der während der dritten Versuchsphase (2 Tage) auftretende MTBE-Verlust war auf die direkte Begasung der Säule zurückzuführen. Bei der Analyse möglicher Ursachen für einen fehlenden MTBE-Abbau wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei der Bildung von Konsortien neben positiven Wechselwirkungen zwischen den Kulturen auch negative auftreten können (→ Kapt. 4.3.1.3). Zur Klärung dieser Hypothese wurden parallel in Laborsäulen MTBE-Abbauversuche mit den Reinkulturen B12 bzw. K152 sowie mit dem Konsortium aus beiden Stämmen durchgeführt. In den Abbauversuchen der Reinkulturen konnte ein MTBE-Abbau mit durchschnittlichen Raten von 25,9 mg MTBE/g BTS *d für K152 und 20,6 mg MTBE/g BTS *d für

Ergebnisse

B12 nachgewiesen werden. Das Konsortium B12-K152 war nicht in der Lage, MTBE cometabolisch abzubauen. Fazit dieser Untersuchungen war die Bestätigung der Hypothese, dass negative Wechselwirkungen zwischen den Kulturen B12 und K152 stattfanden.

Gestützt auf dieses Resultat wurde die kleintechnische Säule nach 20 Tagen mit einer aktiven Kultur des Stammes K152 beimpft. Durch diese Neubeimpfung erfolgte eine Verschiebung des Gleichgewichtes des Konsortiums in Richtung des Stammes K152. Wie in Abb. 33 erkennbar ist, setzte nach Neubeimpfung der Säule sofort ein MTBE-Abbau ein. Die durchschnittliche Abbaurrate in der fünften Versuchsphase lag bei 14,4 mg MTBE/g BTS*d und erreichte somit eine 54%ige Effizienz des MTBE-Abbaupotenziales der Laborsäulenversuche des Stammes K152 (26,5 mg MTBE/g BTS *d).

4.4 Untersuchungen zum Enzymsystem des Stammes BU3

In diesen Untersuchungen sollte das für den MTBE-Abbau relevante Enzymsystem des Stammes BU3 näher charakterisiert werden. Die ersten zwei Schritte des aeroben MTBE-Abbaues, die Oxidation von MTBE und TBA, wird durch Monooxygenasen katalysiert. Versuche zur Hemmung des MTBE- und TBA-Abbaues durch verschiedene Monooxygenasen-Inhibitoren (Tab. 31) gaben erste Hinweise auf das für den MTBE- und TBA-Abbau relevante Enzymsystem des Stammes BU3 (→ Kapt. 5.3.2).

Tab. 31: Profil der Hemmung des MTBE- und TBA-Abbaues des Stammes BU3 durch verschiedene Monooxygenase-Inhibitoren (Abbauversuche nach Schema B-Variante 1, T= 20°C, Wachstumssubstrate Propan und 1-Propanol)

Inhibitor	spezifisch für	Hemmung MTBE-Abbau	Hemmung TBA-Abbau
Acetylen	diverse Monooxygenasen	Hemmung	Hemmung
ABT	Cytochrom P450	Hemmung	Hemmung
Hexin	eisenhaltige Monooxygenase	Hemmung	Hemmung
ATU	kupferhaltige Monooxygenase	keine Hemmung	keine Hemmung
Methimazol	flavinhaltige Monooxygenase	keine Hemmung	Hemmung

Anmerkung: Ergebnisse der Hemmversuche waren bei Anzucht der Kulturen auf 1-Propanol und Propan identisch.

In molekularbiologischen Untersuchungen wurde überprüft, ob das durch das Operon eth RABCD codierte Enzym Cytochrom P450 in dem Stamm BU3 exprimiert wird (Abb. 34 A). Dazu wurden PCRs mit den für das Protein EDH B (400 Aminosäuren) spezifischen Primern (EDHB_rev, EDHB_for) durchgeführt. Es konnte keine Amplifizierung des 1,2 kb großen Genfragmentes in den Ansätzen des Stammes BU3 (→ Abb. 34 A – Slot 2 und 3) beobachtet werden.

Ergebnisse

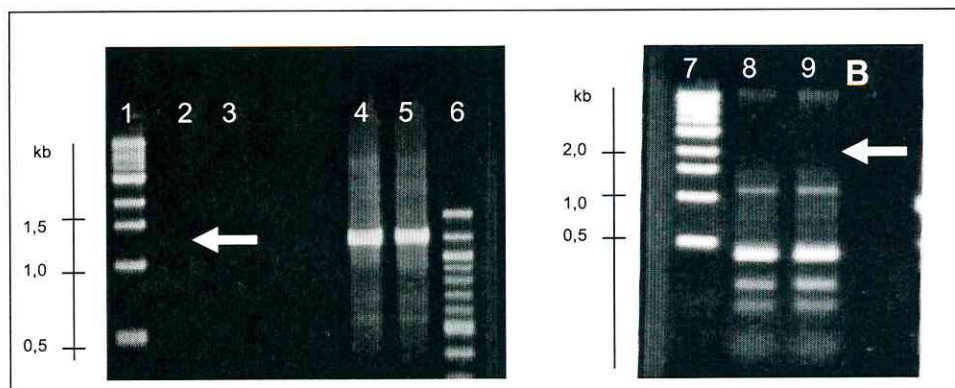


Abb. 34: Ergebnisse der PCRs: (A) Nachweis der Expression des Cytochroms P450: Primer EDHB_rev, EDHB_for : (Slot 1,6: Marker, Slot 2-3: BU3, Slot 4-5: Positivkontrolle: *Nocardia* ENV 759); (B) Nachweis der Expression der Isobutyryl-CoA Mutase (ICM): Primer ICMA_f, ICMA_r: (Slot 7: Marker, Slot 8-9: BU3) ; Die weißen Pfeile markieren die Lage der zu erwartenden Banden.

Als Metabolite des cometabolischen MTBE-Abbaues des Stammes BU3 konnte eindeutig TBA nachgewiesen werden (→ Kapt. 4.3.1.4). Die Akkumulation anderer Zwischenprodukte, wie z. B. HIBA, wurde während der MTBE-Abbauversuche nicht beobachtet bzw. konnten mit den eingesetzten gaschromatographischen Analysen nicht nachgewiesen werden.

Der Stamm war allerdings auch nicht in der Lage, HIBA als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten (→ Kapt. 4.2.3). In molekularbiologischen Untersuchungen des Stammes wurde die Expression des HIBA abbauenden Enzymes, der Isobutyryl-CoA Mutase (ICM) (Abbaupfad → Kapt. 1, Abb. 2), untersucht (Abb. 34-B, Slot 8 und 9). Die zu erwartende Bande des Genfragmentes der ICM hatte eine Größe von 1,7 kb. In diesem Bereich der Slots 8, 9 (Stamm BU3) der Abb. 34 B konnten keine Banden nachgewiesen werden. Desweiteren konnte ausgeschlossen werden, dass der Stamm BU3 MTBE und TBA als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzt (→ Kapt. 4.2.3).

4.5 Feldversuch

4.5.1 Prinzip des Feldversuches

In dem, vom BMBF geförderten METLEN-Projekt (Förderkennzeichen 02 WN-0350), am Projektstandort Leuna errichteten Referenztestfeldes wurde der cometabolische MTBE-Abbau alkanverwertender Bakterien unter Anwendung des ENA-Konzeptes getestet.

In Vorbereitung auf den Feldversuch wurden auf der Basis der Ergebnisse der Laboruntersuchungen der einzusetzende Stamm und das Wachstumssubstrat ausgewählt. Für den Einsatz im Feldversuch standen die Stämme K152, B12 und BU3 zur Verfügung, da diese höhere MTBE-Abbauraten als die Anreicherungskulturen aufwiesen. Eine Übersicht der MTBE-

Ergebnisse

Abbauraten und Wachstumsparameter der drei Reinkulturen in den getesteten Laborsystemen bietet die Tab. 32.

Tab. 32: Übersicht der Laborergebnisse der MTBE-Abbaupotenziale und der Wachstumsraten der drei Stämme B12, K152 und BU3

Parameter/ Stämme	BU3		K152	B12
verwendetes Wachstumssubstrat	2-Propanol	1-Propanol	1-Propanol	
maximale Wachstumsrate [h^{-1}]	0,17	0,2	0,16	0,06
maximale Enzymaktivitäten des Stammes (indirekter Nachweis) [$\text{mg MTBE/g BTS} \cdot \text{h}$]	2,3	3,1	2,0	1,0
maximale MTBE-Abbauraten an ruhenden Zellen bei 20°C [$\text{mg MTBE/g BTS} \cdot \text{h}$]	2,3	3,1	1,9	1,1
maximale MTBE-Abbauraten an ruhenden Zellen bei 12°C [$\text{mg MTBE/g BTS} \cdot \text{h}$]	1,0	1,4	1,1	0,3
durchschnittliche MTBE-Abbauraten in den Laborsäulen [$\text{mg MTBE/g BTS} \cdot \text{d}$]	33,3	50,4	26,5	23,7
durchschnittliche MTBE-Abbauraten in den kleintechnische Säulen [$\text{mg MTBE/g BTS} \cdot \text{d}$]	20,4	31,2	14,4	k. A.

Der Stamm BU3 zeichnete sich in allen Laborsystemen durch ein höheres MTBE-Abbaupotenzial gegenüber den Stämme B12 und K152 aus. Desweiteren besaß er ein breites Spektrum an verwertbaren Kohlenstoffquellen (→ Kapt. 4.2.3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Stamm BU3 als Modellorganismus für den Feldversuch ausgewählt.

Als Wachstumssubstrate standen Propan, 1- bzw. 2-Propanol zur Diskussion. Propan bewirkte zwar höhere Enzymaktivitäten des Stammes BU3 nach kürzeren Aktivierungszeiten, demgegenüber standen jedoch als negative Aspekte

- ein hoher Kosten- und Sicherheitsaufwand bei der Anzucht der Kulturen in Fermentern,
- die notwendige Etablierung einer Propanbegasungsanlage im Feldversuch und
- die geringe Bioverfügbarkeit Propans aufgrund der niedrigeren Löslichkeit des Gases im Wasser.

Diese Nachteile und die bei den Laborsäulen beobachtete geringere Effizienz der Regenerierung des Enzymssystems (→ Kapt. 4.3.2) führten dazu, Propan als Wachstumssubstrat auszuschließen. Bei der Verwendung von 1- bzw. 2-Propanol als Wachstumssubstrate ergaben sich keine Probleme bei der Anzucht des Stammes BU3 bzw. der Zugabe von Wachstumssubstrat im Feldversuch. Vorversuche im Labor zeigten, dass 1-Propanol sowohl von den autochthonen Bakterien ($\mu_{\text{max}} = 0,21 \text{ h}^{-1}$) und dem Stamm BU3 ($\mu_{\text{max}} = 0,20 \text{ h}^{-1}$) mit ähnlicher Effizienz metabolisiert wurde (Abb. 35). Im Gegensatz dazu war bei Verwendung von 2-Propanol als Kohlenstoffquelle nur ein sehr geringes Wachstum der autochthonen Bakterien im Vergleich zum Stamm BU3 festzustellen.

Ergebnisse

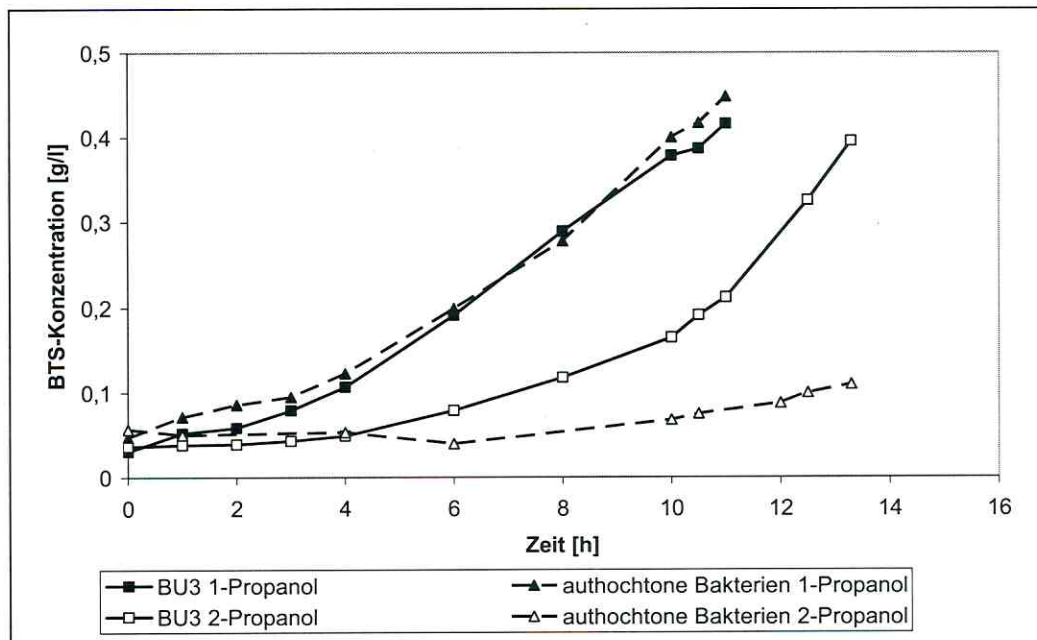


Abb. 35: Vergleich des Wachstumes des Stammes BU3 und der autochthonen Bakterien des Standortes Leuna auf den Wachstumssubstraten 1- bzw. 2-Propanol ($T = 30^{\circ}\text{C}$, NMS-Medium, C 1-bzw. 2-Propanol = 1,6 g/l)

Obwohl im Feld nur geringe Konzentrationen der Wachstumssubstrate dosiert wurden, wäre durch die Anwendung von 1-Propanol ein Verdrängen der Kultur BU3 durch die autochthonen Bakterien zu erwarten gewesen. Desweiteren ist bekannt, dass 2-Propanol beim vollständigen Abbau von MTBE gebildet wird (→ Abbauweg Kapt. 1, Abb. 2). Aufgrund dessen wurde für die Projektphase III (Bioaugmentation) 2-Propanol als Wachstumssubstrat ausgewählt.

Aufgrund der Ergebnisse der Laboruntersuchungen wurden für den Feldversuch folgende Empfehlungen gegeben:

- Anwendung des Wachstumssubstrat 1- bzw. 2-Propanol in Konzentrationen von 40 mg/l
- Einsatz des Stammes BU3 zum Test des Prozesses der Bioaugmentation
- Gewährleistung einer minimalen Sauerstoffgrenzkonzentration von 0,4 mg/l

Während des Untersuchungszeitraumes Oktober 2004 - Mai 2006 wurde die Rinne zum cometabolischen MTBE-Abbau unter drei verschiedenen Versuchsbedingungen gefahren (I: Biostimulation, II: Biostimulation mit zusätzlicher Dosierung von Wasserstoffperoxid, III: Bioaugmentation).

Ergebnisse

Die im unbehandelten Grundwasserleiter des Feldstandortes (Probenahmestelle EB) ermittelten Parameter wiesen während des Versuchszeitraumes die in Tab. 33 dargestellten Werte auf.

Tab. 33: Parameter des unbehandelten Grundwasserleiters des Projektstandortes Leuna im Untersuchungszeitraum Oktober 2004 - Mai 2006

Parameter	unbehandelter Grundwasserleiter
Temperatur	typischer Jahresverlauf, Maximum (September, Oktober): 17°C Minimum (März): 9,5 °C
pH-Wert	6,8 – 7,0
Redoxpotenzial	(- 88 mV) – (- 124 mV)
MTBE-Konzentration	38 mg/l - 45 mg/l
TBA-Konzentration	0,280 mg/l - 0,440 mg/l
durchschnittliche Zahl der heterotrophen autochthonen Bakterien *	1,1*10 ³ Zellen/ ml
durchschnittliche Zahl der 1-propanol-verwertenden Bakterien	4,3*10 ² Zellen/ ml
durchschnittliche Zahl der 2-propanol-verwertenden Bakterien	2,5*10 ² Zellen/ ml

Anmerkung: * Die Bestimmung der kultivierbaren Bakterien erfolgte über MPN-Methode und Ausplattierungen. Die Angaben entsprechen den Mittelwerten des gesamten Untersuchungszeitraumes.

4.5.2 Projektphase I : Prozess Biostimulation

Die Dosierung von Sauerstoff, 1-Propanol und Phosphat in der Projektphase I hatte folgende Auswirkungen auf den Grundwasserleiter:⁶ (→Anhang- Abb. A-7 – A-10)

- Erhöhung des Redoxpotenziales des Grundwassers von -97 mV (EB) auf 125 mV im Infiltrationsbrunnen (IB) bzw. 10,8 mV im Brunnen Saf 56
- Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration von 0,63 mg/l auf 1,29 mg/l, die aber bereits im Konditionierungsbauwerk und den ersten 15 m des Abstromstreifens (Saf 56) verbraucht wurde
- vollständiger Verbrauch des zudosierten 1-Propanol im Konditionierungsbauwerk
- Erhöhung der heterotrophen autochthonen Bakterien im Konditionierungsbauwerk um eine Zehnerpotenz von 1,1*10³ Zellen/ ml auf 1,1*10⁴ Zellen/ml
- Anstieg des Anteiles der 1-propanolverwertenden Bakterien an der heterotrophen Gesamtbakterienzahl von 38% auf 72%

Es konnte weder im Feld eine signifikante Abnahme der MTBE-Konzentration nachgewiesen werden noch waren die angereicherten autochthonen 1-propanolverwertenden Bakterien unter optimalen Laborbedingungen (T= 20°C, NMS-Medium, Abbauprobversuche nach Schema A, Gelöstsauerstoffkonzentration > 0,6 mg/l) in der Lage, MTBE cometabolisch abzubauen.

⁶ Bei allen dargestellten Werten handelt es sich um Durchschnittswerte der Projektphase I.

Ergebnisse

4.5.3 Projektphase II: Biostimulation mit zusätzlicher Zugabe von Wasserstoffperoxid (200 ml 50 % H₂O₂/ m³ Grundwasser)

In der Projektphase II wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid weiter erhöht. Die Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Infiltrationsbrunnen lag in der Projektphase I zwischen 0,4 und 1,4 mg/l Sauerstoff. Am Ende der Projektphase II (Dezember 2005) wurden in diesem Brunnen 62,2 mg/l Gelöstsauerstoff ermittelt. Anhand der gemessenen Redoxpotenziale wurde ebenfalls die zunehmende Aerobisierung des Grundwasserleiters vor allem in den Brunnen Saf 58 (72 mV) und Saf 59 (99 mV) des Abstromstreifens nachgewiesen (→ Anhang Abb. A-8). Durch die verbesserte Sauerstoffbereitstellung stieg die Zahl der heterotrophen Bakterien von $8,4 \cdot 10^3$ Zellen/ml (Saf 56: Projektphase I) auf $2,2 \cdot 10^4$ Zellen/ml (Saf 56: Projektphase II) an. Der Anteil der 1-propanolverwertenden Bakterien an der Gesamtbakterienzahl blieb dabei konstant bei 72%. Ein signifikanter cometabolischer MTBE-Abbau wurde auch in dieser Projektphase nicht nachgewiesen. Die im Labor parallel durchgeführten MTBE-Abbauversuche der autochthonen Bakterien zeigten, dass die Kulturen auch unter optimalen Bedingungen (T= 20°C, NMS-Medium, Gelöstsauerstoffkonzentrationen > 0,6 mg/l, MTBE-Abbauversuche nach Schema A) kein MTBE-Verwertungspotenzial besaßen.

4.5.4 Projektphase III: Bioaugmentation

Die Versuchsphase der Bioaugmentation lief von Januar 2006 - Mai 2006.

Ende Dezember 2005 wurden 100 l einer aktiven Kultur des Stammes BU3 mit einer Biomassekonzentration von 7,9 g/l und einer Enzymaktivität von 2,0 mg MTBE/g BTS*h in das Konditionierungsbauwerk injiziert. Durch die in der Projektphase II optimierte Sauerstoffdosierung wurden während der Projektphase III im Infiltrationsbrunnen (IB) Gelöstsauerstoffkonzentrationen von durchschnittlich 51 mg/l gemessen. Nach der Injektion des Stammes lag die Gelöstsauerstoffkonzentration im Abstromstreifen bei < 0,2 mg/l. Als Wachstumssubstrat wurde 2-Propanol statt 1-Propanol zugegeben, wodurch die Gefahr einer Verdrängung des Stammes BU3 durch autochthone Bakterien minimiert wurde (→ Kapt. 4.5.1). Das zudosierte 2-Propanol wurde wie das in Projektphase I und II zugegebene 1-Propanol innerhalb des Konditionierungsbauwerkes abgebaut. Es war nicht möglich 1- bzw. 2-Propanol im Abstromstreifen der Rinne nachzuweisen. In dieser Projektphase wurde erstmalig ein cometabolischer MTBE-Abbau im Feld nachgewiesen (Abb. 36).

Ergebnisse

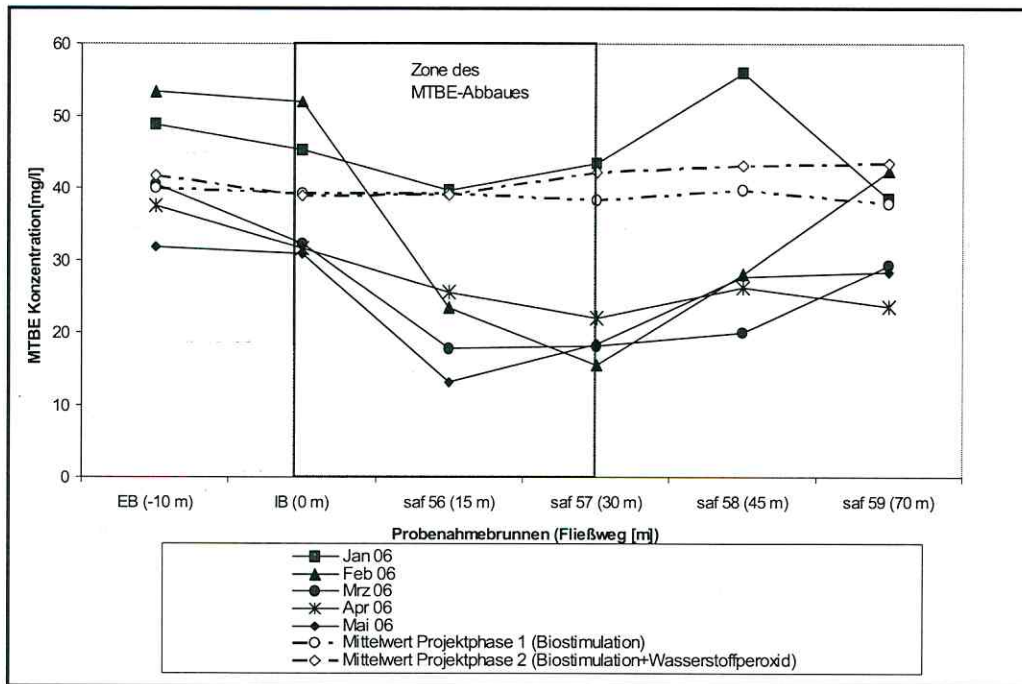


Abb. 36: MTBE-Abbau entlang des Abstromstreifens der Rinne während der Projektphase III (Bioaugmentation) (Jan 06- Mai 06)

Im Februar 2006 (2 Monate nach der Injektion des Stammes BU3) konnte eine maximale Verringerung der MTBE-Konzentration um 71,3% von 53,3 mg/l MTBE (EB-Brunnen) auf 15,3 mg/l MTBE im Brunnen Saf 57 des Abstromstreifens ermittelt werden. Die Effizienz des durchschnittlichen MTBE-Abbaues sowie die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen dieser Projektphase sind in Tab. 34 dargestellt.

Ursache für den Anstieg der MTBE-Konzentration in den Brunnen Saf 58, Saf 59 des Abstromstreifens waren hydrologische Prozesse, möglicherweise in Form von Rückvermischung und eine zeitliche Verschiebung der MTBE-Konzentration aufgrund der Fließgeschwindigkeit des Grundwassers. Ein signifikanter MTBE-Abbau wurde im Infiltrationsbrunnen (IB) und den ersten zwei Brunnen des Abstromstreifens (Saf 56, Saf 57) nachgewiesen. Parallel zur Abnahme der MTBE-Konzentration konnte im Infiltrationsbrunnen eine Erhöhung der TBA-Konzentration um das 3,9-fache ermittelt werden. Die darauffolgende Abnahme der durchschnittlichen TBA-Konzentrationen von 1,05 mg/l auf 0,20 mg/l im ersten Brunnen des Abstromstreifens (Saf 56) war unter anderem auf die Ausbildung natürlicher Konsortien

Ergebnisse

zwischen dem Stamm BU3 und den autochthonen Bakterien zurückzuführen, welche bei den mikrobiologischen Ausplattierungen der Grundwasserproben nachgewiesen wurden.

Diese Ausplattierungen zeigten Bakterienkolonien mit typischen Spezifikationen des Stammes BU3 (→ Kapt. 4.1.2, Tab. 16) und Kolonien mit anderer Makromorphologie.

Tab. 34: Parameter der Projektphase III (Bioaugmentation) des Feldversuches (dargestellt sind gemittelte Werte der Projektphase III (Monate Februar 2006 - Mai 2006)**

Parameter	Probenahmebrunnen					
	EB	IB	Saf 56	Saf 57	Saf 58	Saf 59
Lage der Brunnen	Konditionierungseinheit		Fließweg des Abstromstreifens			
	Eingang	Ausgang	15 m	30 m	45 m	75 m
durchschnittliche MTBE-Konzentration [mg/l]	39,5	36,7	18,2	17,3	25,5	27,0
durchschnittliche TBA-Konzentrationen [mg/l]	0,27	1,05	0,24	0,20	0,20	0,20
Effizienz des MTBE-Abbaues	-	7%	50%	5%	-	-
durchschnittliche Anzahl der heterotrophe Bakterien [KBE/ml]	$1,1 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$
durchschnittliche Anzahl der 2-propanolverwertende Bakterien [KBE/ml]	$2,5 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$
durchschnittliche Zellzahl des Stammes BU3 [KBE/ml]*	0	$9,8 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$

Anmerkung: * Nachweis erfolgte über Plattenausstriche, deren Ergebnisse molekularbiologisch (PCR) verifiziert wurden.

** Die Ergebnisse des Monats Januar 2006 (Anlaufphase) wurden in Berechnung nicht einbezogen

Durch die Injektion des Stammes BU3 erhöhte sich die Anzahl der 2-propanolverwertenden Bakterien im Infiltrationsbrunnen von $2,5 \cdot 10^2$ Zellen/ ml auf $1,2 \cdot 10^4$ Zellen/ ml. Die Anzahl der durchschnittlichen 2-propanolverwertenden Bakterien nimmt mit der Länge des Abstromstreifens geringfügig ab. Im Gegensatz dazu nimmt der prozentuale Anteil des Stammes BU3 von den 2-propanolverwertenden Bakterien mit der Länge des Abstromstreifens zu (Abb. 37). Im Brunnen Saf 59 wurden 97% der ermittelten Bakterien ($1,8 \cdot 10^3$ Zellen/ ml) als BU3 identifiziert.

Ergebnisse

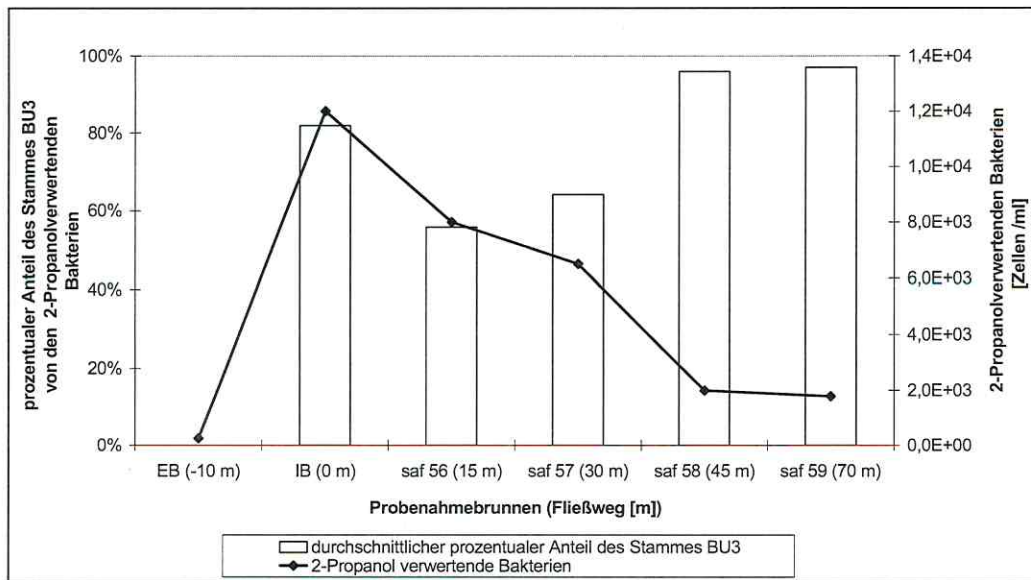


Abb. 37: Anzahl der 2-propanolverwertende Bakterien und der prozentuale Anteil der injizierten Kultur BU3 in der Rinne in der Projektphase III

Die Identifizierung des Stammes BU3 erfolgte durch kultivierungsabhängige Methoden (→ Kapt. 3.6.2), deren Ergebnisse mithilfe molekularbiologischer Methoden verifiziert wurden. Dazu wurden die makromorphologisch als Stamm BU3 identifizierten Kolonien molekularbiologisch unter Anwendung der PCR-Methode mit den stammspezifischen Primern BU3dn und BU3rd untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen gaben Aufschluß darüber, dass es sich bei den getesteten Kulturen um den Stamm BU3 handelte. Qualitative Aussagen zur Anwesenheit des Stammes BU3 erfolgten parallel dazu durch Flüssiganreicherungen der einzelnen Brunnen, die mithilfe der stammspezifischen Primer (BU3dn, BU3rd) überprüft wurden. Das Ergebnis einer solchen Überprüfung ist in Abb. 38 dargestellt.

In beiden Ansätzen (Flüssiganreicherungen und Plattenausstriche) konnte in den Brunnen IB, Saf 56 – Saf 59), dass für den Stamm BU3 spezifische 0,85 kb große Genfragment nachgewiesen werden.

Ergebnisse

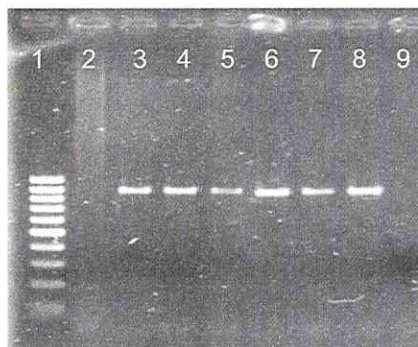


Abb. 38: PCR der Grundwasseranreicherungen der Probenahmebrunnen mit den spezifischen Primern (BU3dn, BU3rd) für den Stamm BU3: (Slot 1: 1 kb Marker; Slot 2: EB; Slot 3: IB; Slot 4: Saf 56; Slot 5: Saf 57; Slot 6: Saf 58; Slot 7: Saf 59; Slot 8: Positivkontrolle (BU3); Slot 9: Negativkontrolle)

Zur Verbesserung der Effizienz und der Verringerung des Betreuungsaufwandes des Monitorings der applizierten Kultur wurde als quantitative Methode die in-situ-Hybridisierung mit einer für den Stamm BU3 spezifischen FISH-Sonde etabliert. Nach Ableitung der im Kapt. 3.6.2 beschriebenen stammspezifischen FISH-Sonde wurde diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Spezifität und Stringenz für den Stamm BU3 getestet. Dazu wurde die Sonde bei verschiedenen Formamidkonzentrationen und konstanter Hybridisierungstemperatur gegen den Stamm BU3 und die Vergleichsstämme *Mycobacterium mageritense* B12, *Rhodococcus aetherovorans* und *Rhodococcus rhodochrous* und zwei Umweltisolate vom Projektstandort Leuna getestet. Die Ergebnisse ergaben, dass die Sonde bei 20%iger Formamidkonzentration spezifisch war (nicht dargestellt) und der Stamm BU3 eindeutig in einer Mischkultur nachgewiesen werden konnte (Abb. 39).

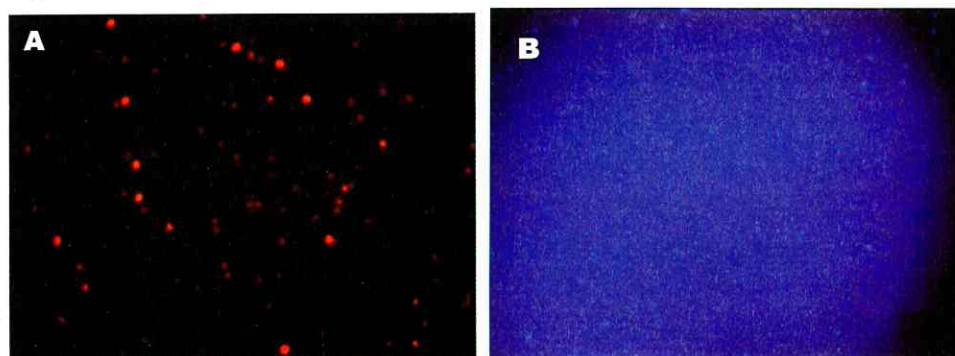


Abb. 39: Mikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung des Stammes BU3 in einer Mischkultur mit der stammspezifischen FISH-Sonde (A: Sonde des Stammes BU3; B: DAPI Färbung, Formamidkonzentration 20% , 1000-fache Vergrößerung)

5 Diskussion

Die Zunahme von MTBE-Schadensfällen im Grundwasserbereich und der steigende MTBE-Verbrauch in der Kraftstoffindustrie (1995: 8 Millionen Tonnen/Jahr, 2004:- 20 Millionen Tonnen/Jahr (Kepler, 2006, Arp et al. 2004)) zeigen, dass MTBE als Grundwasserkontaminante ein ernstzunehmendes Gefährdungspotenzial besitzt. Sanierungsstrategien, basierend auf konventionellen Techniken, sind kostenintensiv und besitzen eine geringe Effektivität. Die sich daraus ergebenden Zielstellungen der vorliegenden Arbeit waren neben Grundlagenuntersuchungen zum cometabolischen Abbau von MTBE durch alkan- und alkoholverwertende Bakterien die Erarbeitung eines Verfahrensvorschlages zur Sanierung von MTBE-Schäden im Grundwasserbereich im Sinne des ENA-Konzeptes. Im Gegensatz zu bisherigen Literaturstudien, in denen zumeist höherwertige Alkane verwendet wurden, kamen in der vorliegenden Arbeit Methan, Propan, Butan sowie 1- und 2-Propanol als Wachstumssubstrate zum Einsatz.

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutiert. Auf die relevanten Abschnitte der Ergebnisse wird der Übersichtlichkeit halber verwiesen (→).

5.1 Auswahl und Charakterisierung der verwendeten Misch- und Reinkulturen

→ Kapitel 4.1

Als methanverwertende Kulturen wurden neun methanotrophe Reinkulturen und sieben methanverwertende Anreicherungskulturen ausgewählt, die die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO) exprimieren. Die sMMO ist ein unspezifisches Enzym, das eine Vielfalt von Kohlenwasserstoffen wie z.B. verzweigte Alkane, zyklische Verbindungen (Colby et al. 1977), Ether (Patel et al. 1982) und chlorierte Kohlenwasserstoffe (Jechorek et al. 2003) oxidiert. Aufgrund der Eigenschaften dieses Enzymes leitete sich die Hypothese ab, dass auch eine Oxidation von MTBE durch die sMMO möglich sein sollte. Dazu wurden im → Kapt. 4.3.1.1 MTBE-Abbauversuche mit methanverwertenden Anreicherungskulturen und aus diesen isolierten methanotrophen Reinkulturen durchgeführt, bei denen sMMO-Aktivitäten bis zu 101,7 nmol/mg BTS*h gemessen wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten die Hypothese, dass ein cometabolischer MTBE-Abbau durch sMMO-exprimierende methanverwertende Kulturen möglich war.

Durch ein Screening der aus den Umweltproben (→ Kapt. 3.3.1, 4.1.2) isolierten methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen gelang es innerhalb von 3 Monaten aus dem großen Pool an Bakterien effiziente MTBE-abbauende Stämme auszuwählen.

Diskussion

Die propanverwertenden Stämme B12 (*Mycobacterium mageritense*), K152 (β -Proteobacterium) und der butanverwertende Stamm BU3 (*Rhodococcus ruber*) erwiesen sich aufgrund ihres hohen MTBE-Abbaupotenziales am besten geeignet für die Zielstellung der vorliegenden Arbeit. Zur Identifizierung dieser drei Stämme wurde eine Kombination von morphologischen, physiologischen und molekularbiologischen Methoden angewendet. Durch die Verknüpfung dieser Techniken konnten Probleme bei der Stammidentifizierung ausgeschlossen werden, wie sie in den Arbeiten von Goodfellow et al. (1998) zur Identifizierung von Actinomyceten mithilfe biochemischer Testsysteme auftraten. Wie der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene morphogenetische Zellzyklus des Stammes BU3 → Kapt. 4.1.3 zeigten auch Untersuchungen des Stammes *Rhodococcus ruber* von Lechevalier et al. (2005) eine Änderung der Kulturmorphologie während des Wachstumsprozesses. Beim Vergleich des Kohlenstoffverwertungsspektrums des Stammes *Rhodococcus ruber* (Lechevalier et al. 2005) mit dem des Stammes BU3 sind Ähnlichkeiten erkennbar. Mithilfe der Sequenzierung der 16 S-rRNA wurde der Stamm BU3 als *Rhodococcus ruber* identifiziert.

Die Stämme BU3 und B12 gehören zur Klasse der *Actinomyceten*, die in der Literatur häufig im Zusammenhang mit dem Abbau von Schadstoffen, wie z.B. chlorierte polyzyklische Aromaten (Briglia et al. 1994), Pestizide (Parekh et al. 1994) und MTBE (Beguín et al. 2003; Solano-Serena et al. 2000), genannt werden.

Der Stamm K152 wurde der Klasse der *Burkholderiales* zugeordnet. Bisher sind aus der Literatur keine Stämme dieser Klasse bekannt, die in der Lage sind MTBE cometabolisch abzubauen. Die evolutionär nächsten Verwandten, mit denen ein MTBE-Abbau beschrieben wurde, gehören zur Gattung *Pseudomonas* (Garnier et al. 1999, Smith et al. 2003a). Die Isolierung des Stammes K152 stellt auf dem Gebiet der Grundlagenforschung des cometabolischen MTBE-Abbaues eine wichtige Novität dar.

5.2 Wachstumsuntersuchungen

→ Kapitel 4.2

Nach Auswahl der methan-, propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen bezüglich der Fähigkeit, MTBE cometabolisch abzubauen, wurden die Kulturen hinsichtlich der Parameter Wachstumsgeschwindigkeiten und Enzymaktivitäten, der für den MTBE-Abbau relevanten Enzymsysteme, untersucht.

Bei der Anzucht der methanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen musste ein kupferfreies NMS-Medium verwendet werden, da aus der Literatur bekannt war, dass die sMMO bei Kupferkonzentrationen über 0,1 μmol gehemmt wird (Grosse et al. 1999).

Die maximalen sMMO-Aktivitäten der Kulturen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase gemessen. Auch Beck (2000) beobachtete in seinen Untersuchungen mit dem Stamm *Methylocystis* spec. GB 14 maximale sMMO-Aktivitäten (132,9 nmol/mg*h) in der exponentiellen Wachstumsphase.

Eine bis zu vierfache Steigerung der maximalen Wachstumsraten der methanverwertenden Anreicherungskultur Ks C wurde bei Anzucht auf Methanol nachgewiesen, welche unter anderem auch auf die Anwesenheit methanolverwertender Bakterien in der Begleitflora der Anreicherungskultur zurückzuführen war. Eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit des methanotrophen Bakterienstammes *Methylocystis* GB25 ZIMET B 502, allerdings nur bis zu 25%, konnten Schneider et al. (1983) durch den Zusatz von Methanol (0,23g/ g gebildete Biomasse) registrieren. Die in der Arbeit isolierten methanverwertenden Kulturen konnten nach Anzucht auf Methanol MTBE nicht cometabolisch abbauen, da während des gesamten Versuchszeitraumes keine sMMO-Aktivität nachgewiesen wurde. Ursache hierfür war eine Hemmung der sMMO durch Methanol, wie die Ergebnisse der Versuche zur Stabilität der sMMO-Aktivität durch verschiedene Substanzen gezeigt haben (→ Kapt. 4.2.1). Eine Hemmung des Enzymes bei Anzucht auf Methanol wurde auch in den Arbeiten von Broholm et al. (1993) beobachtet. Sie stellten beim cometabolischen TCE-Abbau durch ein mikrobielles methanverwertendes Konsortium einen Abbruch des Abbaues nach 5 Tagen fest, wenn die Kulturen auf Methanol angezogen wurden, während Methan-inkubierte Zellen TCE über 30 Tage abbauten.

Bei den propan- und butanverwertenden Anreicherungskulturen (→ Kapt. 4.2.2) wurden beim Einsatz von Alkoholen (Propanol, Butanol) bis zu 2,5-fach höhere maximale Wachstumsraten als bei der Verwendung von Alkanen (Propan, Butan) beobachtet. Eine Hemmung der für den MTBE-Abbau verantwortlichen Monooxygenasen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden und ist auch aus der Literatur nicht bekannt.

Die maximalen Wachstumsraten des zu den Mycobakterien gehörenden Stammes B12 ($\mu_{\max} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ auf 1-Propanol) lagen in geringeren Bereichen als bei den Stämmen BU3 und K152. Sie lagen jedoch in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquellen in ähnlichen Größenordnungen wie die in der Literatur beschriebenen Wachstumsraten von Mycobakterien ($0,03 \text{ h}^{-1} - 0,1 \text{ h}^{-1}$) (Wayne et al. 1980). Von den drei isolierten Stämmen BU3, K152 und B12 zeigte der Stamm BU3 bei Anzucht auf 1-Propanol mit $0,2 \text{ h}^{-1}$ die höchste maximale Wachstumsrate. Hernandez-Perez et al. (2001) bestimmten für den Stamm *Gordonia terrae* IFP 2001 (später *Rhodococcus ruber* IFP 2001) bei Verwendung von ETBE als Wachstumssubstrat eine maximale Wachstumsrate von $0,042 \text{ h}^{-1}$.

Diskussion

Daraus folgt, dass ETBE aufgrund seiner Etherstruktur, für deren Spaltung ein Energieaufwand von 360 kJ (White et al. 1996) notwendig ist, ein schlechtes Wachstumssubstrat für die Spezies *Rhodococcus ruber* ist (Salanitro et. al. 1994). Unter dem Aspekt einer schnellen Anzucht aktiver Kulturen besitzt das Wachstumssubstrat Propanol für *Rhodococcus ruber* einen entscheidenden Vorteil gegenüber ETBE.

Alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Anreicherungs- und Reinkulturen konnten MTBE, TBA sowie HIBA nicht als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten. Daraus ist zu schlussfolgern, dass der Abbau von MTBE und TBA cometabolisch erfolgt. Diese Ergebnisse stehen den von Fayolle et al. (2004) durchgeführten Untersuchungen mit dem Stamm *Rhodococcus ruber* IFP2007 bzw. den Studien von Francois et al. (2003) mit *Mycobacterium austroafricanum* IFP-2012 entgegen. Beide Stämme können MTBE als Wachstumssubstrat verwerten. Aufgrund dieser Resultate wird vermutet, dass die genetischen Voraussetzungen eines Stammes, MTBE cometabolisch bzw. als Wachstumssubstrat abzubauen, sehr eng beieinander liegen, da taxonomisch nahverwandte Bakterien unterschiedliche metabolische Wege für den MTBE-Abbau besitzen.

Die Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität der propan- und butanverwertenden Kulturen erwies sich aufgrund der Diversität dieser Enzymklasse als schwierig. Direkte Aktivitätsbestimmungen von höherwertigen Monooxygenasen, mit Ausnahme des Cytochrom P450, sind aus der Literatur nicht bekannt. Die Aktivität des Cytochrom P450 kann über Kohlenmonoxid-Differenzspektren ermittelt werden. Die Aussagekraft dieses Tests in ganzen Bakterienzellen ist jedoch gering (Sträuber et al. 2003). Demzufolge wurde bei der Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität der propan- und butanverwertenden Kulturen in der vorliegenden Arbeit auf zwei indirekte Methoden (Kurzzeit-MTBE-Abbautest, Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit) zurückgegriffen. Die Validierung des neu etablierten Kurzzeit-MTBE-Abbautests mithilfe der in der Literatur mehrfach beschriebenen Methode zur Messung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit (Goswami et al. 1999, Arp et al 1999) ergab, dass beide Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt werden konnten (→ Kapt. 4.2.3., Abb.13).

Die maximale Enzymaktivität der propan- und butanverwertenden Kulturen war abhängig von dem eingesetzten Wachstumssubstrat und wurde, wie die sMMO-Aktivität der methanverwertenden Kulturen, in der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Bei der Verwendung von Alkanen konnten die maximalen Enzymaktivitäten der Stämme (z.B. BU3: 7,1 mg MTBE/g BTS*h) bereits nach zwei Stunden gemessen werden, während sie beim Einsatz von Alkoholen als Wachstumssubstrat erst nach sechs Stunden erzielt wurden und geringere Werte aufwiesen (BU3 - Wachstumssubstrat 1-Propanol: 3,1 mg MTBE/g BTS*h).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Alkan-Oxidation ist die Umwandlung des Alkans zum Alkohol, welcher durch Monooxygenasen katalysiert wird. Bei der Anzucht von propan- und butanverwertenden Kulturen auf Alkoholen ist somit vermutlich die unvollständige Aktivierung der Monooxygenase Ursache für die geringeren Enzymaktivitäten und die längeren Aktivierungszeiten. Auch Perry (1968) und Steffan et al. (1997) wiesen in ihren Studien daraufhin, dass bei der Anzucht alkanverwertender Kulturen auf Alkoholen die Monooxygenase unvollständig aktiviert wird. Steffan et al. (1997) zum Beispiel zeigten, dass der Stamm *Nocardia* ENV425 nach Anzucht auf Alkoholen eine geringere Aktivität des Enzymes Cytochrom P450 besitzt als nach Anzucht auf Alkanen. Die Enzymaktivität des Stammes BU3 der vorliegenden Arbeit nach Anzucht auf 1-Propanol lag bei 39% der Enzymaktivität nach Anzucht auf Propan. Der Stamm *Mycobacterium vaccae* JOB5 hingegen besaß nach Anzucht auf 1-Propanol im Vergleich zu propangewachsenen Zellen nur eine 19%ige Enzymaktivität (Smith et al. 2003).

Als optimale Wachstumssubstratkonzentrationen für die Anzucht der Kulturen BU3, B12 und K152 wurden 50% Propan in Luft und 1,6 g/l 1- bzw. 2-Propanol (Ergebnisse 2-Propanol nicht dargestellt) bestimmt. Unter dem Aspekt der Nutzung der Stämme B12, BU3 und K152 für Grundwassersanierungsprojekte war es wichtig, die Ergebnisse der Wachstumsprozesse im Schüttelkolben auf größere Maßstäbe zu übertragen. Hierbei stand die Auswahl des einzusetzenden Wachstumssubstrates an erster Stelle. Propan als Wachstumssubstrat zeichnete sich durch hohe Enzymaktivitäten und kurze Aktivierungszeiten aus.

Dem gegenüber standen jedoch:

- höhere Wachstumsraten der Kulturen auf Propanol
- eine bessere Löslichkeit von Alkoholen (1- bzw. 2-Propanol) in Wasser im Vergleich zu Alkanen (Propan)
- ein hohes Sicherheitsrisiko beim Arbeiten mit Propan im Labor- und Feldversuch
- ein hoher technischer Aufwand bei der Anzucht der Kulturen mit Propan als Wachstumssubstrat in speziellen Fermentern unter Ex-Bedingungen

Diese Faktoren und die im Vergleich zur Literatur hohe Enzymaktivität des Stammes BU3 bei Anzucht auf 1- bzw. 2-Propanol waren ausschlaggebend für die Auswahl von Propanol als Wachstumssubstrat für den Feldversuch.

Beim Stamm BU3 wurde neben 1-Propanol auch 2-Propanol als Wachstumssubstrat eingesetzt, da der sekundäre Alkohol von den autochthonen Mikroorganismen des Projektstandortes Leuna schlechter verwertet wurde als 1-Propanol und somit einen Vorteil für den Feldversuch darstellte (→ Kapt. 4.5.1). Ähnliche Erfahrungen hinsichtlich der schlechteren Verwertbarkeit von 2-

Diskussion

Propanol durch Mikroorganismen beschrieben auch Bustard et al. (2000) in ihren Studien zur Biodegradation von 1- und 2-Propanol durch eine Mischkultur.

Neben den Fermentationen des Stammes BU3 mit 1-Propanol als Wachstumssubstrat wurde für die Anzucht des Stammes für die Säulenversuche und den Feldversuch die zweistufige fed-batch Fermentation mit dem Wachstumssubstrat 2-Propanol durchgeführt (→ Kapt. 4.2.4). Durch Anwendung dieser neu etablierten Methode gelang es hohe BTS-Konzentrationen des Stammes mit hohen Enzymaktivitäten zu produzieren. In Abhängigkeit der verwendeten Fermenter konnten maximale BTS-Konzentration von 3,0 g/l (5 l-Fermenter) bzw. 7,5 g/l (50 l-Fermenter) sowie Enzymaktivitäten von 2,3 mg MTBE/g BTS*h (5 l-Fermenter) bzw. 2,0 mg MTBE/g BTS*h (50 l-Fermenter) erreicht werden. Die erlangten maximalen Enzymaktivitäten des Stammes in den Fermentationen und in den Schüttelkolbenversuchen (2,3 mg MTBE/g BTS*h) (→ Kapt. 4.2.3) lagen in ähnlichen Größenordnungen, jedoch konnten bei den Fermentationen zehnfach höhere BTS-Konzentrationen geerntet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das durchgeführte Upscaling des Wachstumsprozesses des Stammes BU3 erfolgreich und effizient war. Bei den Arbeiten von Beck (2000) hingegen konnte bei der Anzucht der methanotrophen Kultur GB14 im 5 l-Fermenter keine hohe sMMO-Aktivitäten beobachtet werden. Auch in Fermentationen mit anderen sMMO-positiven methanotrophen Bakterien traten diese Probleme auf (Wendlandt 2006).

Die Stämme B12 bzw. K152 zeigten in den Wachstumsuntersuchungen im Schüttelkolben und im 300 ml-Fermenter geringere maximale Wachstumsraten als der Stamm BU3 (→ Kapt. 4.2.3). Durch die Kreierung eines künstlichen Konsortiums aus beiden Stämmen sollten die Wachstumsprozesse optimiert werden. Starostina et al. (1995) beobachteten während des Wachstums eines künstlichen Konsortiums aus den methanotrophen Bakterien *Methylobacter* sp. GB130 und *Methylocystis* sp. GB25 positive Wechselwirkungen, die zu einer Steigerung der Wachstumsrate im Vergleich zu den Reinkulturen führten. Bei der Fermentation des Konsortiums B12 - K152 (→ Kapt. 4.2.4) der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz dazu negative Wechselwirkungen zwischen den zwei Stämmen nachgewiesen (Wachstumsraten [$\mu_{\max} = 0,07 \text{ h}^{-1}$], Enzymaktivierungszeit [13 Stunden]). Diese können in einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren begründet sein. Es wird vermutet, dass vor allem die Konkurrenz der zwei Stämme um Sauerstoff und Wachstumssubstrat für die negativen Wechselwirkungen verantwortlich sind.

5.3 Cometabolischer MTBE-Abbau unter Verwendung ausgewählter methan-, propan- und butanverwertender Anreicherungs- und Reinkulturen

→ Kapt. 4.3

Die untersuchte Biodegradation von MTBE durch die isolierten alkanverwertenden Bakterien ist eine cometabolische Oxidation, da keiner der Stämme in der Lage war, MTBE als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Bei der cometabolischen Oxidation sind Wachstum und cometabolischer Abbau nicht miteinander gekoppelt (Fritsche 1998). Im Falle des cometabolischen MTBE-Abbaues stellen die eingesetzten Alkane und Alkohole das Wachstumssubstrat und MTBE das cometabolische Substrat dar. Für die Umwandlung des cometabolischen Substrates ist eine Regenerierung der Reduktionäquivalente erforderlich. Voraussetzung für den effektiven MTBE-Abbau bildeten die in den Wachstumsuntersuchungen angezogenen Kulturen mit maximaler Enzymaktivität.

Die Methode der MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen wurde erstmalig in den Studien von Stirling et al. (1979) zum Cometabolismus und später auch in Untersuchungen von Smith et al. (2003b) und Steffan et al. (1997) angewandt. Dabei erfolgte die Aktivierung der für die Umsetzung des cometabolischen Substrates relevanten Monooxygenase durch eine Vorkultivierung der Bakterien mit dem Wachstumssubstrat, während die Abbauversuche in Abwesenheit des Wachstumssubstrates durchgeführt wurden. Am Beispiel des Stammes BU3 wurde die kompetitive Hemmung, die zwischen Wachstumssubstrat und cometabolischen Substrat (MTBE) bei gleichzeitiger Anwesenheit auftritt, gezeigt (→ Kapt. 4.3.1).

5.3.1 MTBE-Abbau der methanverwertenden Kulturen (→ Kapt. 4.3.1.1)

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eindeutig nachgewiesen, dass methanotrophe Bakterien in der Lage sind, MTBE cometabolisch abzubauen und dass ein direkter Zusammenhang zwischen der sMMO-Aktivität und der MTBE-Abbaurate dieser Kulturen besteht. Dieser wurde unter Anwendung der HILL-Gleichung durch eine nichtlineare Regressionsanalyse mathematisch dargestellt (→ Kapt. 4.3.1.1). In der Literatur gibt es bisher nur einen einzigen Hinweis auf einen cometabolischen MTBE-Abbau unter Verwendung von Methan als Kohlenstoffquelle. In einem Patent von Zittwitz et al. (2001) wurde ein Verfahren zur Dekontamination von MTBE-belasteten Böden und/oder Grundwasser durch die Belüftung mit einem methanhaltigen Luftgemisch bei gleichzeitiger Bodenluftabsaugung angezeigt. Die Anmelder des Patentes behaupten, dass verfahrensbedingt die *in-situ* Abbauprozesse im Vordergrund standen. Ein Nachweis, dass tatsächlich methanotrophe Bakterien den MTBE-Abbau bewirkten wurde nicht erbracht.

Diskussion

Die weiterführenden Abbauprobversuche der methanverwertenden Kulturen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die heterotrophe Begleitflora dieser Kulturen eine wichtige Rolle für einen effektiven cometabolischen MTBE-Abbau spielt. Nur vier der zwölf getesteten methanotrophen Reinkulturen waren in der Lage MTBE abzubauen. Die Reinkulturen bauten in allen Fällen MTBE mit geringeren Raten ab, als die Anreicherungskulturen, aus denen die Stämme isoliert wurden. Die heterotrophe Begleitflora der Kulturen, die 20% – 50% der Gesamtbakterienzahl betrug, war am TBA-Abbau der Kulturen beteiligt und besaß einen positiven Einfluss auf den MTBE-Abbau dieser, obwohl sie selbst MTBE weder cometabolisch noch als einzige Kohlenstoffquelle verwerten konnte. Dieser positive Einfluss könnte unter anderem im Abbau sogenannter „dead end“ Metaboliten bestehen.

„Dead end“ Metaboliten sind toxische Zwischenprodukte, die beim cometabolischen Abbau von Schadstoffen durch Reinkulturen gebildet werden und häufig zur Schädigung der Stämme führen (Arp et al. 2001).

Beim MTBE-Abbau des Stammes *Rhodococcus ruber* IFP 2005 wurde z. B. TBA als „dead end“ Metabolit nachgewiesen (Fayolle et al. 2004). Zwar konnten in der vorliegenden Arbeit weder bei den methanverwertenden Kulturen noch bei den propan- und butanverwertenden Stämmen „dead end“ Metabolite identifiziert werden, jedoch ist die Bildung solcher Zwischenprodukte nicht auszuschließen.

5.3.2 MTBE-Abbau der propan- und butanverwertenden Kulturen - enzymatische Untersuchungen (→ Kapt. 4.3.1.2 und 4.4)

Die propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen degradierten MTBE mit höheren Effizienzen (max. Abbaurrate des Stammes BU3: 7,9 mg MTBE/g BTS*h) als die methanverwertenden Kulturen (max. Abbaurrate der Kultur Ks C: 2,1 mg MTBE/g BTS*h). Beim cometabolischen MTBE-Abbau dieser Kulturen wurde TBA intermediär akkumuliert. Der konsekutive Abbau von TBA begann erst als die MTBE-Konzentration im Ansatz unter 5 mg/l gesunken war. Die Autoren Smith et al. (2003a) und Steffan et al. (1997) beobachteten eine ähnliche TBA-Akkumulation während des MTBE-Abbaues der Stämme *Mycobacterium vaccae* JOB 5 bzw. *Nocardia* ENV425 und führten ihn darauf zurück, dass ein und dasselbe Enzym für den Abbau beider Substrate verantwortlich war und diese mit unterschiedlichen Affinitäten metabolisierte.

Die Untersuchungen der Monooxygenasen des Stammes BU3 in Hemmversuchen unter Verwendung verschiedener Monooxygenase-Inhibitoren (→ Kapt. 4.4) ergaben, dass mindestens zwei verschiedene Enzyme den Abbau von MTBE und TBA katalysieren. Beide Enzyme gehören zur Gruppe der eisenhaltigen Monooxygenasen, da sowohl der Abbau von MTBE als auch von TBA durch den Inhibitor Hexin gehemmt wurde.

Hexin hemmte das Wachstum des Stammes *Nocardioides* sp. CF8 bei Anzucht auf Butan und Hexan (Hamamura et al. 2001). In molekularbiologischen Untersuchungen dieses Stammes stellten Hamamura et al. fest, dass eine eisenhaltige Monooxygenase an der Metabolisierung von Butan und Hexan beteiligt war.

Das unterschiedliche Hemmmuster des Inhibitors Methimazol beim MTBE- und TBA-Abbau des Stammes BU3 der vorliegenden Arbeit lässt schlussfolgern, dass der TBA-Abbau durch eine flavinhaltige Monooxygenase katalysiert wird. Methimazol wurde in den Arbeiten von Francois (2003) als Inhibitor für die Aceton-Monooxygenase eingesetzt.

Die Fähigkeit des Stammes BU3, nach Anzucht auf Aceton MTBE und TBA cometabolisch abzubauen, war ein weiteres Indiz dafür, dass ein solches Enzym am cometabolischen Abbau beteiligt ist.

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse von Steffan et al. (1997), Hernandez-Perez et al. (2001) mit den Ergebnissen des MTBE-Abbaues des Stammes BU3 (Tab. 35) wurde die These aufgestellt, dass es sich bei mindestens einem der Enzyme des Stammes BU3 um ein Cytochrom P450 handelt.

Tab. 35: Vergleich des MTBE-Abbauverhaltens der Stämme *Nocardia* ENV425, *Rhodococcus ruber* IFP 2001 und des Stammes BU3

Parameter/ Referenzen	vorliegende Arbeit	Steffan et al. (1997)	Hernandez-Perez et al. (2001)
Stamm	<i>Rhodococcus ruber</i> BU3	<i>Nocardia</i> ENV425	<i>Gordonia terrae</i> (<i>Rhodococcus ruber</i>) ⁷ IFP2001
Wachstumssubstrat	Propan, Propanol, Aceton	Propan, Propanol, Aceton	ETBE, Ethanol
MTBE-Abbau [mg MTBE/g BTS*h]	7,9 (20°C) ²	10,4 (28°C) ²	31,0 (30°C) ³
TBA-Abbau	ja	ja	nein
TBA-Akkumulation	stöchiometrisch	stöchiometrisch	stöchiometrisch
systematische Einordnung des Stammes	Actinomyceten	Actinomyceten	Actinomyceten
am MTBE-Abbau beteiligtes Enzymsystem	unbekannt	Cytochrom P450	Cytochrom P450

Anmerkung: Wachstumssubstrat: ²Propan, ³ ETBE

⁷ spätere taxonomische Einordnung

Diskussion

Die Resultate der molekularbiologischen Untersuchungen zeigten, dass der Stamm BU3 unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht das Enzym Cytochrom P450, welches von dem Operon eth RABCD codiert wird, exprimiert.

Die hohe Diversität der am cometabolischen MTBE- und TBA-Abbau beteiligten Enzymsysteme wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. Hernandez-Perez et al. (2001) z. B. isolierten aus dem Stamm *Gordonia terrae* ein Cytochrom P450, welches nur die Oxidation von MTBE zu TBA katalysierte. TBA konnte durch den Stamm nicht abgebaut werden. Das aus dem Stamm *Nocardia* ENV425 isolierte Cytochrom P450 hingegen katalysierte die Degradation von MTBE und TBA (Steffan et al. 1997).

Schlussfolgernd aus den genannten Literaturstudien und den Arbeiten von Karlson et al. (1993), die aus dem Stamm *Rhodococcus rhodochrous* zwei unabhängig voneinander regulierende P450-Cytochrome isolierten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Cytochrom P450 am Abbau von MTBE durch den Stamm BU3 beteiligt ist.

Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass andere Alkan-Monooxygenasen den MTBE-Abbau des Stammes BU3 katalysieren. Hyman et al. (1998) z. B. isolierten aus dem Stamm *Mycobacterium vaccae* als relevantes Enzym für den cometabolischen MTBE- und TBA-Abbau eine Propan-Monooxygenase.

5.3.3 Einfluss der Begleitflora auf den cometabolischen MTBE-Abbau

(→ Kapt. 4.3.1.3)

Die isolierten propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen (B12, K152 und BU3) bauten MTBE mit unterschiedlichen Effizienzen ab, wobei sich die heterotrophe Begleitflora der Anreicherungskulturen stimulierend bis inhibierend auf den MTBE-Abbau auswirkte. Hrsak et al. (2000) beschrieben in ihren Untersuchungen zum cometabolischen Abbau von Schadstoffen komplexe Wechselwirkungen zwischen den Einzelspezies der Konsortien, die von der Bereitstellung von Nährstoffen, dem Abbau von hemmenden Komponenten („dead end“ Metabolite), der mutualen Modifikation der Grundwachstumsparameter bis hin zur metabolischen Kooperation beim Abbau der Schadstoffe reichen. Am Beispiel der Kulturen B12 und Bs D konnten positive Wechselwirkungen zwischen der heterotrophen Begleitflora und dem Stamm B12 nachgewiesen werden, die vermutlich auf den Abbau von „dead end“ Metaboliten durch die Begleitflora der Anreicherungskultur Bs D zurückzuführen waren. Beim Einsatz einer methanotrophen-heterotrophen Grundwasser-Anreicherungskultur in den Untersuchungen von Hrsak et al. (2000) erhöhte sich die Wachstumsgeschwindigkeit und die cometabolische Abbaurate von linearen

Alkylbenzensulfonaten im Vergleich zur Verwendung der aus dieser Kultur isolierten methanotrophen Reinkultur Met 1. Ausschlaggebend dafür war unter anderem der Abbau von Methanol durch die heterotrophe Begleitflora, welche bei Konzentrationen von 0,2 mmol das Wachstum des Stammes Met 1 hemmte (Hrsak et al. 2000).

Bei der Isolierung der Reinkultur BU3 aus der butanverwertenden Anreicherungskultur Buti A erfolgte hingegen eine Verbesserung der MTBE-Abbaurrate von 4,1 mg MTBE/g BTS*h (Buti A) auf 7,2 mg MTBE/g BTS*h (BU3). Neben der Konkurrenz der heterotrophen Begleitflora der Anreicherungskultur um Nährstoffe und Sauerstoff sind bei diesen Kulturen weitere negative Wechselwirkungen, wie die Sekretion inhibierender Stoffe zu vermuten. Eine Verbesserung der cometabolischen MTBE-Abbauleistung bei der Verwendung von Reinkulturen, wie im vorliegenden Fall festgestellt wurde, ist in der Literatur nach derzeitigem Kenntnisstand nicht beschrieben. Zumeist geht die Tendenz des cometabolischen Schadstoff-Abbaues zur Verwendung von Misch-/ Anreicherungskulturen (Chang et al. 1996; Mo et al. 1997), um das Auftreten von „dead end“ Metaboliten zu verhindern.

Bei der Anreicherungskultur Ks 1:5 und dem Stamm K152 wurde kein offensichtlicher Einfluss der heterotrophen Begleitflora der Anreicherungskultur auf den MTBE-Abbau des Stammes K152 beobachtet.

5.3.4 Effizienz des MTBE-Abbaues der Stämme B12, K152 und BU3 (→Kapt. 4.3.1.4)

Die Fähigkeit der Stämme BU3 und B12 nach Anzucht auf Alkoholen, Hefeextrakt+Pepton, Natriumacetat und Aceton, MTBE cometabolisch abzubauen, lässt auf eine geringe Substratspezifität der Monooxygenasen schließen. Die Verwendung von Hefeextrakt+Pepton als Wachstumssubstrat für den cometabolischen MTBE-Abbau wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Viele Stämme produzieren die für den MTBE-Abbau relevanten Monooxygenasen nur nach Anzucht auf spezifischen Substraten, wie die Studien von Liu et al. (2001) zeigten. Der von diesen Autoren isolierte Stamm *Arthrobacter* spec. baute nur nach Anzucht auf Butan MTBE cometabolisch ab, während bei Verwendung von Alkoholen oder Glukose als Wachstumssubstrat kein MTBE-Abbau beobachtet wurde.

Der cometabolische MTBE-Abbau durch Actinomyceten, zu denen die Stämme B12 und BU3 gehören, wurde in der Literatur bereits mehrfach dargestellt (Hyman et al. 1998; Steffan et al. 1998; Garnier et al. 1999; Solano-Serena et al. 2000). Bei vielen dieser Studien wurden höherwertige Alkane (ab C₅) als Wachstumssubstrate verwendet, die laut der EG-Richtlinie 91/155 EWG (1991) der Wassergefährdungsgruppe 2 zugeordnet sind und eine Gesundheitsgefährdung aufweisen. Deshalb sind diese Wachstumssubstrate für den Einsatz bei Grundwassersanierungsprojekten nicht geeignet.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit den Stämme BU3 und B12 schon bei 20°C MTBE-Abbauraten von 7,9 mg MTBE/g BTS*h (BU3, Wachstumssubstrat Propan) und 1,1 mg MTBE/g BTS*h (B12, Wachstumssubstrat 1-Propanol) erreicht. Ähnliche MTBE-Abbauraten sind in der Literatur (Smith et al. 2003a, Steffan et al. 1997) nur bei höheren Temperaturen, die nicht relevant sind für in-situ Grundwassersanierungen, bekannt. Das Bakterium *Mycobacterium vaccae* JOB 5 metabolisierte MTBE bei 30°C nach Anzucht auf 1-Propanol mit Raten von 1,3 mg MTBE/g BTS*h (Smith et al. 2003a). Auch die MTBE-Abbauraten, die Steffan et al. (1997) mit dem Stamm *Nocardia ENV425* bei 28°C beobachteten (10,4 mg MTBE/g BTS*h, Wachstumssubstrat Propan) liegen in der Größenordnung der Abbauraten des Stammes BU3 bei 20°C.

Neben dem Einsatz von Actinomyceten zum MTBE-Abbau sind vereinzelt auch MTBE-Abbaustudien mit *Pseudomonas* Arten (Smith et al. 2003b; Garnier et al. 1999) sowie einige andere Bakteriengattungen, wie z. B. *Arthrobacter* (Liu et al. 2001) beschrieben.

Während Actinomyceten über ein sehr breites Verwertungsspektrum an Kohlenstoffquellen von Vollmedien (vorliegende Arbeit) über Alkane, Alkohole (Smith et al. 2003a) bis zu Aceton (Steffan et al. 1997) verfügen, ist das Spektrum der verwertbaren Wachstumssubstrate für den cometabolischen MTBE-Abbau bei anderen Stämmen geringer. Der Stamm *Pseudomonas mendocina* KR-1 kann nur nach Anzucht auf C₅-C₈ n-Alkanen und Toluol MTBE cometabolisch abbauen (Smith et al. 2003a). Auch der aus dem Boden isolierte *Pseudomonas aeruginosa* degradierte MTBE nur nach Wachstum auf höherwertigen Alkanen (Pentane) (Garnier et al. 1999). Der den *Pseudomonaden* verwandte Stamm K152 der vorliegenden Arbeit wies hingegen ein größeres Kohlenstoffverwertungsspektrum auf. Er kann MTBE cometabolisch abbauen nach Anzucht auf Alkanen (Propan, Butan) und Alkoholen (Propanol, Butanol). Ein Vergleich der MTBE-Abbauraten dieses Stammes mit der Literatur ist nicht möglich, da nach dem derzeitigen Kenntnisstand noch kein Bakterium der Ordnung *Burkholderiales* beschrieben worden ist, das in der Lage war, sowohl MTBE als auch TBA cometabolisch abzubauen. Der von Piveteau et al. (2001) isolierte methylotrrophe Stamm CIP I-2052, den die Autoren aufgrund seiner phänotypischen Eigenschaften der Spezies *Burkholderia cepacia* zuordneten, konnte nur TBA als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten (Piveteau et al. 2001).

Neben der Fähigkeit der drei Stämme BU3, K152 und B12 auch bei grundwasserrelevanten Temperaturen von 12°C MTBE abzubauen, zeichnen sie sich gegenüber anderen Stämmen dadurch aus, dass sie auch bei geringen Gelöstsauerstoffkonzentrationen (0,4 - 0,6 mg/l

Sauerstoff) noch MTBE abbauen. Als Vergleich dazu ermittelten Park et al. (1997) als untere Sauerstoffgrenzkonzentration für den cometabolischen MTBE-Abbau 0,9 mg/l Sauerstoff.

Die Resultate der MTBE-Abbauversuche mit MTBE-Konzentrationen bis zu 350 mg/l und TBA-Konzentrationen bis zu 182 mg/l (→ Kapt. 4.3.1.4, Abb. 25) stellten einen weiteren positiven Aspekt im Hinblick auf die Anwendung der Kulturen in Grundwassersanierungsprojekten dar. Bei diesen hohen Schadstoffkonzentrationen wurde keine inhibierende Wirkung auf das Abbaupotenzial der Stämme BU3, K152 und B12 nachgewiesen. Die durchschnittlichen MTBE-Abbauraten erhöhten sich sogar beim Einsatz höherer MTBE-Konzentrationen (350 mg/l). Aufgrund der erzielten Ergebnisse eignen sich die Stämme theoretisch für den Einsatz an Standorten mit hohen Schadstoffkonzentrationen. Inhibierende Wirkungen des cometabolischen Abbaues durch Zwischenprodukte oder zu hohe Schadstoffkonzentrationen sind in der Literatur häufig beschrieben.

Liu et al. (2001) beobachteten in ihren Untersuchungen mit dem butanverwertenden Stamm *Arthrobacter* (ATCC 27778), dass bereits geringe TBA-Konzentrationen im Ansatz zu einer Hemmung des MTBE-Abbaues führten.

Andere Schadstoffgruppen, wie z. B. TCE, bewirkten bereits bei Konzentrationen von 10 mg/l einen inhibierenden Effekt auf die abbauenden Bakterien (Beck 2000).

5.3.5 Batch-Langzeit-Abbauversuche der Stämme K152 und BU3 (→Kapt. 4.3.1.5)

Die Übertragung der Ergebnisse der Versuche an ruhenden Zellen auf komplexere Laborsysteme war Ziel weiterer Untersuchungen, in deren Vorfeld Grundlagen in Batch-Langzeit-Abbauversuchen im 1 l Schüttelkolben mit den Stämmen K152, BU3 (Ergebnisse des Stammes BU3 nicht dargestellt) erlangt wurden. Bei dem Stamm K152 verringerte sich die MTBE-Abbaurrate von 70 mg MTBE/g BTS *h auf 12,5 mg MTBE/g BTS *h innerhalb von 30 Tagen. Diese Abnahme der MTBE-Abbaurrate war auf eine fehlende Nachlieferung der Reduktionsäquivalente während des cometabolischen Abbaues zurückzuführen. Im Vergleich dazu stagnierte der MTBE-Abbau der methanverwertenden Kulturen der vorliegenden Arbeit bereits nach 60 Stunden. Auch Literaturdaten weisen deutlich kürzere Enzymstabilitäten aus. So beobachteten Hardison et al. (1997) in MTBE-Abbauversuchen mit dem Pilz *Graphium spec.* bereits innerhalb eines Tages ein Absinken der MTBE-Abbaurrate um 71%. Während Hernandez-Perez et al. (2001) bei Studien mit dem Stamm *Gordonia terrae* bereits nach 6 Tagen den MTBE-Abbau regenerieren mussten, war dies bei dem Stamm K152 erst nach 36 Tagen bzw. bei dem Stamm BU3 nach 35 Tagen notwendig. Aufgrund der großen Zeitintervalle zwischen den Regenerationsphasen erwiesen sich die Stämme K152 und BU3 als sehr effizient unter dem Gesichtspunkt der Wirtschaftlichkeit und des Betreuungsaufwandes

Diskussion

beim Einsatz in Sanierungsprojekten. Die Regenerierung der MTBE-Abbauleistung der Kulturen erfolgte durch die Dosierung geringer Konzentrationen des Wachstumssubstrates (0,8 mmol 1-Propanol, 0,2 mmol Propan).

5.3.6 Untersuchung des cometabolischen MTBE-Abbauversuches in den Säulensystemen

Die Versuchsdauer in den Laborsäulen betrug 1 - 3 Monate, ohne dass die Säulen zusätzlich mit Luft oder Sauerstoff begast wurden. Die im Rinnenbauwerk am Projektstandort Leuna vorliegenden geringen Sauerstoffkonzentrationen entsprachen dem Konzept auf eine zusätzliche Begasung der Säulen zu verzichten.

Die in den Batch-Langzeit-Abbauversuchen gewonnenen Resultate:

- Abnahme der MTBE-Abbauraten infolge fehlender Nachlieferung von Reduktionsäquivalenten (Abnahme um 72% nach 15 Tagen)
- Regenerierung der Abbauleistung durch Zugabe geringer Konzentrationen des Wachstumssubstrates (0,8 mmol 1-Propanol, 0,2 mmol Propan)

konnten in den Säulenversuchen verifiziert werden.

Bei der Regenerierung der MTBE-Abbauleistung mit dem Wachstumssubstrat Propanol wurden bessere Ergebnisse erzielt als beim Zusatz von Propan. Dies war ein unerwartetes Ergebnis, da bei den MTBE-Abbauversuchen an ruhenden Zellen in HS-Röhrchen mit propangewachsenen Kulturen höhere MTBE-Abbauraten nachgewiesen wurden als bei der Verwendung von Propanol als Wachstumssubstrat. Mögliche Ursache hierfür könnten zu geringe eingesetzte Propankonzentrationen und zu kurze Begasungsintervalle sein. Eine Optimierung dieser Parameter war jedoch aufgrund sicherheitstechnischer Aspekte nicht möglich.

Eine TBA-Akkumulation wurde in den Säulenversuchen nur in den ersten Versuchsphasen beobachtet. Im Verlauf der Versuche kam es durch die unsterile Arbeitsweise zur Ausbildung natürlicher Konsortien. Es wird postuliert, dass durch das Zusammenwirken der Bakterien innerhalb der Konsortien die Metabolisierung des TBA bei gleichzeitiger Anwesenheit von MTBE in den Säulensystemen erfolgte. Die fehlende TBA-Akkumulation erwies sich als vorteilhaft im Hinblick auf den Einsatz der Stämme in Sanierungsprojekten. TBA wird als toxische und kanzerogene Substanz eingestuft (Cirvello et al. 1995). Dadurch kann bei einer Akkumulation im Grundwasserbereich nicht von einer erfolgreichen Sanierung gesprochen werden, sondern lediglich von einer Verlagerung des Schadstoffproblems. In Literaturstudien (Chang et al. 1996; Mo et al. 1997) werden zumeist Mischkulturen eingesetzt, um eine Akkumulation von toxischen Zwischenprodukten zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, dieses Problem durch den Einsatz von Reinkulturen unter unsterilen Bedingungen und der daraus folgenden Ausbildung spontaner Konsortien zu lösen.

Die MTBE-Abbaueffizienzen der Laborsäulenversuche der Stämme K152 und BU3 lagen bei 58% (K152, Wachstumssubstrat 1-Propanol), 68% (BU3 Wachstumssubstrat 1-Propanol) und 60% (BU3, Wachstumssubstrat 2-Propanol) im Vergleich zu den Abbauprobversuchen an ruhenden Zellen. Die höhere Komplexität der Säulensysteme und die veränderten Versuchsbedingungen im Vergleich zu den Abbauprobversuchen an ruhenden Zellen (immobilisierte Zellen, geringe Gelöstsauerstoffkonzentrationen im System) sind hierbei als Gründe anzuführen.

Für den Stamm B12 hingegen wurde eine 89%-ige Effizienz des MTBE-Verwertungspotenziales im Vergleich zu den Abbauprobversuchen an ruhenden Zellen ermittelt. Diese hohe Effizienz für den Stamm B12 ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich während der Abbauprobversuche eine heterotrophe Begleitflora ausbildete, die einen positiven Einfluss auf den Metabolismus des Stammes hatte. Ähnliche Wechselwirkungen wurden bereits bei den Untersuchungen der Anreicherungskultur Bs D und des Stammes B12 in Abbauprobversuchen an ruhenden Zellen nachgewiesen (→ Kapt. 4.3.1.3 und 5.3.3).

Säulenversuche entsprechend des dargestellten Konzeptes zum cometabolischen MTBE-Abbau sind aus der Literatur nicht bekannt. In Studien von Maciel et al. (2004) und Fayolle et al. (2004) wurde der MTBE-abbauende Stamm *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 in Biofiltern getestet. In diesen konnten MTBE-Konzentrationen von 12 - 20 mg/l zu 90% - 100% abgebaut werden. Die Verweilzeit der Bakterien in den Filtern, die zusätzlich mit Luft begast (0,12 l Luft / l Flüssigkeit * h) wurden, lag bei 5 - 6 Tagen (Abbauraten 4 mg MTBE/*d, keine Angaben zur BTS-Konzentration vorhanden). Eine TBA-Akkumulation wurde in keiner der beiden Studien nachgewiesen. Im Gegensatz zu diesen Versuchen konnten in den Laborsäulen der vorliegenden Arbeit durchschnittliche Abbauraten von bis zu 50,4 mg MTBE/g BTS*d gemessen werden.

Beim Upscaling der Laborsäulenversuche im kleintechnischen Maßstab wurden für den Stamm BU3 maximale MTBE-Abbauraten von 31,2 mg MTBE/g BTS *d (Wachstumssubstrat 1-Propanol) bzw. 20,4 mg MTBE/g BTS *d (Wachstumssubstrat 2-Propanol) ermittelt. Diese entsprachen 62% (Wachstumssubstrat 1-Propanol) bzw. 61% (Wachstumssubstrat 2-Propanol) der maximalen Abbauraten der Laborsäulenversuche und 42% (Wachstumssubstrat 1-Propanol) bzw. 37% (Wachstumssubstrat 2-Propanol) der maximalen Abbauraten der Versuche an ruhenden Zellen.

Hauptlimitationsfaktoren beim cometabolischen MTBE-Abbau in den kleintechnischen Säulenversuchen waren die geringen Sauerstoffkonzentrationen im System. Die in die Säule S 1 integrierte blasenfreie Begasungseinheit erwies sich als nicht wirkungsvoll.

Diskussion

Die Säulenversuche des Stammes BU3 (→ Kapt. 4.3.2, Abb. 33) zeigten, dass durch die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration bzw. der MTBE-Konzentration im System die MTBE-Abbauraten der Kultur gesteigert wurde. Des Weiteren konnten durch die Zugabe geringer Konzentrationen des Wachstumssubstrates (0,8 mmol 1-Propanol, 0,2 mmol Propan) die Abbauraten als Folge einer Enzymsystemregenerierung zyklisch erhöht werden.

Der Einsatz eines Konsortiums aus den Stämmen B12 und K152 brachte aufgrund der gegenseitigen negativen Wechselwirkung der zwei Stämme nicht den erwarteten Erfolg einer Erhöhung der MTBE-Abbauraten.

5.4 Untersuchungen zur Aufklärung des MTBE-Abbauweges durch den Stamm BU3 (→ Kapt. 4.4)

Die Oxidation von MTBE zu TBA wurde bei dem Stamm BU3 durch die gaschromatographische Analyse des Metaboliten TBA nachgewiesen. Gemäß den Untersuchungen von Steffan et al. (1997) wird TBA weiter über 2-Hydroxy-2-Methylpropanol zu HIBA metabolisiert (→ Kapt. 1, Abb. 2). In den Arbeiten von Rohwerder et al. (2006) und Steffan et al. (1997) wurde beobachtet, dass HIBA teilweise akkumuliert wird.

Bei dem Stamm BU3 konnte während des MTBE-Abbaues keine Akkumulation von HIBA gemessen werden. Diese Ergebnisse ließen folgende zwei Hypothesen hinsichtlich der weiteren Metabolisierung von TBA zu:

- der cometabolische Abbau von MTBE stoppt bereits bei dem Metabolit 2-Hydroxy-2-Methylpropanol
- HIBA wird ebenfalls cometabolisch abgebaut

Die Nutzung von HIBA als einzige Kohlenstoffquelle durch den Stamm BU3 kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden (→ Kapt. 4.2.3, Tab. 20). Unter Annahme, dass HIBA cometabolisch umgesetzt wurde, erfolgte dies nicht über den von Rohwerder et al. (2006) beschriebenen Weg zu 3-Hydroxybutyrat. Dieser Abbau wird von einer Isobutyryl-CoA Mutase katalysiert, deren Anwesenheit in dem Stamm BU3 nicht nachgewiesen werden konnte. Entsprechend des in Abb. 2, Kapt. 1 dargestellten Abbauweges kann HIBA noch über drei anderer Stoffwechselwege abgebaut werden. Der Abbau durch eine Decarboxylase (Weg III) zu 2-Propanol und Aceton wird für den Stamm BU3 ausgeschlossen. Beide Metabolite werden von dem Stamm verwertet. Dies hätte eine vollständige Metabolisierung von MTBE zur Folge, wozu der Stamm BU3 jedoch nicht in der Lage ist. Es wird vermutet, dass HIBA cometabolisch durch den Stamm BU3 über den Stoffwechselweg II bzw. I (Kapt. 1, Abb. 2) abgebaut wird und dass die weitere Verwertung der Metabolite unvollständig abläuft.

Die erste Hypothese, dass der cometabolische MTBE-Abbau bereits bei dem Zwischenprodukt 2-Hydroxy-2-Methylpropanol stoppt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig bestätigt werden. Bei den gaschromatographischen Analysen der MTBE-Abbauversuche an ruhenden Zellen wurde mit Ausnahme von TBA keine Akkumulation diverser Zwischenprodukte beobachtet.

5.5 Feldversuch zum cometabolischen MTBE-Abbau des Stammes BU3 unter Anwendung des ENA-Konzeptes am Projektstandort Leuna

(→ Kapt. 4.5)

Die Isolierung der drei Reinkulturen B12, BU3 und K152 und die Ergebnisse der Laborversuche zum cometabolischen MTBE-Abbau bildeten die Grundlage für die Erstellung eines Verfahrensvorschlages zur Anwendung des cometabolischen MTBE-Abbaues im Sinne des ENA-Konzeptes (→ Kapt. 4.5). Dieser wurde in einem Feldversuch am Projektstandort Leuna getestet. In den ersten zwei Projektphasen des Feldversuches kam der Prozess der Biostimulation zum Einsatz.

In diesen beiden Projektphasen wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration des Grundwasserleiters erhöht (Gelöstsauerstoffkonzentration 62 mg/l, Brunnen IB Dezember 2005), wodurch die Voraussetzungen für einen aeroben MTBE-Abbau geschaffen wurde. In der Projektphase I konnte durch die Zugabe von reinem Sauerstoff mittels blasenfreier Begasung eine Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Bereich des Konditionierungsbauwerkes realisiert werden. Ein Grossteil des zugegebenen Sauerstoffes wurde bereits im Konditionierungsbauwerk durch die autochthonen Mikroorganismen verwertet, da dort neben Sauerstoff noch 1-Propanol als Wachstumssubstrat vorlag. Die Konzentration des zugesetzten 1-Propanol im Feldversuch (50 ml/ m³) entsprach der Propanolkonzentration, die zur maximalen Aktivierung der Monooxygenase des Stammes BU3 (→ Kapt. 4.3.1.4) erforderlich war. Eine Dosierung des Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid in der Projektphase II führte zur Aerobisierung des Abstromstreifens, der entsprechend des ENA-Konzeptes als Reaktorraum für den cometabolischen MTBE-Abbau geplant war. Die Zugabe von Oxidationsmitteln zur Erhöhung der Gelöstsauerstoffkonzentration des Grundwassers wird auch bei konventionellen Sanierungsstrategien, wie z.B. dem ORC®-Verfahren (Koenigsberg et al. 2003) angewendet. Durch diese Zugabe erhöhten sich zwar die Kosten und der Betreuungsaufwand des Verfahrens, was jedoch zunächst erforderlich war, um die Voraussetzungen für einen aeroben MTBE-Abbau im Grundwasserleiter zu realisieren. Erst durch den Ausschluss des limitierenden Parameters der Sauerstoffkonzentration war es möglich, eine Aussage hinsichtlich des MTBE-Abbaupotenziales der autochthonen Bakterien des Standortes vorzunehmen. Durch die Zugabe

Diskussion

von Sauerstoff, Kaliumhydrogenphosphat und 1-Propanol in der Projektphase I wurde der Anteil der autochthonen 1-propanolverwertenden Bakterien von 34% auf 72% gesteigert. Jedoch konnte trotz dieser Erhöhung selbst unter optimalen Laborbedingungen ($T=20^{\circ}\text{C}$, Gelöstsauerstoffkonzentration $> 0,6 \text{ mg/l}$, NMS-Medium, Abbauprobversuche nach Schema A) kein MTBE-Abbaupotenzial der autochthonen 1-propanolverwertenden Bakterien nachgewiesen werden. Eine wichtige Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung der Biostimulation ist, dass am zu sanierenden Standort autochthone MTBE-degradierende Mikroorganismen vorhanden sind (Smith et al. 2005). Aus den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen wird postuliert, dass die Zahl der 1-propanolverwertenden Bakterien des Standortes Leuna, die MTBE cometabolisch abbauen können, sehr gering ist. Die Anreicherungskultur G7, die aus dem Grundwasser des Projektstandortes ($\rightarrow$ Kapt. 4.1.2) isoliert wurde, bestätigte jedoch, dass am Standort Bakterien vorhanden sind, die MTBE cometabolisch abbauen können. Die Resultate der MTBE-Abbauprobversuche der autochthonen 1-propanol-verwertenden Bakterien lassen vermuten, dass die cometabolisch MTBE-abbauenden autochthonen Bakterien unter den ungünstigen Bedingungen des Feldversuches (geringe Sauerstoffkonzentration, Temperatur 12°C , geringe Konzentration des Wachstumssubstrates) durch andere 1-propanolverwertende Bakterien gehemmt bzw. verdrängt worden sind.

Die verbesserte Sauerstoffbereitstellung in der Projektphase II führte zu einem weiteren Anstieg der Zahl der heterotrophen Bakterien ($\rightarrow$ Kapt. 4.5.3). Der Anteil der 1-Propanolverwerter an der Gesamtbakterienzahl blieb dabei mit 72% konstant. Auch unter diesen Bedingungen war es nicht möglich, einen cometabolischen MTBE-Abbau unter Feld- bzw. Laborbedingungen nachzuweisen. Aufgrund der Ergebnisse der ersten zwei Projektphasen wird postuliert, dass der Prozess der Biostimulation am Projektstandort Leuna zum cometabolischen MTBE-Abbau durch 1-propanolverwertende autochthone Bakterien nicht eingesetzt werden kann.

Eine *in-situ* Remediation von MTBE unter Anwendung der Biostimulation und Bioaugmentation (propanverwertenden Mikroorganismen) wurde im Patent von Steffan et al. (1998) beschrieben. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurden dort als Wachstumssubstrate Propan und Butan verwendet, die mittels „Vapor extraction“ oder *in-situ*-Begasung in den Aquifer eingebracht wurden. Bei Anwendung dieser Technologien besteht theoretisch die Gefahr, dass aufgrund der hohen Flüchtigkeit von MTBE Verdunstungen des Schadstoffes die Folge sein könnten. Durch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte blasenfreie Begasung des Grundwassers (Schirmer 2000) und der Verwendung eines geschlossenen Rinnensystemes konnte eine Verflüchtigung von MTBE ausgeschlossen werden. Die Anwendung der Biostimulation für den MTBE-Abbau in Feldversuchen ist abhängig von den am Standort vorliegenden Mikroorganismen. In Arbeiten von Smith et al. (2005) zeigte sich der Einsatz der Biostimulation

effektiver als die Bioaugmentation, da am Standort (Port Hueneme Naval Construction Battalion Center, Oxnard, California, USA) das MTBE-abbauende Bakterium PM1 bereits vorhanden war. Hingegen konnte in den Studien von Seklemova et al. (2001) (Zugabe von anorganischem Dünger zu Diesel-kontaminierter Walderde) und in den Arbeiten von Schirmer et al. (2002) (Zugabe von Methan zu MTBE-kontaminierten Aquifermaterial des Canadian Force Base Testfeldes (Borden, Ontario, Canada)) durch Anwendung der Biostimulation kein Schadstoffabbau beobachtet werden.

Da auch in der vorliegenden Arbeit kein MTBE-Abbau im Feld nachgewiesen werden konnte, wurde in der Projektphase III der Prozess der Bioaugmentation getestet. Dieser Prozess beinhaltete im Gegensatz zur Biostimulation die Dosierung einer aktiven MTBE-abbauenden Bakterienkultur. Als Bakterium für den Feldversuch der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm BU3 ausgewählt.

Dieser Stamm zeichnete sich aufgrund folgender Faktoren aus:

- hohe MTBE-Abbauraten (→ Kapt. 4.3.1.4)
- breites Kohlenstoffverwertungspotenzial (→ Kapt. 4.2.3)
- hohe Enzymaktivitäten bei BTS-Konzentrationen bis zu 7,9 g/l nach Anzucht im 50 l- Fermenter (→ Kapt. 4.2.4)
- effizienter cometabolischer MTBE-Abbau in den Labor- und kleintechnischen Säulensystemen mit hohen Enzymstabilitäten und der Möglichkeiten der Reaktivierung des MTBE-Abbaues durch 1- bzw. 2- Propanol (→ Kapt. 4.3.2)

Aufgrund der Ergebnisse der Laborversuche (→ Kapt. 4.5.1) erfolgte in dieser Projektphase zusätzlich eine Umstellung des Wachstumssubstrates auf 2-Propanol, welches von den autochthonen Bakterien schlechter verwertet wird kann als 1-Propanol.

Bereits einen Monat nach Injektion des Stammes BU3 (100 l, BTS: 7,5 g/l im Dezember 2005) in die Rinne wurde sowohl im Konditionierungsbauwerk als auch im Abstromstreifen ein cometabolischer MTBE-Abbau gemessen (→ Kapt. 4.5.4). Die maximale Verringerung der MTBE-Konzentration von 53,3 mg/l auf 15,3 mg/l wurde im Februar 2006 (2 Monate nach Injektion der Kultur) im Probenahmebrunnen Saf 57 nachgewiesen. Im Brunnen Saf 56 lag die durchschnittliche Effizienz des MTBE-Abbaues bei 50%. Im Brunnen IB konnte trotz hoher Gelöstsauerstoffkonzentrationen nur eine 7%ige Effizienz des MTBE-Abbaues beobachtet werden. Diese war höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Stamm BU3 am Trägermaterial des Konditionierungsbauwerkes (Blähton) nur sehr schlecht immobilisiert wurde (Gräber 2005). Im ersten Brunnen der Rinne (Saf 56) hingegen wurden trotz geringer Gelöstsauerstoffkonzentrationen höhere MTBE-Abbauraten nachgewiesen, die hier unter anderen mit der besseren Immobilisierung des Stammes BU3 am Aquifermaterial begründet

Diskussion

werden können. Mit zunehmender Länge des Abstromstreifens (Saf 57) nimmt die Effizienz des MTBE-Abbaues infolge abnehmender Gelöstsauerstoffkonzentrationen ab.

Die in der Literatur beschriebene Problematik, dass beim cometabolischen Abbau durch Reinkulturen eine Inhibierung bzw. Schädigung der Stämme aufgrund der Bildung von „dead end“ Metaboliten auftreten (Uchiyama et al. 1992), wurde im vorliegenden Feldversuch nicht beobachtet. Die unsterile Arbeitsweise bei der Anzucht der Kultur im 50 l-Fermenter und die Ausbildung natürlicher Konsortien im Feldversuch verhinderte das Auftreten von „dead end“ Metaboliten. Der leichte Anstieg der TBA-Konzentration im Probenahmebrunnen IB war ein weiteres Indiz dafür, dass die Verringerung der MTBE-Konzentration in dieser Projektphase auf den cometabolischen MTBE-Abbau durch den Stamm BU3 zurückzuführen war.

Der cometabolische MTBE-Abbau des Stammes BU3 war gekennzeichnet durch eine intermediäre Akkumulation von TBA (→ Kapt. 4.3.1.4). Die fehlende TBA-Akkumulation im Abstromstreifen der Rinne trotz MTBE-Abbaues resultierte auf der Ausbildung natürlicher Konsortien.

Mithilfe des etablierten Monitoringprogrammes gelang es, den Stamm BU3 qualitativ und halbquantitativ durch kultivierungsabhängige und molekularbiologische Methoden nachzuweisen. Die Ergebnisse dieses Monitorings zeigten, dass der Stamm BU3 in allen Probenahmebrunnen der Rinne wiedergefunden wurde. Der prozentuale Anteil des Stammes BU3 von den 2-Propanol-verwertenden autochthonen Bakterien lag zwischen 52% und 97% in Abhängigkeit des Probenahmebrunnens. Als Vorarbeit für die Weiterführung des Feldversuches wurde eine BU3-stammspezifische FISH-Sonde entwickelt, um den quantitativen Nachweis des Stammes zu verbessern und den Betreuungsaufwand des Feldversuches zu verringern.

Steffan et al. (2001) setzten propanoxidierende Bakterien zur Biodegradation von MTBE-kontaminierten Grundwasser unter Anwendung der Biobarriere als Sanierungstechnik ein. Sie erzielten innerhalb von 3 Monaten eine Verringerung der MTBE-Konzentration von 320 mg/l auf 70 mg/l. Salanitro et al. (2000) nutzten den Prozess der Bioaugmentation im Feldversuch am Testfeld Port Hueneme Naval Construction Battalion Center (Oxnard, California, USA) und konnten 7 mg/l MTBE in einem Versuchszeitraum von 130 - 200 Tagen vollständig abbauen. Als Mikroorganismen verwendeten sie dabei den Stamm PM1, der MTBE als einzige Kohlenstoffquelle verwertet. Neben der Beimpfung des Testfeldes mit den Bakterien wurde es direkt mit Sauerstoff begast (Technik: Air-sparging). Beide Literaturstudien verwendeten aktive Sanierungstechniken, die mit dem Prozess der Bioaugmentation kombiniert wurden. In beiden Studien ist der Raum, in welchem die Begasung, Zugabe des Wachstumssubstrates und der Mikroorganismen erfolgte, identisch mit dem Reaktionsraum, an welchem der MTBE-Abbau stattfand. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde das ENA-Konzept als Grundlage gewählt.

Diskussion

Hierbei gab es eine eindeutige räumliche Trennung zwischen dem Konditionierungsbauwerk (Zugabe der Bakterien, des Wachstumssubstrates und blasenfreie Begasung) und dem Abstromstreifen als eigentlichen Reaktionsraum.

Ein Feldversuch nach dem ENA-Konzept, in welchem ein cometabolischer MTBE-Abbau nachgewiesen wurde, ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden und stellt somit eine Neuheit auf dem Gebiet der Sanierung von MTBE-Schadensfällen dar.

6 Fazit und Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse stellen eine Erweiterung der Kenntnisse bei der Grundlagenforschung des cometabolischen MTBE-Abbaues durch alkan- bzw. alkoholverwertende Bakterien dar. Sie bieten einen umfassenden Überblick über den Prozess der Isolierung effektiver cometabolisch MTBE-abbauender Mikroorganismen von der Anreicherung über die Untersuchung der Wachstums- und Abbaubedingungen in verschiedenen Größenmaßstäben bis hin zum Feldversuch. Im weiteren Sinne können sie auch als methodische Grundlage für die Isolierung anderer schadstoffabbauender Mikroorganismen angewandt werden.

Sie bilden eine Grundlage für die Weiterführung und Optimierung des ENA-Konzeptes als Sanierungsmethode für den Schadstoff MTBE. Dabei erwies sich die Anwendung des wachstumsunabhängigen cometabolischen Abbauprozesses und der Bioaugmentation unter dem Gesichtspunkt des Zeitfaktors und der Übertragbarkeit auf verschiedene Standorte als vorteilhaft. Durch den Einsatz des Stammes BU3, der ein breites Substratverwertungsspektrum besitzt sowie unter grundwasserrelevanten Milieubedingungen MTBE cometabolisch abbaut, können lange Akklimationszeiten und der Betreuungsaufwand bei Sanierungsprojekten reduziert werden. Die Bioaugmentation empfiehlt sich bei der Sanierung von kontaminierten Standorten, an denen keine autochthonen schadstoffabbauenden Mikroorganismen vorhanden sind. Durch die Erhöhung der maximalen Abbauraten beim Vorhandensein höherer MTBE-Konzentrationen besteht die Möglichkeit diese Methode mit anderen Sanierungstechniken zu kombinieren.

Die Fortführung weiterer Forschungsarbeiten auf dem Gebiet des cometabolischen MTBE-Abbaues sollte in drei Richtungen erfolgen:

1. Weiterführung der Untersuchungen zur Aufklärung des Stoffwechselweges des cometabolischen MTBE-Abbaues und der daran beteiligten Enzymsysteme
2. Optimierung der Versuchsbedingungen des Feldversuches am Projektstandort Leuna (Prozess Bioaugmentation mit dem Stamm BU3) in Hinblick auf
 - a. Senken der Kosten durch Verringerung der Wasserstoffperoxiddosierung
 - b. Reduzierung des Betreuungsaufwandes durch den Einsatz der entwickelten FISH-Sonde für den Stamm BU3 beim Monitoring des Feldversuches

Fazit und Ausblick

3. Anwendung der Fähigkeiten des Stammes BU3 bei konventionellen Pump- und Treat-Verfahren. Der Stamm BU3 könnte bei Adsorptionstechniken z.B. Aktivkohle-Adsorption theoretisch bei der Regenerierung von Sorbenzien angewendet werden. Bei biologischen Verfahren z.B. Bioreaktoren wäre ein Einsatz des Stammes ebenfalls denkbar.

Letztendlich stellt der Stamm BU3, aufgrund seiner Fähigkeit ETBE cometabolisch abzubauen (Ergebnisse nicht dargestellt), in Hinblick auf die geplante Umstellung des Benzinadditivs MTBE auf ETBE (Terra Tech 2006) auch in zukünftigen Sanierungsprojekten ein effektives Werkzeug dar.

Zusammenfassung

7 Zusammenfassung

Der Schadstoff MTBE wird weltweit als häufigstes Benzinadditiv eingesetzt. Trotz seiner geringen Toxizität stellt er aufgrund seiner hohen biologischen Resistenz, dem steigenden Verbrauch und negativen Beeinträchtigungen des Trinkwassers schon bei geringen Konzentrationen ein nicht zu unterschätzendes Umweltproblem dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der wachstumsunabhängige cometabolische Abbau von MTBE durch methan-, propan-, butan- und propanolverwertende Bakterien untersucht. Es wurde ein Verfahrensvorschlag zur Anwendung des cometabolischen MTBE-Abbaues im Sinne des ENA-Konzeptes im kontaminierten Grundwasser des METLEN-Projektstandortes Leuna erarbeitet. Im Einzelnen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

Aus verschiedenen Schadstoff-kontaminierten und nicht -kontaminierten Umwelthabitaten wurden methan-, propan- und butanverwertende Anreicherungskulturen isoliert, die in der Lage waren, MTBE abzubauen. Dabei erwiesen sich die Umwelthabitate Klär- bzw. Bläschlamm besser geeignet als das mit MTBE-kontaminierte Grundwasser des Projektstandortes Leuna. Keine der isolierten Anreicherungs- und Reinkulturen war in der Lage, MTBE, TBA oder HIBA als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten, woraus zu schlussfolgern war, dass der MTBE- und TBA-Abbau der isolierten Kulturen cometabolisch erfolgte.

Es gelang erstmalig methanverwertende Anreicherungs- und Reinkulturen zu isolieren, die in der Lage waren, sowohl MTBE als auch TBA cometabolisch mit maximalen Raten von 2,1 mg MTBE/g BTS*h bzw. 0,7 mg TBA/g BTS*h (Anreicherungskulturen) abzubauen. Die isolierten methanotrophen Bakterien besaßen ein geringeres MTBE-Abbaupotenzial (Abbaurrate 0,9 mg MTBE/g BTS*h) als die Anreicherungskulturen aus denen sie isoliert wurden. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität der löslichen Methanmonooxygenase (sMMO) und der MTBE-Abbaurrate festgestellt. Die methanverwertenden Kulturen bauten MTBE nur nach Anzucht auf Methan ab.

Die isolierten propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen waren nach Anzucht auf Propan, Butan, aber auch Propanol, Butanol, komplexen Kohlenstoffquellen (Pepton+Hefeextrakt) und teilweise Aceton in der Lage, MTBE cometabolisch abzubauen. Die MTBE-Abbauraten der Kulturen bei Verwendung von Alkanen als Wachstumssubstrat lagen zwischen 20% – 28% höher als bei der Nutzung von Alkoholen.

Zusammenfassung

Im Vergleich zu den methanverwertenden Kulturen wiesen die isolierten propan- und butanverwertenden Anreicherungs- und Reinkulturen eine höhere Effizienz für den cometabolischen MTBE-Abbau auf. Die maximal erreichten Abbauraten der propanverwertenden Anreicherungskulturen nach Anzucht auf Propan lagen bei 6,6 mg MTBE/g BTS*h (Anreicherungskultur Bs D) bzw. 7,9 mg MTBE/g BTS*h (Stamm BU3). Die Untersuchungen zeigten, dass die heterotrophe Begleitflora der Anreicherungskulturen unterschiedliche Wirkungen auf die MTBE-abbauenden Stämme besaß, welche von stimulierend bis inhibierend reichten.

Die isolierten, charakterisierten und identifizierten propanverwertenden Stämme B12 (*Mycobacterium mageritense*) und K152 (β -*Proteobacterium*) sowie der butanverwertende Stamm BU3 (*Rhodococcus ruber*) zeichneten sich durch sehr hohe maximale MTBE-Abbauraten aus (BU3: 7,9 mg MTBE/g BTS*h, K152 4,2 mg MTBE/g BTS*h, B12: 1,7 mg MTBE/g BTS*h; Wachstumssubstrat: Propan).

Die detaillierte Untersuchung des MTBE-Abbaues dieser Stämme hinsichtlich grundwasserrelevanter Milieubedingungen ergab folgende Ergebnisse:

- Ein cometabolischer MTBE-Abbau wurde nachgewiesen im Temperaturbereich von 12°C - 20°C
- Eine Erhöhung der eingesetzten MTBE-Konzentration führte zur Steigerung der MTBE-Abbauraten
- MTBE-Konzentrationen ≤ 350 mg/l und TBA-Konzentrationen ≤ 182 mg/l besaßen keine toxischen oder inhibierenden Wirkungen auf die Zellen bzw. den MTBE-Abbau
- Die minimale Gelöstsauerstoffgrenzkonzentration für den cometabolischen MTBE-Abbau betrug 0,4 – 0,6 mg/l
- Eine maximale Aktivierung der Monooxygenase wurde erreicht nach Zugabe von 40 mg/l 1- bzw. 2-Propanol für den Stamm BU3, 50 mg/l 1-Propanol für den Stamm K152 und 55 mg/l 1-Propanol für den Stamm B12

In Wachstumsuntersuchungen der Stämme konnte gezeigt werden, dass mit Alkoholen höhere Wachstumsraten ($\mu_{\max}$: 0,10 h⁻¹ - 0,20 h⁻¹) erreicht werden als nach Anzucht auf Alkanen ($\mu_{\max}$: 0,05 h⁻¹ – 0,08 h⁻¹).

Die Stämme B12, K152 und BU3 exprimierten eine maximale Monooxygenase-Aktivität nach zweistündiger (Wachstumssubstrat Propan) bzw. sechsständiger (Wachstumssubstrat 1- bzw. 2-Propanol) Inkubation bei 30°C.

Zusammenfassung

Durch das Upscaling der Wachstumsprozesse vom 1 l-Schüttelkolben auf den 5 l-Fermenter bzw. 50 l-Fermenter (Stamm BU3) war es möglich, ausreichend Biomasse ($\leq 7,9$ g/l) mit hoher Enzymaktivität für die MTBE-Abbauversuche in den kleintechnischen Säulen und im Feldversuch zur Verfügung zu stellen. Der Einsatz der neu etablierten Methode der zweistufigen Fermentation ermöglichte eine zeitgleiche Produktion hoher Biomassekonzentration ($\leq 7,9$ g/l) und hoher Enzymaktivitäten.

In Säulenversuchen im Labor- und kleintechnischen Maßstab konnte der cometabolische MTBE-Abbau der am Trägermaterial immobilisierten Bakterienstämme BU3, B12 und K152 nachgewiesen werden. Eine Steigerung der MTBE-Abbauraten war möglich durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration bzw. der MTBE-Konzentration im System. Außerdem konnten die Abbauraten durch die Zugabe geringer Konzentrationen des Wachstumssubstrates (0,8 mmol 1-Propanol, 0,2 mmol Propan) infolge einer Enzymsystemregenerierung erhöht werden. Die durchschnittlichen MTBE-Abbauraten sind in Tab. 36 dargestellt.

Tab. 36: Durchschnittliche MTBE-Abbauraten der Stämme B12, K152 und BU3 in den Labor- und kleintechnischen Säulen (T= 20°C; Anzucht der Kulturen bis zur maximalen Enzymaktivität)

Wachstumssubstrat	maximale MTBE-Abbauraten [mg MTBE/ g BTS *h]		
	B12	K152	BU3
MTBE-Abbauversuche in Laborsäulen			
1-Propanol	23,7	26,5	50,4
2-Propanol	k. A.	k. A.	33,3
MTBE-Abbauversuche in kleintechnischen Säulen			
1-Propanol	k. A.	14,4	31,2
2-Propanol	k. A.	k. A.	20,4

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wurde folgender Verfahrensvorschlag zur Anwendung des cometabolischen MTBE-Abbaues im Sinne des ENA-Konzeptes am Standort Leuna abgeleitet: Es wurde empfohlen, die Wachstumssubstrate 1-bzw. 2- Propanol einzusetzen. Im Falle der Anwendung des Prozesses der Bioaugmentation unter Verwendung einer aktiven Kultur des Stammes BU3 wurde 2-Propanol als Wachstumssubstrat bevorzugt. Im Grundwasserleiter des Standortes muß sowohl eine Gelöstsauerstoffkonzentrationen von mindestens 0,4 mg/l als auch eine Dosierung von 1- bzw. 2-Propanol ($c_{1- \text{ bzw. } 2\text{-Propanol}} = 40$ mg/l) zur Regenerierung des Enzymssystems gewährleistet werden.

Bei der Erprobung dieses Verfahrensvorschlages im Feldversuch wurde während der ersten zwei Projektphasen (Biostimulation, erweiterte Biostimulation mit Dosierung von Wasserstoffperoxid) kein MTBE-Abbau beobachtet. Bei der Prüfung der Methode der

Zusammenfassung

Bioaugmentation unter Zugabe von Sauerstoff (30 l/ m³), Wasserstoffperoxid (200 ml 50% iges H₂O₂/ m³), Phosphat (27 g/m³), 2-Propanol (50 ml/m³) und der Injektion einer aktiven Kultur des Stammes BU3 (Enzymaktivität 2,0 mg MTBE/g BTS*h, BTS-Konz.: 7,9 g/l) wurde ein signifikanter MTBE-Abbau festgestellt. Bereits 2 Monate nach Injektion der Kultur (Februar 2006) konnte eine maximale Abnahme der MTBE-Konzentration des Grundwassers von 71,3% ermittelt werden. Die MTBE-Abbauaktivität des Stammes BU3 wurde durch die kontinuierliche Dosierung geringer Konzentrationen des Wachstumssubstrates 2-Propanol (50 ml/ m³) über bisher 5 Monate erhalten. Der Stamm BU3 konnte im Konditionierungsbauwerk und in allen Probenahmebrunnen des Abstromstreifens, dies entspricht einer Wegstrecke von 75 m, über kultivierungsabhängige Methoden nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden mithilfe der PCR unter Verwendung der für den Stamm BU3 entwickelten spezifischen Primer BU3dn und BU3rd verifiziert. Der durchschnittliche Anteil des Stammes BU3 an der 2-propanolverwertenden Bakterienzahl des Standortes lag in Abhängigkeit des Probenahmebrunnens zwischen 50-97%. In Vorbereitung auf die Weiterführung des Projektes wurde eine BU3-spezifische FISH-Sonde entwickelt und hinsichtlich ihre Spezifität und Stringenz für den Stamm BU3 überprüft. Als optimale Formamidkonzentration wurde dabei 20% Formamid ermittelt.

Die Ergebnisse der Versuche zum Wachstum- und MTBE-Abbauverhalten bei grundwasserrelevanten Milieubedingungen der isolierten methan-, propan- und butan-verwertenden Kulturen stellen einen Kenntniszuwachs im Bereich der Grundlagenforschung des cometabolischen MTBE-Abbaues dar. Sie bieten einen Ansatzpunkt zum Einsatz dieser Kulturen in Grundwassersanierungsprojekten. Der Prozess der Isolierung des Stammes BU3 (*Rhodococcus ruber*) von der Anreicherung über die Untersuchung von Wachstums- und MTBE-Abbaubedingungen in verschiedenen Maßstäben bis hin zum Einsatz in einem Feldversuch bietet eine methodische Grundlage für die Vorgehensweise bei der Isolierung anderer schadstoffabbauender Mikroorganismen. Mit Hilfe dieses Stammes war es möglich einen cometabolischen MTBE-Abbau unter Anwendung des ENA-Konzeptes im Grundwasserleiter des Projektstandortes Leuna zu realisieren.

Aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften stellt dieser Stamm ein effektives Werkzeug auch bei zukünftigen Schadstoffsanierungsprojekten dar.

Literaturverzeichnis

8 Literaturverzeichnis

1. AHMED, F. E. (2001) Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. *Toxicology Letters* 123: 89 - 113
2. AMERSON, I. and Johnson, R. L. (2003) Natural Gradient Tracer Test to Evaluate Natural Attenuation of MTBE Under Anaerobic Conditions. *Ground Water Monitoring Remediation* 23: 54 - 61
3. AN, Y. J.; Kampbell, D. H., and McGill, M. E. (2002) Toxicity of MTBE to plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 1679 - 1682
4. ARP, D. J. (1999) Butane metabolism by butane-grown '*Pseudomonas butanovora*'. *Microbiology* 145: 1173 - 1180
1. ARP, D. J.; Yeager, C. M., and Hyman, M. R. (2001) Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation* 12: 81 - 103
2. ARP, H. P., and Schmidt, T. C. (2004) Air-Water transfer of MTBE, its degradation products, and alternative fuel oxygenates: the role of temperature. *Environmental Science and Technology* 38: 5405 - 5412
3. BAST, E. (1999) Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin
4. BECK, M. (2000) Cometabolische Degradation von Trichlorethen in Wässern mittels methanotropher Bakterien. Dissertation. Universität Leipzig. UFZ-Bericht Nr. 31/2000
5. BEGUIN, P.; Chauvaux, I. M.; Francois, A.; Fayolle, F., and Monot, F. (2003) Genes Involved in the Degradation of Ether Fuel by Bacteria of the *Mycobacterium/Rhodococcus* Group. *Oil & Gas Science and Technology Review*.58: 489 - 495
6. BISSWANGER, H. (1979) Enzymkinetik -Theorie und Methoden. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deerfield Beach (Florida), Basel.
7. BORDEN, R. C., Daniel, R. A., Le Brun IV, L. E., and Davis, C. W. (1997) Intrinsic Biodegradation of MTBE and BTEX in a Gasoline-Contaminated Aquifer. *Water Resources Research*. 33: 1105 - 1115
8. BRADLEY, P. M.; Chapelle, F. H., and Landmeyer, J. E. (2001a) Effect of redox condition on MTBE biodegradation in surface water sediments. *Environmental Science and Technology* 35: 4643 - 4647
9. BRADLEY, P. M.; Chapelle, F. H., and Landmeyer, J. E. (2001b) MTBE mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 4: 1975 - 1978
10. BRAIDS, O. C. (2001) Commentaries and Perspectives MTBE -Panacea or Problem. *Environmental Forensics* 2: 189 - 196

Literaturverzeichnis

11. BREUER, U. (2006) Persönliche Mitteilung. November 2006
12. BRIGLIA, M.; Eggen, R. I. L.; van Elsas, D. J., and De Vos, W. M. (1994) Phylogenetic evidence for transfer of pentachlorophenol-mineralizing *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 to the genus *Mycobacterium*. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 377 - 385
13. BROHOLM, K.; Christensen, T. H., and Jensen, B. J. (1993) Different Abilities of eight Mixed Cultures of Methane-oxidizing Bacteria to Degrade TCE. *National Research* 27: 215 - 224
14. BRUSSEAU, G. A.; Tsien, H. C.; Hanson, R. S., and Wackett, L. P. (1990) Optimization of TCE oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect sMMO activity. *Biodegradation* 1: 19 - 29
15. BUSTARD, M. T.; Mc Evoy, E. M.; Goodwin, J. A. S.; Burgess, J. G., and Wright, P. C. (2000) Biodegradation of propanol and isopropanol by a mixed microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 424 - 431
16. CHANG, H. L. and Alvarez-Cohen, L. (1995) Model for the cometabolic biodegradation of chlorinated organics. *Environmental Science and Technology* 29: 2357 - 2367
17. CHANG, H. L. and Alvarez-Cohen, L. (1996) Biodegradation of Individual and Multiple Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by Methane-Oxidizing Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3371 - 3377
18. CHAUVAUX, S.; Chevalier, F.; Le Dantec, C.; Fayolle, F.; Miras, I.; Kunst, F., and Beguin, P. (2001) Cloning of a Genetically Unstable Cytochrome P-450 Gene Cluster Involved in Degradation of the Pollutant Ethyl *tert*-Butyl Ether by *Rhodococcus ruber*. *Journal of Bacteriology* 183: 6551 - 6557
19. CIRVELLO, J. D.; Radovsky, A.; Heat, J. E.; Farnell, D. R., and Lindamood, C. (1995) Toxicity and carcinogenicity of *t*-butyl alcohol in rats and mice following chronic exposure in drinking water. *Toxicology and Industrial Health*. 11: 151 - 165
20. COLBY, J.; Stirling, D. I., and Dalton, H. (1977) The sMMO of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochemical Journal* 165: 395 - 402
21. DEEB, R. A.; Hu, H. Y.; Hanson, J. R.; Scow, K. M., and Alvarez-Cohen, L. (2001) Substrate interactions in BTEX and MTBE Mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environmental Science and Technology* 2: 312 - 317.
22. EFFENBERGER, M.; Weiß, H.; Popp, P., and Schirmer, M. (2001) Untersuchungen zum Benzininhaltstoff MTBE in Grund- und Oberflächenwasser in Deutschland. *Grundwasser* 2: 51 - 60
23. EG Richtlinie (1991) EG Richtlinie 91/155/EWG. Anhang 2, Kennnummer 452
24. EPA (1998) Oxygenates in Water: Critical Information and Research Needs. Report-Nr. EPA/600/R-98/048
25. FAYOLLE, F.; Vandecasteele, J. P., and Monot, F. (2001) Microbial degradation and fate in the environment of MTBE and related fuel oxygenates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 339 - 349

Literaturverzeichnis

26. FAYOLLE, F.; Francois, A.; Garnier, L.; Godefroy, D.; Mathis, H.; Piveteau, P., and Monot, F. (2003) Limitation in MTBE Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology Review* 58: 497 - 504
27. FAYOLLE, F.; Francois, A.; Mathis, H.; Guiot, S. R., and Monot, F. (2004) Biodegradation of fuel oxygenates by MTBE-degrading microorganisms. In: W. Verstraete (Ed.), *Environmental Biotechnology. Proceedings of the European Symposium on Environmental Biotechnology (Oostende, Belgium – April 2004)*, Balkema Publishers, the Netherlands, pp. 221-225. ISBN: 90-5809-653-X.
28. FINNERAN, K. T. and Lovley, D. R. (2001) Anaerobic degradation of MTBE and TBA. *Environmental Science and Technology* 35: 1785 - 1790
29. FIORENZA, S.; Suarez, M. P., and Rifai, H. S. (2002) MTBE in groundwater: status and remediation. *Journal of Environmental Engineering* 128: 773 - 781
30. FRANCOIS, A.; Mathis, H.; Godefroy, D.; Piveteau, P.; Fayolle, F., and Monot, F. (2002) Biodegradation of MTBE and other fuel oxygenates by a new strain *Mycobacterium austroafricanum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2754 - 2762
31. FRANCOIS, A.; Garnier, L.; Mathis, H.; Fayolle, F., and Monot, F. (2003) Roles of *tert*-butyl formate, *tert*-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP-2012. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 256 – 262
32. FRITSCH, W. (1998) *Umweltmikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen*, 1.Auflage, Gustav Fischer Verlag: Jena
33. GARNIER, P. M.; Auria, R.; Augur, C., and Revah, S. (1999) Cometabolic biodegradation of MTBE by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 498 - 503
34. GOODFELLOW, M.; Alderson, G., and Chun, J. (1998) Rhodococcal systematics: problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 3 - 20
35. GOSWAMI, P., and Cooney, J. J. (1999) Subcellular location of enzymes involved in oxidation of n-alkane by *Cladosporium resinae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 860 – 864
36. GRÄBER, A. (2005) Modelluntersuchungen zum cometabolischen Abbau von Methyl-tertiär-butylether mit dem Stamm *Nocardia* ENV 425 und weiteren propanolverwertenden Kulturen. Diplomarbeit. Technische Universität Bergakademie Freiberg.
37. GROSSE, S.; Laramée, L.; Wendlandt, K. D.; McDonald, I. R.; Miguez, C. B., and Kleber, H. P. (1999) Purification and Characterization of the sMMO of Type II Methanotrophic Bacterium *Methylocystis* sp. Strain W114. *Applied and Environmental Microbiology* 209: 3929 - 3935
38. Hach (2005) Bedienungsanleitung der Sauerstoffmessenkrode LDO HQ20
39. HAMAMURA, N.; Yeager, C. M., and Arp, D. J. (2001) Two Distinct Monooxygenases for Alkane Oxidation in *Nocardioides* sp. Strain CF8. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4992 - 4998
40. HAPPEL, A. M.; Beckenbach, E. H., and Halden, R. U. (1998) An evaluation of MTBE impacts to California groundwater resources. Report to California State Water Resources Control Board,

Literaturverzeichnis

Department of Energy and Western States Petroleum Association, Report-Nr. UCRL-AR-130897:
1 - 68

41. HARDISON, L. K.; Curry, S. S.; Ciuffetti, L. M., and Hyman, M. R. (1997) Metabolism of Diethyl Ether and Cometabolism of MTBE by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. . Applied and Environmental Microbiology 63: 3059 - 3067
42. HELM, J. (2002) Methanotrophe Bakterien als Produzenten von Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB) - Charakterisierung des Prozesses, des Polymers und einer stabilen Mischkultur. Dissertation. Technische Universität Dresden. UFZ-Bericht: Nr. 9/ 2002
43. HERNANDEZ-PEREZ, G.; Fayolle, F., and Vandecasteele, J. P. (2001) Biodegradation of ethyl t-butyl ether (ETBE), methyl t-butyl ether (MTBE) and t-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrea*. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 117 - 121
44. HRSACK, D., and Begonja, A. (2000) Possible Interactions within a Methanotrophic-Heterotrophic Groundwater Community Able To Transform Linear Alkylbenzenesulfonates. Applied and Environmental Microbiology 66: 4433 - 4439
45. HYMAN, M. R.; Kwon, P.; Williamson, K., and O'Reilly, K. T. (1998) Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms. In: First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. May 1998. Monterey. California, Battelle Press: 321 – 326
46. HYMAN, M. R. and O'Reilly, K. T. (1999) Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria. In Proceedings of the Fifth International Symposium on In situ and On-site Bioremediation. B. Alleman and A. Leeson (Eds.) April 19-22, San Diego, CA. Battelle Press, 7 - 12
47. JECHOREK, M.; Wendlandt, K. D., and Beck, M. (2003) Cometabolic degradation of chlorinated aromatic compounds. Journal of Biotechnology 1: 1 - 6
48. KARLSON, U.; Dwyer, D. F.; Hooper, S. W.; Moore, E. R.; Timmis, K. N., and Eltis, L. D. (1993) Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate. Journal of Bacteriology 175: 1467 - 1474
49. KELLER, A. A.; Froines, J.; Koshland, C.; Reuter, J.; Suffet, I. M., and Last, J. (1998) Health & environmental assessment of MTBE -Volume 1: Summary and recommendations. Report to the governor and legislature of the State of California, University of California Davis, CA, USA
50. KELLEY, K. L.; Marley, M. C., and Sperry, K. L. (2003) In Situ Chemical Oxidation. In: MTBE Remediation Handbook, Amherst, MA: Amherst Scientific Publishers, 2003, 201 - 221.
51. KEPLER, C. (2006) Altlastenbericht. [http:// www. kepler.han-solo.net/uba/altlast/web1/bericht/tanklager/tankan44.htm](http://www.kepler.han-solo.net/uba/altlast/web1/bericht/tanklager/tankan44.htm). Zugriff 12.11.2006
52. KOENIGSBERG, S. S.; Gillespie, R., and Mahaffey, W. R. (2003) The bioremediation of MTBE with oxygen release compound (ORC). [http:// www. ipec. utulsa. edu/lpec/conf/ koenigsberg_gillespie_52.pdf](http://www.ipecc.utulsa.edu/lpec/conf/koenigsberg_gillespie_52.pdf). Zugriff 25.11.2005
53. LANDESAMT FÜR UMWELTSCHUTZ BADEN-WÜRTTEMBERG (2000) Grundwasser-überwachungsprogramm - Ergebnisse der Beprobung 1999. Report der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg 14: Annex 32

Literaturverzeichnis

54. LANDMEYER, J. E.; Chapelle, F. H.; Bradley, P. M.; Pankow, J. F.; Church, C. D., and Tratnyek, P. G. (1998) Fate of MTBE Relative to Benzene in a Gasoline-Contaminated Aquifer (1993-1998). Ground Water Monitoring Remediation: 93 – 102
55. LANDMEYER, J. H.; Chapelle, F. H.; Herlong, H. H., and Bradley, P. M. (2001) MTBE biodegradation by indigenous aquifer microorganisms under natural and artificial oxic conditions. Environmental Science and Technology 6: 1118 - 1126
56. LANE, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-173. In E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England.
57. LECHEVALIER, H. A. (2005) Genus Nocardioforms (Chapter 17). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, New York. pp. 1458 - 1480.
58. LIU, C. Y.; Speitel, G. E., and Georgiou, G. (2001) Kinetics of MTBE cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria. Applied and Environmental Microbiology 5: 2197 - 2201
59. MACIEL, H.; Mathis, H.; Fayolle, F., and Monot, F. (2004) Effect of MTBE concentration on its aerobic degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 in a fixed-bed bioreactor. European Conference on MTBE, Barcelona, Spain, 12 –13. 11. 2004. Abstract-Band 2. 345-367
60. MARTIENSSEN, M. and Schirmer, M. (2004) Verbundvorhaben METHyltertiärbutylether (MTBE) – Leuna als Referenzstandort zur Implementierung des „Enhanced Natural Attenuation“ – Ansatzes (METLEN), BMBF-Projekt-Förderkennzeichen 02WN0348, Statusbericht zur Projektphase 1
61. MARTIENSSEN, M.; Fabritius, H.; Kukla, S.; Balcke, G. U.; Hasselwander, E., and Schirmer, M. (2006) Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products. Journal of Contaminant Hydrology 87:37 – 53
62. MC KINNON, R. J., and Dyksen, J. E. (1984) Removing organics from groundwater through aeration plus GAC. Journal American Water Works Association 5: 42 - 47
63. MO, K.; Lora, C. O.; Wanken, A. E.; Javanmardian, M.; Yang, X., and Kulpa, C. F. (1997) Biodegradation of MTBE by pure bacterial cultures. Applied Microbiology and Biotechnology 47: 69 - 72
64. MORTON, J. D.; Hayes, K. F., and Semrau, J. D. (2000) Effect of copper speciation on whole-cell sMMO activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b. Applied and Environmental Microbiology 66: 1730 - 1733
65. PAGE, R. D. M. (1996) "TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358
66. PAHLKE, G.; Leonhard, H., and Tappe, M. (2000) Mögliche Umweltbelastung durch die Nutzung von MTBE als Kraftstoffzusatz in Deutschland und Westeuropa. Erdöl Erdgas Kohle 116: 498 - 504

Literaturverzeichnis

67. PAREKH, N. R.; Walker, A.; Roberts, S. J., and Welch, S. J. (1994) Rapid degradation of the triazinone herbicide metamitron by *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 467 - 475
68. PARK, K. and Cowan, R. M. (1997) Effects of Oxygen and Temperature on the Biodegradation of MTBE. In: *Proceedings of American Chemical Society Division of Environmental Chemistry*. Vol. 37 (1) April 1997. 421 - 424
69. PATEL, R.; Hou, C. T.; Laskin, A. I., and Felix, A. (1982) Microbial Oxidation of Hydrocarbons: Properties of a Soluble Methane Monooxygenase from a facultative Methane utilizing Organism, *Methylobacterium* sp. Strain CRL-26. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1130 - 1137
70. PERRY, J. J. (1968) Substrate specificity in hydrocarbon utilizing microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 34: 27 - 36
71. PIVETEAU, P.; Fayolle, F.; Vandecasteele, J. P., and Monot, F. (2001) Biodegradation of TBA and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 369 - 373
72. RALOFF, J. (2000) Gasoline additive's going, but far from gone. *Science* 4: 229 - 236
73. REUTER, J. E.; Allen, B. C.; Richards, R. C.; Pankow, J. F.; Goldman, C. R.; Scholl, R. L., and Seyfried, J. S. (1998) Concentrations, Sources, and Fate of Gasolines Oxygenate MTBE in a Multiple-Use Lake. *Environmental Science and Technology* 32: 3666 - 3672
74. ROHWERDER, T.; Breuer, U.; Benndorf, D.; Lechner, U., and Müller, R. H. (2006) The Alkyl *tert*-Butyl Ether Intermediate 2-Hydroxyisobutyrate Is Degraded via a Novel Cobalamin-Dependent Mutase Pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4128 - 4135
75. SALANITRO, J. P.; Diaz, L. A.; Williams, M. P., and Wisniewski, H. L. (1994) Isolation of a bacterial culture that degrades MTBE. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2593 - 2596
76. SALANITRO, J. P.; Johnson, P. C.; Spinnler, G. E.; Maner, P. M.; Wisniewski, H. L., and Bruce, C. (2000) Field-Scale Demonstration of Enhanced MTBE Bioremediation through Aquifer Bioaugmentation and Oxygenation. *Environmental Science and Technology* 34: 4152 - 4162
77. SCHIRMER, M. and Barker, J. F. (1998) A Study of Long-term MTBE Attenuation in the Borden Aquifer, Ontario, Canada. *Ground Water Monitoring Remediation* 18: 113 - 122
78. SCHIRMER, M. (1999a) Das Verhalten des Benzininhaltsstoffes MTBE in Grundwasser. *Grundwasser* 4: 95 - 101
79. SCHIRMER, M.; Butler, B. J.; Barker, J. F.; Church, C. D., and Schirmer, K. (1999b) Evaluation of Biodegradation and Dispersion as Natural Attenuation Process of MTBE and Benzene at Borden Field Site. *Physics, Chemistry and Earth Sciences (B)* 6: 557 - 560
80. SCHIRMER, M. (2000) Projektantrag des Verbundvorhaben METHyltertiärbutylether (MTBE) – Leuna als Referenzstandort zur Implementierung des „Enhanced Natural Attenuation“ – Ansatzes (METLEN), BMBF-Projekt-Förderkennzeichen 02WN0348

Literaturverzeichnis

81. SCHIRMER, M.; Butler, B. J.; Church, C. D.; Barker, J. F., and Nadarajah, N. (2002) Laboratory evidence of MTBE biodegradation in Borden aquifer material. *Journal of Contaminant Hydrology* 60: 229 - 249
82. SCHNEIDER, J. D.; Wendlandt, K. D.; Brühl, E., and Mirschel, G. (1983) Einfluß sauerstoffhaltiger C1-Verbindungen auf das Wachstum methanassimilierender Bakterien. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 23: 33 - 35
83. SEKLEMOVA, E.; Pavlova, A., and Kovacheva, K. (2001) Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* 8: 311 - 316
84. SMITH, C. A.; O'Reilly, K. T., and Hyman, M. R. (2003a) Cometabolism of Methyl *tertiary* Butyl Ether and Gaseous n-Alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 Grown on C5 to C8 n-Alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7385 - 7394
85. SMITH, C. A.; O'Reilly, K. T., and Hyman, M. R. (2003b) Characterization of the Initial Reactions during the Cometabolic Oxidation of Methyl *tert*-Butyl Ether by Propane-Grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 796 - 804
86. SMITH, E. S.; Hristova, K. R.; Wood, I.; Mackay, D. M.; Lory, E., and Lorenzana, D. (2005) Comparison of Biostimulation versus Bioaugmentation with Bacterial Strain PM1 for Treatment of Groundwater with Methyl *Tertiary* Butyl Ether (MTBE). *Environmental Health Perspectives* 113: 317 - 322
87. SOLANO-SERENA, F.; Marchal, R.; Casaregola, S.; Vasnier, C.; Lebeault, J. M., and Vandecasteele, J. P. (2000) A *Mycobacterium* Strain with Extended Capacities for Degradation of Gasoline Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2392 - 2399
88. SOMSAMAK, P.; Cowan, P. M., and Häggblom, M. M. (2001) Anaerobic biotransformation of fuel oxygenates under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 259 - 264
89. SQUILLACE, P. J.; Pankow, J. L.; Korte, N. E., and Zogorski, J. S. (1997) Review of the environmental behavior and fate of Methyl *tert*-Butyl Ether. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1836 - 1844
90. STAROSTINA, N. G. (2000) Consortium of psychrophile methanotrophic Bacteria for Biodegradation. Report Nr. 0311553/BMBF
91. STAROSTINA, N. G.; Wendlandt, K. D.; Rogge, G., and Jechorek, M. (1995) Interactions between populations of methanotrophic bacteria in a two-component culture. *Microbiology* 6: 722 - 724
92. STEFFAN, R. J.; McClay, K.; Vainberg, S.; Condee, C. W., and Zhang, D. (1997) Biodegradation of the gasoline oxygenates MTBE, ETBE, and TAME by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4216 - 4222
93. STEFFAN, R. J.; Condee, C. W.; McClay, K.; Michelson, J. D., and DeFlaun, M. F. (1998) Biodegradation of the gasoline oxygenates. US-Patent 5,814,514
94. STEFFAN, R. J.; Hatzinger, P. B.; Farhan, Y., and Drew, S. R. (2001) in-situ and ex-situ biodegradation of MTBE and TBA in contaminated groundwater. *Petroleum Hydrocarbons and*

Literaturverzeichnis

- Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection, and Remediation Conference and Exposition. Houston, Texas, USA. Abstract-Band: 252 - 264
95. STIRLING, D. I. and Dalton, H. (1979) Fortuitous oxidation and cometabolism of various carbon compounds by whole-cell suspensions of *Methylococcus capsulatus* (Bath). FEMS Microbiology Letters 5: 315 - 318
 96. STOCKERL, H.; Hagenguth, and Kramer (2000) MTBE- eine neue Gefahr für das Grundwasser? Ergebnisse eines orientierenden Untersuchungsprogramms. Bayrisches Landesamt für Wasserwirtschaft Report-Nr. 23
 97. STRAN, S. E.; Bjelland, M. D., and Stensel, H. D. (1990) Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by suspended cultures of methane-oxidizing bacteria. Research Journal Water Pollution Control Fed. 62: 124 - 129
 98. STRÄUBER, H.; Müller, R. H., and Babel, W. (2003) Evidence of cytochrome P450-catalyzed cleavage of the ether bond of phenoxybutyrate herbicides in *Rhodococcus erythropolis* K2-3. Biodegradation 14: 41 - 50
 99. STUPP, H. D., Bakenhus, A., Stauffer, R., and Lorenz, D. (2004) Verfahren zur Reinigung von mit MTBE verunreinigtem Grundwasser unter Einbeziehung der Kosten zur Sanierung www.dscweb.de/Publikationen/mtbe/mtbe/html. (Zugriff 12.08.2006)
 100. Stupp, H. D. (2006) MTBE ist zu einem Wasserproblem geworden. Fachsymposium Terra Tech 05/ 2006. Köln, BRD. http://bauerumweltgruppe.com/dt/gruppe/presse/artikel/200605_mtbe.htm. (Zugriff 09.06.2006)
 101. Sur, S. and Pahlke, G. (2003) Umweltrelevanz des Stoffes Methyl-*tert*-ärbutylether (MTBE) unter besonderer Berücksichtigung des Gewässerschutzes. www.umweltbundesamt.de/verkehr/kraftsubst/additiva/mtbe.htm (Zugriff 28.12.2004)
 102. SYMONS, B. D. and Greene, J. (2003) Soil Vapor Extraction, Bioventing, Air Sparging. In MTBE Remediation Handbook, Amherst, MA: Amherst Scientific Publishers, 207-223
 103. TESSERAUX, I. and Koss, G. (1999) Toxikologie von Methyl-*tert*-ärbutylether (MTBE) als Bestandteil des Otto-Motoren-Kraftstoffes. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 42: 332 - 343
 104. TEUTSCH, G.; Weiß, H., and Schirmer, M. (1999) Verfahren und Vorrichtung zur Sanierung von kontaminiertem Grundwasser. DE-Patent Az9910
 105. UCHIYAMA, H.; Nakajima, T.; Yagi, O., and Nakahara, T. (1992) Role of heterotrophic Bacteria in Complete Mineralization of TCE by *Methylocystis* sp Strain M. Applied and Environmental Microbiology 58: 3067 - 3071
 106. USEPA (1994) Health risk perspectives on fuel oxygenates., Office of research and Development, Washington D.C., USA. Report-Nr. EPA 600/R-94/217
 107. WAYNE, L. G. and Kubica, G. P. (1980) The *Mycobacteria*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, New York. pp.1436 - 1457

Literaturverzeichnis

108. WENDLANDT, K. D.; Brühl, E.; Ambrossius, J.; Kranz, E.; Karbaum, K., and Lingner, G. (1981) Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen. DDR-Patent 148465
109. WENDLANDT, K.-D. 2005. Persönliche Mitteilung. Oktober 2005
110. WERNER, I.; Deanovic, L. A., and Hinton, D. E. (2001) Toxicity of MTBE to freshwater organisms. *Environmental Pollution* 111: 83 - 88
111. WHITE, G. F.; Russell, N. J., and Tidswell, E. C. (1996) Bacterial scission of ether bonds. *Microbiological Reviews* 60: 216 - 232
112. WILSON, J. T.; Cho, J.S.; Wilson, B.H., and Vardy, J.A. (2000) Natural Attenuation of MTBE in the subsurface under methanogenic conditions. Report-Nr. EPA/600/R-00/006
113. WILSON, J. T. (2003) Aerobic In Situ Bioremediation In: In MTBE Remediation Handbook, Amherst, MA: Amherst Scientific Publishers, 243-264
114. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (1998) Methyl tertiary-butyl-ether. Environmental Health Criteria Report. WHO, Genf, Belgien. Report-Nr. 206
115. YEH, C. K. and Novak, J. T. (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soil. *Water Environmental Research* 66: 744 - 752
116. ZITZWITZ, M.; Ringpfeil, M., and Gerhardt, M. (2001) Verfahren zur Dekontamination von ter-Butylmethylether (MTBE) belastetem Boden und/oder Grundwasser durch Belüftung mit einem methanhaltigem Luftgemisch. DE-Patent 10225100A1

Anhang

Tab. A-1: Charakteristika der verwendeten Umweltproben

	Grundwasser	Blähschlamm	Klärschlamm
Herkunft	MTBE-kontaminiertes Grundwasser der Grundwasserbrunnen GW 7 und GW 9 des Projektstandortes METLEN	Absetzbecken der, Rechenanlage der Kläranlage Halle-Lettin	Belebungsbecken der biologischen Reinigung der Kläranlage Leipzig-Rosental
Phosphat [mg/l]	0,4	20,3	14,5
Nitrat [mg/l]	< 0,05	0,90	2,69
Ammonium [mg/l]	50 - 60	k. A.	k. A.
pH	6,8 - 7,0	7,6	6,8
Kupfer [mg/l]	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Sulfat [mg/l]	720 – 725	200	220
CSB [mg/l]	26	50,2	44,5
MTBE [mg/l]	27	0	0

Anmerkung: Die physikalisch, chemische Charakterisierung der Proben erfolgte maximal 24 Stunden nach der Probenahme.

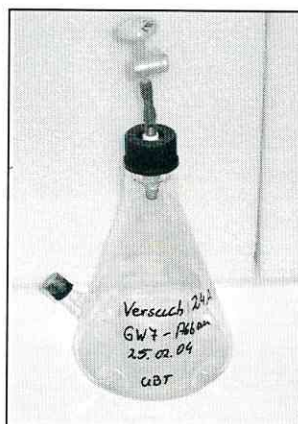


Abb. A-1: 1 Liter-gasdichter Schüttelkolben mit Ansatzstutzen und speziellen Begasungsaufsatz

Anhang



Abb. A-2: Laborsäulen

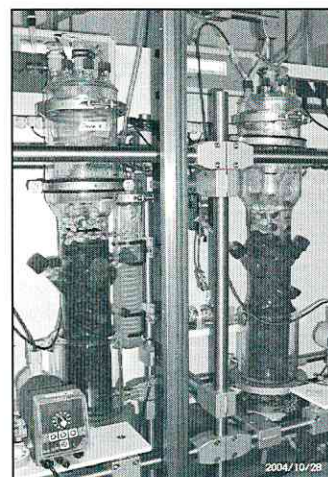


Abb. A-3: kleintechnische Säulen (Säule S1 links, Säule S2 rechts)

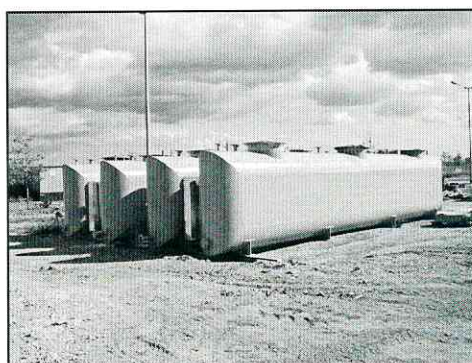


Abb. A-4: Konditionierungseinheiten des Feldversuches am Projektstandort Leuna vor dem Absenken in den Grundwasserleiter (Martienssen 2005)



Abb. A-5: Abstromstreifen mit Probennahmebrunnen des Feldversuches am Projektstandort Leuna (Martienssen 2005)

Tab. A-2: Formeln zur Berechnung der BTS-Konzentration der Kulturen anhand der Extinktionsmessungen bei 600 nm

Kultur	Gleichung
BU3	$y=0,21 \cdot x - 0,021$
K152	$y=0,49 \cdot x$
B12	$y=0,31 \cdot x + 0,01$
Anreicherungskulturen*	$y=0,3 \cdot x$

Anmerkung: * anhand der Kulturen BsD und Ks C erstellt. Es wurde festgelegt das diese Gleichung für alle Anreicherungskulturen zur Umrechnung verwendet wird.

Anhang

Tab. A-3: Kohlenstoffverwertungsspektrum der Stämme BU3, B12 und K152 (Testsysteme API 20 NE, BIOLOG-Microlog –GN für K152 und BIOLOG-Microlog- GP für BU3 und B12)

Substrate	BU3	B12	K152
α-Cyclodextrin	-	-	-
α-D-Glukose	+	+	+
Acetatsäure	+	+	-
Adonit	k. A.	+	-
Alaninamide	-	+	-
Arabinose	+	+	+
Citrat	k. A.	+	+
Alanine	+	+	+
D-Arabit	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Gluconinsäure	+	+	+
D-Mellobiose	-	-	-
D-Saccharinsäure	k. A.	+	+
D-Serine	-	+	+
D-Galactonsäure-lacton	k. A.	+	-
D-Galactose	+	+	+
D-Galacturoninsäure	+	+	+
D-Glucosaminsäure	k. A.	+	+
D-Mannose	+	+	+
D-Psicose	+	+	+
D-Raffinose	-	-	-
D-Sorbit	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+
D, L-Lactatsäure	+	+	+
D,L-α-Glycerolphosphat	-	-	+
Dextrin	-	+	+
D-Mannit	+	+	+
Erythol	k. A.	+	+
Forminsäure	k. A.	+	+
Gentobiose	-	-	-
Glucuronamide	k. A.	-	-
Glukonat	+	+	+
Glukose-1-Phosphat	-	-	-
Glukose-6-Phosphat	-	-	-
Glycerol	+	+	+
Glycogen	-	-	-
Glycyl-L-Aspartinsäure	k. A.	-	-
Glycyl-L-Glutaminsäure	-	-	-
Hydroxy-L-prolin	k. A.	+	+
Itaconsäure	k. A.	+	+
L-Aspartin	+	+	+

Substrate	BU3	B12	K152
L-Histidin	k. A.	-	+
L-Leucin	k. A.	+	+
L-Phenylalanine	k. A.	-	-
L-Proline	k. A.	+	+
L-Serine	-	-	+
Lactulose	-	-	-
m-Inositol	+	+	+
Malat	+	+	+
Malonsäure	-	+	+
Maltose	-	-	+
Mannit	+	+	+
Mannose	+	+	+
Methylpyruvate	+	+	+
Mono-Methyl-Succinate	+	+	+
N-Acetyl-D-galactosamine	k. A.	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+	+
P-Hydroxyphenyllessigsäure	+	+	+
Phenylethylamin	k. A.	-	-
Propionsäure	+	+	-
Putrescine	-	+	+
Succinaminsäure	-	+	-
Succininsäure	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Thymidine	-	-	-
Turanose	-	-	-
Tween 40	+	+	+
Urocaninsäure	k. A.	+	+
Xylit	-	+	-
α D-Lactose	-	-	-
(α,β,γ) Hydroxybuttersäure	(+)nur β	+	+
α-Keto-Buttersäure	k. A.	+	+
α-Keto-Glutarsäuresäure	+	+	+
β-Methyl-D-glucose	-	-	-
D-Ribose	+	k. A.	k. A.

Tab. A-4: Stabilität der sMMO-Aktivität der Anreicherungskultur Ks C nach Anzucht auf Methan und Zugabe von Methanol ($c_{\text{Methanol}} = 1,6 \text{ g/l}$) zum Ansatz 2

Zeit [h]	sMMO-Aktivität [nmol/mg BTS*h]	
	Ansatz 1: Ks C	Ansatz 2: Ks C + Methanol
0	179,5	179,0
1	141,2	32,5
2	95,3	30,0
6	83,4	15,6

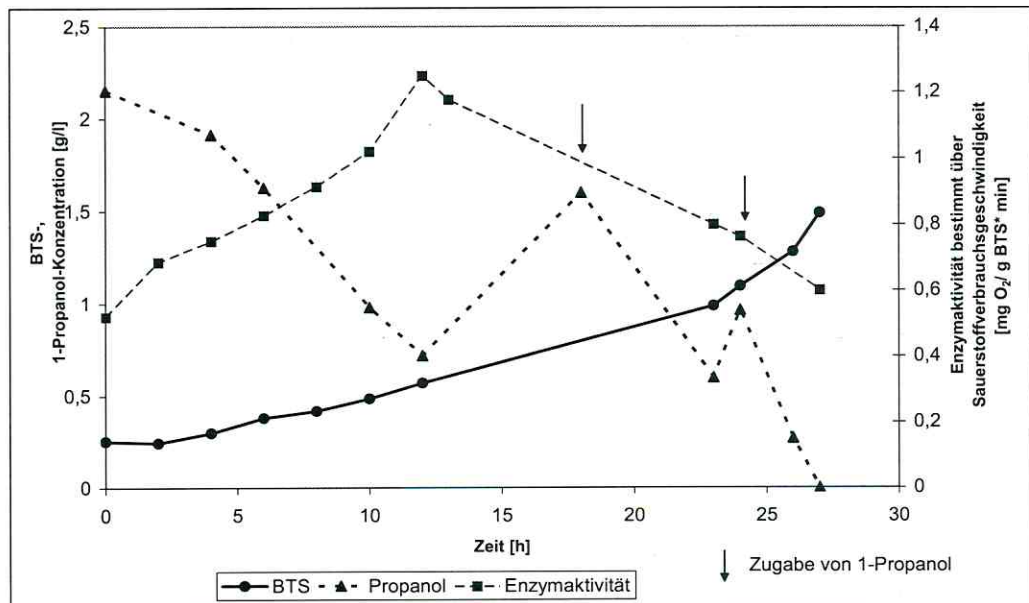


Abb. A-6 Fermentation des Konsortiums B12-K152 (Verhältnis 2:1) im 5 l-Fermenter mit 1-Propanol als Wachstumssubstrat. ($T = 30^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,5$; $r = 400 \text{ rpm}$, Luftbegasung = 2 l/min , $c_{1\text{-Propanol}} = 1,6 \text{ g/l}$)

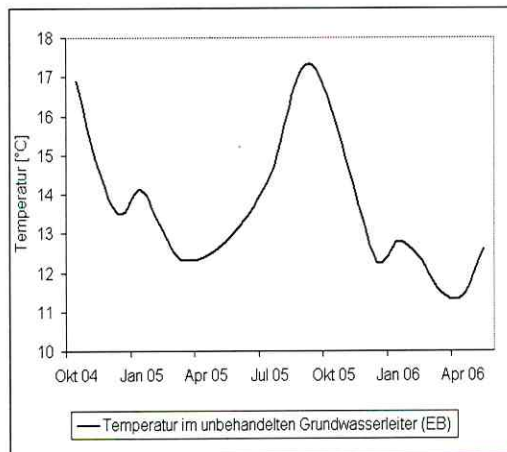


Abb. A-7: Temperaturverlauf des unbehandelten Grundwasserleiters des Feldversuches am Projektstandort Leuna während des Untersuchungszeitraumes Oktober 2004 – Mai 2006

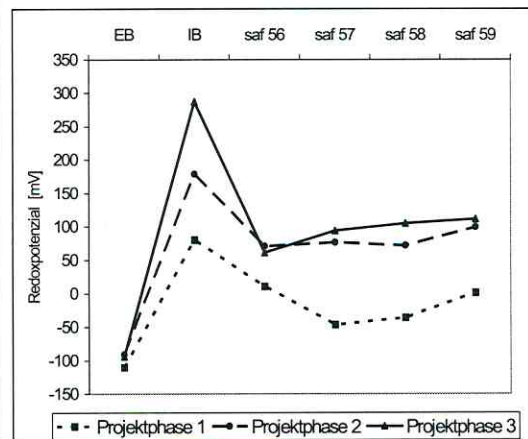


Abb. A-8: Redoxpotenzial während der drei Projektphasen des Feldversuches zum cometabolischen MTBE-Abbau am Projektstandort Leuna

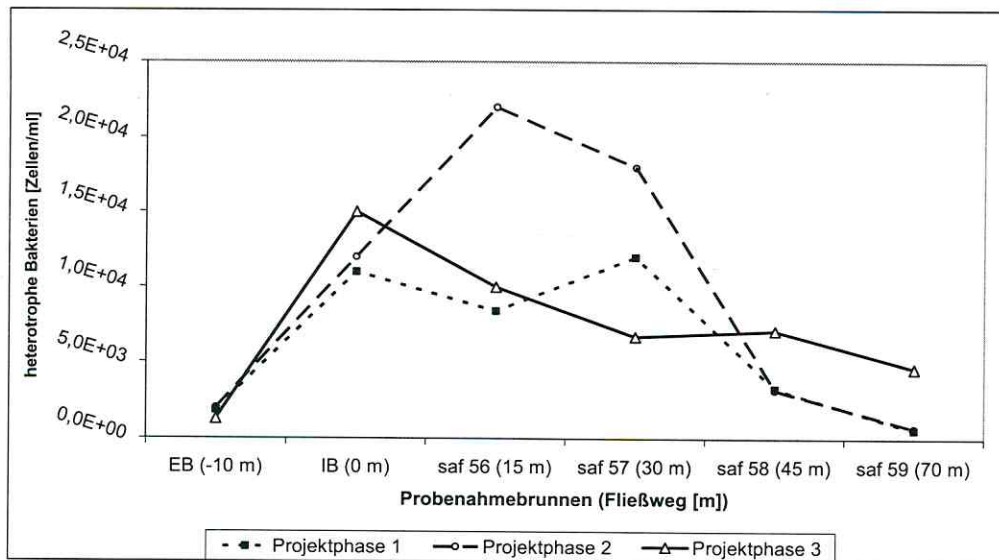


Abb. A-9: Durchschnittliche Zellzahl der heterotrophen Bakterien der drei Projektphasen des Feldversuches zum cometabolischen MTBE-Abbau am Projektstandort Leuna (Bestimmung über Ausplattierungen und MPN-Methode, Werte entsprechen den Mittelwerten der monatlichen Probenahmen während der drei Projektphasen)

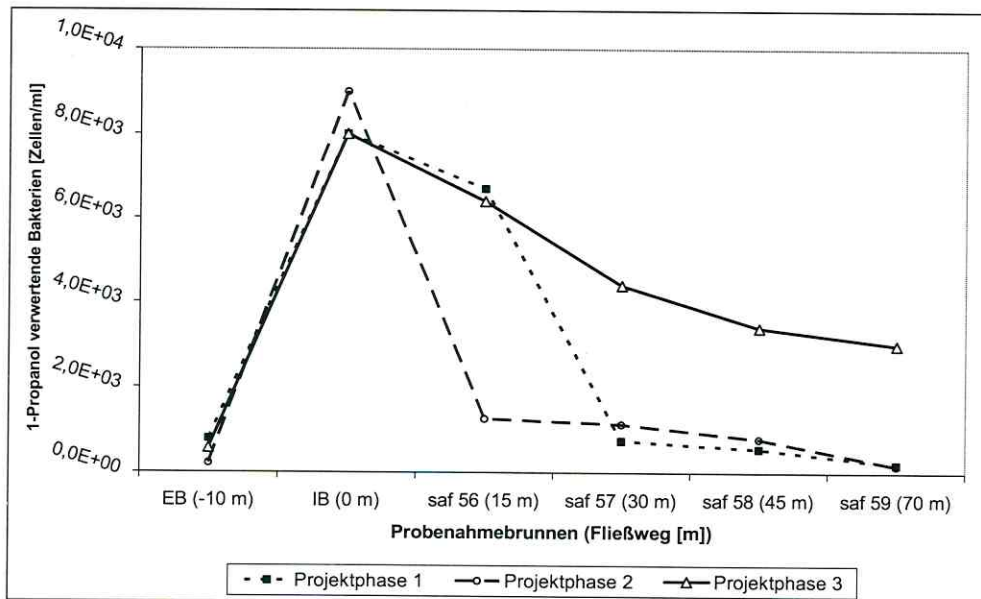


Abb. A-10: Durchschnittliche Zellzahl der 1-propanolverwertenden Bakterien der drei Projektphasen des Feldversuches zum cometabolischen MTBE-Abbau am Projektstandort Leuna (Bestimmung über Ausplattierungen und MPN-Methode, Werte entsprechen den Mittelwerten der monatlichen Probenahmen während der drei Projektphasen)

Lebenslauf

Name, Vorname: **Haase, Kathleen**
Geburtsdatum: 23. November 1976
Geburtsort: Dresden
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 - 1990 Polytechnische Oberschule „G. Wolff“, Dresden
1990 - 1995 Erweiterte Oberschule „J. H. Pestalozzi“, Dresden
Abschluss: Abitur

Studium:

1995 - 2000 Angewandte Biologie an der Technische Universität
Dresden mit Spezialisierung Mikrobiologie, Zoologie,
Botanik
Abschluss: Diplom-Biologe
Jan. 2000 - Sept. 2000 Diplomarbeit
Thema: „Das physiologische und ökologische Potential von
Pseudomonas stutzeri MK 21 als Modellorganismus zur
Denitrifikation im hyporheischen Interstitial der Elbe“

Dissertation:

2003 - 2006 UFZ-Helmholtz Zentrum für Umweltforschung GmbH
Thema: „Cometabolischer Abbau von Methyl-*tertiär*-
butylether unter Nutzung alkanverwertender
Bakterienspezies“

Berufstätigkeit:

Feb. 2001 - April 2003 technische Assistentin in der pflanzenbiotechnologischen
Firma SunGene GmbH, Abteilung Molekularbiologie,
Gatersleben
ab August 2006 Laborleiterin der Mikrobiologie der CUP-Laboratorien Dr.
Freitag GmbH, Bischofswerda

Weiterbildung:

Feb. 1992/ Aug. 1993 Praktikum, Alte Apotheke, Radebeul

Oktober 1994 Praktikum, pharmakologische Abteilung, Arzneimittelwerk
Dresden GmbH

März 1998 Praktikum, mikrobiologische Qualitätskontrolle,
Arzneimittelwerk Dresden GmbH

Juli 1998 Praktikum, Labor Analytik/ Biotechnologie, ASTA Medica
AG, Halle-Künsebeck

