UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

Nr. 15/1996 Dissertation

Kinetische Untersuchungen zum Abbau chlorierter und methylierter Benzoesäuren duch Pseudomonas spec. B13 FR1 (SN45P)

Roland A. Müller

ISSN 0948-9452

Kinetische Untersuchungen zum Abbau chlorierter und methylierter Benzoesäuren durch *Pseudomonas spec.* B13 FR1(SN45P)

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl. Biol. Roland Arno Müller
aus Jülich

1. Referent:	Prof. Dr. W.-D. Deckwer
2. Referent:	Prof. Dr. C. Syldatk
Eingereicht am:	13.10.1995
Mündliche Prüfung am:	13.03.1996

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1990 bis November 1993 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (**GBF**), Braunschweig, in der Abteilung Bioverfahrenstechnik angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. -D. Deckwer und Herrn Dr. V. Hecht für die Anregung zu diesem interessanten Thema, die fachliche Betreuung und die Unterstützung mit Sachmitteln.

Herrn Prof. Dr. C. Syldatk danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dem Bereich Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Timmis danke ich für die Zurverfügungstellung der Mikroorganismen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn H. Bischof für die tatkräftige Unterstützung bei Wartung und Reparatur von analytischem und verfahrenstechnischem Equipment. Ebenso danke ich Herrn D. Pape für die sorgfältige Arbeit bei Isolierung und Aufreinigung von Intermediaten des Benzoesäurekatabolismus.

Herrn Dr. Vray danke ich für die NMR-spektrometrischen Untersuchungen, die zur Identifizierung eines Metaboliten geführt haben. Ebenso möchte ich Frau Schweer für die massenchromatographischen Untersuchungen meinen Dank aussprechen.

Herrn M. Schmidt danke ich für die Anfertigung der CAD-Zeichnung der Versuchsapperatur.

Vor allem möchte ich der gesamten Abteilung Bioverfahrenstechnik für das stets freundliche Arbeitsklima danken, das nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Frau und meinen Eltern, die mich in vielfältiger Weise unterstützt und bestätigt haben.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

R. Müller, W.-D. Deckwer and V. Hecht: Degradation of chloro- and methylsubstituted benzoic acids by a genetically modified microorganism. [im Druck] in Biotechnol. Bioeng.

Tagungsbeiträge:

R. Müller, W. Lietz, V. Hecht und W.-D. Deckwer: Untersuchungen zum Abbau von chlor- und methylsubstituierten Benzoesäuren im Laborreaktor in batch- und in kontinuierlicher Kultur. Jahrestagung der Biotechnologen; Nürnberg, 1993; 63.

W. Lietz, R. Müller, V. Hecht und W.-D. Deckwer: Einzel- und Simultanabbau methylierter Benzoesäuren durch *Pseudomonas spec.* B13-FR1(pFRC20P). Jahrestagung der Biotechnologen; Nürnberg, 1993; 104.

R. Müller; V. Hecht; W.-D. Deckwer: Simultanabbau chlorierter und methylierter Benzoesäuren: Untersuchungen zur Bewertung der Leistungsfähigkeit gentechnisch optimierter Mikroorganismen für eine Anwendung in dezentralen Abwasserbehandlungsanlagen. Jahrestagung der Biotechnologen; Wiesbaden, 1995; Band II; 197.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1
1. Freisetzung von Xenobiotika: Auswirkungen auf die Mikrobiologie 1
2. Konsequenzen der Xenobiotikafreisetzungen für Abwasserbehandlungsanlagen . 2
3. Stammentwicklung Xenobiotika-transformierender Mikroorganismen 4
4. Benzoesäuren als Modellsubstanzen für den Abbau aromatischer Komponenten . 6
5. Ziele der Arbeit 7

II. Literaturübersicht 8
1. Abbau von substituierten Benzoesäuren 8
1.1. Reduktive Dehalogenierung 8
1.2. Hydrolytische Dehalogenierung 9
1.3. Oxidative Dehalogenierung 9

2. Abbau von Benzoesäuren: Ortho- und meta-Spaltung intermediärer halogenierter Brenzkatechine 10
3. Abbausequenzen von *Pseudomonas spec.* B13 und *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P) 11
4. Ortho- und meta-Spaltungsaktivität von Mikroorganismen: Bedeutung für die Umweltverfahrenstechnik 15
5. Stammoptimierung 19
6. Enzymausstattung von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P) 21

III. Material und Methoden 23
1. Stammherkunft 23
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen 24
2.1. Pseudomonas M9-Mineralmedium: 24
2.2. Selektivmedium für Schüttelkolbenversuche und Stammhaltung 25
2.3. Selektives Fermentationsmedium 27

3. Stammkultivierung 29
4. Test auf genetische Stabilität von SN45P 29
5. Aufzucht einer Batchkultur 30
6. Fermentersysteme und Betriebsweise 31
6.1. Bioreaktoren 31
6.2. Versuchsaufbau der Fermenter 32
6.3. Durchführung der diskontinuierlichen Satzversuche (adjusted batch) 34

7. Analytische Verfahren 34
7.1. Bestimmung der Biotrockenmasse 34
7.2. Bestimmung der optischen Dichte 35
7.3. Ammoniumbestimmung 35
7.4. Chloridbestimmung 36
7.5. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen 36
7.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 37
7.7. Nachweis von Intermediaten in kontinuierlicher Kulturführung 38

8. Berechnung der OTR- und CTR-Rate aus abgasanalytischen Messungen 39
9. Berechnungen zur instationären Versuchsführung 41
9.1. Satzversuche 41
9.2. Auswaschexperimente 42

10. Berechnungen zur stationären Versuchsführung 42
11. Beschreibung der Massenbilanzen 44
11.1. Beschreibung der Massenbilanzen unter stationären Versuchsbedingungen...44
11.2. Beschreibung der Massenbilanzen unter instationären Versuchsbedingungen 45

12. Chemostattheorie 46
13. Hemmung der Substratverwertung 47

14. Computeranpassung/Computersimulation: 50

IV. Ergebnisse und Diskussion 51

1. Charakterisierung des Abbaupotentials von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P) 51

1.1. Transformation verschieden substituierter Benzoesäuren im Schüttelkolbenexperiment 51

1.2. Simultanabbau eines 3CB/4MB Gemisches im Rührkesselreaktor im repeated batch-Versuch 55

2. Adjusted batch Versuche 59

2.1. Satzversuche im Rührkesselreaktor 59

2.2. Übersicht über die durchgeführten adjusted batch Versuche 60

2.3. Darstellung typischer Reaktionsverläufe anhand des Vergleichs und der Bilanzierung der Satzversuche mit großen Substratausgangskonzentrationen 66

2.4. Einfluss der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit; Dynamik der Substratverwertung im Satzversuch 73

2.4.1. Einfluß der 3CB auf die Reaktionsgeschwindigkeit 74

2.4.2. Einfluß der 4CB auf die Reaktionsgeschwindigkeit 75

2.4.3. Einfluß der 4MB auf die Reaktionsgeschwindigkeit 76

3. Kontinuierliche Kultivierung 78

3.1. Langzeituntersuchungen zur genetischen Stabilität der Abbausequenzen . . 78

3.2. Bilanzierung der Verwertung von 3CB, 4CB und 4MB 80

3.3. Reaktionsgleichungen für die Substrate 3CB, 4CB und 4MB 83

3.4. Spezifische Raten und Erhaltungsstoffwechsel 87

3.5. Simultanabbau eines Gemisches aus 3CB, 4CB und 4MB in kontinuierlicher Kultivierung 91

3.5.1. Ergebnisse im Chemostatversuch 91

3.5.2. Massenbilanzen 95

4. Auswaschversuche: Bestimmung kinetischer Parameter 98
4.1. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB 99
4.2. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 4CB 103
4.3. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 4MB 106

5. Dynamische Versuche zur Charakterisierung des Simultanabbaus von 3CB/4CB/4MB-Gemischen durch SN45P im adjusted batch Versuch und im Auswaschversuch 110
5.1. Simultanabbau von Gemischen aus 3CB, 4CB und 4MB in diskontinuierlicher Kulturführung 110
5.2. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf dem Substratgemisch 118
5.3. Diskussion der Entkopplungsphänomene 120

6. Abbau der 3CB: Stammvergleich von SN45P mit dem Parentalstamm Pseudomonas spec B13 123
6.1. Stammvergleich bei kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB 123
6.2. Stammvergleich unter diskontinuierlichen Versuchsbedingungen 129

V. Zusammenfassung 136

VI. Literaturhinweise 140

VII. Anhang 147

Abkürzungen und Indizes

Abkürzungen

2-Methyl-2-en-Lakton	4-Carboxymethyl-2-Methyl-but-2-en-1,4-olid
3-Methyl-3-en-Lakton	4-Carboxymethyl-3-Methyl-but-2-en-1,4-olid
4-Methyl-2-en-Lakton	4-Carboxymethyl-4-Methylbut-2-en-1,4-olid
av	Mittelwert (avarage value)
B-Mix	äquimolares Benzoesäuregemisch aus 3CB, 4CB und 4MB
B13	*Pseudomonas spec.* B13
bsw.	beispielsweise
BTM	Biotrockenmasse [g l^{-1}]
BTM*	Biotrockenmasse im steady-state [g l^{-1}]
C120 I	Catechol 1,2-Dioxygenase I
C120 II	Catechol 1,2-Dioxygenase II
Cat	Brenzkatechin (Catechol)
CB	Chlor-substituierte Benzoesäure
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Zuflußrate [l h^{-1}]
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GEM	genetic engineered microorganism
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Inhibitor
KM	Kanamycin
M	Molare Masse
MB	Methyl-substituierte Benzoesäure
MS	Massenspektroskopie

NMR	Nuclear Magnetic Resonance-Spectroskopy
r	Regressionskoeffizient
rec	Wiederfindung (recovery)
sdev	Standardabweichung
SN45P	*Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P)
TCC	Tri-Carbonsäure-Cyclus
UPR	Umdrehungen pro Minute (Zentrifuge)

Formelzeichen

μ	spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
μ_{max}^{*}	maximale erreichbare spezifische Wachstumsrate bei Substrathemmung [h^{-1}]
a_{ij}	Massenanteil des Elementes i in der Komponente j
BTM	Biotrockenmasse [g l^{-1}]
CPR	Kohlendioxidproduktionsrate [g l^{-1} h^{-1}]
cs	Konzentration [g l^{-1}; mmol l^{-1}]
CTR	Kohlendioxidtransferrate [g l^{-1} h^{-1}]
D	Verdünnungsrate [h^{-1}]
F	Zuflußrate [l h^{-1}]
k	Geschwindigkeitskonstante
K_I	Inhibierungskonstante [mg l^{-1}]; [mmol l^{-1}]
K_M	Halbsättigungskonstante (Menten) [mg l^{-1}]; [mmol l^{-1}]
K_S	Halbsättigungskonstante (Monod) [mg l^{-1}]; [mmol l^{-1}]
M	molare Masse [g mol^{-1}]
OTR	Sauerstoffeintragsrate [g $l^{-1}h^{-1}$]
OUR	Sauerstoffaufnahmerate [g $l^{-1}h^{-1}$]
pO_2	Partialdruck des Gelöst-Sauerstoffs [%]
q_{CO2}	spezifische Kohlendioxidbildungsrate [g $g^{-1}h^{-1}$]
q_{CO2M}	spezifische Kohlendioxidbildungsrate [g $g^{-1}h^{-1}$] bei μ=0
q_{O2}	spezifische Sauerstoffumsatzrate [g $g^{-1}h^{-1}$]

q_{O2M}	spezifische Sauerstoffumsatzrate [g $g^{-1}h^{-1}$] bei $\mu=0$
q_S	spezifische Abbaurate [g $g^{-1}h^{-1}$]; [mmol $g^{-1}h^{-1}$]
Q_S	volumetrische Substratabbaurate [g $l^{-1}h^{-1}$]; [mmol $l^{-1}h^{-1}$]
q_{SM}	Maintenance-Koeffizient [g $g^{-1}h^{-1}$]
q_{Smax}	maximal erreichbare spezifische Abbaurate
q_{Smax}^*	maximal erreichbare spezifische Abbaurate bei inhibierendem Substrat [g $g^{-1}h^{-1}$]
r	Korrelationskoeffizient
S	Substratkonzentration [g l^{-1}]; [mmol l^{-1}]
S^*	Substratkonzentration [g l^{-1}]; [mmol l^{-1}] im steady-state
S_0	Ausgangskonzentration; Benzoesäurekonzentration im einlaufenden Medium [g l^{-1}]; [mmol l^{-1}]
V_G	Volumenstrom der Luft bezogen auf Normalbedingungen [Nl h^{-1}]
V_M	Molvolumen [l/mol]
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_R	Reaktorvolumen [l]
X	Biotrockenmasse [g l^{-1}]
x_i	Molenbruch der Komponente i
Y_{ai}^*	Koeffizient; Maintenance-korrigiert
$Y_{CO2/S}$	substratbezogener CO_2-Ertragskoeffizient [g g^{-1}]
$Y_{X/S}$	substratbezogener Biomasseertragskoeffizient [g g^{-1}]
$Y_{X/CO2}$	CO_2-bezogener Biomassekoeffizient [g g^{-1}]
$Y_{X/O}$	sauerstoffbezogener Ertragskoeffizient [g g^{-1}]

Indices

A	Reaktorausgang
C	Element Kohlenstoff
Cl	Element Chlor
CO_2	Komponente Kohlendioxid
E	Reaktoreingang
H	Element Wasserstoff

i	Komponente i
j	Komponente j
N	Element Stickstoff
NaCl	Komponente NaCl
$[NH_3]$	Komponente NH_3
O	Element Sauerstoff
S	Komponente Substrat (substituierte Benzoesäure)
t	zur Zeit t [h]
t=0	zur Zeit t=0 [h]
X	Komponente Biotrockenmasse

I. Einleitung

1. Freisetzung von Xenobiotika: Auswirkungen auf die Mikrobiologie

Die Folgen einer unzureichend durchgeführten Abfallstoffbehandlung und fehlende Strategien zur Vermeidung und Reduzierung umweltbelastender Chemikalien sind in den letzten Jahrzehnten in aller Welt spürbar geworden. Vor allem die halogenierten Kohlenwasserstoffe sind aufgrund ihres großen Gefährdungspotentiales ins öffentliche Interesse gerückt.

Viele der in den Ökosystemen vorkommenden Schadstoffe weisen eine strukturelle Verwandtschaft zu Naturstoffen auf und können durch Mikroorganismen mineralisiert werden. Daneben existieren Stoffe, die sogenannten Xenobiotika, die neue oder seltene Strukturelemente oder Substituenten besitzen. Dieses macht sie einer schnellen mikrobiologischen Verwertung gegenüber persistent und es erfolgt eine Schadstoffakkumulation in der Umwelt (Timmis et al., 1988). Die Ursache für die relative Unwirksamkeit der katalytischen Aktivität der Mikroorganismen bzw. der Initialenzyme der katabolen Abbausequenzen liegt meist in folgenden Faktoren begründet:

1. Die Konzentration der Xenobiotika ist in den Ökosystemen so niedrig, daß sich ein Abbau dieser Substanzen, d.h. eine Entwicklung neuer Abbauwege (Synthese entsprechender Enzyme) und gleichzeitige Nutzung der Xenobiotika/Intermediate als Kohlenstoff- und Energiequelle, für die Mikroorganismen aus energetischen Gründen nicht rentiert (Knackmuss, 1983).

2. Der Grund für die biologische Persistenz vor allem chlorierter Verbindungen ist auch in der physikochemischen Natur der Halogen-Arenbindung zu suchen. Der Abbau von Aromaten wird unter aeroben Bedingungen oft durch eine Dioxygenierungsreaktion des Aromatenkerns eingeleitet. Für die Initial-Dioxygenierung aromatischer Kohlenwasser-

stoffe wird ein elektrophiler Reaktionsmechanismus angenommen (Gibson, 1968; Dagley, 1975). Halogensubstituenten, die die Elektronendichte in bestimmten Bereichen des Benzolkernes mindern, erschweren somit den enzymatischen Angriff am Aromatenkern (Reinecke und Knackmuss, 1978).

3. Ein weiterer Grund für die Akkumulation/Persistenz von Xenobiotika ist in konzentrationsabhängigen Umsatzraten (Inhibierung) zu finden. Hohe Abbauraten treten oft nur in einem kleinen Konzentrationsbereich auf (Mikroenvironment-Einfluß).

4. Aufgrund der in den Punkten 1 und 2 aufgeführten Faktoren wird die Persistenz der Xenobiotika in der Umwelt im wesentlichen durch abiotische Prozesse und durch cometabolische Aktivitäten der Mikroorganismen beeinflußt. Dabei ist beim Cometabolismus der Fremdstoffumsatz um so effektiver, je mehr eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen Fremdstoff und natürlichem Substrat besteht (Knackmuss, 1983). Durch die in den Mikroorganismen vorhandenen Enzyme des Naturstoffabbaus werden Fremdstoffmoleküle zufällig, ohne Gewinn von Energie oder Synthesebausteinen, umgesetzt. Ungünstig kann sich hierbei neben oft sehr langsam ablaufenden Xenobiotikaumsatzraten die Bildung von dead-end Metaboliten auswirken.

2. Konsequenzen der Xenobiotikafreisetzungen für Abwasserbehandlungsanlagen

Die oben geschilderten Faktoren gelten auch für die industrielle Abwasserreinigung. Gelangen xenobiotikahaltige Abwässer in die Sammelleitungen zentraler, kommunaler Abwasserbehandlungsanlagen, werden die Xenobiotika stark verdünnt. Diese Substanzen passieren normalerweise nur unvollständig oder gar nicht abgebaut die Belebungsbecken, da Mikroorganismen mit speziellen Abbaupotentialen fehlen.

Werden industrielle Kläranlagen oder kommunale Kläranlagen durch Einleiten von Halogenaromaten hoch belastet, so findet aufgrund fehlender Spezialisten oftmals ein

nur unvollständiger Abbau, z.B. durch Cometabolismus statt. Optisch gibt sich dieser durch Bildung schwarzer, schwer sedimentierender Intermediate zu erkennen. Diese Intermediate können zudem schon existierende Biozönosen destabilisieren.

Bei der Konzeption moderner Kläranlagen müssen notwendige Verfahrensumstellungen zur Vermeidung von Abwässern, geeignete Vorortmaßnahmen zur gezielten Behandlung anfallender Abwässer sowie die Leistung der zentralen Kläranlage in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander stehen. Durch Verfahrensumstellungen kann der Anfall spezifischer Stoffe wie Schwermetalle, halogenierte organische Verbindungen usw. vermindert werden, wodurch die zentrale Abwasserbehandlungsanlage entlastet wird (Strotmann et al., 1992). Durch dezentrale Reinigung müssen standortspezifische xenobiotikahaltige Abwässer vor dem Durchmischen mit dem Gesamtabwasser behandelt werden, um Xenobiotika von der zentralen Kläranlage fernzuhalten. Verfahrenstechnisch ist dieses möglich, da hier, am Produktionsort, die Zusammensetzung und Konzentration der Abwässer noch überschaubar ist. In den Belebungsbecken der zentralen Abwasserbehandlungsanlagen etablieren sich Belebtschlammflocken (Mischkulturen), deren biologische Zusammensetzung von der qualitativen und quantitativen Nährstoffzusammensetzung des Kläranlagenzulaufes abhängt. Die Biomasse eliminiert organisch verwertbare Stoffe ohne die Nachteile der physikochemischen Reinigung von Abwässern, welche normalerweise stoffspezifisch wirksam ist.

Es existieren für jede biologische Abwasserbehandlungsanlage jedoch Leistungsgrenzen, die erkannt und umgangen werden müssen. Destabilisierende Effekte für die Biozönosen, wie sie bei Einleitung von Xenobiotika durch die Bildung von dead-end oder suicide-Metaboliten oder Schwermetallen auftreten, müssen vermieden werden, soll Abwasser wirtschaftlich gereinigt werden. Derartige Abwässer müssen von den zentralen, kommunalen Abwasserströmen ferngehalten werden.

Das Fernhalten der Xenobiotika von der zentralen Abwasserreinigungsanlage kann durch dezentrale Abwasserbehandlung realisiert werden. Folgende Anforderungen müssen aus verfahrenstechnischer Sicht an derartigen Anlagen gestellt werden:

- hohe Effizienz
- kleines Arbeitsvolumen
- vollständiger Xenobiotikaabbau

Für derartige Abbauleistungen sind Abbauspezialisten von Vorteil, die Xenobiotika nicht nur durch cometabole Stoffwechselaktivitäten umsetzen, sondern diese auch als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen; eine Vermehrung der Mikroorganismen auf Kosten der Schadstoffe wird angestrebt. Für derartige Aufgaben sind mikrobielle Reinkulturen von Vorteil, da hier die Biologie der katabolen Prozesse aufgrund vorangegangener Laborversuche genau bekannt ist. "End of pipe"-Anlagen werden generell nicht monoseptisch betrieben werden können. Eine monoseptische Betriebsweise ermöglicht im Labor- oder halbtechnischen Maßstab die gezielte verfahrenstechnische Auslegung von Bioreaktoren und vereinfacht durch Kenntnisse entscheidender Prozeßparameter die Übertragung in den technischen oder Pilotmaßstab. Moderne Immobilisierungstechniken erlauben zudem, hohe Zellkonzentrationen von Abbauspezialisten in biologischen Systemen ohne aufwendige mechanische Trennoperationen aufrecht zu erhalten (Ulonska et al; 1995). Eine dezentrale Abwasserreinigung mit Abbauspezialisten bietet so neben einer exakten Reaktorauslegung die Vorteile einer reproduzierbaren und steuerbaren Prozeßführung.

3. Stammentwicklung Xenobiotika-transformierender Mikroorganismen

Glücklicherweise entwickeln Mikroorganismen gegenüber den meisten der heute bekannten Xenobiotika im Verlauf eines Evolutionsprozesses Abbauaktivitäten, so daß eine Selektion von Spezialisten möglich ist (z.B. Rojo et al., 1988, Timmis et al., 1988a, Timmis et al. 1988b, Knackmuss, 1983). Dieser Evolutionsvorgang kann sich jedoch über sehr lange Zeiträume erstrecken. Die Selektion von Bakterien, die bsw. 3-Chlor-Benzoesäure (3CB) oder 1,2,4-Trichlorbenzol verwerten, nahm im Chemostat-Anreicherungsversuch Monate in Anspruch (Dorn et al., 1974; Meer et al., 1987; Schraa et al, 1986; Haigler et al., 1988). Grund hierfür ist das Auftreten notwendiger Veränderungen

auf der Basis präexistenter oder durch Mutation rekrutierbarer Abbauaktivitäten, was eine Vielzahl zufälliger genetischer Veränderungen erfordert.

Neben der Selektion unterscheidet man zwischen zwei weiteren Strategien für die Herstellung von Spezialkulturen (Knackmuss, 1983):

1. Die in vivo-Konstruktion durch konjugative Eigenschaftsübertragung.
2. In vitro-Evolution neuer Abbausequenzen durch Genklonierung.

1. Die Evolution neuer funktionsfähiger Abbauwege für Fremdstoffe läßt sich drastisch beschleunigen, wenn man geeignete Partnerstämme mit komplementären Abbausequenzen zusammenbringt. Ziel dieses Stammkontaktes ist die konjugative Übertragung extrachromosomaler Gene (Plasmide) sowie Genaustausch zwischen verschiedenen Plasmiden und Chromosomen (Knackmuss, 1983; Reineke, 1989).

2. Die in vitro-Neukombination von Genen erlaubt es, die für den Xenobiotikaabbau relevanten Gene noch gezielter als bei der in vivo-Konstruktion manipulieren zu können. Dadurch können die gewünschten Abbaueigenschaften frei von störenden Fremdgenen für den Schadstoffabbau rekrutiert werden.

Somit kann die moderne Mikrobiologie prinzipiell spezifisch adaptierte Mikroorganismen für die Mineralisierung von Xenobiotika bereitstellen. In wieweit solche Laborergebnisse als praxisrelevant einzuschätzen sind, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben werden. Erfolgreiche Untersuchungen sind mit immobilisierten Mikroorganismen-Isolaten (z.B. Ulonska et al.; 1995) oder mit genetisch manipulierten Mikroorganismen (Nüßlein, 1992, Heuer, 1994) erzielt worden. Der biologische Abbau von Xenobiotika in Bioreaktoren ist bisher reaktionstechnisch noch wenig untersucht. Detaillierte Kenntnisse wie die Aufklärung von Abbaukinetiken, Bestimmung von maximalen Abbauleistungen, Auswirkungen von Stoßbelastungen, Kenntnisse über den Erhaltungsstoffwechsel, Verhalten nach Substratwechsel und Stabilität von Abbauwegen, sind unumgänglich für eine optimale Konzeption und Betrieb eines Reaktors bzw. einer

dezentralen Abwasserreinigungsanlage. Daneben müssen auch physikochemische Parameter, Stoffaustauschparameter und die Reaktordynamik berücksichtigt werden.

4. Benzoesäuren als Modellsubstanzen für den Abbau aromatischer Komponenten

Die vorliegende Dissertation stellt die Ergebnisse aus Abbauversuchen von verschieden substituierten Benzoesäuren in Labor-Rührkesselreaktoren vor. Benzoesäuren sind im Vergleich zu den Phenolverbindungen wenig toxisch und zugleich gut wasserlöslich. Gleichzeitig stellen Benzoesäuren charakteristische Metabolite von verschieden substituierten Phenolverbindungen wie z.B. Biphenyle, Toluol, Alkylphenole und Vertreter der verschiedenen, weit verbreiteten eingesetzten Herbizide, dar (Reineke und Knackmuss, 1978a). Aus diesen Gründen sind Benzoesäuren als Modellsubstanzen für schwerer zu handhabende Schadstoffe mit flüchtigen oder gesundheitsgefährdenden Eigenschaften geeignet.

Substituierte Benzoesäuren treten als Metabolite beim Abbau mehrerer Verbindungen in der Umwelt auf. So fanden Masse et al. (1984) bsw. beim Abbau von 4-Chlorbiphenyl durch *Achromobacter* neben anderen Metaboliten 4-Chlorbenzoesäure (4CB) als Hauptprodukt. Zahlreiche Arbeiten berichten von der oxidativen Verwertung von substituierten Benzoesäuren (vgl. Literaturübersicht; Kap. II). Hier wird über den Abbau von 3-Chlorbenzoesäure (3CB), 4CB, 4-Methylbenzoesäure (4MB) sowie dem Abbau von Gemischen der drei Substrate berichtet.

Als bakterielles System wurden in dieser Arbeit Bakterien der Gattung *Pseudomonas* hinsichtlich ihrer Abbaukapazitäten charakterisiert. *Pseudomonas spec.* B13, im folgenden als B13 bezeichnet, gilt als Spezialist der 3CB Verwertung; *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P), im folgenden als SN45P bezeichnet, ist ein Derivat des B13-Stammes, dessen Abbaukapazität mit gentechnischen Methoden auf die Verwertung von 4CB und 4MB erweitert wurde (vgl. Kap. II.5.).

5. Ziele der Arbeit

In Zukunft werden durch die Gentechnik oder durch screening-Verfahren mikrobielle Abbauspezialisten zur Verfügung stehen, deren Einsatzpotential für dezentrale Abwasserbehandlungsanlagen zu überprüfen ist. Die Besonderheit des in dieser Arbeit untersuchten SN45P-Stammes besteht darin, bei herabgesetzter Substratspezifität der Initialenzyme potentiell Gemische aus chlorierten und methylierten Aromaten ausschließlich über ortho-Abbausequenzen verwerten zu können. Diese Eigenschaft, die sonst mit Ausnahme von Vertretern der Gattung *Alcaligenes* nur von Mikroorganismenagglomeraten erfüllt wird, macht diesen Stamm sowie die gentechnischen Methoden der Stammoptimierung interessant für die Abwassertechnik.

Es sollte die Arbeitshypothese überprüft werden, ob durch die Lokalisierung der mit gentechnischen Methoden eingeführten Abbausequenzen im Bakterienchromosom ein leistungsfähiges und im Vergleich zu plasmid-lokalisierten Abbausequenzen stabileres biologisches System zur Verfügung steht. Dazu wurde SN45P sowohl in diskontinuierlicher wie auch in kontinuierlicher Kultur kultiviert und hinsichtlich seiner kinetischen und stammspezifischen Eigenschaften charakterisiert. Im Vordergrund standen Untersuchungen

- zur Stabilität der neuen Abbaueigenschaften,
- zum Stammverhalten im adjusted batch Versuch bei Belastungsstößen durch Applikation von Benzoesäuren unterschiedlicher Ausgangskonzentration,
- zur Vollständigkeit der Benzoesäurenverwertung durch Aufstellung von Massenbilanzen im Chemostatversuch,
- Überprüfung des Potentials zur simultanen Verwertung chlorierter und methylierter Benzoesäuren,
- Vergleich der 3CB-Verwertung durch SN45P und B13.

II. Literaturübersicht

1. Abbau von substituierten Benzoesäuren

Obwohl halogenierte Verbindungen in der Natur nur selten gebildet werden, sind viele Mikroorganismen mit Abbaukapazitäten für diese Chemikalien isoliert worden. Oftmals sind diese Mikroorganismen unfähig, auf diesen Substanzen zu wachsen; vielmehr werden Xenobiotika in cometabolen Aktivitäten neben nicht-halogenierten Verbindungen umgesetzt. Spezialisierte Bakterienkulturen sind dagegen in der Lage, auch verschieden substituierte Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen.

1.1. Reduktive Dehalogenierung

In Sedimenten aus Süßwasserseen konnte die reduktive Dehalogenierung von Chlor-, Brom- und Jodbenzoesäuren zu den entsprechenden unsubstituierten Benzoesäuren nachgewiesen werden (Horowitz et al., 1983). Aus Schlammproben konnte ein unter anaeroben Bedingungen wachsendes Bakterium isoliert werden, welches in Gegenwart unsubstituierter Benzoesäure 3CB in Benzoesäure umwandelt (Boyd und Shelton, 1984).

Bei der reduktiven Dehalogenierung wird der Halogensubstituent in chlorierten Kohlenwasserstoffen durch Wasserstoff ersetzt. Dieser Reaktionstyp wurde häufig unter anaeroben Bedingungen bei methanogenen und bei denitrifizierenden Bakterien gefunden. Die reduktive Dehalogenierung tritt sowohl bei aliphatischen als auch bei aromatischen Verbindungen auf (Müller, 1987). Es wird diskutiert, daß der halogenierte Aromat als terminaler Elektronenakzeptor fungiert (Commandeur und Parsons, 1990).

Eine reduktive Dechlorierung wurde auch für *Alcaligenes denitrificans* NTB-1Y beschrie-

ben (van den Tweel et al., 1987). 2,4 Dichlorbenzoesäure wird nach 4-Hydroxylierung an der 2-Position reduktiv dehalogeniert. Bock et al. (1991) berichten über eine 3CB-verwertende Mischkultur, welche anaerob auf Trägermaterialen kontinuierlich kultiviert wurde. In einem Festbettreaktor wurden 11,2 mmol l^{-1} d^{-1} abgebaut.

Das reduktive Abbaupotential der Mikroorganismen könnte in Zukunft auch von praktischer Relevanz sein (z.B. Problematik Rüstungsaltlasten). Im Gegensatz zum aeroben Abbau mit Sauerstoff als Oxidationsmittel ist die Bioverfügbarkeit der reduzierenden Hilfssubstrate des anaeroben Abbaus in der Regel nicht limitierend (Knackmuss, 1994). Die bessere Verfügbarkeit kann demzufolge dazu führen, daß die in-situ Stimulierung reduktiver Abbauprozesse einfacher zu bewerkstelligen ist als die Stimulierung oxidativer, aerober Abbauprozesse. Durch Kombination einer anaeroben und aeroben Prozeßführung ergeben sich hieraus neue, praxisrelevante Einsatzmöglichkeiten für die Mikrobiologie.

1.2. Hydrolytische Dehalogenierung

Hier erfolgt ein Austausch im Sinne einer nukleopohilen Substitution des Halogens durch eine Hydroxylgruppe. Das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe stammt aus dem Wasser. Die Reaktion kann sowohl unter aeroben als auch unter denitrifizierenden Bedingungen ablaufen (Commandeur und Parsons, 1990). Thiele et al. (1987) gelang der Nachweis eines Enzyms aus *Pseudomonas spec.* CBS3, das unter diesen Bedingungen 4CB in 4-Hydroxybenzoesäure umwandelt. Das die eingeführte Hydroxylgruppe aus der Spaltung eines Wassermoleküls stammt, zeigten Müller et al., (1984).

1.3. Oxidative Dehalogenierung

Bei der oxidativen Dehalogenierung geht das Halogenatom während der Oxygenierung des Aromatenringes verloren. Der Sauerstoff, der den Halogensubstituenten ersetzt,

stammt aus der Luft. Eine oxygenolytische Eliminierung des Halogensubstituenten wurde z.B. für 2-Chlorbenzoesäure, 4-Chlorphenylacetat, 2-Fluorbenzoesäure oder 3-Fluortoluol nachgewiesen (Engesser et al., 1980; Renganathan, 1989; Zaitsev, 1982).

2. Abbau von Benzoesäuren: Ortho- und meta-Spaltung intermediärer halogenierter Brenzkatechine

Halogenierte Benzoesäuren werden hauptsächlich über Dioxygenierung des Aromatenkernes zu Halobrenzkatechinen umgesetzt. In 2-Position substituierte Benzoesäuren werden über 3-Halobrenzkatechin, in 3-Position substituierte Benzoesäuren über 3- oder 4-Halobrenzkatechin und in 4-Position substituierte Benzoesäuren über 4-Halobrenzkatechinen als zentrales Intermediat umgesetzt. Die substituierten Brenzkatechine können über eine ortho- oder über eine meta-Ringspaltung katabolisiert werden.

Spaltprodukte der ortho-Ringspaltung sind halogenierte cis, cis-Mukonsäuren. Eine Vielzahl von Stämmen, meist Vertreter der Gattung *Pseudomonas*, sind hinsichtlich ihrer Abbauwege von halogenierten Benzoesäuren beschrieben worden. Eine Literaturübersicht bieten z.B. Commandeur und Parsons, (1990).

Spaltprodukte der meta-Ringspaltung der substituierten Brenzkatechine sind halogenierte 2-Hydroxymukonsäure-Semialdehyde, welche toxische Wirkung auf die Mikroorganismen haben können (Timmis, 1980).

Über Dehalogenierungen während der Initialreaktion der katabolen Abbausequenzen berichten Schreiber et. al, (1980). Sie beobachteten, daß *Pseudomonas spec.* B13 Zellen, die auf 3CB gewachsen waren, bei Verwertung von 2- und von 3-Fluor-Benzoesäuren 2-Fluor-cis,cis-Mukonsäure als dead-end Metabolit akkumulierten. Während des Cometabolismus von 2-Fluorbenzoesäure wird Fluor während der Initialreaktion (Dioxygenierung) abgespalten.

Higson und Focht (1990) berichten von Arbeiten mit *Pseudomonas aeroginosa* 2-BBZA. Dieser Stamm besitzt ein Initialenzym mit breiter Substratspezifität, welches den Stamm zum Wachstum auf unterschiedlichen aromatischen Säuren befähigt. Wachstumssubstrate sind u.a.: 2-Brom-, 2-Chlor-, 2-Jod-, 2-Fluor-, 3-Brom- und 3-Chlor-Benzoesäure. Das Initialenzym erkennt während der Dehalogenierung einen ortho-, nicht aber einen para-Substituenten; im Inialreaktionsschritt wird Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure) gebildet.

Commandeur und Parsons (1990) kommen nach einer Literaturrecherche zu dem Schluß, daß die meisten Arbeiten über hydrolytische Dehalogenierungen von in 4-Position substituierten Benzoesäuren über einen Ersatz des Halogens durch eine Hydroxylgruppe berichten. Der Abbau von in 4-Position substituierten Benzoesäuren verläuft über 4-Hydroxybenzoesäuren und Protokatechuat. Daß dabei das Wachstum auf 4CB unabhängig von der Verwertung der unsubstituierten Benzoesäure ist, konnten Keil et al., (1981) zeigen. *Pseudomonas spec.* CBS 3 verwertet 4CB über 4-Hydroxybenzoesäure und Protokatechuat. Eine CBS 3-Mutante (CBS 3-317) hat die Fähigkeit zum Wachstum auf 4CB verloren, wächst aber weiterhin auf Benzoesäure.

3. Abbausequenzen von *Pseudomonas spec.* B13 und *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P)

Pseudomonas spec. B13 zeigt keine meta-Aktivität (Reineke und Knackmuss, 1980) für die Spaltung der gebildeten Brenzkatechine. Vielmehr besitzt der Stamm zwei ortho-Abbausequenzen für die Verwertung von unsubstituierter Benzoesäure (ortho-I) und für die Verwertung von 3CB (ortho-II). Abb. 1 gibt einen Überblick über den zentralen Abbaumechanismus von Benzoesäuren durch *Pseudomonas spec.* B13.

Pseudomonas spec. B13 besitzt neben den Enzymen des 3-Oxoadipatweges weitere Isoenzyme, die für die produktive Verwertung chlorierter Intermediate verantwortlich sind. Bei der Verwertung von 3CB wurde von Reineke und Knackmuss, (1978a) nur ein

Initialenzym, die Benzoat-Dioxygenase (1), nachgewiesen. Die Umsatzraten dieses Enzyms mit substituierten Benzoesäuren wurden überwiegend beeinträchtigt von sterischen Substituenteneinflüssen. Benzoesäuren mit Substituenten in meta-Position wurden deutlich schneller umgesetzt als solche in ortho- oder para-Position. Die Inhibierungsstudien ließen eine große Stereospezifität der 1,2-Dioxygenierung mit Substituenten in 2- oder 4-Position erkennen.

Legende zu den Abbausequenzen von *Pseudomonas* spec. B13 der Abb. 1:

1 Benzoat-Dioxygenase

2 3,5-Cyclohexadien-1.2-diol-1-carbonsäure-Dehydrogenase

3 Catechol 1,2-Dioxygenase I (C120 I)

4 Catechol 1,2-Dioxygenase II (C120 II)

5 cis, cis-Mukonsäure-Cycloisomerase I

6 cis, cis-Mukonsäure-Cycloisomerase II

7 4-Carboxymethylbut-2-en-4-olid-Isomerase

8 4-Carboxymethylbut-3-en-4-olid-Hydrolase

9 4-Carboxymethylenbut-2-en-4-olid-Hydrolase

10 Maleylacetat-Reduktase

Die entstehenden 3- und 5-Chlor-1,2 dihydro-1,2-Dihydroxybenzoesäuren sowie die unsubstituierte 1,2-Dihydro-1,2-Dihydroxybenzoesäuren werden von der Dihydrodihydroxybenzoesäure-Dehydrogenasen (DHB; (2)) zu einem zentralen Metaboliten, dem 3- und 4-Chlorbrenzkatechin bzw. dem unsubstituierten Brenzkatechin dehydrogeniert (Reineke und Knackmuss, 1978b). *Pseudomonas spec.* B13 bildet beim Wachstum auf 3CB dieselbe DHB wie beim Wachstum auf unsubstituierter Benzoesäure. Die Autoren stellten im Vergleich zur unsubstituierten 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoesäure niedrigere Umsatzraten mit den substituierten Verbindungen fest.

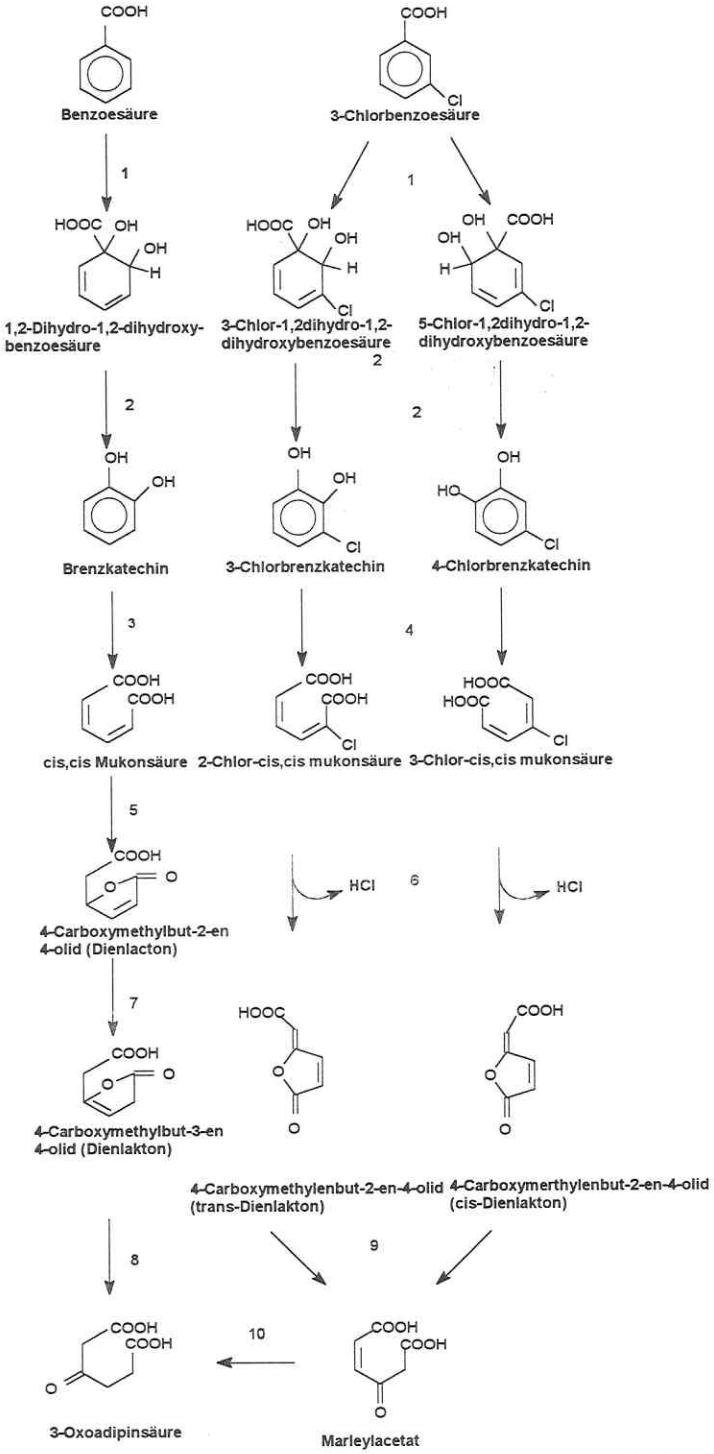


Abb. 1: Übersicht des Benzoesäurekatabolismus von *Pseudomonas* spec. B13.

Im Gegensatz zu der Benzoat-Dioxygenase und der DHB weisen die weiteren Enzyme des klassischen 3-Oxoadipatweges nur niedrige Umsatzraten mit chlorsubstituierten Metaboliten der 3CB-Verwertung auf. *Pseudomonas spec.* B13 bildet zusätzlich mehrere Isoenzyme des 3-Oxoadipatweges, welche einen produktiven Metabolismus chlorierter Brenzkatechine ermöglichen.

Die oxygenolytische Spaltung von Halobrenzkatechinen scheint eine der ausschlaggebenden Reaktionen für den Totalabbau halogen-substituierter Aromaten zu sein (Dorn und Knackmuss, 1978). Die Autoren wiesen das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Catechol 1,2-dioxygenasen in *Pseudomonas* spec. B13 nach, die sich signifikant in der Spaltungsaktivität von chlorierten Brenzkatechinen unterscheiden. So wurde neben der Catechol 1,2-Dioxygenase (3) des 3-Oxoadipatweges (C120 I) eine Catechol 1,2-Dioxygenase nachgewiesen (4), die neben Brenzkatechin auch monochlorsubstituierte Brenzkatechine sowie 3,5-Dichlorbrenzkatechin mit großen Umsatzraten umsetzt (C120 II). Ein Cometabolismus mit 3-Methylbenzoesäure, 3- und 4-Methylbrenzkatechin durch 3CB-verwertende *Pseudomonas spec.* B13-Zellen führt zur Bildung von dead-end Produkten, die meist in stöchiometrischen Mengen als Mukonolaktone ((+)-2,5-Dihydro-5-oxofuran-2-ylessigsäure) akkumulieren (Knackmuss et al., 1976). Chlor wird vor der Ringspaltung nicht abgespalten.

Analog zu der Benennung der beiden Catechol 1,2-dioxygenasen ist auch zwischen zwei Mukonsäure-Cyclosisomerasen, der cis, cis-Mukonsäure-Cyclosisomerase I und II zu unterscheiden. Die Cycloisomerase II (6) setzt im Gegensatz zur Cycloisomerase des 3-Oxoadipatweges (5) auch Chlormukonsäuren mit hoher Aktivität zu chlorsubstituierten 4-Carboxymethylbut-2-en-4-oliden (Dienlactonen) bei gleichzeitiger, spontaner Chlorabspaltung, um (Schmidt und Knackmuss, 1980). Die beiden Cycloisomerasen werden während des Wachstums auf Benzoesäure oder 3CB induziert. Beide Enzyme katalysieren denselben Reaktionstypus; die chlorierten Mukonsäuren werden in die gleichen Folgeprodukte cycloisomerisiert. Die Cycolisomerase I setzt neben der cis, cis-Mukonsäure auch 2-Methyl-cis, cis -Mukonsäure mit 90% der Umsatzrate des unsubstituierten Moleküles um. Substrate für die Cycloisomerase II sind neben der cis, cis-

Mukonsäure auch 2-Methyl-, 3-Methyl-, 2-Chlor- und 3-Chlor-cis, cis Mukonsäure.

Tab.1: Literaturdaten zur Cycloisomerase 1+2 (Schmidt und Knackmuss, 1980)

	Cycloisomerase I		**Cycloisomerase II**	
Substrat	K_M [μmol l^{-1}]	v_{max} [%]	K_M [μmol l^{-1}]	v_{max} [%]
cis, cis Mukonsäure	55,8	100,0	92,8	100
2-Methyl-cis, cis Mukonsäure	105,0	90,0	30,9	276
3-Methyl-cis, cis Mukonsäure	18,0	11,7	13,4	232
2-Chlor-cis, cis Mukonsäure	415,0	0,8	60,1	180
3-Chlor-cis, cis Mukonsäure	134,8	7,1	128,6	201

Die Reaktion der Cycloisomerase I scheint durch die Größe des Substituenten, nicht aber durch Elektronegativität beeinflußt zu werden. Die Cycloisomerase II setzt dagegen sowohl 3-Chlor- wie auch 3-Methylmukonsäure mit hohen Umsatzraten um. Die Reaktion dieses Enzyms scheint durch die herabgesetzte Substratspezifität beeinflußt zu werden.

Eine mit der 4-Carboxymethylbut-3-en-4-olid-Hydrolase des 3-Oxoadipatweges verwandte 4-Carboxymethylenbut-2-en-4-olid-Hydrolase (9) setzt 4-Carboxyxmethylenbut-2-en-4-olid zu Maleylacetat um (Pieper, 1986). Durch eine Maleylacetat-Reduktase (10) wird letzteres zu 3-Oxoadipinsäure reduziert, und somit die Konvergenz des Abbauweges für chlorsubstituierte Brenzkatechine mit dem 3-Oxoadipatweges hergestellt.

4. Ortho- und meta-Spaltungsaktivität von Mikroorganismen: Bedeutung für die Umweltverfahrenstechnik

Substituierte Phenole und Benzoesäuren besitzen ein hohes Maß an Toxizität für mikrobielle Gemeinschaften. Dennoch entwickeln Mikroorganismen Abbaukapazitäten für diese Chemikalien mit Brenzkatechinen als zentrale Intermediate. Industriemüll enthält

jedoch häufig Mischungen aus Chlor- und Methyl-substituierten Phenolen und Benzoesäuren (Timmis, 1988). Diese Mischungen werden von mikrobiellen Gemeinschaften oft nicht oder nur unvollständig verwertet. Ursache hierfür ist a) eine hohe Eigentoxizität derartiger Xenobiotika-Mischungen oder b) die Zellökonomie, die bei niedrigen Xenobiotika-Konzentrationen und/oder gleichzeitiger Verfügbarkeit anderer Kohlenstoffquellen letztere bevorzugt umsetzt.

Xenobiotika werden oft im bakteriellen Cometabolismus umgesetzt, was jedoch zur Destabilisierung von mikrobiellen Gemeinschaften (z.B. Belebtschlammflocken) führen kann. Ursache hierfür ist die Existenz von ortho- und meta-Abbausequenzen (Timmis, 1988a+b). Chlorierte und unsubstituierte Brenzkatechine werden üblicherweise über ortho-Abbausequenzen durch eine Catechol 1,2-dioxygenase gespalten, während methyl-substituierte Brenzkatechine einer meta-Spaltung durch eine Catechol 2,3-dioxygenase unterworfen werden (Burlage et al., 1989).

Bodenbakterien besitzen häufig potentiell beide Spaltungsmodi für die Brenzkatechine. Üblicherweise ist jedoch nur einer der beiden Abbauwege aktiv, je nach dem verfügbaren Substrat. Werden solche Bakterien mit Mischungen aus chlorierten und methylierten Aromaten konfrontiert, können in einem Mikroorganismus beide Abbautypen aktiviert sein (Timmis, 1988a+b), wodurch die Brenzkatechine beiden Spaltungsmodi unterworfen werden.

Während die ortho-Spaltung von Chlorbrenzkatechinen zur vollständigen Mineralisierung des Aromaten führt, werden Methylbrenzkatechine durch ortho-Spaltung zu dead-end Produkten umgewandelt.

Ebenso ist die meta-Spaltung methylsubstituierter Brenzkatechine produktiv, während die meta-Spaltung von chlorierten Brenzkatechinen zur Bildung von dead-end oder suicide Produkten führt. Diese schädigen das Ringspaltungsenzym Catechol 2,3-dioxygenase irreversibel (Bartels et al., 1984; Knackmuss, 1983; Schmidt et al. 1985).

Während diese akkumulierenden Intermediate im Ökosystem Boden durch Adaptation der Biozönosen an die neuen, potentiellen Substrate nach entsprechender - oft langer - lag-Phase verwertet werden können, ist die Konsequenz für Misch- oder Reinkulturen in der industriellen Abwasserreinigung fatal: Die Biozönosen werden destabilisiert und/oder vergiftet, was zur Auswaschung der Kulturen aus den Reaktionsbecken führt. Aus diesem Grund ist die Selektion von Spezialisten, die derartige Substratgemische z.B. in dezentralen Abwasserbehandlungsanlagen produktiv verwerten können, notwendig.

Alcaligenes eutrophus JMP 134 kann als der erste isolierte Mikroorganismus angesehen werden, der sowohl chlorsubstituierte Aromate als auch methylsubstituierte 4-Carboxymethylbut-2-2-4-olide (Methyl-2-en Lakton) über Wege der ortho-Spaltung verwerten kann (Pieper, 1986). Problematisch bei diesem Stamm ist jedoch die Tatsache, daß durch bestimmte Substrate wie z.B. Phenol, 2- und 4-Methylphenol auch eine meta-Abbausequenz induziert wird. Chlorsubstituierte Aromaten wie 4-Chlorphenol oder 4-Chlorphenoxyacetat, die produktiv nur durch ortho-Spaltung umgesetzt werden, können in die meta-Sequenzen fehlgeleitet werden.

Legende zu den Abbausequenzen von *Pseudomonas* spec. B13 FR1 (SN45P) der Abb. 2:

1 Benzoat-1,2-Dioxygenase
2 3,5-Cyclohexadien-1.2-diol-1-carbonsäure-Dehydrogenase
3 Catechol 1,2-Dioxygenase I (C120 I)
4 Catechol 1,2-Dioxygenase II (C120 II)
5 cis, cis-Mukonsäure-Cycloisomerase I
6 cis, cis-Mukonsäure-Cycloisomerase II
7 4-Carboxymethylbut-2-en-4-olid-Isomerase
8 4-Carboxymethylbut-3-en-4-olid-Hydrolase
9 4-Carboxymethylenbut-2-en-4-olid-Hydrolase
10 Maleylacetat-Reduktase
11 Toluat-1,2-Dioxygenase

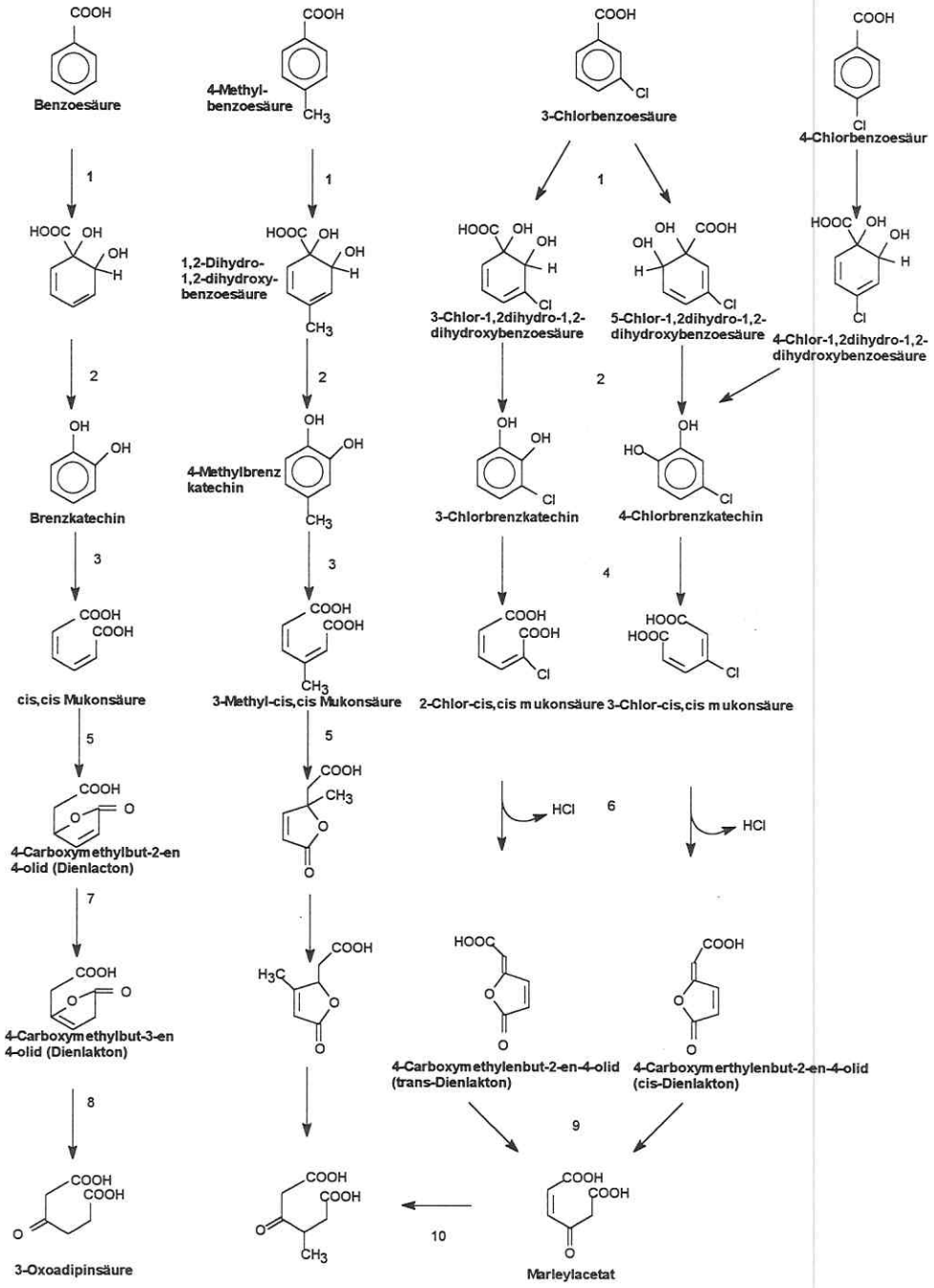


Abb. 2: Übersicht des Benzoesäurekatabolismus von *Pseudomonas* spec. B13 (SN45P).

5. Stammoptimierung

Mehrere Autoren beschreiben die Konstruktion von Spezialisten-Stämmen mit dem Ziel a) das Substratspektrum durch Rekrutierung von Isoenzymen zu erweiterten und b) der Ausschaltung von dead-end oder suicide Abbausequenzen (z.B. Knackmuss; 1983; Ramos und Timmis, 1987).

Wie oben beschrieben, besitzt *Pseudomonas spec.* B13 eine ortho-Spaltungssequenz für die Verwertung von 3CB und 4-Chlor-Phenol. Die große Substratspezifität dieses Stammes sollte durch Rekrutierung zusätzlicher Enzyme mit herabgesetzten Substrat-Effektor-Spezifitäten vermindert werden (Rojo et al., 1987). Ein Beispiel für ein solches Enzym mit geringer Substratspezifität ist die Toluat-Dioxygenase, deren Synthese von Sequenzen des TOL-Plasmides codiert wird. *Pseudomonas putida* besitzt das TOL-Plasmid pWWO. Dieser Stamm wächst auf Benzoesäure und auf mehreren Alkylbenzoesäuren wie 3MB, 4MB, 3,4-Dimethylbenzoesäure und 3-Ethylbenzoesäure (Worsey und Williams, 1975). Der TOL-Abbauweg (Abb. 2) beginnt mit der Ringdioxygenierung als Initialreaktion; anschließend erfolgt die Decarboxylierung. Reaktionsprodukte sind Alkylbrenzkatechine, welche durch meta-Spaltung und weitere Oxidationsreaktionen dem Tricarbonsäurecyclus zugeführt werden.

Die Toluat-Dioxygenase und die Dihydroxycyclohexadien-carboxylat Dehydrogenase werden durch die Cistrons xylXYZ und xylL codiert. Diese Cistrons bilden ein Operon, welches durch einen Promotor Pm durch ein xylS Regulatorprotein positiv kontrolliert wird (Mermod et al., 1984; Ramos et al., 1986).

Um ein stabiles B13-Derivat zu bekommen, in dem die Enzyme des TOL-Plasmides stabil exprimiert werden, wurden die Gene des TOL-Plasmides, des Promotors sowie die des xylS Gen in das Transposon Tn5 inseriert. Das Hybrid Transposon wurde in das B13-Chromosom transponiert (Rojo et al., 1987; Simon et al., 1983). Das entstehende B13-Derivat, *Pseudomonas spec.* B13 FR1, konnte 3CB und 4CB vollständig verwerten. Gleichzeitig wurden 3MB und 4MB zu 2-Methyl-2-Enlacton und 4-Methyl-2-Enlacton

umgesetzt. FR1 wuchs, wie schon der Elternstamm, auch auf 3-Methyl-2-en-Lakton, nicht aber auf den 2-und den 4-Methyl-2-Enlaktonen. Auf Vollmedium wird die Stabilität dieses Stammes von Rojo et al. (1987) mit mindestens 50 Generationen angegeben.

Alcaligenes eutrophus JMP134 besitzt eine meta-Abbausequenz für die Verwertung von 4MB. Intermediär wird dabei 4-Methyl-2-en-Lakton gebildet, welches durch die 4-Methyl-2-en-Lakton Isomerase (mli-Gen) in die 3-Methyl-2-en-Lakton überführt wird. Diese wird zu 4-Methyl-3-oxoadipinsäure transferriert und anschließend zu TCC-Intermediaten abgebaut (Pieper et al., 1985).

Da *Pseudomonas spec.* B13 das 3-Methyl-2-en-Lakton umsetzen kann, führte die Rekrutierung der *Alcaligenes*-Isomerase in den FR1-Stamm zur Konstruktion eines Benzoesäurespezialisten, der neben den chlorierten Benzoesäuren auch die methylierte Benzoesäure metabolisieren kann (Rojo et al., 1987). Dieser Stamm, *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (pFRC20P), besitzt neben den Eigenschaften des FR1-Stammes somit ein zusätzliches Plasmid, welches die Expression der Isomerase spezifisch reguliert.

3MB und 3-Methylphenol werden von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (pFRC20P) nur zu 2-Methyl-2-en-Laktonen cometabolisiert, welches weder von den B13-Enzymen noch von der *Alcaligenes*-Isomerase umgesetzt wird.

Das enge Substratspektrum von *Pseudomonas spec.* B13 konnte somit durch die Einführung der vom TOL-Plasmid kodierten Enzyme auf die Verwertung von 4CB erweitert werden. Diese Enzymausstattung gewährt gleichzeitig die Umsetzung von 4MB zu 4-Methylbrenzkatechin und zum 4-Methyl-2-en-Lakton. Die Akkumulation dieses Laktons, welches für den Elternstamm einen dead-end-Metaboliten darstellt, konnte durch Rekrutierung der 4-Methyl-2-en-Lakton Isomerase verhindert werden. Da das Isomerisierungsprodukt 3-Methyl-2-en-Lakton ein Substrat für den B13-Wildstamm darstellt, wurde somit eine Mineralisierung auch von methylierter Benzoesäure ausschließlich über den ortho-Weg ermöglicht.

SN45P besitzt dieselben Abbaueigenschaften wie der oben beschriebene Stamm, enthält aber neben den xylXYZLS auch das mli-Gen im Chromosom des B13-Wildstammes integriert (Negoro et al, nicht veröff.). Es stehen für beide GEMs (**g**enetic **e**ngineered **m**icroorganisms) somit zwei ortho-Abbausequenzen für die vollständige Metabolisierung von Chlor- und von Methylaromaten zur Verfügung.

6. Enzymausstattung von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P)

Die Abb. 2 zeigt die Abbausequenzen für die verschieden substituierten Benzoesäuren, der unsubstituierten Benzoesäure sowie die enzymatische Grundausstattung.

Die Benzoat-1,2-Dioxygenase (vgl. 1 in der Legende zur Abb. 2) von *Pseudomonas spec.* B13 zeigt hohe Aktivitäten für Benzoesäure und 3CB. Die Aktivität gegenüber 4CB und 4MB beträgt weniger als 1% der Aktivität für 3CB und für die unsubstituierte Benzoesäure. Durch Rekrutierung der Toluat-1,2-Dioxygenase des TOL-Plasmides (12, siehe Legende Abb. 2) wurde das Substratspektrum erweitert (Reineke und Knackmuss, 1978).

Dihydrodihydroxybenzoat Dehydrogenase: Dieses B13-Enzym (2) zeigt große Umsatzaktivität mit der Dihydrodihydroxybenzoesäure (DHB), 3-Chlor-DHB, 4-Chlor-DHB sowie 4-Methyl-DHB als Substrat (Reineke und Knackmuss, 1978). Die Autoren beobachteten eine nur geringfügige Beeinflussung der Enzymaktivität durch sterische oder durch elektronische Substituenteneffekte. Nur bei in 4-Position substituierter DHB wurden hohe K_m-Werte nachgewiesen. Durch Rekrutierung der Gene des TOL-Plasmides ist gleichzeitig die vom TOL-Plasmid kodierte Dihydroxycyclohexadiene-Carboxylate Dehydrogenase aktiv (2).

Catechol 1,2-Dioxygenase: Es sind, je nach induzierendem Substrat, die beiden B13 Dioxygenasen aktiv. Die Catechol 1,2 Dioxygenase des ortho-I Weges (3) mit 3-Chlorbrenzkatechin als Substrat zeigt ein v_{max} mit nur einem Prozent der Umsatzrate des

unsubstituierten Brenzkatechins. 4-Methylbrenzkatechin wird ebenso von diesem Enzym umgesetzt (Negoro et al., nicht veröff.).

Die Catechol 1,2-Dioxygenase des ortho-II Weges (4) transformiert Brenzkatechin, 3-Chlor-, 4-Chlor- und 4-Methylbrenzkatechin (Dorn und Knackmuss, 1978).

Die Cycloisomerase-I (5) (vgl. Tab. 1) zeigt neben dem Umsatz der unsubstituierten Mukonsäure auch Umsatzaktivität zur 3-Methyl-cis, cis-Mukonsäure (Intermediat des 4MB-Metabolismus) bei niedrigem K_m-Wert. Die Affinität dieses Enzym gegenüber der 2-Chlor-cis, cis Mukonsäure ist ausgesprochen gering, wie der hohe K_m-Wert zeigt (vgl. Tab.1).

Das Enzym Cycloisomerase-II zeigt Aktivität gegenüber der cis, cis-Mukonsäure sowie den substituierten 2-Chlor-, 3-Chlor-, 2-Methyl- und 3-Methyl-Strukturanalogen (Schmidt und Knackmuss, 1980).

Mukonolakton-Isomerase und ß-Ketoadipate Enol-Lakton Hydrolase: Die Abbauwege für Chlorbenzoesäure und unsubstituierte Benzoesäure divergieren beim Umsatz der Laktone zu den ß-Ketoadipinsäuren. Negoro et al. (nicht veröff.) vermuten, daß die Mukonolakton-Isomerase (7) und ß-Ketoadipate Enol-Lakton Hydrolase (8) des ortho-1-Abbauweges von *Pseudomonas spec.* B13 für die Verwertung der 3-Methyl-cis, cis-Mukonsäure verantwortlich sind. Der entscheidende Schritt für den Abbau der 4MB ist der Transfer der Methylgruppe von Position 4 zu Position 3 des Laktonringes. Dieser Transfer erfolgt durch enzymatischen Angriff der Mukonolakton-Isomerase.

Somit scheinen die Enzyme der ortho-I Abbausequenzen eine wichtige Rolle bei der Verwertung methylierter Benzoesäuren zu spielen, während die Enzyme des ortho-II essentiell für den 3CB und 4CB-Metabolismus zu sein scheinen (Negoro et al., nicht veröff.). SN45P kann die ortho-II Abbauenzyme für den Umsatz des Brenzkatechins zu Mukonolaktonen im Benzoesäuremetabolismus und für den Umsatz vom 4-Methyl-brenzkatechin zum 4-Methyl-2-en-Lakton im 4MB Metabolismus rekrutieren.

III. Material und Methoden

1. Stammherkunft

Pseudomonas spec. B13 wurde durch eine Chemostat-Anreicherungskultur aus Klärschlammproben des Göttinger Raumes isoliert (Dorn et al., 1974). Der Stamm ist ein gram-negatives, polar begeißeltes Stäbchen. Es bildet auf 3CB-Minimal-Agarmedium runde, glatte Kolonien von einem bis zwei mm Durchmesser. Die Autoren beobachteten gutes Wachstum u.a. auf folgenden Substraten: Glukose, Fructose, Testosteron, Succinat, Pyrovat, Fumarsäure, DL-Malat, Glutamat, Acetat, DL,-Milchsäure, Propionsäure, Zitronensäure, Pelargonat, ..., Benzoesäure, 3CB, 3-Brombenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure und 3,4 Dihydroxybenzoesäure und in geringen Konzentrationen Phenol, 4-Chlorphenol und Brenzkatechin. Kein Wachstum erfolgte u.a. auf 4CB, 4-Fluorbenzoesäure, 4MB, 3-Fluorbenzoesäure, 3-Hydroxybenzoesäure und 3-Methylbenzoesäure.

Auf die Konstruktion von SN45P wurde bereits in der Literaturübersicht eingegangen. Er ist ein B13-Derivat und verwertet Benzoesäure, 3CB, 4CB und 4MB ausschließlich über ortho-Abbausequenzen. Das erweiterte Abbaupotential dieses Spezialisten ist im Bakterienchromosom lokalisiert (Negoro et al., nicht veröff.). Neben den erweiterten Abbausequenzen besitzt der Stamm eine Resistenz für Kanamycin (Antibiotika-Marker).

Beide Stämme wurden der Abteilung Bioverfahrenstechnik von der Abteilung Mikrobiologie (beide Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig) zur Verfügung gestellt. *Pseudomonas spec.* B13 wird von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) geführt.

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1. Pseudomonas M9-Mineralmedium:

Komponente	**Schüttelkolben**	**Fermenter**
$Na_2HPO_4*2H_2O$	8,78 [g l^{-1}]	0,88 [g l^{-1}]
KH_2PO_4	3,00 [g l^{-1}]	0,30 [g l^{-1}]
NaCl	0,50 [g l^{-1}]	0,50 [g l^{-1}]
NH_4Cl	1,00 [g l^{-1}]	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	1,24 [g l^{-1}]
Benzoesäure (n)	* 1)	*2)
MgO	13,4 [mg l^{-1}]	13,4 [mg l^{-1}]
$CaCO_3$	2,50 [mg l^{-1}]	2,50 [mg l^{-1}]
$FeSO_4 * 7H_2O$	9,05 [mg l^{-1}]	9,05 [mg l^{-1}]
$ZnSO_4 * 7H_2O$	1,80 [mg l^{-1}]	1,80 [mg l^{-1}]
$MnSO_4 * 4H_2O$	1,40 [mg l^{-1}]	1,40 [mg l^{-1}]
$CuSO_4 * 5H_2O$	0,31 [mg l^{-1}]	0,31 [mg l^{-1}]
$CaSO_4 * 7H_2O$	0,35 [mg l^{-1}]	0,35 [mg l^{-1}]
$H_3BO_3 * 7H_2O$	0,08 [mg l^{-1}]	0,08 [mg l^{-1}]
HCl (conc.)	0,06 [ml l^{-1}]	0,06 [ml l^{-1}]
$MgSO_4$	0,08 [mg l^{-1}]	0,08 [mg l^{-1}]
Titriplex III (EDTA)	-	0,04 [g l^{-1}]

*1) Für die Stammhaltung wurden 5 mmol l^{-1} der Benzoesäure zugegeben (3CB und 4CB: 0,78 [g l^{-1}]; 4MB: 0,68 [g l^{-1}]. Für die Abbauversuche im Schüttelkolben wurden die Benzoesäuren in den zu testenden Konzentrationsbereichen verwendet.

*2) Die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen und Benzoesäuren sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

Das Pseudomonas M9-Mineralmedium setzt sich aus mehreren Komponenten/Stammlösungen zusammen. Bei der Herstellung der Lösungen wurde wie folgt vorgegangen:

2.2. Selektivmedium für Schüttelkolbenversuche und Stammhaltung

M9-Puffer (nach Maniatis et al., 1982):

a) Stammlösung: Die im folgenden beschriebene Stammlösung wurde in deionisiertem Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 7-7,2 bei einem Endvolumen von 1 l eingestellt und bei 4 °C maximal 4-6 Wochen gelagert.

$Na_2HPO_4*2H_2O$.....87,75 g
KH_2PO_4.....30,00 g
NaCl.....5,00 g
NH_4Cl.....10,00 g

Kohlenstoffquelle:

Es wurde jeweils eine 0,5 molare Stammlösung der verwendeten Benzoesäuren angesetzt. Dazu wurde die Lösung mit 25-35 ml 10-normaler NaOH versetzt. Für die Stammhaltung wurden Verdünnungen [5 mmol l^{-1}] der jeweils verwendeten Benzoesäuren hergestellt. Die bei den Versuchen eingesetzten Substratkonzentrationen werden im Ergebnisteil benannt. Verwendet wurden:

Benzoesäure (B)	Merck	Art. Nr. 136
2-Chlorbenzoesäure	Merck	800463
3-Chlorbenzoesäure	Merck	800473
4-Chlorbenzoesäure	Merck	800476
2-Methylbenzoesäure	Merck	821901
3-Methylbenzoesäure	Merck	821902
4-Methylbenzoesäure	Merck	821903

Pseudomonas Nährsalze:

Komponente 1 (Salzlösung; diese ist als Stammlösung vier bis sechs Wochen verwendbar) auf 1 l:

MgO	10,75 g
$CaCO_3$	2,00 g
$FeSO_4 * 7H_2O$	4,50 g
$ZnSO_4 * 7H_2O$	1,44 g
$MnSO_4 * 4H_2O$	1,12 g
$CuSO_4 * 5H_2O$	0,25 g
$CaSO_4 * 7H_2O$	0,28 g
$H_3BO_3 * 7H_2O$	0,06 g
HCl (conc.)	51,30 ml

Komponente 2: $MgSO_4$ ..... 1 mol l^{-1}

Komponente 3: $FeSO_4$ ..... 36 mmol l^{-1} (bei jedem Ansatz neu angesetzt)

Die fertige Nährsalzlösung wird zum benötigten Zeitpunkt in den folgenden Anteilen der Einzellösungen hergestellt:

50 ml Salzlösung (Komponente 1)
25 ml $MgSO_4$ 1 mol l^{-1} (Komponente 2)
25 ml $FeSO_4$ 36 mmol l^{-1} (Komponente 3)

Ein Medium mit einer Substratkonzentration von 5 mmol l^{-1} setzt sich somit wie folgt zusammen:

890 ml H_2O
100 ml M9 Puffer
2,5 ml der fertigen Nährsalzlösung *[1]
10 ml der jeweiligen Kohlenstoffquelle

*[1]: Für Festmedien wurde Agar im üblichen Konzentrationsbereich zugesetzt; die Nährsalze wurden erst nach Abkühlung des Mediums auf 35-40 °C sterilfiltriert zugegeben.

2.3. Selektives Fermentationsmedium

Das Pseudomonas Minimalmedium wurde für Versuche im Fermenter wie folgt modifiziert:

1) NH_4Cl wurde durch die für Ammonium äquimolare Menge $(NH_4)_2SO_4$ ersetzt, wodurch der Chlorgehalt des Mediums/der Fermentationsbrühe herabgesetzt wird. Dieses bewirkt durch Senkung des Chlor-Blindwertes eine exaktere Chloridbestimmung (vgl. analytische Methoden).

2) Die Pufferkomponenten Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 konnten auf 1/10 der Konzentration des M9-Puffers reduziert werden, da der Bioreaktor während der Kultivierungen auf pH 7 geregelt wurde.

3) Für Chemostatversuche wurden größere Medienvolumina benötigt. In Vorratsbehältern wurden 50 l Medium bei Standzeiten bis zu zwei Wochen bereitgestellt. Da in Vorversuchen bei kontinuierlicher Kulturführung ein Auswaschen der Teststämme aufgrund einer Oxidation des $FeSO_4$ aufgetreten war, wurde dem Medium ein Komplexbildner zugesetzt. 0,333 g $FeSO_4$ wurden dazu mit 1,9 g Titriplex III und 200 ml Wasser autoklaviert und dem Medium im 50 l Vorratsbehälter aseptisch zugesetzt.

Das Fermentationsmedium setzte sich wie folgt zusammen:

M9-Puffer modifiziert:

a) Stammlösung: Die im folgenden beschriebene Stammlösung wurde in deionisiertem Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 7-7,2 auf einem Endvolumen von 1 l eingestellt.

$Na_2HPO_4 * 2H_2O$.....8,78 g
KH_2PO_4.....3,00 g
NaCl.....5,00 g
$(NH_4)_2SO_4$.....12,34 g

Kohlenstoffquelle (C-Quelle):

Es wurde jeweils eine 0,5 molare Stammlösung der einzelnen Substrate angesetzt. Das Medium wurde für die 50 l Vorratstanks wie folgt hergestellt: (Angaben für eine Substratkonzentration von 10 mmol l^{-1}:)

44 l H_2O
5 l modifizierter M9-Puffer
0,125 l Mineralsalze *2
1 l Substratlösung

*2: Der Vorratstank wurde mit dem Wasseranteil, dem modifiziertem M9-Puffer und der Benzoesäurelösung autoklaviert. Die Mineralsalze wurden wie folgt zugesetzt:

0,333 g l^{-1} $FeSO_4$ (Anteil der Komponente 1) wurden mit 1,89 g Titriplex (EDTA) in 200 ml H_2O gelöst, in einer Animpfflasche autoklaviert und dem Vorratstank aseptisch zugegeben. Ebenso wurden 66,4 ml der Salzlösung (Komponente 1) mit 33,33 ml der einmolaren $MgSO_4$-Lösung (Komponente 2) sterilfiltriert und dem Vorratstank aseptisch zugegeben.

3. Stammkultivierung

Stammkulturen: Die Stämme wurden von der Abteilung Mikrobiologie, GBF, übernommen, wo sie als Glycerin-Stammkonserve gelagert wurden. Die Reaktivierung erfolgte üblicherweise in Pseudomonas M9-Mineralmedium oder, falls der Stamm in diesem nicht anwuchs, zunächst auf LB-Vollmedium (Maniatis et al., 1982).

Vollmedium LB.:

Pepton, tryptisch verdaut	10,0 [g l^{-1}]
Hefeextrakt	10,0 [g l^{-1}]
NaCl	5,0 [g l^{-1}]

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend erfolgte in beiden Fällen Überimpfung auf Agarplatten mit Pseudomonas M9-Mineralmedium.

Nach Übernahme der Stämme wurde die Funktionalität der Abbausequenzen durch Ausstrich auf Kanamycin-LB-Vollmedium (50 mg Kanamycin l^{-1} im LB-Vollmedium) bzw. auf 3CB, 4CB oder 4MB-Mineralmedium überprüft. Anschließend wurde der getestete Stamm in Schrägröhrchenkultur bei 4°C gelagert. Zur Aufrechterhaltung eines Selektionsdruckes auf die neuen Xenobiotika-Abbaueigenschaften von SN45P wechselte die Kohlenstoffquelle in den Schrägröhrchen alternierend von 3CB auf 4MB und 4CB. Die Stämme in den Schrägröhrchen wurden alle drei bis vier Wochen überimpft, maximal 6 mal (vgl. genetische Stabilität der Stammkulturen).

4. Test auf genetische Stabilität von SN45P

Zur Gewährleistung der Funktionalität der Abbausequenzen wurde ein Test auf genetische Stabilität der GEMs unter den Bedingungen der Stammhaltung durchgeführt. Dazu wurde die mit den neuen Abbaueigenschaften erworbene Kanamycin-Resistenz als Marker benutzt. Im Gegensatz zu der üblichen Stammkulturführung (alternierender -

Wechsel der Kohlenstoffquelle) wurden zwei SN45P-Schrägröhrchenkulturen in einem Zeitraum von 30 Wochen sechs mal ausschließlich auf 3CB-Pseudomonas-Minimalmedium in Schrägröhrchenkultur überimpft. Nach dieser Zeit wurde ein Schüttelkolben mit LB-Vollmedium mit diesen Kulturen beimpft. Nach dem Anwachsen der Kulturen wurde in fallender Reihe auf Festmedien unterschiedlicher Zusammensetzung (vgl. Tab. 2+3) ausgespatelt.

Tabelle 2: Ermittelte Koloniezahlen auf Agarplatten mit der Kultur 1

Verd.-Stufe	LB	$LB_{(KM)}$	3CB	4CB	4MB
10^{-3}	1135	1207	1386	1420	1562
10^{-4}	197	139	175	144	99
10^{-5}	5	9	6	9	17

Tabelle 3: Ermittelte Koloniezahlen auf Agarplatten mit der Kultur 2

Verd. Stufe	LB	$LB_{(KM)}$	3CB	4CB	4MB
10^{-3}	1282	1071	1350	1360	1250
10^{-4}	269	226	269	268	300
10^{-5}	27	21	30	22	32

Die beiden Tabellen zeigen, daß in den beiden getesteten Kulturen die genetischen Informationen für die Abbausequenzen von 3CB, 4CB und 4MB auch nach 5- bzw. 6-maligem Überimpfen weiterhin aktiv sind. Die ermittelten Koloniezahlen zeigen zwar eine methodisch bedingte breite Streuung, sind aber tendenziell eindeutig. Eine Stammhaltung mit alternierender Kultivierung auf 3CB, 4CB und 4MB konnte in Schrägröhrchenkultur somit in den beschriebenen Zeiträumen ohne die Gefahr des Verlustes der neuen Abbausequenzen durchgeführt werden.

5. Aufzucht einer Batchkultur

Eine Schrägröhrchenkultur wurde auf einer Agarplatte mit der Kohlenstoffquelle, die auch im eigentlichen Versuch angeboten wurde, ausgestrichen und ein bis zwei Tage bei

30 °C kultiviert. Mit dieser Vorkultur 1 wurden 30 ml Pseudomonas M9-Mineralmedium mit derselben Kohlenstoffquelle [5 mmol l^{-1}] beimpft. Diese Vorkultur 2 wurde ungefähr 24 Stunden bei 30 °C auf einem Schüttler bei mittlerer Umdrehungsgeschwindigkeit inkubiert. Die Vorkultur 2 dient als Inokulum für 250 ml eines Pseudomonas Minimalmediums der gleichen Kohlenstoffquelle [5 mmol l^{-1}]. Diese Vorkultur 3 wurde 12-15 Stunden bei 30 °C inkubiert. Diese Kultur wurde aseptisch in eine Animpfflasche gegeben und diente als Inokulum für 2250 ml des Fermentationsmediums gleicher Kohlenstoffquelle und Konzentration. Die weitere Prozedur richtete sich nach Art der Kultivierung:

Bei **Satz-Versuchen** wurde erneut das gleiche Substrat in gleicher Konzentration (5 mmol l^{-1}) zugegeben (Vorkultur 4). Nach 10 bis 15 Stunden wurde mit dem eigentlichen Satzversuch begonnen **(repeated batch)**.

Bei diskontinuierlichen Satzversuchen **(adjusted batch)** und bei **kontinuierlicher** Kulturführung wurde mit gleicher Methodik gearbeitet. Allerdings wurde nach Einsetzen der exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen mit einer Verdünnungsrate von 0,1 h^{-1} auf die jeweiligen Substrate umgeschalten.

6. Fermentersysteme und Betriebsweisen

6.1. Bioreaktoren

Es fanden zwei Bioreaktoren Verwendung. Die kontinuierlichen Experimente sowie die diskontinuierlichen Satzversuche wurden mit einem 3,5 l Rührkesselreaktor der Firma Chemap (FZ-3000) mit einem Arbeitsvolumen von 2,5-2,8 l durchgeführt. Die Temperatur wurde auf 30°C und der pH-Wert auf 7,0 geregelt. Die Rührerdrehzahl wurde, wenn nicht anders angegeben, auf 300 U min^{-1} und die Begasungsrate auf 121 Nl h^{-1} eingestellt. Der pO_2, der Laugenverbrauch und das Reaktorgewicht wurden routinemäßig erfaßt. Der Reaktorkessel, Zuluft- und Abluftleitungen, Zu- und Abluftfilter, das Reaktor-

probenahmeventil, die doppelte Gleitringdichtung sowie das zugehörige Vorratsgefäß der Gleitringdichtung waren in-situ dampfsterilisierbar. Die repeated batch Versuche wurden in 4,5 l Rührkesselreaktoren der Firma Setric Genie Industrie S.G.I., Frankreich (Modell 30/set 004 V) bei einem Arbeitsvolumen von 3 l bei gleichen Regelgrößen durchgeführt.

6.2. Versuchsaufbau der Fermenter

Der pH-Wert wurde über 1N KOH/H_2SO_4-Dosierung geregelt. Im Gleichgewichtszustand konnte bei Kultivierung auf 3CB oder 4CB oder auf einem Substratgemisch aus 3CB/4CB/4MB ausschließlich 1N KOH zum Gegentitrieren verwendet werden. Da der KOH-Verbrauch proportional zur Transformation der chlorierten Benzoesäuren verläuft, konnte dieser als Schnellkontrolle der Stammfitness genutzt werden.

Bei pO_2-Werten unterhalb 20 % der maximalen Sauerstoffsättigung des unbeimpften Mediums wurde die Rührerdrehzahl manuell erhöht, um Sauerstofflimitierungen zu vermeiden. Für die kontinuierliche Betriebsweise wurde dem Reaktor aus einem 60 l - Vorratsgefäß steriles Medium zugeführt. Das Vorratsgefäß wurde auf einer Waage plaziert, wodurch sich die Verdünnungsraten genau berechnen ließen. Um eine Kontaminationsgefahr zu minimieren, wurde über ein zweites 60 l-Gefäß das erste Gefäß bei Bedarf nachgefüllt. Dazu wurde es über ein Sterilfilter mit Druck beaufschlagt und das frische Medium über eine Sterilverbindung dem Vorratsgefäß zugeführt.

Der Fermentationsabfall wurde in einem 60 l-Stapeltank zwischengelagert. Nach Füllung dieses Tanks wurde auch dieses Gefäß mit Druck beaufschlagt und der Inhalt über eine Entsorgungsleitung nach Alkalisierung thermisch inaktiviert.

Die Fermenterabluft wurde nach dem Durchströmen der Vor- und Sterilfilter der Abluftanalytik zugeführt. Um die Emission von potentiell gesundheitsschädlichen Gasen zu vermeiden, wurde der Abluftanalyse ein Aktivkohlefilter nachgeschaltet.

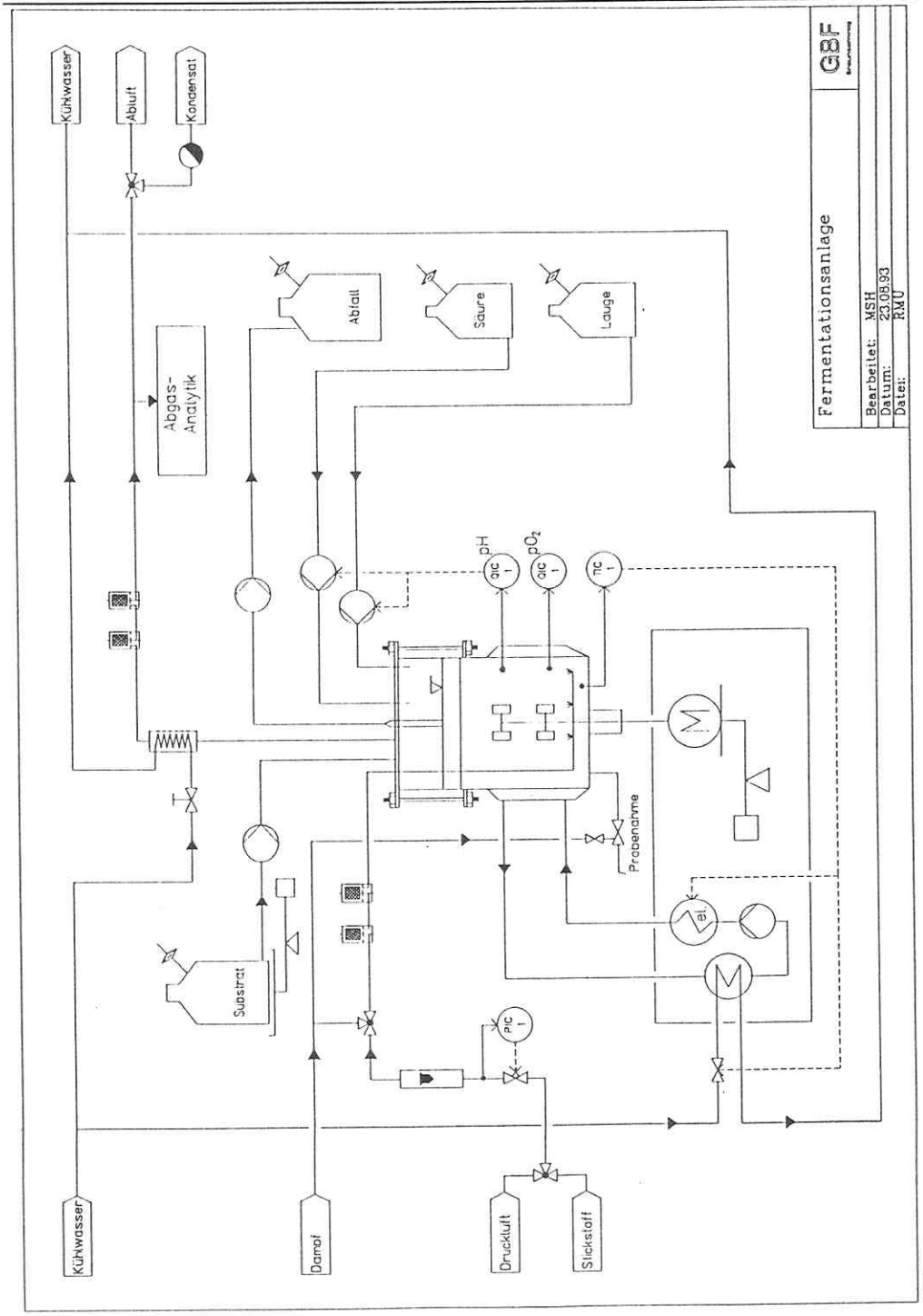


Abb. 3: Versuchsaufbau

6.3. Durchführung der diskontinuierlichen Satzversuche (adjusted batch)

Um eine bessere Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse und eine gleichbleibende Stammfitness zu gewährleisten, wurden die Satzversuche aus einer Chemostatkultivierung heraus nach Beendigung der kontinuierlichen Substratzufuhr durchgeführt. Vor einem Satzversuch wurde die Substratzudosierung gestoppt und nach Erreichen von definierten Abluftwerten (O_2: 20,94%; CO_2: 0,05%) die jeweiligen Substrate im jeweiligen Konzentrationsbereich durch ein Septum oder mit Hilfe einer Animpfflasche appliziert. Dadurch wurden gleiche Startbedingungen ebenso gewährleistet wie eine gleichbleibende Adaptation der Teststämme an die jeweiligen Substrate.

In den 60 l Vorratsgefäßen wurde ein in der Summe 5 mmol l^{-1} äquimolares Gemisch aus 3CB, 4CB und 4MB vorgelegt. Dadurch wurde die Induktion aller für die Verwertung der unterschiedlich substituierten Benzoesäuren notwendigen Enzyme durch gleiche Versuchsstartbedingungen sichergestellt. Genetische Defekte, wie der Verlust kataboler Enzyme, würden durch Akkumulation der korrespondierenden Metabolite infolge eines Fehlleitens der Intermediate analytisch nachweisbar. Nach Beendigung der Satzversuche wurde durch Einschalten der Substratddosierpumpen wieder auf kontinuierliche Kultivierung umgeschalten. Vor Beginn des nächsten Satzversuches wurde die Kultur für mindestens zwei Verweilzeiten kontinuierlich kultiviert.

7. Analytische Verfahren

7.1. Bestimmung der Biotrockenmasse

Als Maß für die Zelldichte wurde bei jeder Kultivierung das Trockengewicht bestimmt. 10 ml Bakteriensuspension wurden in Stahlzentrifugenbechern mit 19000 x g für 15 min zentrifugiert. Verwendet wurde eine Zentrifuge der Firma Heraeus Sepatech (Biofuge 17 S/RS). Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der gesamte Überstand durch ein 0,2 μm Filter (Rezist 30/0,2 μm, Schleicher & Schüll; Ref. Nr. 463503) filtriert, um möglicher-

weise noch vorhandene Mikroorganismen zurückzuhalten (Sterilschranke) und um die flüssig-chromatographische Säule vor Verunreinigungen zu schützen. Durch Filtration des gesamten Volumens können Sorptionseffekte durch das Filtermaterial vernachlässigt werden. Das im Zentrifugenröhrchen zurückbleibende Pellet wurde nach dem Abdekantieren durch ein genau dreiminütiges Abtropfen auf Zellstoff von Medienresten gereinigt und anschließend im Vakuumtrockenschrank bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz 2 Tage getrocknet. Vor dem Auswiegen erfolgte ein Temperaturausgleich im Exsikkator über Trockengel (40 Minuten).

7.2. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen wurde als Hilfsmittel zur Glättung der Biomassedaten verwendet. Dazu wurden die Werte der optischen Dichte mit der Biotrockenmasse korrelliert (Anhang Abb. 54 +55). Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Proben wurden 1:10 verdünnt. Die Untersuchungen wurden mit einem Photometer der Firma LKB Biochrom Ltd. (Ultraspec II) mit Halbmikroküvetten der Firma Greiner (Art. Nr. 613101) durchgeführt.

7.3. Ammoniumbestimmung

Die Bestimmung des Ammoniums erfolgte potentiometrisch mit einer Ammoniakelektrode der Firma Orion (Modell 95-12; Cambridge USA). Als Kalibrierlösungen wurden $(NH_4)_2SO_4$-Lösungen im Konzentrationsbereich 0,0001 bis 0,1 mol l^{-1} verwendet. 9 ml deionisiertes Wasser wurden mit 100 μl 10 N NaOH-Lösung versetzt. Nach einer Äquilibrierungszeit (positiver Meßwert) wurden 100 μl Probe zudosiert (Eppendorfpipette). Alle Proben und verwendeten Lösungen hatten Raumtemperatur. Da die Elektrode während der Messung eine gerätebedingte Drift des Millivolt-Signales aufwies, erfolgte nach 4 Proben eine erneute Vermessung der Standardlösungen.

7.4. Chloridbestimmung

Chlorid wurde potentiometrisch mit einer Chloridelektrode der Firma Orion (Modell 96-17) bestimmt. Als Eichlösungen wurden NaCl-Lösungen im Konzentrationsbereich 0,3 bis 3 g l^{-1} verwendet. In 9 ml deionisiertem Wasser wurden 200 μl ISA-Lösung (5 mol l^{-1} $NaNO_3$) und nach einer Äquilibrierungszeit 1 ml der Probe zugegeben. Alle Proben und verwendeten Lösungen hatten Raumtemperatur. Nach sechs Messungen wurde die Elektrodendrift durch erneute Messung der Referenzproben korrigiert.

7.5. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Für den Nachweis von Intermediaten des Benzoesäurekatabolismus wurde mit Laufmitteln folgender Zusammensetzung gearbeitet:

Laufmittelgemisch 1:	50 % (v/v) Toluol
	40 % (v/v) Essigester
	10 % (v/v) Essigsäure
Laufmittelgemisch 2:	50 % (v/v) Diisopropylether
	40 % (v/v) Chloroform
	10 % (v/v) Essigsäure
Laufmittelgemisch 3:	70 % (v/v) Toluol
	20 % (v/v) Methanol
	5 % (v/v) Aceton
	5 % (v/v) Essigsäure

Für den Nachweis von Intermediaten für die Chlorbilanzierung der Satzversuche sowie für den Nachweis des 3-Methyl-Enlakton wurden 8 ml des Zentrifugationsüberstandes im Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in 1,5 ml Methanol aufgenommen.

7.6. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die qualitatative und quantitative Analyse von Substanzen und Substanzgemischen erfolgte durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Es wurde mit "reverse phase" Chromatographie gearbeitet; das Lösungsmittel ist polarer als die stationäre Phase.

Chromatographiebedingungen zum Nachweis der Einzelsubstanzen:

Säule:	RP18; Ultrasphere XL ODS, 3 μm
	4,6 * 70 mm (Beckmann, Art. Nr. 237500)
Mobile Phase:	55% [v/v] Methanol (HPLC-grade)
	45% [v/v] Reinstwasser; (Additive: 1 % H_3PO4],
	0,05% [v/v] NaN_3); Fließrate: 1,5 ml/min

Chromatographiebedingungen zur Trennung von Benzoesäuregemischen:

Säule:	Wie oben, jedoch zwei RP18 Säulen hintereinander geschalten.
Mobile Phase:	50% [v/v] Methanol / 50% [v/v] Reinstwasser mit den gleichen Additiven; Flußrate: 1 ml/min

HPLC-Systeme:

Aus technischen Gründen wurde mit HPLC-Anlagen mehrerer Hersteller gearbeitet.

Tab. 4: Verwendete HPLC-Systeme

HPLC-System	Detektor	Wellenlänge	Probengeber	Auswertung
Spectra-Physics	LC 871 UV-VIS	236 nm	Perkin Elmer ISS-100	SP 4270
Gilson	115	236 nm		Data Master 621 mit HPLC-System Controller Software (714)
Gilson	117	236/270 nm		

7.7. Nachweis von Intermediaten in kontinuierlicher Kulturführung

Während des Chemostatversuches mit 4MB als alleiniger C-Quelle wurden bei einer Verdünnungsrate von 0,4 h^{-1} 4 l Fermentationsbrühe aufgefangen und abzentrifugiert. Der farblose Überstand wurde vor Aufhebung der Sterilschranke mit einer Laborfiltrationseinheit (FILTRON) mit 0,2 μm-Filtermodulen sterilfiltriert. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer anschließend bei 40° C eingeengt. Das erhaltene Kristallgemisch (3,75 g l^{-1}) wurde in Ethanol gelöst (Ultraschallbad). Die im Ethanol gelösten Stoffanteile (1,5 g) wurden nach erneuter Einengung im Rotationsverdampfer in Essigester aufgenommen und wiederum im Ultraschallbad behandelt. Der Essigester wurde im Spitzkolben eingeengt; im Kolben verblieben 0,382 g eines gelben, sirupösen Öls mit darin enthaltenen kristallinen Strukturen.

Um die Kristalle zu isolieren, wurde die ölige Komponente in Essigester und Chloroform (je fünf mal) gelöst und anschließend im Rotationsverdampfer eingeengt. Die so aufgereinigten Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 113,5 bis 115°C. Um die Struktur dieses Stoffes zu klären, wurde zunächst die molare Masse bestimmt. Dazu wurden die Kristalle in Methanol gelöst und mit massenspektroskopischen Methoden untersucht.

Massenspektrometrie:

Einlaß:.....direkt
Mode: .....positiv
Ionisierung:.....EI+
Quellentemperatur:.....200°C
Energie:.....70 eV
Einlaßtemperatur:.....90°C
Auflösung:.....1000

Zur Strukturaufklärung wurde ein Massenspektrum (MAT 95, Fa. Finnigan, Bremen) aufgenommen und eine NMR-Analyse (AM600/300; Fa. Bruker) durchgeführt. (Auswertung und Darstellung des Massenspektrums im Anhang; Abb. 62).

NMR-Analyse:

^{1}H: AM-600; Firma Bruker (600 MHz)
AM-300; Firma Bruker (300 MHz)
^{13}C: AM-600; Firma Bruker (150 MHz)

Die Proben wurden in deuteriertem Methanol bei Raumtemperatur gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm gegen TMS (Tetra-Methylsilan) angegeben (Auswertung und Darstellung des Spektrums im Anhang; Abb. 63). Es wurde das ^{1}H-Standardspektrum sowie das ^{13}C-Spektrum ermittelt. Als Lösungsmittel diente deuterisiertes Methanol.

8. Berechnung der OTR- und CTR-Rate aus abgasanalytischen Messungen

Die Massenströme des verbrauchten Sauerstoffs und des gebildeten Kohlenstoffs wurden aus der Konzentrationsänderung von O_2 und CO_2 in der Reaktorabluft gegenüber der

Reaktorzuluft errechnet. Für die Abgasmessungen wurde ein Analysensystem der Firma Maihak verwendet (O_2: Oxygor 6N; CO_2: Defor). Beide Gase sind in der Fermentationsbrühe löslich. Daher unterscheidet man zwischen der Sauerstoffeintragsrate (OTR; oxygen transfer rate) und der Sauerstoffaufnahmerate (OUR; oxygen uptake rate). Analog hierzu grenzt man die Kohlendioxidbildungsrate (CPR; carbondioxid production rate) von der Transferrate ab (CTR; carbondioxid transfer rate). Die Abluft wurde über einen Kondensatabscheider am Reaktorausgang über ein Vorfilter und einen 0,2 μm-Filter der Abluftanalyse zugeleitet. Vor Eintritt in das Meßsystem durchströmte die Abluft über ein Magnetventil eine Verteilerleiste. Das Magnetventil wurde im Chemostatbetrieb über ein Zeitprogramm periodisch mit anderen Magnetventilen (Raumluft und zwei weitere Reaktoren) angesteuert.

Sauerstoff ist im Fermentationsmedium nur schlecht löslich (in Wasser: $7{,}5*10^{-3}$ kg/m^3; 30 °C; 1,013 bar und Luftsättigung). Die OTR (1) und OUR-Werte können aus diesem Grund näherungsweise gleichgesetzt werden. Die Löslichkeit des Kohlendioxids wird stark beeinflußt von dem pH-Wert des Mediums. Liegt der pH-Wert oberhalb des neutralen Bereiches, muß die Abweichung des CPR und CTR (2) rechnerisch korrigiert werden. Da die Kultivierungen pH-gesteuert bei pH=7 durchgeführt wurden, entfiel hier die Notwendigkeit der Berücksichtigung des gelösten CO_2.

$$OTR = \frac{M_{O_2} \cdot \dot{V}_{G,E}}{V_M \cdot V_L} \cdot \left[x_{O_2 E} - \frac{x_{O_2 A} \cdot x_{I,E}}{1 - x_{O_2 A} - x_{CO_2 A}} \right] \left[\frac{g}{l \cdot h} \right] \qquad (1)$$

$$CTR = \frac{M_{CO_2} \cdot \dot{V}_{G,E}}{V_M \cdot V_L} \cdot \left[\frac{x_{CO_2 A} \cdot x_{I,E}}{1 - x_{O_2 A} - x_{CO_2 A}} - x_{CO_2 E} \right] \left[\frac{g}{l \cdot h} \right] \qquad (2)$$

Der respiratorische Quotient (RQ) (Gleichung 3) gibt das molare Verhältnis vom gebildeten Kohlendioxid zu verbrauchtem Sauerstoff an.

$$RQ = \frac{CPR \cdot M_{O_2}}{OUR \cdot M_{CO_2}} \qquad (3)$$

9. Berechnungen zur instationären Versuchsführung

9.1. Satzversuche

Subtratbezogener Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ (nicht Maintenance-korrigiert):

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_{t=0} - S} \qquad (4)$$

Der $Y_{X/S}$ wurde aus den Substrat- und Biomassenanfangs- und -endkonzentrationen berechnet und stellt somit einen integralen Yield-Koeffizienten dar.

Spezifische Substratverbrauchsrate mit $X_{t_m} = \frac{X_{t_2} - X_{t_1}}{2}$ (5)

$$q_S = \frac{S_{t_1} - S_{t_2}}{t_2 - t_1} \cdot \frac{1}{X_{t_m}} \qquad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \qquad (6)$$

Spezifische Wachstumsrate:

$$\mu = \frac{X_{t_2} - X_{t_1}}{t_2 - t_1} \cdot \frac{1}{X_{t_m}} \qquad \left[\frac{1}{h}\right] \qquad (7)$$

9.2. Auswaschexperimente

Spezifische Wachstumsrate:

$$\mu = D + \frac{1}{X}\frac{dx}{dt} \qquad \left[\frac{1}{h}\right] \tag{8}$$

Spezifische Substratumsatzrate:

$$q_S = \frac{1}{X}\left[S_0 D - SD - \frac{dS}{dt}\right] \qquad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{9}$$

10. Berechnungen zur stationären Versuchsführung

Substratbezogener Ertragskoeffizient:

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S} = \frac{DX}{Q_S} = \frac{X}{S_0 - S} \tag{10}$$

Sauerstoffbezogener Ertragskoeffizient:

$$Y_{X/O_2} = \frac{\mu}{q_{O_2}} = \frac{DX}{OTR} \tag{11}$$

Substratbezogener CO_2-Ertragskoeffizient:

$$Y_{CO_2/S} = \frac{CTR}{(S_0 - S)D} \tag{12}$$

CO_2-bezogener Ertragskoeffizient:

$$Y_{X/CO_2} = \frac{DX}{CTR} \tag{13}$$

Spezifische Abbaurate:

$$q_S = \frac{(S_0 - S)D}{X} \quad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{14}$$

Spezifische Kohlendioxidbildungsrate:

$$q_{CO_2} = \frac{CTR}{X} \quad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{15}$$

Spezifische Sauerstoffumsatzrate

$$q_{O_2} = \frac{OTR}{X} \quad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{16}$$

Maintenance-korrigierte spezifische Raten:

Spezifische Substratabbaurate:

$$q_s = \frac{1}{Y^*_{X/S}} \mu + q_{SM} \quad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{17}$$

Spezifische Sauerstoffumsatzrate:

$$q_{O_2} = \frac{1}{Y^*_{X/O}} \cdot \mu + q_{O_2M} \quad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{18}$$

Spezifische Kohlendioxidbildungsrate:

$$q_{CO_2} = \frac{1}{Y^*_{X/CO_2}} \cdot \mu + q_{CO_2M} \quad \left[\frac{g}{g \cdot h}\right] \tag{19}$$

11. Beschreibung der Massenbilanzen

Tab. 5: Elementarzusammensetzungen

a_i: Stöchiometrischer Faktor des Elementes i in der Summenformel

*: Es wurde mit einer Zellzusammensetzung von $CH_2O_{0,52}N_{0,23}$ bei einem Ascheanteil von 7,5 % gerechnet (Roels, 1983).

3CB und 4CB	4MB	Zellen (7,5%Asche)*	CO_2	NH_3
a_C=0,537	a_C=0,705	a_C=0,4371	a_C=0,273	-
a_O=0,204	a_O=0,235	a_O=0,3030	a_O=0,727	-
a_H=0,032	a_H=0,059	a_H=0,073	-	a_H=0,178
a_{Cl}=0,226	-	a_N=0,1173	-	a_N=0,823

11.1. Beschreibung der Massenbilanzen unter stationären Versuchsbedingungen

Kohlenstoffwiederfindung im Chemostatversuch:

$$C_{rec} = \frac{a_{C_x} X\ D\ +\ a_{C_{CO_2}} CTR}{a_{C_s} S_0 D} \qquad (20)$$

Chlorwiederfindung im Chemostatversuch:

$$Cl_{rec} = \frac{a_{Cl_s} S\ +\ a_{Cl_{NaCl}} [NaCl]\cdot}{a_{Cl_s} S_0\ +\ a_{Cl_{NaCl}} [NaCl]_0} \qquad (21)$$

Sauerstoffwiederfindung im Chemostatversuch:

$$O_{rec} = \frac{a_{O_x} X D\ +\ a_{O_{CO_2}} CTR}{a_{O_s} S_0 D\ +\ OTR} \qquad (22)$$

Stickstoffwiederfindung im Chemostatversuch:

$$N_{rec} = \frac{a_{N_X} X + a_{N_{[NH]_3}} [NH_3]_t}{a_{N_{[NH]_3}} [NH_3]_0} \quad (23)$$

Wasserstoffwiederfindung im Chemostatversuch:

$$H_{rec} = \frac{a_{H_X} X + a_{H_{HCl}} HCl}{a_{H_S} S_0 + a_{H_{[NH]_3}} [NH_3]_0} \quad (24)$$

11.2. Beschreibung der Massenbilanzen unter instationären Versuchsbedingungen

Kohlenstoffwiederfindung im Satzversuch:

$$C_{rec} = \frac{a_{C_S} S_t + a_{C_X} X_t + a_{C_{CO2}} \int_0^t CTR \, dt'}{a_{C_S} S_0 + a_{C_X} X_0} \quad (25)$$

Chlorwiederfindung im Satzversuch:

$$Cl_{rec} = \frac{a_{Cl_S} S_t + a_{Cl_{NaCl}} [NaCl]_t}{a_{Cl_S} \cdot S_0 + a_{Cl_{NaCl}} [NaCl]_0} \quad (26)$$

Kohlenstoffwiederfindung im Auswaschversuch:

$$C_{rec} = \frac{a_{C_X} XD + a_{C_{CO_2}} CTR + a_{C_S} SD + a_{C_X} \frac{dx}{dt} + a_{C_S} \frac{dS}{dt}}{a_{C_S} S_0 D} \quad (27)$$

Chlorwiederfindung im Auswaschversuch:

$$Cl_{rec} = \frac{a_{Cl_S} SD + a_{Cl_{NaCl}} [NaCl] D + a_{Cl_S} \frac{dS}{dt} + a_{Cl_{NaCl}} \frac{d[NaCl]}{dt}}{a_{Cl_S} S_0 D + a_{Cl_{NaCl}} [NaCl]_0 D} \quad \textbf{(28)}$$

12. Chemostattheorie

Bei einer kontinuierlichen Kultur handelt sich es sich um ein System im Fließgleichgewicht, bei dem das Substrat mit einer konstanten Zuflußrate F dem System zugeführt wird und gleichzeitig Fermentationsbrühe mit der gleichen Flußrate abgeführt wird. Nach entsprechenden Adaptationszeiten stellt sich ein Fließgleichgewicht ein, in dem alle Parameter konstante Werte annehmen; man spricht von einer Chemostatkultur.

$$D = \frac{F}{V} \quad [h^{-1}]$$

D ist die Verdünnungsrate, F ist die Zuflußrate [l h^{-1}] und V das Reaktorarbeitsvolumen (l). Die Änderung dX/dt errechnet sich aus folgender Beziehung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad [g \ l^{-1} h^{-1}] \quad \textbf{(29)}$$

Im Gleichgewichtszustand wird dX/dt = 0 und daraus ergibt sich

$$D = \mu \quad [h^{-1}] \quad \textbf{(30)}$$

Im steady-state entspricht die Verdünnungsrate zahlenmäßig der Wachstumsrate, solange die spezifische Substratzuführungsrate kleiner als die q_{Smax} ist. Die Konzentration der Biomasse ist im Fließgleichgewicht nur noch abhängig von der Substratkonzentration im Vorratsgefäß (S_0) und dem stammspezifischen Ertragskoeffizienten $Y_{X/S}$. Aus der Monod-Gleichung und der Gleichung 30 ergibt sich dann folgende Beziehungen:

$$D = \mu_{max} \cdot \frac{S_0}{K_S + S_0} \quad \textbf{(31)}$$

und daraus

$$S_0 = \frac{K_S \cdot D}{\mu_{max} - D} \quad \textbf{(32)}$$

In der Chemostatkultur stellt sich eine konstante Mikroorganismen-Zellkonzentration ein. Diese vermehrt sich bei der jeweiligen Verdünnungsrate mit gleichbleibender Wachstumsrate und Substratabbaurate, was eine genaue Charakterisierung des Stammverhaltens bei vorgegebener Verdünnungsrate ermöglicht.

13. Hemmung der Substratverwertung

Wird die Konzentration eines Substrates in einem Konzentrationsbereich von extrem gering bis extrem hoch variiert, können verschiedene Muster von konzentrationsabhängigen Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen und dem Substrat auftreten. Im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Auswirkung auf die physiologische Aktivität abhängig davon, in wieweit das Substrat essentiell für das Wachstum der Mikroorganismen ist (Edwards, 1970). Mit steigender Substratkonzentration wird ein Punkt erreicht, wo eine weitere Konzentrationserhöhung keine weitere Stoffwechselstimulation mehr bewirkt. Hier findet eine Limitierung aufgrund spezifischer Umwelt-/Medieneinflüsse statt; die Zellen wachsen mit der maximalen, unter den spezifischen Bedingungen möglichen Wachstumsrate. Bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration kann eine Inhibierung auftreten.

Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Beziehung läßt sich eine hyperbolische Abhängigkeit der Reaktionsrate von der Substratkonzentration beschreiben. Grundlage für diese Ab-

hängigkeit ist die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Unter der Voraussetzung, daß der Zerfall dieses Komplexes geschwindigkeitsbestimmend ist, ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtreaktion der Konzentration des Gesamtkomplexes proportional. Im Satzversuch wird bei Erhöhung der Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst steigen, d.h. es wird mehr Enzym im Enzym-Substratkomplex gebunden, bis schließlich das Enzym vollständig komplexiert vorliegt.

Monod hat diese Michaelis-Menten Beziehung verifiziert. Er bezieht diese Gleichung nicht mehr ausschließlich auf Enzyme, sondern verallgemeinert die Abhängigkeiten auf Mikroorganismen (Zellen). Bei Vernachlässigung des Erhaltungsstoffwechsels durch die Zellen kann die maximale Wachstumsrate durch die maximale spezifische Substratabbaurate ersetzt werden (Monod, 1944).

Monod:

$$q_S = q_{Smax} \cdot \frac{S}{K_S + S} \qquad \textbf{(33)}$$

Nicht übertragbar ist das Monod-Modell auf solche Substrate, die das Wachstum bei niedrigen Substratkonzentrationen limitieren, in hohen Konzentrationen jedoch inhibierend auf die Mikroorganismen wirken (Powell, 1965; Andrews, 1968).

Eine Gleichung zur Beschreibung solcher Gesetzmäßigkeiten wurde von Haldane (Haldane, 1930) entwickelt. Die Haldane-Gleichung beschreibt die Bildung eines *inaktiven* Enzym-Substrat-Komplexes durch eine Substratinhibierung. Eine Vielzahl weiterer Inhibierungsmodelle sind entwickelt worden. In dieser Arbeit fanden die folgenden Modelle zur Beschreibung des Stammverhaltens Anwendung:

Haldane-Modell:

$$q_S = q_{Smax} \cdot \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \qquad (34)$$

Kompetitive Hemmung:

In der Modellvorstellung ist das Kennzeichen der kompetitiven Hemmung, daß ein Inhibitor mit dem Enzym so reagieren kann, daß er mit dem normalen Substrat um das aktive Zentrum konkurriert (Lehninger, 1987). Der kompetitive Inhibitor bindet reversibel an das Enzym und bildet den Enzym-Inhibitor-Komplex. Bei konstanter Inhibitorkonzentration nimmt bei steigenden Substratkonzentrationen der Grad der Hemmung ab. Der apparente K_M-Wert eines Enzyms nimmt bei Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors zu. Ein besonderer Fall der kompetitiven Hemmung ist die Produkthemmung. Sie tritt auf, wenn ein Intermediat auf das Enzym zurück wirkt und dadurch das Substrat vom aktiven Zentrum verdrängt.

$$q_S = q_{Smax} \cdot \frac{S}{S + (1 + \frac{I}{K_I}) * K_S} \qquad (35)$$

Nicht kompetitive Hemmung:

In der biochemischen Modellvorstellung bindet bei der nicht kompetitiven Hemmung ein nicht kompetitiver Inhibitor entweder an das freie Enzym oder an der Enzym-Substrat-Komplex, wobei er die Interaktion beider stört (Lehninger, 1987). Nicht kompetitive Inhibitoren binden daher an einer anderen Stelle des Enzyms als das aktive Zentrum. Der gebildete Enzym-Substratkomplex kann nicht in seine Produkte zerfallen. Durch eine Erhöhung der Substratkonzentration kann dieser Effekt nicht aufgehoben werden. Übertragen auf ein zelluläres System deutet man diese Modellvorstellung derart, das der Inhibitor mit der Biomasse um eine andere Bindungsstelle als die des wachstumslimitierenden Substrates konkurriert (Pirt, 1975). Die spezifische Wachstums-

rate wird herabgesetzt, ohne des K_S-Wert zu beeinflussen.

$$q_S = q_{Smax} \cdot \frac{S}{(1+\frac{I}{K_I})\ (S+K_S)} \qquad \textbf{(36)}$$

14. Computeranpassung/Computersimulation:

Die Computeranpassungen der Meßdaten an mathematische Funktionen erfolgte über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit einem Graphikprogramm (MicroCal Origin; Version 2.94; Northhampton). Welche Parameter der Gleichungen vorgegeben und welche angepaßt wurden, wird im Ergebnis- und Diskussionsteil beschrieben.

IV. Ergebnisse und Diskussion

1. Charakterisierung des Abbaupotentials von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P)

In Vorversuchen wurde die Verwertung verschieden substituierter Benzoesäuren durch SN45P überprüft. Die Experimente wurden im 500 ml Schüttelkolben und im Rührkesselreaktor durchgeführt. Es wurde das Substratspektrum von SN45P durch Applikation von einfach substituierten Chlor- und Methylbenzoesäuren sowie Benzoesäuregemischen bestimmt. Ebenso wurde der Einfluß hoher Benzoesäureausgangskonzentrationen auf die Abbaukapazitäten von SN45P untersucht.

1.1. Transformation verschieden substituierter Benzoesäuren im Schüttelkolbenexperiment

Zur Bestimmung des Benzoesäure-Substratspektrums von SN45P wurden jeweils 200 ml Pseudomonas Minimalmedium mit der Kohlenstoff- und Energiequelle Benzoesäure, 2CB, 3CB, 4CB, 2MB, 3MB und 4MB mit 5 ml Bakteriensuspension beimpft und bei 30°C inkubiert. Reaktionsgefäße waren 500 ml Erlenmeyerkolben mit eingearbeiteten Schikanen, die zum besseren Stoffübergang des atmosphärischen Sauerstoffs in das Medium beitragen sollten. Das Inokulum stammte aus einer auf LB- Medium wachsenden Vorkultur.

Abb. 4 gibt eine Übersicht über die vorgelegten Benzoesäuren. Mit Ausnahme der in 2-Position substituierten Benzoesäuren 2CB und 2MB waren nach 9 Tagen Abnahmen der Konzentrationen aller Ausgangssubstanzen festzustellen. Die Konzentration von 3MB nahm trotz aufgetretener morphologischer Veränderungen im Versuchszeitraum signifikant ab. Während des gesamten Versuchszeitraumes zeigten die Mikroorganismen in

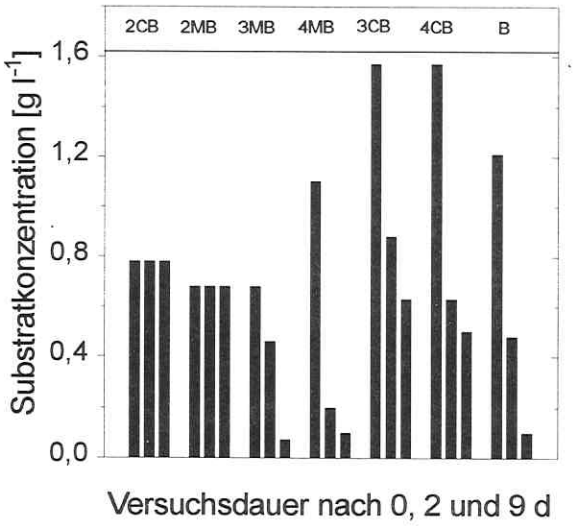


Abb. 4: Verwertung unterschiedlicher Benzoesäuren durch SN45P im Schüttelkolbenversuch.

den 3MB-Ansätzen eine kugelige bis gekrümmt-kurzstäbchenförmige Morphologie mit der Tendenz zur Bildung von Zellagglomeraten. Die Umsetzung der 3MB war dabei von einer Schwarzfärbung der Kulturbrühe bei nur schwachem Kolbenbewuchs gekennzeichnet. In den Kulturkolben mit B, 3CB, 4CB und 4MB wies der GEM einen stäbchenförmigen Habitus bei gleichzeitig hoher Zellmobilität auf. Nach vollständiger Substrattransformation wurde auch hier ein Verlust der Zellmobilität bei gleichzeitiger Abnahme der Zellgröße beobachtet.

Die Fähigkeit von SN45P zur Verwertung von Substratgemischen ist in der Abb. 5 dargestellt. Die Benzoesäuren, die sich in den Vorversuchen zur Ermittlung des Substratspektrums als umsetzbar erwiesen haben, werden auch bei Vorlage als Benzoesäuregemisch transformiert. 2CB/2MB-Gemische werden nicht verwertet. Auch bei gleichzeitigem Angebot einer verwertbaren Benzoesäure wie 3CB erfolgt kein kometaboler Umsatz der in 2-Stellung substituierten Benzoesäuren. Aus dem Gemisch der Benzoesäuren 2CB/3CB (0,4/0,4 g l^{-1}) wurde vom GEM im Versuchszeitraum die 3CB zu 85 % umgesetzt; ein Abbau von 2CB wurde auch hier nicht nachgewiesen. In den Kulturkolben mit 2MB/3MB erfolgte kein Anwachsen des Teststammes.

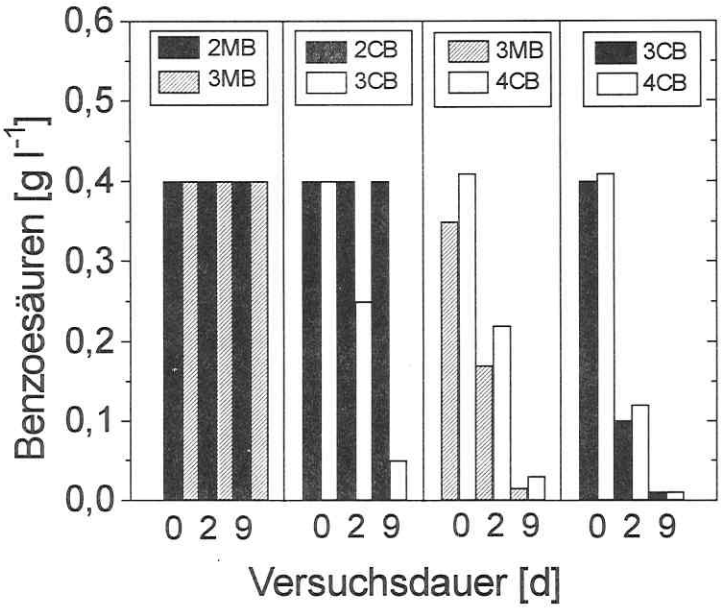


Abb. 5: Umsatz von Benzoesäuregemischen durch SN45P im 500 ml Schüttelkolbenexperiment.

Wird 3MB dem GEM gleichzeitig mit 4CB angeboten, werden beide Benzoesäuren transformiert. Eine Braunfärbung der Mediums trat hier und überall dort auf, wo 3MB als Substrat vorgelegt wurde (2MB/3MB; 3MB/4CB). Die Färbung deutet hier und bei den 3MB-Monosubstratversuchen auf suboptimale Wachstumsbedingungen hin. Anhand einer veränderten Zellmorphologie (Verklumpung) und dem Verlust der Beweglichkeit wurde dieses deutlich. Eine weiß-cremige Färbung der Kulturbrühe ging dagegen einher mit physiologischer Aktivität des Stammes (starke Beweglichkeit, deutlicher Substratumsatz).

1.2. Verwertung von 3CB, 4CB und 4MB und von 3CB/4MB Gemischen bei hohen Benzoesäure-Ausgangskonzentrationen

Die Überprüfung des Einflusses hoher Benzoesäure-Ausgangskonzentrationen auf die Umsetzung der Benzoesäuren war Gegenstand dieser Versuchsserie. Dazu wurden die

Benzoesäuren als Monosubstrate sowie als 3CB/4MB-Gemisch den Bakteriensuspensionen zugesetzt (Abb. 6).

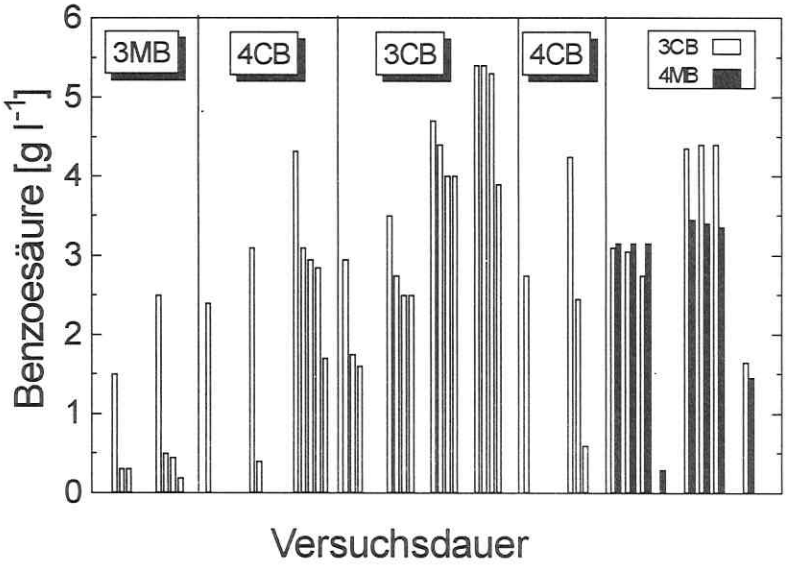


Abb. 6: Umsatz verschieden substituierter Benzoesäuren durch SN45P im 500 ml Schüttelkolben. Die Beprobung der Kulturkolben erfolgte nach 0, 1, 2, 5 und 9 Tagen.

Bis zu einer S_0 von 5,4 g l^{-1} 3CB und bis zu insgesamt 7,9 g l^{-1} des Substratgemisches waren keine irreversible Inaktivierungen der mikrobiellen Abbauleistungen aufgetreten. Mit Ausnahme der 3MB-Ansätze waren die Kulturkolben dicht bewachsen. Bei S_0-Konzentrationen ab 3,0 g l^{-1} trat auch in den Kulturkolben mit 3CB als Kohlenstoffquelle eine dunkle Verfärbung der Kulturbrühe auf, was auf die Autoxidation von Brenzkatechinen im Reaktionsgefäß hindeutet. Da dieses Phänomen bei Abbauexperimenten im Rührkesselreaktor nicht aufgetreten ist, sind als Ursache suboptimale Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben wahrscheinlich. Die Kolben mit 3MB wiesen in den Konzentrationsbereichen von 1,5 bis 2,5 g l^{-1} eine tiefschwarze Färbung auf. Aber auch hier war eine signifikante Abnahme der 3MB-Konzentration festzustellen. Die Schwarzfärbung weist auf die Akkumulation von Methylbrenzkatechinen hin, die durch Autoxidation zu tiefgefärbten Polymeren reagieren können. Wie in der Literaturübersicht beschrieben, wird 3MB von SN45P über 1,2-Dihydro-1,2-dihydroxybenzoesäure zum 3-Methylbrenzkatechin umgesetzt. Dieses wird durch die Catechol 1,2-Dioxygenase zur

2-Methylmukonsäure oxidiert. Aus diesem Metaboliten entsteht das 2-Methyl-2-en-Lakton, welches weder von den B13-Enzymen noch von der *Alcaligenes*-Isomerase umgesetzt werden kann (Taeger et al. 1988). Das Lakton akkumuliert als dead-end Produkt. Daß die Schwarzfärbung auf nur geringe Konzentrationen des Brenzkatechins zurückzuführen ist, konnte mit HPLC-Untersuchungen nachgewiesen werden. Bei einer 3MB Ausgangskonzentration von 1,5 g l^{-1} wurde eine 3-Methylbrenzkatechin-Endkonzentration von 0,04 g l^{-1} und bei einer Ausgangskonzentration von 2,5 g l^{-1} eine Endkonzentration von 0,12 g l^{-1} ermittelt. Nach Applikation von 3MB wird das intermediär anfallende 3-Methylbrenzkatechin somit zumindest anteilig aus der Zelle ausgeschleust.

Die Untersuchungen zur Transformation von 3CB/4MB-Gemischen im Schüttelkolben zeigten ein von der Ausgangskonzentration abhängiges Ergebnis. Während ein Ansatz mit 3CB/4MB (2,7 g l^{-1}/3,0 g l^{-1}) nach zweitägiger Inkubation eine vollständige Substrattransformation aufwies (nicht graphisch dargestellt), verlängert sich die Adaptationsphase bei nur geringfügiger Erhöhung der Substratkonzentration auf 3,0 g l^{-1}/3,1 g l^{-1} (3CB/4MB) auf zwei Tage (Abb. 6). Nach 5 Tagen wird auch hier eine vollständige Transformation des Ausgangssubstrates festgestellt. Bei weiterer Erhöhung von S_0 auf 4,3 g l^{-1}/3,5 g l^{-1} ist nach 9 Tagen eine Restkonzentrationen beider Substrate nachzuweisen (0,7/1,3 g l^{-1} 3CB/4MB). Während des gesamten Kultivierungszeitraumes wies hier die Farbe der Kulturbrühe nicht auf die Autoxidation von Brenzkatechinen hin. Die HPLC-Analyse bestätigte diese Beobachtung.

1.2. Simultanabbau eines 3CB/4MB Gemisches im Rührkesselreaktor im repeated batch-Versuch

Unter praktischen Gesichtspunkten ist v.a. die Stabilität der Abbauleistung des biologischen Systems bei einer Stoßbelastung durch hohe Aromatenkonzentrationen von Bedeutung. Um dieses im repeated batch Experiment für die Benzoesäuren zu testen, wurde der Umsatz eines 3CB/4MB-Gemisches durch SN45P mit einer Substratausgangskonzentration von insgesamt 7,1 g l^{-1} im Rührkesselreaktor kinetisch verfolgt. Die Abb.

7 zeigt den Reaktionsverlauf anhand der Darstellung BTM- und Substratumsatzkinetiken.

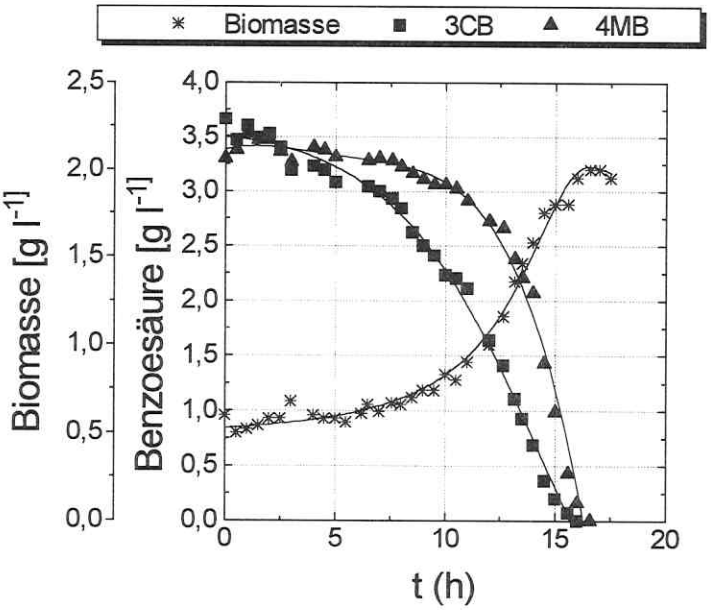


Abb. 7: Simultane Verwertung eines Gemisches aus 3,7 g l^{-1} 3CB und 3,4 g l^{-1} 4MB im Rührkesselreaktor.

Unterschiedliche Affinitäten des GEM zu den beiden Benzoesäuren werden deutlich. Während bis zum Zeitpunkt t=8 h die 4MB Konzentration nur geringfügig abnahm, ist im gleichen Zeitraum eine 3CB Konzentrationsabnahme um ca. 1 g l^{-1} festzustellen. Beide Substrate sind zum gleichen Zeitpunkt (16,5 h) verbraucht. Der Kurvenverlauf der Biomasse macht deutlich, daß eine simultane Verwertung des Substratgemisches vorliegt. Die Expression und Regulation der neuen Abbausequenzen erwiesen sich als stabil. Im Versuchszeitraum wurden bei einer maximalen Substratumsatzrate von q_{Smax}=0,9 g $g^{-1}h^{-1}$ insgesamt 7,1 g l^{-1} des Benzoesäuregemisches umgesetzt. Als Ursache für die größere Affinität von SN45P zu der 3CB ist zunächst die doppelte Initialenzymausstattung des GEM anzuführen. SN45P transkribiert neben der Benzoat-1,2-Dioxygenase auch die Toluat-1,2-Dioxygenase des TOL-Plasmids. Diese doppelte Enzymausstattung bedingt zudem eine höhere Umsatzwahrscheinlichkeit der 3CB. Die 4MB

konkurriert mit der 3CB um Umsatz durch die Toluat-1,2-Dioxygenase, während 3CB zusätzlich spezifisch durch die Benzoat-1,2-Dioxygenase transformiert werden kann.

Anhand der Bilanzierung des Elementes Chlor wurde der Simultanabbau des 3CB/4MB-Gemisches näher untersucht. Die Auftragung der Chlor-Wiederfindung im parity-plot (Abb. 8) zeigt eine Abweichung des Chlor-Sollwertes (stöchiometrischer Anteil des Elementes Chlor in der 3CB bei 100 prozentiger Chlorabspaltung) vom Ist-Wert (analytisch bestimmter Chlorgehalt). Dieses deutet auf die Bildung eines temporären, zellinternen chlorierten Metaboliten hin.

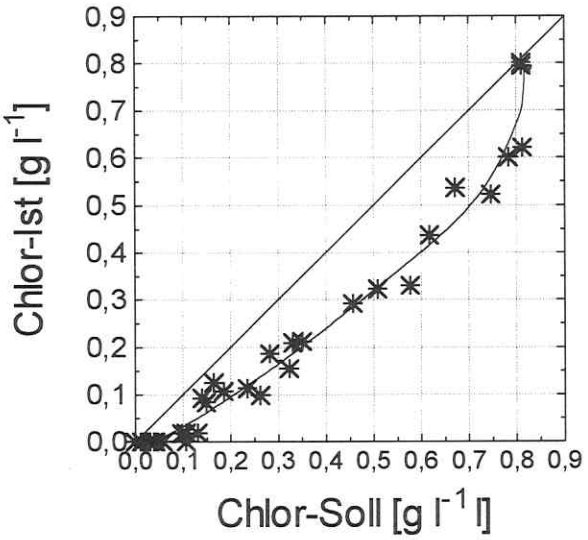


Abb. 8: Chlorwiederfindung beim Abbau von 7,1 g l^{-1} eines 3CB/4MB-Gemisches.

Nach Substraterschöpfung (t=15 h) belegt die Chlorbilanz vollständige Wiederfindung des vom Aromaten abgespaltenen Chlorids. Ein Abbau der 3CB bis zum 4-Carboxymethylenbut-2-en-4-olid (cis- und trans Dienlakton) ist somit experimentell nachgewiesen. In den meisten chloraromatischen Systemen sind die Halogensubstituenten verantwortlich für die Persistenz dieser Komponenten gegenüber einem mikrobiellen Abbau (Schmidt und Knackmuss, 1980; Sahasrabudhe et al. 1987). Die 100-prozentige Freisetzung der Chlorid-Ionen kann daher als Indiz für die vollständige 3CB-Mineralisation gewertet werden. Um zu überprüfen, ob und welche Intermediate extrazellulär auftreten,

wurde der Kulturüberstand nach charakteristischen Zwischenprodukten des 3MB- und 4CB-Metabolismus untersucht. Als Referenzsubstanzen standen dafür 3-Chlor-Brenzkatechin (3Cl-Cat), 4-Chlor-Brenzkatechin (4Cl-Cat), 3-und 4-Methyl-Brenzkatechin (3M-Cat, 4M-Cat) und 2-Chlor-Mukonsäure zur Verfügung. Die HPLC-Laufbedingungen wurden für die Auftrennung möglicher Intermediate variiert. Dazu wurde die Flußrate der HPLC-Pumpen auf 1 ml min^{-1} herabgesetzt und das Laufmittelgemisch zugunsten der wäßrigen Komponente (Methanol-/Wassergemisch 45/55% v/v) bei gleichzeitiger Verlängerung der Analysendauer auf 15 Minuten modifiziert. Die HPLC-Läufe wurden bei Wellenlängen von 225, 239, 254 und 275 nm durchgeführt. Komponenten, die hinsichtlich ihrer Detektorantwort nicht eindeutig den Referenzsubstanzen zuzuordnen waren, wurden zusätzlich dünnschichtchromatographisch mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen untersucht.

Bis auf den 4M-Cat-Peak konnten keine Retentionszeiten der Referrenzsubstanzen Peaks des Probenlaufes zugeordnet werden. Unterschiedliche RF-Werte beim dünnschichtchromatographischer Vergleich des 4M-Cat Referenz mit den Komponenten der Probe bei unterschiedlichen Laufmittelzusammensetzungen zeigten, daß auch diese Referenzsubstanz nicht im Kulturüberstand vorhanden war.

2. Adjusted batch Versuche

2.1. Satzversuche im Rührkesselreaktor

Wichtige Kenngrößen zur Auslegung einer dezentralen Abwasserreinigung mit einem Bioreaktor sind Kenntnisse über maximale Abbauraten, Stabilität der Abbauleistung bei Substrat-Unter- oder -Überversorgung sowie die Bestimmung kinetische Parameter. Deshalb bildeten den Schwerpunkt der **adjusted batch** Versuche Untersuchungen zum Einfluß wechselnder Substratkonzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Diese Versuche wurden, wie im Methodenteil beschrieben, unter optimierten Versuchsstartbedingungen durchgeführt. Den Mikroorganismen wurde während des Chemostatbetriebes ein Gemisch aus 3CB, 4CB und 4MB in einer Gesamtkonzentration von 5 mmol l^{-1} als Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten. Da im Verlauf dieser kontinuierlichen Kultivierung keinerlei Ausgangssubstrate in der Fermentationsbrühe nachzuweisen waren, wurde sichergestellt, daß die Synthese aller Initialenzyme des Stammes induziert war. Für reproduzierbare Startbedingungen der Experimente im nachfolgenden Satzbetrieb war dieses unabdingbar. Die Mikroorganismen waren somit in allen Satzversuchen an die jeweiligen Substrate adaptiert und in vergleichbaren physiologischen Zuständen. Gleichzeitig ermöglichte die zu Versuchsbeginn konstante BTM-Konzentration einen zeitlichen Vergleich der mikrobiellen Abbauleistung. Vor den jeweils durchgeführten Satzversuchen wurde die stationäre Kultvierung durch Abschalten der Substratdosierpumpen unterbrochen. Nachdem die Abluftanalyse "definierte" Startwerte anzeigte (CO_2: 0,05 %; O_2 20,94 %), wurde der Satzversuch durch Zugabe der Benzoesäuren begonnen und kinetisch verfolgt. Die Startwerte wurden etwa 10 Minuten nach dem Ausschalten der Substratdosierpumpen erreicht. Auf ein Erreichen der Sauerstoff- und Kohlendioxidwerte der Raumluft (CO_2: 0,03 % und O_2: 20,946%) wurde verzichtet, da die dazu notwendigen langen Zeiträume zu einer Adaptationsphase der Mikroorganismen durch erneute Induktion der katabolen Enzyme hätten führen können. Als Ende des Satzversuches wurde der Zeitpunkt definiert, an dem mit HPLC-Analyse kein Substrat mehr nachzuweisen war und/oder der Abluftanalysator die Ausgangswerte für CO_2: 0,05 % und O_2: 20,94 % anzeigte.

2.2. Übersicht über die durchgeführten adjusted batch Versuche

Tab.6: Tabellarische Übersicht über die durchgeführten adjusted batch-Versuche: μ_{max} und q_{Smax} wurde aus der Auftragung der spezifischen Raten als Funktion der 3CB-Konzentration graphisch bestimmt: * [1] nach vollständigem Benzoesäureumsatz; [2] Der $Y_{X/S}$ wurde zeichnerisch durch Quotientenbildung errechnet (integral).

Substrat	S [g l^{-1}]	Zeit[1] [h]	μ_{max} [h^{-1}]	q_{Smax} [g $g^{-1}h^{-1}$]	$Y_{X/S}$[2]	Cl^--recovery (%)*1
3CB	0,22	1,2	0,3	0,70	0,3	-
4CB	0,21	1,3	0,3	0,47	0,3	-
4MB	0,19	1,1	0,3	0,66	0,5	-
3CB	0,36	1,5	0,2	0,92	0,4	-
4CB	0,40	1,5	0,3	0,68	0,4	-
4MB	0,32	1,8	0,3	0,70	0,4	-
3CB	0,69	2,6	0,3	0,92	0,3	-
4CB	0,71	3,0	0,3	0,85	0,3	-
4MB	0,65	2,2	0,4	1,39	0,3	-
3CB	1,46	7,5	0,2	0,85	0,2	105
4CB	1,65	6,0	0,2	0,94	0,2	103
3CB	2,35	10,0	0,3	0,87	0,2	102
4CB	2,33	9,0	0,2	0,63	0,3	95
4MB	1,85	5,5	0,3	1,00	0,4	-
3CB	4,28	17,8	0,1	1,01	0,1	100
4CB	4,68	12,0	0,2	0,67	0,2	102
4MB	3,65	11,0	0,3	1,20	0,4	-

Der Einfluß steigender Benzoesäure-Ausgangskonzentrationen im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 4,7 g l^{-1} (3CB und 4CB) und 0,19 bis 3,65 g l^{-1} (4MB) auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde untersucht. Zum Vergleich der Abbaukapazitäten wurde der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$, die spezifische Wachstumsrate μ [h^{-1}], die spezifische Substrat-

abbaurate q_S [g $g^{-1}h^{-1}$] und die Zeit bis zum vollständigen Umsatz des jeweils zugesetzten Substrates als Parameter bzw. Meßgröße bestimmt.

Tab. 6 zeigt die wichtigsten Abbauparameter der diskontinuierlichen Versuche in der Übersicht. Die Kinetiken des Benzoesäureumsatzes sind in den Abb. 56-58 im Anhang dargestellt. Bei allen durchgeführten Experimenten konnte nach Beendigung der adjusted batch Kultivierungen kein Substrat analytisch nachgewiesen werden. Die Chlorbilanzierung ergab am Versuchsende eine vollständige stöchiometrische Wiederfindung des vom Aromaten abgespaltenen Chlors. Die Akkumulation von dead-end oder suicide-Produkten wurde zu keinem Zeitpunkt analytisch oder optisch durch Schwarzfärbung der Kulturbrühe beobachtet.

Die 3CB und 4CB-Kinetiken lassen sich im Konzentrationsbereich von 0,20 bis 1,50 g l^{-1} zeitlich gut miteinander korrellieren. Die volumenbezogenen Umsetzungen verlaufen bei den beiden chlorierten Substraten bis zu Konzentrationen von 0,39 g l^{-1}, bei der 4MB bis 1,10 g l^{-1}, in einer Reaktion 0-ter Ordnung. Bei Konzentrationen größer als 1,4 g l^{-1} wird die 3CB deutlich langsamer abgebaut als die 4CB (Tab. 6). 4,28 g l^{-1} 3CB werden in 17,8 Stunden quantitativ umgesetzt, während für 4,68 g l^{-1} 4CB nur 12 Stunden bei gleichen Versuchsstartbedingungen benötigt werden. Diese Effekte werden bedingt durch unterschiedliche Ertragskoeffizienten. Während im Konzentrationsbereich bis 0,7 g l^{-1} mit beiden chlorierten Benzoesäuren gleiche Ertragskoeffizienten bestimmt werden können ($Y_{X/S}$ = 0,3 g g^{-1}), fällt dieser bei zunehmender S_0 für 3CB geringer aus. Es ergibt sich eine aus der Steigung der Geraden in Abb. 12 berechnete Abfolge der Ertragskoeffizienten in der absteigenden Reihenfolge 4MB (0,43 g g^{-1}) > 4CB (0,20 g g^{-1})> 3CB (0,17 g g^{-1}). Die Tendenz zu kleiner werdenden Ertragskoeffizienten mit zunehmender S_0 ist eindeutig und wurde auch von Heuer (1991) nachgewiesen. Als Ursache hierfür erscheint zunächst die Deckung des Erhaltungsstoffwechsels plausibel. Mit zunehmender S_0- Konzentration nimmt die Zeit bis zur vollständigen Substrattransformation in den 3CB-Kinetiken im Vergleich zu denen der 4CB-Kinetiken zu (vgl. Tab. 6). Mit zunehmender Versuchsdauer wird gleichzeitig anteilig mehr Substrat zur Deckung des Erhaltungsstoffwechsels benötigt, welches dem Anabolismus nicht mehr zur Verfü-

gung steht. Kleiner werdende Ertragskoeffizienten sind die Folge.

Obwohl die Substrate unter standardisierten Bedingungen (Neutralisation der Benzoesäure-Stammlösungen; vgl. Material und Methoden) dem Reaktor zugesetzt wurden, war eine Beeinflussung der Biomasse dabei nicht vermeidbar und verursachte Schwankungen der BTM-Konzentration. Sowohl die Meßwerte für die OD als auch die der BTM zeigen nach Substratdosierung ein Aufschäumen der Kulturbrühe sowie eine Abnahme der anfänglichen Biomassekonzentration (vgl. z.B. Abb. 13). Als Ursache muß von einem toxischen Einfluß der konzentrierten Substrat-Vorratslösung (neutralisierte Benzoesäurelösung; 50 mmol l^{-1}) zum Zeitpunkt der Zudosierung in den Reaktor ausgegangen werden. Aufgetreten sind diese Effekte bei den Kultivierungen bei 3CB-S_0-Konzentrationen von 2,35 g l^{-1}, beim 4CB (S_0 = 2,33 g l^{-1} und 4,68 g l^{-1}) und bei dem Substratgemisch in den Ansätzen mit einer S_0 von 5,7 und 7,5 mmol l^{-1}. Nicht beobachtet wurde dieses Stammverhalten in den 4MB-Ansätzen und bei dem 3CB-Versuch mit einer Substratausgangskonzentration von 4,28 g l^{-1}.

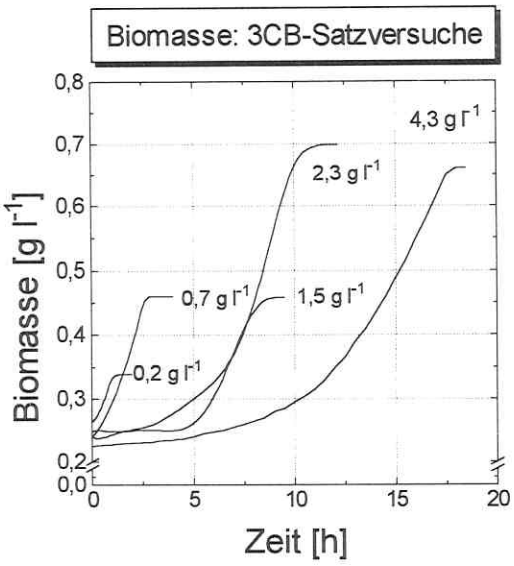


Abb. 9:

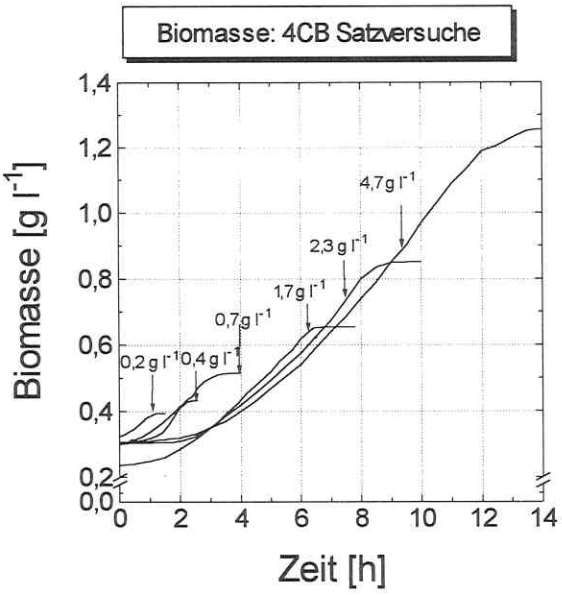


Abb. 9 + Abb. 10: Kinetik der Biomassenbildung in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration der Benzoesäuren. Dargestellt sind die Ausgleichskurven der BTM-Konzentration aus den 3CB- und 4CB- adjusted batch Versuchen. Die dazugehörigen Datenpunkte sind im Anhang tabellarisch aufgeführt (A1-A4).

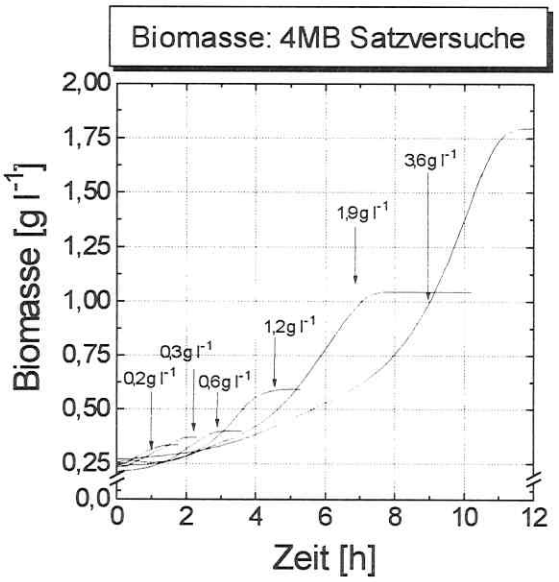


Abb. 11: Kinetik der Biomassenbildung in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration der 4MB. Dargestellt sind die Ausgleichskurven der BTM-Konzentration aus der 4MB Kultivierung. Die dazugehörigen Datenpunkte sind im Anhang in A5 und A6 aufgeführt.

Als Ursache für diese nicht reproduzierbar auftretende Effekte ist eine Beeinflussung durch den Vorgang der Benzoesäureapplikation anzunehmen. Die Zugabe der Benzoesäuren erfolgte über sterilisierte Animpfflaschen. Um die benötigten Massenanteile der Benzoesäuren in Wasser lösen zu können, mußte dieses zunächst stark alkalisiert werden. Um eine zellschädigende Wirkung aufgrund des hohen pH-Wertes zu vermeiden, wurde die Lösung vor Versuchsbeginn auf pH 7-8 neutralisiert. Trotzdem war nach der Applikation der Benzoesäuren bei Ausgangskonzentrationen ab 1,56 g l^{-1} (3CB, 4CB) und 1,36 g l^{-1} (4MB) ein Aufschäumen der Fermentationsbrühe nicht zu vermeiden und machte die Zugabe eines Antischaummittels (Desmophen) erforderlich. Dieser Vorgang läßt auf eine Zellysis und/oder eine Verklumpung der Zellen schließen, die lokal dort auftritt, wo die konzentrierte Stammlösung in die Kulturbrühe des Bioreaktors gelangt. Als alleinige Erklärung kann dieses allerdings nicht dienen, da z.B. im 3CB-Ansatz mit 4,3 g l^{-1} Ausgangskonzentration kein Einbruch der anfänglichen Biomassekonzentration auftritt. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, daß Animpfflaschen verschiedener Volumina und Schlauchdurchmesser Verwendung fanden. Bei Verwen-

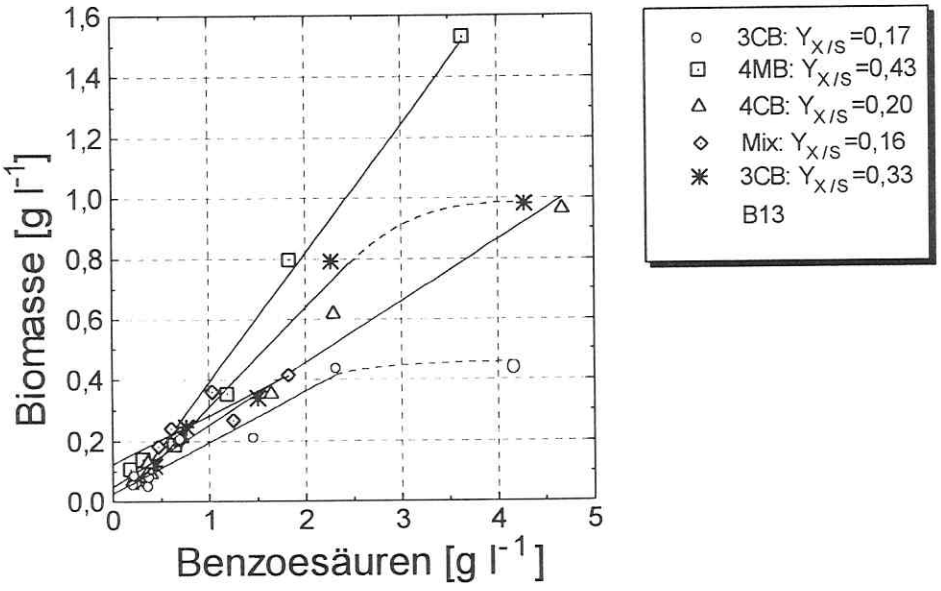


Abb. 12: Einfluß der Konzentration substituierter Benzoesäuren auf die Biomassekonzentration.

dung von Animpfflaschen mit großen Volumina und Schlauchdurchmessern nahm die Substratapplikation weniger Zeit in Anspruch als bei kleineren Flaschen und Schlauchdurchmessern. Im ersten Fall ist eine Beeinflussung der Biomasse durch Verklumpung/Lysis aufgrund höherer "lokaler" Substratkonzentrationen wahrscheinlicher als im letzteren. Als Folge dieses Vorganges könnte eine mikrobielle Absterberate der Wachstumsrate entgegenwirken, welches den anfänglichen Kurvenverlauf der Wachstumskinetiken beeinflussen könnte. Eine mikroskopische Untersuchung der Mikroorganismen unmittelbar nach einer Schaumbildung im Bioreaktor zeigte allerdings keinen Befund: Es waren weder die Bildung von Zell-Aggregaten durch Verklumpung geschädigter Einzelzellen noch ein Auftreten lysierter Zellen zu beobachten. Lediglich die Beweglichkeit der Mikroorganismen erschien leicht herabgesetzt. Dieses deutet darauf hin, daß der Vorgang der Schaumbildung für die Auswertung der batch-Experimente vernachlässigt werden kann.

2.3. Darstellung typischer Reaktionsverläufe anhand des Vergleichs und der Bilanzierung der Satzversuche mit großen Substratausgangskonzentrationen

Die adjusted batch Versuche mit hohen Substratausgangskonzentrationen zeigten substratspezifische Unterschiede hinsichtlich der ermittelten Ertragskoeffizienten, der Anlaufphasen der Wachstumskurven und der Versuchsdauer. Im folgenden werden die Kultivierungen mit einer S_0 von 15 mmol l^{-1} (3CB + 4CB: 2,3 g l^{-1}, 4MB: 1,9 g l^{-1}) miteinander verglichen. Als mögliche Ursache für das Phänomen des Substratumsatzes bei konstant bleibender BTM-Konzentration werden mehrere Möglichkeiten diskutiert: a) Bildung eines Intermediates, b) der Erhaltungsstoffwechsel (Maintenance) und c) eine Entkopplung der Substratverwertung vom bakteriellen Wachstum (verstärkte Bildung gasförmiger Reaktionsprodukte). Die Bildung von Stoffwechselmetaboliten soll zunächst durch Bilanzierung der Elemente Kohlenstoff und Chlor überprüft werden.

Abb. 13-15 geben einen Überblick über die Kinetik der 3CB, 4CB- und 4MB-Verwertung im adjusted-batch Versuch. Trotz gleicher S_0-Konzentrationen werden charakteristische Unterschiede im Abbauverhalten des Stammes deutlich. Am schnellsten wurde die 4MB umgesetzt. Zum Zeitpunkt t=6 h war analytisch kein Ausgangssubstrat mehr nachzuweisen. Im 4MB-Experiment wurde der vergleichsweise höchste Ertragskoeffizient mit einem $Y_{X/S}$ von 0,4 g g^{-1} bestimmt. Zum Zeitpunkt t=4 h sind ein Gramm der 4MB umgesetzt, während im gleichen Zeitraum mit den anderen Substraten 0,6 g der 4CB und 0,4 g 3CB metabolisiert wurden. Der Umsatz der 4MB ging dabei einher mit der Bildung eines temporären Metaboliten. Die C-Bilanz (Abb. 15b) macht deutlich, daß zum Zeitpunkt t=5 h ein 40 prozentiges Massendefizit des Elementes Kohlenstoffs auftritt. Zum Zeitpunkt des vollständigen Substratumsatzes (t=6 h) fehlen 30 % des Kohlenstoffs. Die Kultur befindet sich hier noch in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach Übergang in die stationäre Wachstumsphase wird die C-Bilanz auf 90 % ausgeglichen. Da zum Ende der Satzversuche bei den gemessenen niedrigen CO_2-Konzentrationen der Reaktorabluft die Meßwertschwankungen drastisch ansteigen, sollen an dieser Stelle die Endwerte der C-Bilanz nicht diskutiert werden. Die Chemostatkultur

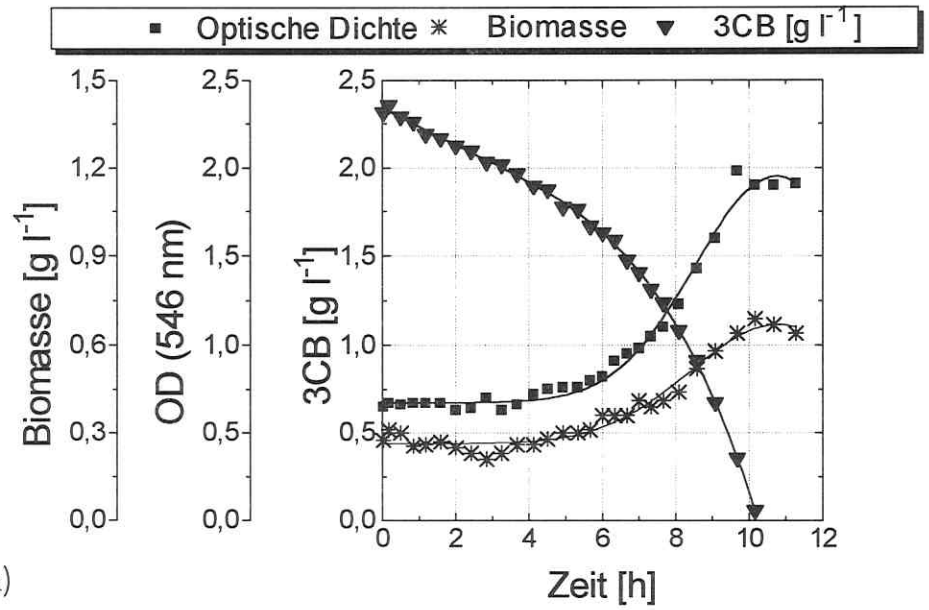
(Kap. VI.3.) bietet durch die Möglichkeit, Bilanzierungen im Fließgleichgleichgewicht durchführen zu können, geeignetere Bilanzierungsbedingungen.

In der mikrobiellen Wachstumskurve verläuft der Übergang in die stationäre Wachstumsphase nicht zeitgleich mit dem vollständigem Substratumsatz (Abb. 15). Diese Beobachtung ist als ein weiterer Hinweis auf eine temporäre Metabolitakkumulation zu werten. Die CTR-Werte steigen unmittelbar nach Applikation der 4MB an und korrellieren somit nicht mit der nur langsam zunehmenden bzw. stagnierenden Biomassekonzentration. Nachdem der Stamm die stationäre Phase der Wachstumskurve erreicht, nimmt die CTR schnell ab, erreicht aber im Versuchszeitraum nicht das Niveau der Ausgangswerte. Als Ursache hierfür ist die nun stattfindende Veratmung der Metabolite der Benzoesäureverwertung im Citratcyclus wahrscheinlich.

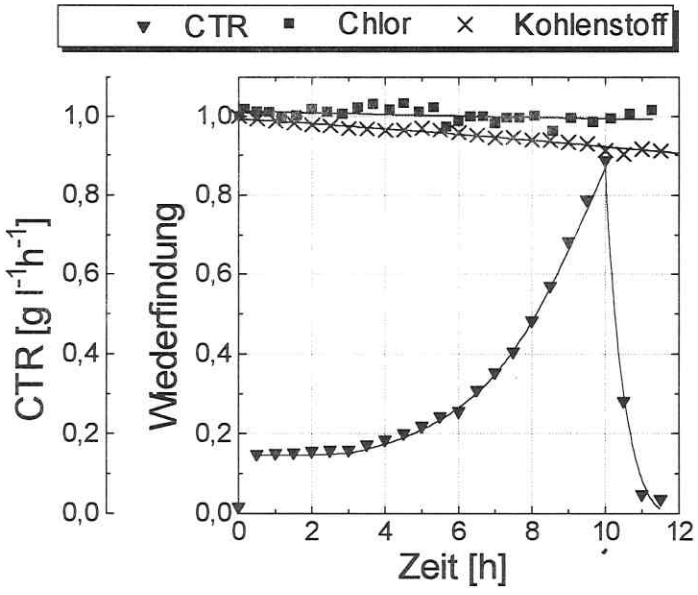
Die Abb. 13 und 14 zeigen eine Übersicht über die Verwertung der chlorierten Substrate durch SN45P. Dabei treten im Vergleich der Abbau- und Biomassen-Kinetiken Substratspezifische Unterschiede auf. Die 3CB wird langsamer und mit geringerem $Y_{X/S}$ umgesetzt als die 4CB. Im 3CB-Versuch nimmt erst zum Zeitpunkt t=4 h die BTM-Konzentration zu; beim 4CB-Experiment steigt die BTM-Konzentration bereits zum Zeitpunkt t= 2 h. Bezieht man die Anlaufphasen beider Wachstumskurven auf die experimentell ermittelten Wiederfindungen für Kohlenstoff und Chlor (Abb. 13b, 14b), so ergeben beide Bilanzen keinen Hinweis auf die Akkumulation von Intermediaten; die Verwertung der chlorierten Benzoesäuren 3CB und 4CB ist begleitet von einer der Stöchiometrie der Ausgangssubstrate entsprechenden CO_2-Transferrate. Im weiteren Verlauf der Kultivierung ist nach vollständigem Substratumsatz ein Kohlenstoff-Defizit von maximal 10 % zu verzeichnen. Ein Kohlenstoff-Defizit von 10 % kann unter den experimentellen Bedingungen am Ende des Satzversuches nicht eindeutig bewertet werden. Auch für die chlorierten Substrate soll im Chemostatversuch dem Aspekt der Bilanzierung der Substratverwertung exakter nachgegangen werden. Nachdem sich die Mikroorganismen in der stationären Wachstumsphase befinden, wurden zuletzt 92 % des Kohlenstoffs wiedergefunden. Nach dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase ist kein Ausgangssubstrat im Kulturüberstand analytisch nachzuweisen. Die Chlor-Bilanzierung

ist über den gesamten Kultivierungsverlauf ausgeglichen. Die CTR-Werte des 3CB-Versuches zeigen im Vergleich zu denen der 4MB-Versuche einen unterschiedlichen Verlauf. Unmittelbar nach Substratzudosierung steigt die CTR auf 0,18 g $l^{-1}h^{-1}$ an. Bis zum Zeitpunkt der meßtechnisch erfaßbaren Zunahme der BTM-Konzentration 4 Stunden nach Versuchsbeginn korrelliert der CTR-Wert auf diesem Niveau mit der Biomasse.

Der stagnierende Anfangsverlauf der Biomasse ist im 3CB- und 4CB-Abbau somit nicht auf eine Intermediatakkumulation zurückzuführen, wie die erfüllte Kohlenstoff- und Chlorbilanzen belegen. Vielmehr scheint das Reaktionsgleichgewicht in Richtung gasförmige Produkte (CO_2) verschoben zu sein. Dieses deutet auf eine Beeinflussung durch den Erhaltungsstoffwechsel hin, welcher für die gleichbleibende Biomassenkonzentrationen bis zum Zeitpunkt t=4 h verantwortlich sein könnte. Je nach Stoffwechseltyp und Organismus kann der Erhaltungsstoffwechsel sehr groß sein. Stouthamer & Bettenhausen (1973) haben für *Klebsiella aerogenes* unter anaeroben Bedingungen beim Wachstum auf Glukose einen Maintenance-Bedarf von 3,69 g $g^{-1}h^{-1}$ ermittelt. Energieverbrauchende Prozesse sind neben dem Umsatz von Zellmaterial und der Zellmobilität vor allem osmotische Zellarbeit (Pirt, 1975). In wieweit der Vorgang der Substratapplikation über eine mikrobielle Absterberate die BTM-Konzentration beeinflußt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Da allerdings bei den Versuchen mit großer S_0-Konzentration (z.B. S_0 3CB: 4,3 g l^{-1}) kein Aufschäumen des Mediums beobachtet wurde, und bei den Versuchen mit Schaumbildung mikroskopisch keine Hinweise auf Zellschädigungen auftraten, wird dieser Effekt in den folgenden Ausführungen vernachlässigt.

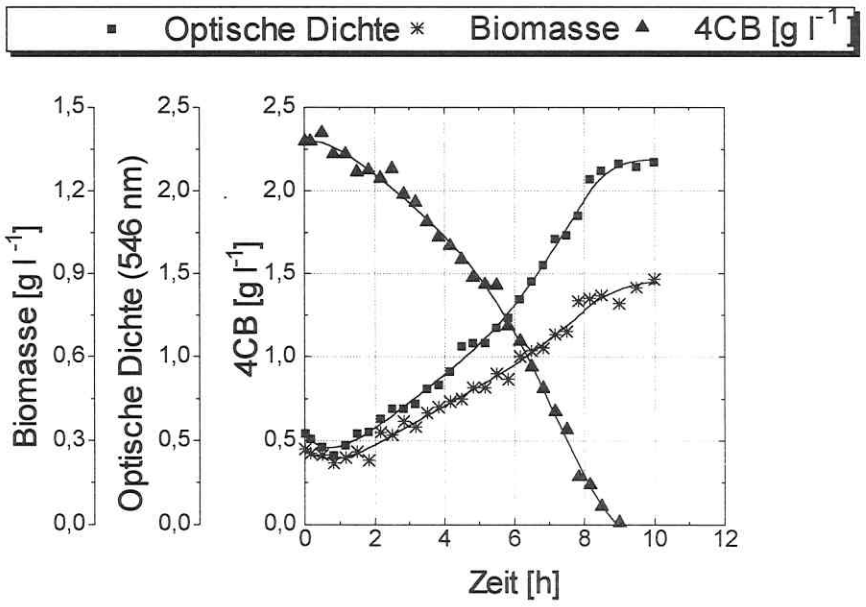


a)

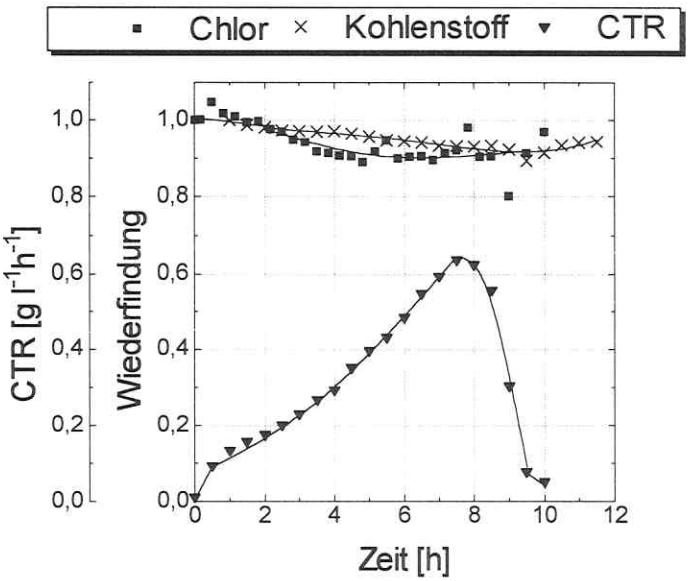


b)

Abb. 13 a+b: Verwertung der 3CB durch SN45P im adjusted batch Versuch. a): Kinetik des Substratumsatzes und Wachstumskurve der Mikroorganismen. b): Wiederfindung der Elemente Kohlenstoff und Chlor sowie Darstellung der CTR.

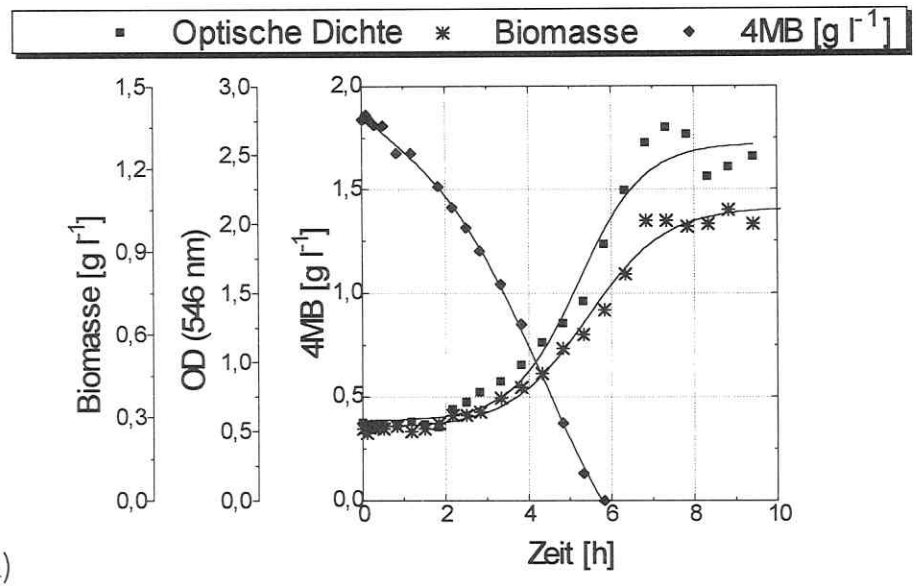


a)

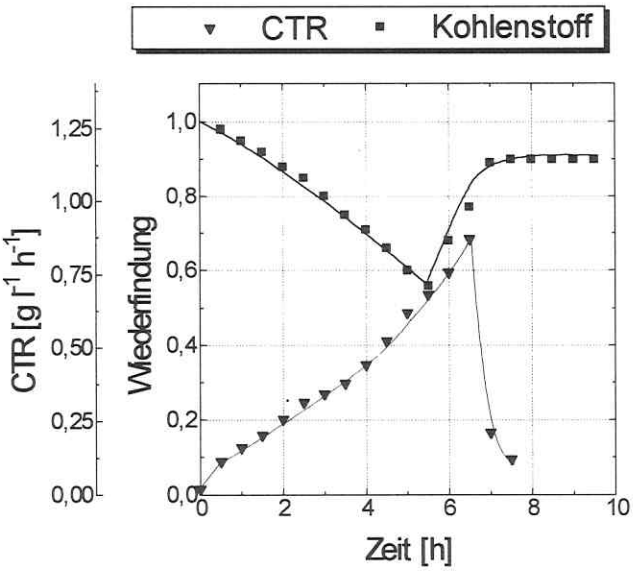


b)

Abb. 14 a+b: Verwertung der 4CB durch SN45P im adjusted batch Versuch. a): Kinetik des Substratumsatzes und Wachstumskurve der Mikroorganismen. b): Wiederfindung der Elemente Kohlenstoff und Chlor sowie Darstellung der CTR.



a)



b)

Abb. 15 a+b: Verwertung von 1,9 g l^{-1} 4MB durch SN45P im adjusted batch Versuch. a): Kinetik der Substratumsetzung und Wachstumskurve der Mikroorganismen. b): Wiederfindung des Elements Kohlenstoff und Darstellung der Kohlendioxidtransferrate.

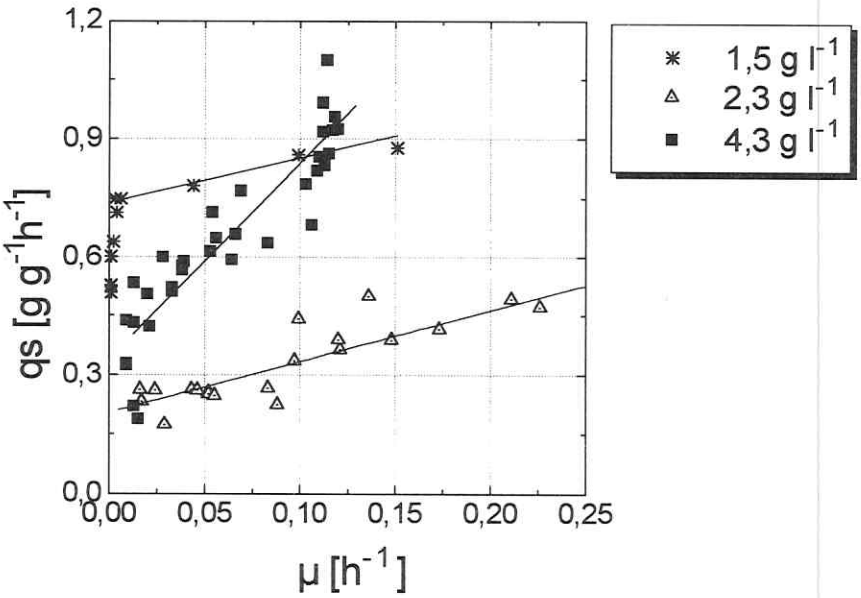


Abb. 16: Darstellung der spezifischen Substratumsatzrate als Funktion der spezifischen Wachstumsrate und Abschätzung von q_{SM}. Ermittelt wurden: S_0=1,5 g l^{-1}: q_{SM}=0,6 g $g^{-1}h^{-1}$; $Y^*_{X/S}$=0,5 g g^{-1}. S_0= 2,3 g l^{-1}: q_{SM}=0,3 g $g^{-1}h^{-1}$; $Y^*_{X/S}$=0,2 g g^{-1}. S_0=4,4 g l^{-1}: q_{SM}=0,3 g $g^{-1}h^{-1}$; $Y^*_{X/S}$=0,5.

Eine Auftragung von q_S über der Wachstumsrate μ ermöglicht eine Abschätzung von q_{SM} (Schnittpunkt mit der Abszisse) und dem wahren Ertragskoeffizienten (Steigung = $1/Y^*_{X/S}$). Die Abb. 16 zeigt die graphische Abschätzung des Maintenance-Bedarfs für 3CB mit den q_S und μ-Meßwerten aus den Kultivierungen mit einer S_0 von von 1.5, 2.3 und 4.3 g l^{-1}. Die Meßwertschwankungen sind in dieser Darstellung aus methodischen Gründen sehr groß, so daß die folgenden Angaben nur eine Größenordnung angeben sollen.

Die q_{SM}-Werte liegen mit 0,3 g $g^{-1}h^{-1}$ (S_0 =2,3 und 4,4 g l^{-1}) bzw. 0,6 g $g^{-1}h^{-1}$ (S_0=1,5 g l^{-1}) für aromatische Substrate sehr hoch. Unterschiedliche wahre Ertragskoeffizienten deuten auf andere oder zusätzliche Mechanismen als den Maintenance-Einfluß hin. Der gekrümmte Verlauf der Daten der Fermentationen mit S_0-Konzentrationen von 1,5- und 2,3 g l^{-1} könnte auf eine Entkopplung der Substratverwertung vom bakteriellen Wachstum zurückzuführen sein. Diese Arbeitshypothese wird in den folgenden Kapiteln bei der

Diskussion des Datenmaterials der Chemostat- und Auswaschversuche überprüft werden.

Der Ertragskoeffizient des 4CB-Experimentes liegt mit $Y_{X/S}$=0,27 g g^{-1} deutlich höher als beim 3CB-Experiment, wo ein Ertragskoeffizient von 0,17 g g^{-1} bestimmt wurde. Erstaunlich ist, daß die $Y_{X/S}$-Werte der 3CB/4CB-Experimente trotz der Substrathomologien deutlich differieren. Dieses Ergebnis ist als weiterer Hinweis dafür zu verwenden, daß im Satz-Versuch neben dem Erhaltungsstoffwechsel weitere Effekte auf die Substratumsatzkinetik einwirken.

2.4. Einfluss der Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit; Dynamik der Substratverwertung im Satzversuch

Von besonderer praktischer Bedeutung ist die Gewährleistung einer stabilen Abbauleistung des biologischen Systems nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen der jeweiligen Benzoesäure(n). Für eine Anwendung in dezentralen Abwasserreinigungsanlagen muß Abbauaktivität des Stammes sowohl für niedrige als auch für hohe Aromatenkonzentrationen sichergestellt sein. Vergleichend dargestellt werden im folgenden die graphisch/rechnerisch ermittelten Datensätze der spezifischen Substratverbrauchsraten (q_S-Werte) als Funktion der Substratkonzentration. Ermittelt wurden diese aus den Abbaukinetiken der zuvor beschriebenen Satzversuche mit Ausgangskonzentrationen von 1,5 bis 30 mmol l^{-1} der jeweiligen Substrate.

2.4.1. Einfluß der 3CB auf die Reaktionsgeschwindigkeit

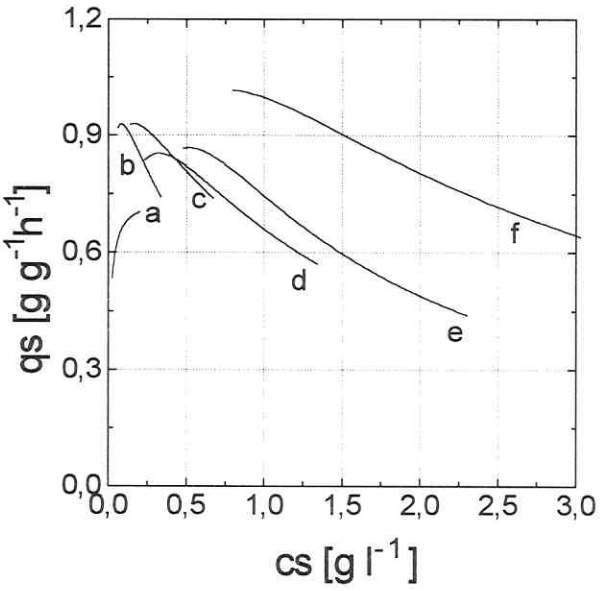


Abb. 17: Übersicht der geglätteten Verläufe der q_S-Werte als Funktion der 3CB-Konzentration. S_0 -Konzentrationen der adjusted batch-Versuche: a) S_0 = 0,22 g l^{-1}; b) S_0 = 0,36 g l^{-1}; c) S_0 = 0,70 g l^{-1}; d) S_0 = 1,46 g l^{-1}; e) S_0 = 2,35 g l^{-1}; f) S_0 = 4,28 g l^{-1}. Die einzelnen Kurvenverläufe mit den Wertepaaren sind in Abb. 59 im Anhang aufgeführt.

Abb. 17 zeigt zusammenfassend die 3CB-Umsetzung durch SN45P in den adjusted batch Experimenten bei steigender S_0-Konzentration anhand der Darstellung der q_S-Werte als Funktion der 3CB-Konzentration. Es zeigt sich, daß der 3CB-Abbau im Satzversuch komplex reguliert wird. In Abhängigkeit von der eingesetzten S_0 unterscheiden sich die Kurvenverläufe der einzelnen Versuche deutlich voneinander. Die q_{Smax}-Daten dagegen liegen ab einer S_0-Konzentration von 0,36 g l^{-1} zwischen 0,85 und 1,0 g $g^{-1}h^{-1}$. Von praktischer Relevanz ist die Beobachtung, daß auch bei hohen S_0-Konzentrationen über weite Bereiche hohe q_S-Werte erreicht werden. Der Kurvenverlauf der Fermentationen mit hohen S_0-Konzentrationen weist über den gesamten aufgetragenen Konzentrationsbereich sogar höhere q_S-Werte auf als die der Versuche mit niedrigeren Ausgangskonzentrationen. In dieser Beobachtung spiegelt sich das bereits diskutierte Phänomen wieder, daß mit zunehmender S_0 die Dauer der lag-Phase der mikrobiellen Wachstumskurven bei gleichzeitig analytisch erfaßbaren Abbauraten zunimmt.

2.4.2. Einfluß der 4CB auf die Reaktionsgeschwindigkeit

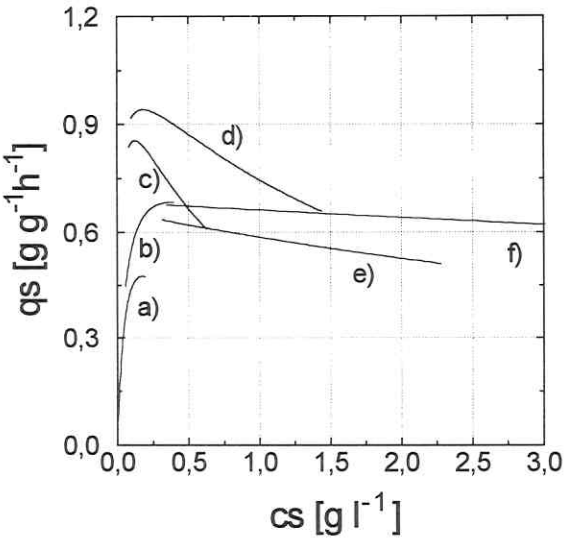


Abb. 18: Übersicht der geglätteten Verläufe der q_S-Werte als Funktion der 4CB-Konzentration. S_0 -Konzentrationen der adjusted batch-Versuche: a) S_0 = 0,21 g l^{-1}; b) S_0 = 0,40 g l^{-1}; c) S_0 = 0,71 g l^{-1}; d) S_0 = 1,65 g l^{-1}; e) S_0 = 2,33 g l^{-1}; f) S_0 = 4,68 g l^{-1}. Die einzelnen Kurvenverläufe mit den Wertepaaren sind in Abb. 60 im Anhang aufgeführt.

Anhand der unterschiedlichen Kurvenverläufe in Abb. 18 wird deutlich, daß auch hier eine komplexe Regulation der Benzoesäureverwertung bei adjusted batch Kultivierung vorliegt. Die Kurvenverläufe können nicht mit einfachen Inhibierungskinetiken beschrieben werden. Es unterscheiden sich die q_{Smax}-Werte als auch die Kurvenverläufe an sich. Die q_{Smax}-Werte durchlaufen ein Maximum; bei hohen 4CB-S_0-Konzentrationen nimmt q_{Smax} deutlich von 0,9 g $g^{-1}h^{-1}$ auf durchschnittlich 0,65 g $g^{-1}h^{-1}$ ab. Dieses könnte auf die Bildung eines zellinternen Intermediates zurückzuführen sein, welches z.B. nichtkompetitiv z.B. auf den Enzym-Substrat-Komplex einwirkt.

2.4.3. Einfluß der 4MB auf die Reaktionsgeschwindigkeit

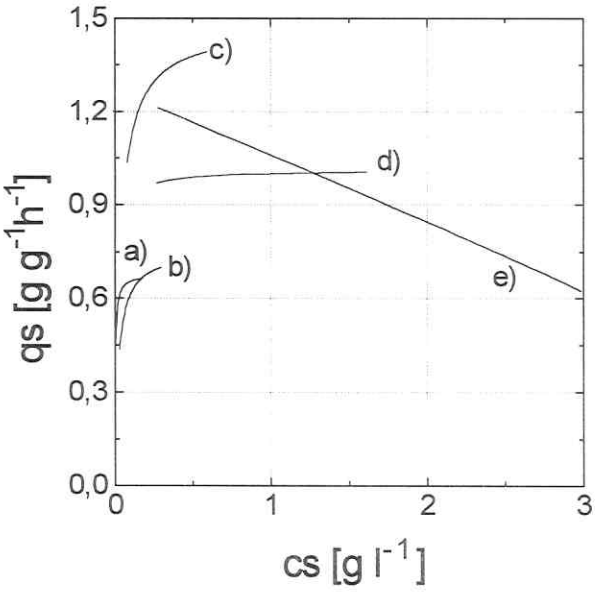


Abb. 19: Übersicht der geglätteten Verläufe der q_S-Werte als Funktion der 4MB-Konzentration. S_0 -Konzentrationen der adjusted batch-Versuche: a) S_0 = 0,19 g l^{-1}; b) S_0 = 0,32 g l^{-1}; c) S_0 = 0,65 g l^{-1}; d) S_0 = 1,85 g l^{-1}; e) S_0 = 3,65 g l^{-1}. Die einzelnen Kurvenverläufe mit den Wertepaaren sind in Abb. 61 im Anhang aufgeführt.

Die Kurvenverläufe in Abb. 19 zeigen, daß auch bei der 4MB-Verwertung eine komplexe Inhibierungskinetik vorliegt. Die Kurvenverläufe der Versuche mit Ausgangskonzentrationen von 0,19 bis 0,65 g l^{-1} nähern sich asympotisch einem Maximalwert. Bei weiterer Erhöhung der S_0 wird q_{Smax} erreicht. Die größten spezifischen Wachstumsraten wurden mit q_{Smax}=1,40 g g^{-1} h^{-1} bei einer S_0 von 0,60 g l^{-1} bestimmt. Bei weiterer Erhöhung der S_0-Konzentration nimmt q_{Smax} ab, so daß auch hier die die spezifischen Raten ein Maximum durchlaufen.

Es scheint somit charakteristisch für die Benzoesäureverwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch zu sein, daß bei einer Erhöhung der S_0-Konzentrationen q_{Smax} zunächst ansteigt. Dieses Phänomen ist bei der 4MB-Verwertung am evidentesten ausgeprägt.

Die Abnahme der q_{Smax}-Werte bei weiterer Erhöhung der 4CB und 4MB Ausgangskonzentrationen kann über eine Inhibierung durch Bildung zellinterner Metabolite zustande kommen. Mit zunehmender S_0 erhöht sich die Konzentration eines Inhibitors, welcher mit dem Substrat, dem Enzym-Substratkomplex oder einem Abbauprodukt des Substrates um eine Bindungsstelle eines katabolen Enzymes konkurriert.

Die adjusted batch Versuche haben gezeigt, daß im gesamten getesteten Konzentrationsbereich das Ausgangssubstrat nach Applikation der Benzoesäuren volumetrisch umgesetzt wird. Auch hohe S_0-Konzentrationen werden mit großen spezifischen Umsatzraten transformiert. Die Abbaukinetiken von chlorierten und methylierten Benzoesäuren sind im adjusted batch System komplex reguliert. Aus Zeitgründen konnten die adjusted batch Experimente nicht durch ein erweitertes Analysenprogramm ergänzt werden, in dem gezielt nach möglichen intra- und extrazellulären Metaboliten gesucht wird.

3. Kontinuierliche Kultivierung

Ziel der kontinuierlichen Kultivierung war die Überprüfung der genetischen Stabilität der Abbausequenzen sowie deren Regulation, Untersuchungen auf vollständigen Substratumsatz und die Ermittlung stammspezifischer Abbauparameter von SN45P. Dazu wurde der GEM über einen Zeitraum von 2500 Stunden kontinuierlich auf den Substraten 3CB, 4MB und 4CB kultiviert. In einem weiteren Chemostatversuch über 1400 Stunden wurde SN45P auf einem Substratgemisch auf 3CB, 4CB und 4MB bei verschiedenen Verdünnungsraten untersucht.

3.1. Langzeituntersuchungen zur genetischen Stabilität der Abbausequenzen

Abb. 20 gibt eine Übersicht über einen Chemostatversuch mit den drei Benzoesäuren, die jeweils als Monosubstrat als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zudosiert wurden. Zur Verdeutlichung der untersuchten Gleichgewichtszustände ist neben der Biomasse die Verdünnungsrate D und die Kohlendioxid-Transferrate (CTR) aufgetragen. Über einen Zeitraum von 500 Stunden (118 Generationen) wurden mehrere Verdünnungsraten mit 3CB als Kohlenstoff- und Energiequelle eingestellt und die Gleichgewichtszustände vermessen. Der Substratwechsel von der 3CB auf die 4MB wurde zunächst bei einer Verdünnungsrate von $D=0{,}09\ h^{-1}$ durchgeführt. Da dieses zu einer Abnahme der Biomasse von 0,85 g l^{-1} auf 0,55 g l^{-1} führte, wurde die Verdünnungsrate für 24 h auf $D=0{,}05\ h^{-1}$ herabgesetzt, woraufhin sich ein Gleichgewichtszustand einstellte. Zu erklären sind diese anfänglichen Schwierigkeiten mit Induktionsvorgängen der hierfür benötigten Enzymsysteme. In der Folge wurde der Stamm für 770 Stunden (313 Generationen) mit verschiedenen Verdünnungsraten auf 4MB kultiviert. Der Wechsel von 4MB auf 4CB wurde bei $D=0{,}09\ h^{-1}$ durchgeführt und verlief unproblematisch. Auf diesem Substrat wurde der GEM 1110 Stunden (252 Generationen) kultiviert.

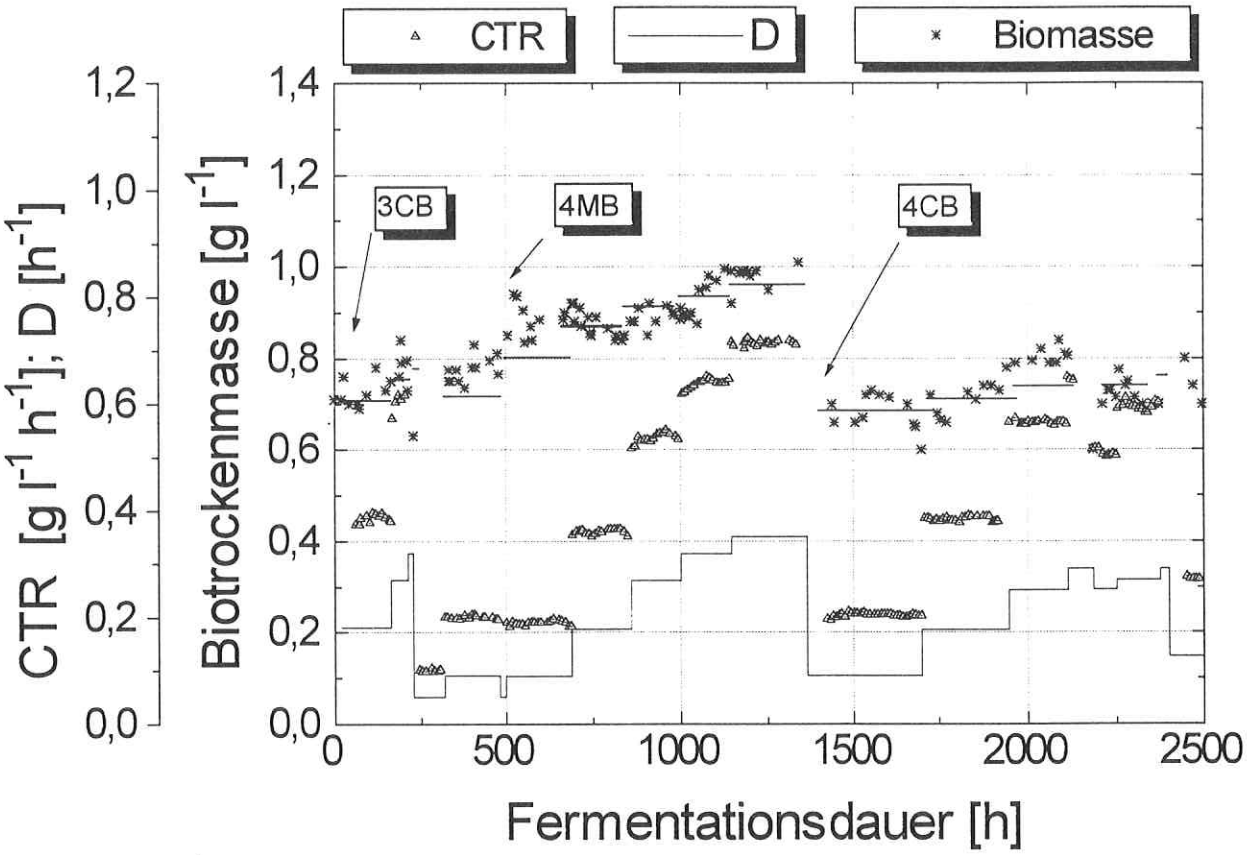


Abb. 20: Stabilität der Abbausequenzen von *Pseudomonas spec.* B13 FR1(SN45P) über einen Kultivierungszeitraum von 2500 Stunden (680 Generationen) im Chemostatversuch; die Substrate 3CB, 4MB und 4CB wurden nacheinander als Einzelsubstrat zudosiert. Die Ausgleichsgeraden der Biomassenkonzentration wurden mit einer Simulationsrechnung nach Pirt (Gleichung 39) bestimmt.

Aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe der 4MB nimmt die Biomasse beim Wechsel von der 3CB auf 4MB zu. Im Gegensatz zu den chlorierten Substraten, wo durch Destabilisierung des aromatischen Systems eine spontane Chlorid-Abspaltung ermöglicht wird und die zentrale "Abbaustrategie" der ortho-Abbausequenzen darstellt, stellt bei der 4MB die Methylgruppe einen zusätzlichen Energiegewinn dar und wird energetisch verwertet. Nach Wechsel auf das Substrat 4CB nimmt die Biomasse aus den dargestellten Gründen wieder ab.

Die Kultivierung des GEM über einen Zeitraum von 2500 Stunden (680 Generationen) belegt, daß die Abbausequenzen sowie deren Regulation stabil sind. Während der gesamten Kultivierungszeit erwies sich der GEM als ein unproblematisch zu kultivierender Stamm; zu keinem Zeitpunkt traten wie bei den adjusted batch ein Aufschäumen der Fermentationsbrühe auf. Anfängliche Kultivierungsprobleme durch Oxidation von $Eisen^{2+}$-Ionen, was sich in Instabilitäten der Biomassenkonzentration wiederspiegelte, wurden durch Verwendung eines Komplexbildners (EDTA) vermieden. Bei allen untersuchten steady-states war kein Substrat im Kulturüberstand analytisch nachzuweisen. Diese Tatsache und die Beobachtung, daß auch die Zellmorphologie auf einen guten physiologischen Zustand des GEM hinweist (hohe Zellmobilität, stäbchenförmiger Habitus) unterstützen die Aussagen über die Funktionabilität der Abbausequenzen und deren Regulation.

3.2. Bilanzierung der Verwertung von 3CB, 4CB und 4MB

Ein weiteres Anliegen dieser Versuchsserie war die Bilanzierung des Abbaus der Xenobiotika, um einer möglichen Akkumulation von unbekannten dead-end Metaboliten nachzugehen. Mit der HPLC-Analytik wurden bei den adjusted batch-Kultivierungen unter Standartlaufbedingungen in den ersten zwei Minuten der jeweiligen Läufe mehrere Peaks mit im Vergleich zu den Referenzsubstanzen kleinen Peakflächen detektiert. Bei kontinuierlicher Kultivierung wurde eine Abhängigkeit der Peakflächen von der Verdünnungsrate beobachtet. Keiner der Peaks konnte den Metaboliten 3-Chlorbrenzkatechin,

4-Chlorbrenzkatechin, 3-Methylbrenzkatechin, 4-Methylbrenzkatechin und 2-Chlormukonsäure, welche als Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, zugeordnet werden.

Da die chemische Zusammensetzung dieser Komponenten nicht bekannt war, wurde eine Massenbilanz der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Chlor (bei den chlorierten Substraten) durchgeführt. Sie sollte überprüfen, in wieweit die Quantität der Metaboliten die Massenbilanzen beeinflußt. Als Edukte wurden die substituierten Benzoesäuren, Stickstoff und Sauerstoff, als Produkte Biomasse, Kohlendioxid und Chlor angenommen und in der Bilanzgleichung (Gleichung 20-24) eingesetzt. Die Bildung von Reaktionswasser wurde nicht berücksichtigt. In Tab. 7 sind die Ergebnisse dieser Bilanzierungen aufgeführt.

Die Massenbilanzen der Elemente Kohlenstoff, Chlor und Stickstoff zeigen bei allen drei Substraten eine im Rahmen der Meßgenauigkeit vollständige Wiederfindung der Elemente. Wasserstoff und Sauerstoff zeigen mit dem Substrat 4MB einen deutlichen Massendefekt mit einer 53 %-igen Wasserstoff und einer 87 %-igen Sauerstoffwiederfindung. Dieses deutet auf die Bildung von Reaktionswasser hin und wird durch Aufstellung von Reaktionsgleichungen im folgenden Kapitel überprüft. An dieser Stelle soll jedoch angemerkt werden, daß die Kohlenstoffbilanzierung unter den gewählten Versuchsbedingungen mit Unsicherheiten behaftet ist. Hauptgrund hierfür war eine mit Literaturwerten (Roels, 1983) nur abgeschätzte Zusammensetzung der Biomasse. Aufgrund rechtlicher Vorlagen war im Rahmen des Gentechnikgesetzes kein Versand der Mikroorganismen zu entsprechenden Institutionen mit dem Ziele der Elementaranalyse möglich, so daß mit den Literaturdaten gearbeitet wurde.

Tab.7: Bilanzen der Chemostatversuche über die Elemente Kohlenstoff, Chlor, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff (av=avarage value); die mit "*" markierten Werte stammen nicht aus dem in Abb. 20 dargestellten Versuch.

D [h^{-1}]	**Substrat**	**C_{rec}**	**Cl_{rec}**	**N_{rec}**	**O_{rec}**	**H_{rec}**
0,093*	3CB	1,00	0,94	1,06	0,96	0,97
0,182*	3CB	1,01	(1,17)	1,01	1,00	0,95
0,175	3CB	1,06	1,04	0,94	1,01	0,89
0,267	3CB	1,12	1,10	0,98	1,02	0,97
0,088	3CB	1,10	1,09	0,89	0,94	0,87
av		1,07	1,04	0,97	0,99	0,93
(sdev)		(0,04)	(0,07)	(0,07)	(0,03)	(0,04)
0,09	4CB	1,09	1,06	0,96	1,00	0,88
0,13	4CB	1,06	1,07	1,02	0,97	0,95
0,18	4CB	1,06	1,00	1,10	1,03	1,01
0,25	4CB	1,00	0,94	1,00	0,98	0,91
0,27	4CB	1,02	0,96	1,04	1,07	0,98
0,29	4CB	1,04	0,99	1,02	1,05	0,95
av		1,05	1,00	1,02	1,01	0,95
(sdev)		(0,03)	(0,05)	(0,05)	(0,04)	(0,05)
0,09	4MB	0,98	-	0,96	0,83	0,61
0,18	4MB	0,99	-	0,92	0,86	0,38
0,27	4MB	0,98	-	1,02	0,86	0,46
0,32	4MB	1,02	-	1,09	0,88	0,55
0,35	4MB	1,04	-	1,03	0,89	0,64
av		1,00	-	1,01	0,87	0,53
(sdev)		(0,03)		(0,07)	(0,02)	(0,11)

Die Massenbilanzen geben somit keinen Hinweis auf eine mengenmäßig relevante Bildung von Intermediaten. Um auch qualitativ eine Aussage über das Peakmuster innerhalb der ersten zwei Minuten der HPLC -Läufe treffen zu können, wurde eine Isolation eines der Komponenten mit anschließender Strukturaufklärung durchgeführt. Dazu wurden zunächst während der kontinuierlichen 4MB-Kultivierung bei einer Verdünnungsrate von D=0,35 h^{-1} vier Liter der Fermentationsbrühe aufgefangen und abzentrifugiert. Der farblose Überstand wurde aus Sicherheitsgründen vor Aufhebung der Sterilschranke mit einer Laborfiltrationseinheit (FILTRON) mit 0,2 μm-Filtermodulen sterilfiltriert. Nach der im Methodenteil beschriebenen Prozedur wurden Kristalle in einer öligen Komponente erhalten. Die Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 113,5 bis 115 °C. Nach Aufreinigung dieser Kristalle wurden diese im Massenspektrometer untersucht. Ein Peak mit höchster Masse von 156 wurde gefunden. Das Massenspektrum ist im Anhang (Abb. 62) ausgewertet und abgebildet. Dieses Molekulargewicht entspricht einer Summenformel von $C_7H_8O_4$. Bezieht man diese Informationen auf die im postulierten Abbauweg existierenden Verbindungen, so könnte es sich bei diesen Substanzen um die Verbindungen 4-Methyl-2-enlakton und 3-Methyl-2-enlakton handeln. Zur weiteren Strukturaufklärung wurde deshalb eine NMR-Analyse durchgeführt. Ergebnis eines Protonenspektrums bestätigte die Laktonhypothese (Auswertung und Darstellung: Abb. 63; Anhang). Im Kohlenstoffspektrum wurde die Existenz von 3-Methyl-2-Enlakton nachgewiesen. Im Gleichgewichtszustand konnten bei einer Verdünnungsrate von 0,35 h^{-1} mit der HPLC-Analytik eine Enlaktonkonzentration von 0,03 g l^{-1} ermittelt werden. Das verbleibende "Öl" stellt ein Gemisch von weiteren 10 Einzelkomponenten dar, die aufgrund zu geringer Mengen nicht weiter aufgereinigt wurden.

3.3. Reaktionsgleichungen für die Substrate 3CB, 4CB und 4MB

Das Aufstellen der Reaktionsgleichungen erlaubt die Überprüfung der experimentell ermittelten Daten. Bei der Aufstellung der Gleichungssysteme wurde der experimentell ermittelte Ertragskoeffizient sowie die Bildung von Reaktionswasser berücksichtigt. Für die monochlorierten Substrate wurde der experimentell ermittelte $Y_{X/S}$ von 0,47 g g^{-1}

und für die 4MB ein $Y_{X/S}$ von 0,70 g g^{-1} eingesetzt. Eine konstante chemische Zusammensetzung der Mikroorganismen bei einem Ascheanteil von 7,5 % wird vorausgesetzt. Folgende Reaktionsgleichung wird vorgeschlagen:

(37)

$$C_7H_5O_2Cl + 4{,}117\ O_2 + 0{,}620\ NH_3 \rightarrow 2{,}7\ CH_2O_{0{,}52}N_{0{,}23} + 4{,}3\ CO_2 + HCl + 0{,}23\ H_2O$$

Für 3CB und 4CB ergaben die Massenbilanzen des Elementes Wasserstoff eine durchschnittliche Wiederfindung von 93 % (3CB) und 95 % (4CB). Dieses läßt auf die Bildung von Reaktionswasser schließen. Der Vergleich der experimentell ermittelten Yields für Wachstumsraten größer als 0,15 h^{-1} mit den berechneten Yields zeigt Tab. 8. Die Yields für die kleineren Verdünnungsraten wurden wegen der vergleichsweise starken Beeinflussung durch den Erhaltungsstoffwechsel bei der folgenden Mittelwertdarstellung vernachlässigt.

Tab.8: Vergleich der theoretischen (stöchiometrisch berechneten) mit den experimentell bestimmten Yields (für D>0,15 h^{-1}).

	3CB-theor.	**3CB-exp.**	**4CB-theor.**	**4CB-exp.**
$Y_{X/S}$	-	0,47	-	0,47
$Y_{CO2/S}$	1,21	1,36	1,21	1,27
$Y_{O2/S}$	0,84	0,91	0,84	0,84
$Y_{X/CO2}$	0,39	0,35	0,39	0,38
$Y_{X/O2}$	0,56	0,52	0,56	0,57
RQ	1,04	1,05	1,04	1,08

Die Massenbilanzen zur Überprüfung der 4MB-Verwertung weisen auf eine stärkere Bildung von Reaktionswasser hin als wie beim 3CB und 4CB-Abbau beschrieben. Es wurden durchschnittlich 53 % des Wasserstoffs und 87 % des Sauerstoffs wiedergefunden. Für den Abbau der 4MB wird folgende Reaktionsgleichung vorgeschlagen:

(38)

$$C_8H_8O_2 + 5{,}299\ O_2 + 0{,}797\ NH_3 \rightarrow 3{,}467\ CH_2O_{0{,}52}N_{0{,}23} + 4{,}533\ CO_2 + 1{,}729\ H_2O$$

Die theoretische Wasserstoffbilanz ohne Berücksichtigung der Reaktionswasserbildung läßt sich aus der Reaktionsgleichung mit 66,7 % errechnen. Experimentell wurden 53 % des Wasserstoffs wiedergefunden.

Die rechnerische Sauerstoffbilanz (ohne Reaktionswasser) beträgt 87%, was die Experimente bestätigten. Der Vergleich der experimentell ermittelten Koeffizienten (Tab. 9) mit den theoretisch errechneten Daten zeigt eine Übereinstimmung der Daten und bestätigt somit die experimentellen Ergebnisse. Die RQ-Werte liegen mit 0,86 in dem Bereich, der auch von anderen Autoren für aromatische Systeme ermittelt wurde (Jones et al., 1973; Miethling et al., 1993).

Tab.9: Vergleich der theoretischen (stöchiometrisch berechneten) mit den experimentell bestimmten Koeffizienten für das Substrat 4MB (für D>0,27 h^{-1}).

	4MB -theor.	**4MB -exp.**
$Y_{X/S}$	-	0,70
$Y_{CO2/S}$	1,47	1,46
$Y_{O2/S}$	1,25	1,30
$Y_{X/CO2}$	0,48	0,49
$Y_{X/O2}$	0,56	0,59
RQ	0,86	0,86

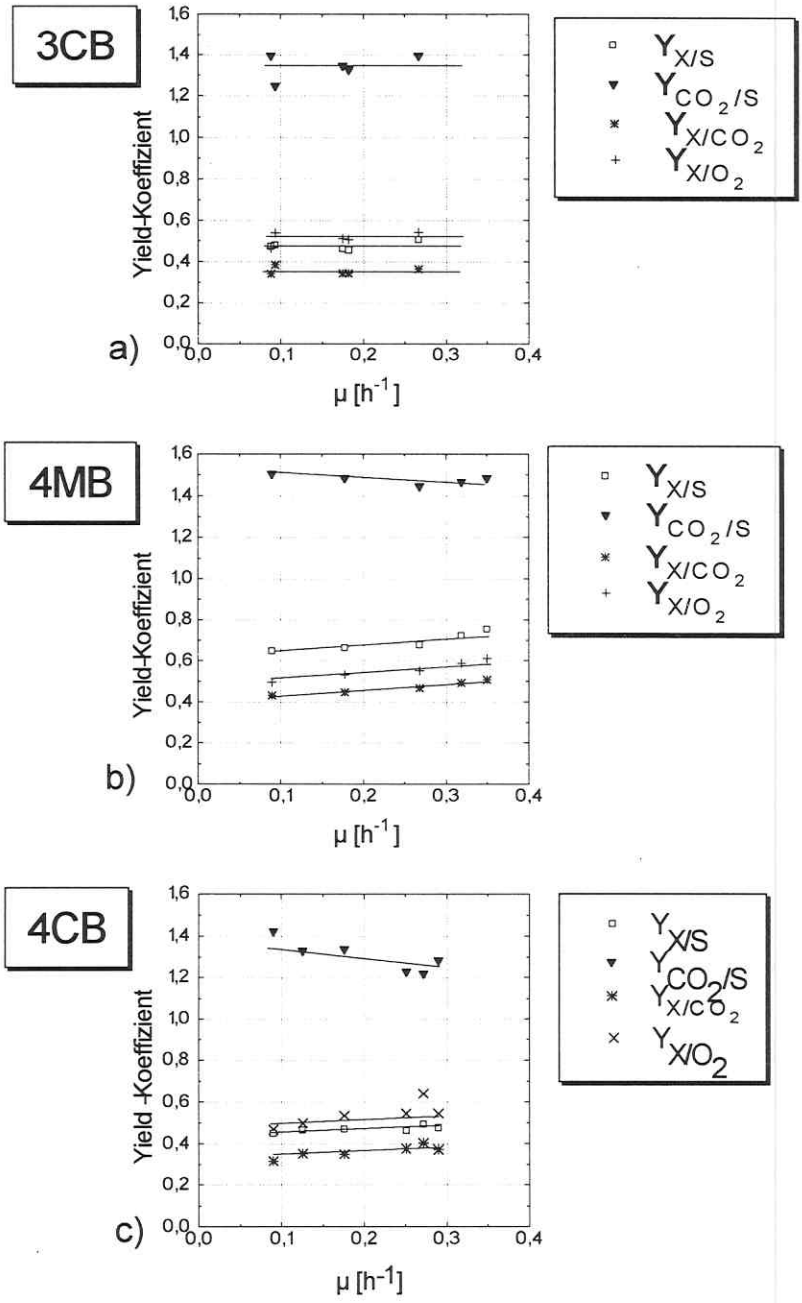


Abb. 21: Vergleichende Darstellung der Yield-Koeffizienten aus den Chemostatversuchen nach Kultivierung mit a) 3CB, b) 4MB und c) 4CB.

3.4. Spezifische Raten und Erhaltungsstoffwechsel

Die Yield-Koeffizienten $Y_{X/O2}$, $Y_{X/CO2}$ und $Y_{X/S}$ in Abb. 21 liegen im 4MB und 4CB-Experiment bei niedrigen Verdünnungsraten unterhalb der Mittelwerte. Der $Y_{CO2/S}$ liegt oberhalb der Mittelwerte. Dieses Phänomen ist auf den Einfluß des Erhaltungsstoffwechsels zurückzuführen. Bei niedrigen Verdünnungsraten wird ein größerer Anteil des Ausgangssubstrates für den Erhaltungsstoffwechsels genutzt; das Verhältnis der Endprodukte der Reaktion ist zu den gasförmigen Produkten verschoben.

In Abb. 22 sind die spezifischen Raten q_S, q_{CO2}, und q_O als Funktion der Wachstumsrate aufgetragen. Die spezifischen Raten steigen bei den untersuchten Verdünnungsraten linear mit der Wachstumsrate an. Der aus den Meßwerten der Abb. 22 bestimmte Maintenance Bedarf von SN45P liegt mit 0,02 g $g^{-1}h^{-1}$ (0,13 mmol g^{-1} h^{-1}) für die chlorierten Benzoesäuren und 0,04 g $g^{-1}h^{-1}$ (0,29 mmol $g^{-1}h^{-1}$) für die 4MB im Vergleich zu Literaturdaten relativ hoch. Miethling et al. (1994) ermittelten für den mikrobiellen Chinolinabbau mit *Comamonas acidovorans* einen q_{SM} von 0,011 mmol $g^{-1}h^{-1}$, Yang und Humphrey (1975) bestimmten für den Phenolabbau mit *Pseudomonas putida* einen q_{SM} von 0,0003 mmol $g^{-1}h^{-1}$. Der q_{SM} liegt deutlich unterhalb der Werte, die die Ergebnisse der adjusted batch Versuche hinsichtlich des Phänomens der gleichbleibenden BTM-Konzentration nach Applikation von 3CB, 4CB erklären würden (vgl. Abb. 16).

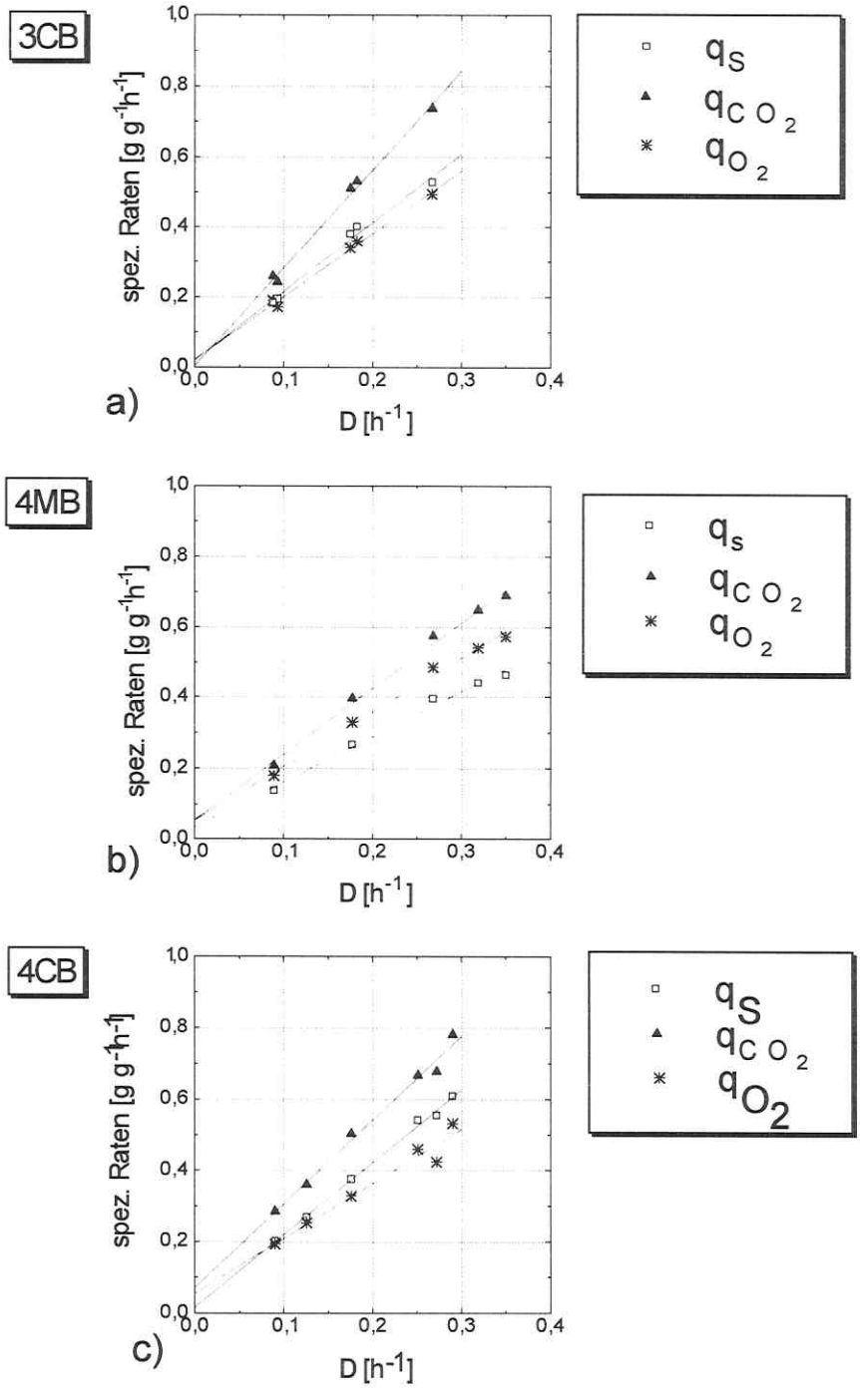


Abb. 22: Vergleichende Darstellung der experimentell ermittelten spezifischen Raten als Funktion von D für die Substrate a) 3CB, b) 4MB, und c) 4CB.

Tab. 10: Spezifische Raten und $Y^*_{X/S}$ der kontinuierlichen Kultivierung von SN45P jeweils auf 3CB, 4CB und 4MB.

Substrat	ai	q_{aiM} [g $g^{-1}h^{-1}$]	$Y^*_{X/ai}$ [g g^{-1}]	r
3CB	S	0,02	0,51	0,993
	O_2	0,02	0,56	0,996
	CO_2	0,01	0,36	0,996
4MB	S	0,04	0,79	0,995
	O_2	0,06	0,66	0,994
	CO_2	0,06	0,54	0,996
4CB	S	0,02	0,49	0,998
	O_2	0,06	0,65	0,984
	CO_2	0,07	0,43	0,999

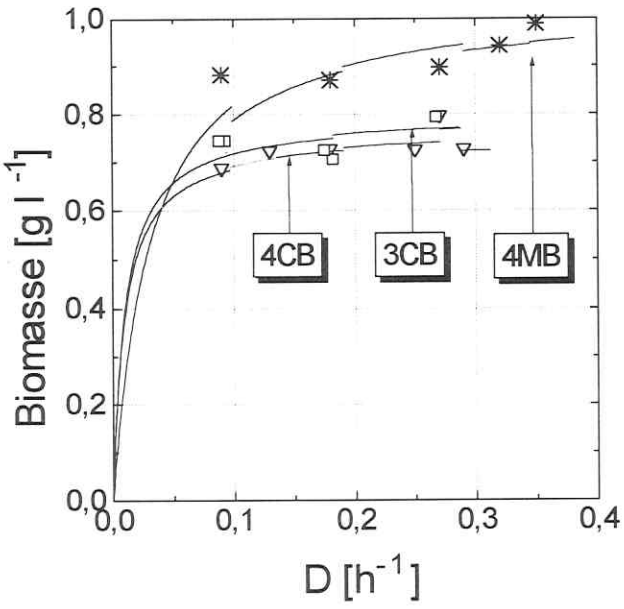


Abb. 23: Simulation der Verläufe der BTM* als Funktion der Verdünnungsrate nach den in Tab. 11 dargestellten Parametern. Die Symbole stellen die empirisch bestimmten Datenpunkte dar, der Kurvenverlauf wurde mit einer Simulationsrechnung mit den Parametern in Tab. 11 bestimmt. Die unterbrochenen Kurvenverläufe sind auf die Berücksichtigung von Schwankungen der Ausgangskonzentration bedingt durch unterschiedliche Autoklavierzeiten der Vorratstanks zurückzuführen.

Tab. 11: Parameter für die Simulationsrechnung zur Beschreibung der BTM* im Abb. 23.

Substrat	D [h^{-1}]	S_0 [g l^{-1}]	$Y_{X/S}$*
3CB	0,093	1,55	0,51
3CB	0,182	1,55	0,51
3CB	0,175	1,57	0,51
3CB	0,267	1,57	0,51
3CB	0,088	1,57	0,51
4MB	0,09	1,36	0,79
4MB	0,18	1,31	0,79
4MB	0,27	1,33	0,79
4MB	0,32	1,31	0,79
4MB	0,35	1,31	0,79
4CB	0,09	1,53	0,49
4CB	0,13	1,55	0,49
4CB	0,18	1,55	0,49
4CB	0,25	1,57	0,49
4CB	0,27	1,62	0,49
4CB	0,29	1,52	0,49

Abb. 20 zeigt in der Fermentationsübersicht relativ hohe Meßwertschwankungen der BTM*. Deshalb wurde in einer Simulationsrechnung die empirischen mit den berechneteten Biomassekonzentrationen bei Auftragung der BTM*-Konzentration über der Verdünnungsrate verglichen. Nach Pirt (1975) kann im Gleichgewichtszustand die BTM*-Konzentration mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$BTM^* = \frac{D\ Y^*_{X/S}\ (S_0 - S)}{(D + q_{SM}\ Y_{X/S}^*)} \qquad \textbf{(39)}$$

Abb. 23 zeigt den simulierten Verlauf der BTM* als Funktion von D. Der unterbrochene Verlauf der Graphen ist auf unterschiedliche S_0-Konzentrationen im Vorratstank zurück-

zuführen. Verursacht wurden diese durch unterschiedliche Autoklavierzeiten, wodurch eine Aufkonzentrierung des Mediums aufgetreten ist. Mit den durch die Simulationsrechnung bestimmten Biomassenkonzentrationen lassen sich die gemessenen Werte über alle vermessenen Verdünnungsraten beschreiben und bestätigen die experimentellen Ergebnisse.

3.5. Simultanabbau eines Gemisches aus 3CB, 4CB und 4MB in kontinuierlicher Kultivierung

Ziel dieses Chemostatversuches war die Überprüfung, Bilanzierung und Charakterisierung des Abbauverhaltens des GEM bei Zudosierung eines in der Summe 10 mmolaren Gemisches aus 3CB, 4CB und 4MB bei unterschiedlichen Verweilzeiten. Unter praktischen Gesichtspunkten ist neben der Stabilität der Abbausequenzen vor allem die Vollständigkeit der Substratumsetzung von Interesse. Es war somit zu klären, ob unter diesen Kultivierungsbedingungen alle drei Benzoesäuren simultan umgesetzt werden, oder ob durch unterschiedliche Affinitäten bestimmte Substrate bevorzugt transformiert werden. Es wurde im gleichen Konzentrationsbereich gearbeitet wie bei Kultivierung auf den Einzelsubstraten. Die NaCl-Konzentration des Mediums wurde um 50 Prozent auf 0,25 g l^{-1} minimiert, um den Chlorid-Blindwert des Mediums herabzusetzen und eine Verbesserung der Testgenauigkeit des photometrischen Chlorid-Nachweises zu erreichen.

3.5.1. Ergebnisse im Chemostatversuch

In den ersten 400 h des Chemostatversuches (Abb. 24) konnte SN45P nicht im steady-state kultiviert werden. Unter Standartbedingungen führte die Kultivierung bei einer Verdünnungsrate von 0,08 h^{-1} zum Auswaschen des Stammes. Um einen limitierenden Einfluß von möglicherweise oxidierten Eisenkomponenten der Spurenelementlösung auszuschließen, wurde bei einer Verdünnungsrate von 0,03 h^{-1} nach 160 h nochmals

frische Spurenelementlösung zugegeben, was jedoch ohne Auswirkung auf Einstellung eines Gleichgewichtzustandes blieb. Nach 165 h wurde die kontinuierliche Substratzudosierung beendet und diskontinuierlich 5 mmol l^{-1} Substratgemisch zudosiert. Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde bei D = 0,03 h^{-1} erneut auf kontinuierliche Kultivierung umgeschalten, was wiederum zum Auswaschen des Stammes führte. Nach 371 h wurde die Konzentration von NaCl auf 0,5 g l^{-1} erhöht. Wie die Abb. 24 zeigt, war die NaCl-Konzentration offensichtlich verantwortlich für die Instabilität des biologischen Systems. Nach dieser Konzentrationserhöhung war ohne weitere Maßnahmen eine Zunahme der Biomasse zu verzeichnen. Der weitere Verlauf der Biomasse-Meßdaten macht deutlich, daß diese von der gewählten Verdünnungsrate beeinflußt wird.

Trotz großer Streuung der Meßwerte wird erkennbar, daß sich bei weiterer Erhöhung von D die Biomasse auf die veränderten Verweilzeiten mit einem neuen Gleichgewicht einstellt. Die Abb. 26 b verdeutlicht dieses anhand der Darstellung der Koeffizienten als Funktion von D. Das Substratgemisch wird bei abnehmender Verdünnungsrate weniger effektiv für das mikrobielle Wachstum verwertet, was auch hier auf eine Beeinflussung durch den Erhaltungsstoffwechsel hinweist. Die Simulationsrechnung (Kurvenverlauf dargestellt in Abb. 25) bestätigt den Verlauf der experimentellen Daten. Die Abb. 26 a zeigt den Verlauf der spezifischen Raten q_S, q_{O2} und q_{CO2} als Funktion der Verdünnungsrate. Über die Geradengleichungen konnten nach Gleichung 17 die Maintenance-Anteile errechnet werden (vgl. Tab. 12).

Tab. 12: Darstellung der Maintenance-korrigierten spezifischen Raten und Koeffizienten

Substrat	**ai**	q_{ai} [g $g^{-1}h^{-1}$]	q_{aiM} [g $g^{-1}h^{-1}$]	$Y^*_{X/ai}$ [g g^{-1}]	**r**
3CB/4CB/	S	q_S	0,043	0,44	0,994
4MB	O_2	q_{O2}	0,045	0,36	0,991
	CO_2	q_{CO2}	0,093	0,32	0,987

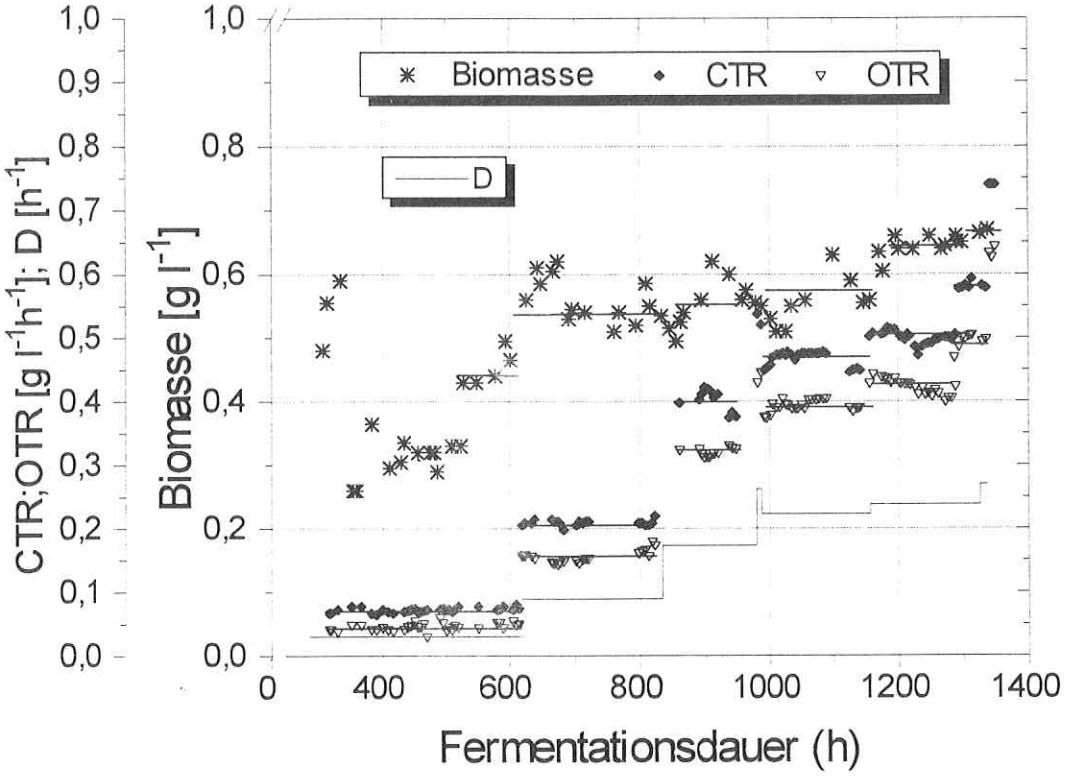


Abb. 24: Stabilität der Abbausequenzen von SN45P im Chemostatversuch über einen Kultivierungszeitraum von 1350 Stunden. Der Anstieg der BTM mit zunehmender Verdünnungsrate deutet auf eine Beeinflussung durch den Erhaltungsstoffwechsel hin.

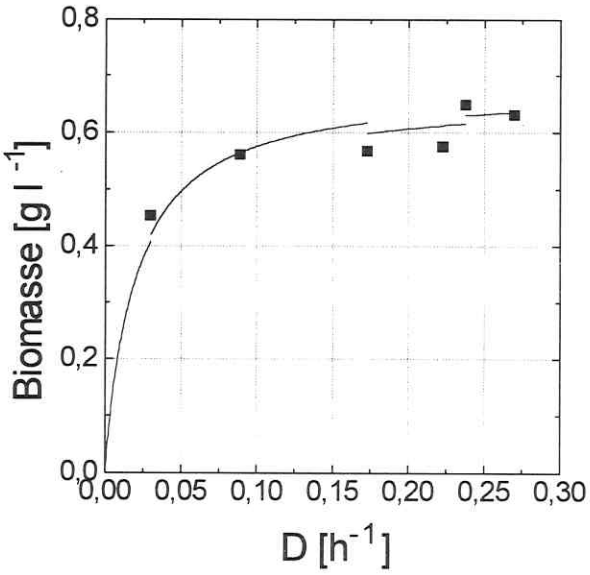


Abb. 25: Simulation der Verläufe von BTM* als Funktion der Verdünnungsrate. Die Symbole stellen die gemittelten BTM*-Konzentrationen der untersuchten Verdünnungsraten dar, die Graphen die simulierten Kurvenverläufe mit den Parametern aus Tab. 13. Die unterbrochenen Kurvenverläufe sind auf Schwankungen der Ausgangskonzentration der Benzoesäuren in den Vorratsgefäßen, hervorgerufen durch unterschiedliche Autoklavierzeiten, zurückzuführen.

Die Werte für q_{O2} und q_{CO2} liegen in der gleichen Größenordnung wie die spezifischen Raten der Monosubstrat-Chemostatversuche. Die q_{SM}-Werte liegen mit 0,043 g $g^{-1}h^{-1}$ in einem Bereich, wie auch für die methylierte Benzoesäure bestimmt. Der experimentell bestimmte Ertragskoeffizient bei Kultivierung auf 10 mmol/l Substratgemisch nimmt mit zunehmender Verdünnungsrate zu (Abb. 26 b). Der Vergleich der wahren, Maintenance-korrigierten Ertragskoeffizienten mit denen der Monosubstratversuche ergibt unterschiedliche Werte. Während bei den Monosubstrat-Chemostatversuchen für 3CB ein $Y_{X/S}^*$ von 0,51, für 4CB ein $Y_{X/S}^*$ von 0,49 und für 4MB ein $Y_{X/S}^*$ von 0,79 bestimmt wurde, liegt der $Y_{X/S}^*$ bei der kontinuierlichen Verwertung von 3CB/4CB/4MB-Gemischen mit $Y_{X/S}^*$=0,44 g g^{-1} unterhalb dieser Vergleichswerte. Die simultane Verwertung von Benzoesäuregemischen bedingt offensichtlich eine energetisch aufwendigere Systhese und Regulation der nun vollständig aktivierten Enzyme des ortho-1 und ortho-2 Abbauweges.

Tab. 13: Parameter für die Simulationsrechnung zur Beschreibung der BTM* im Abb. 25.

Substrat	D [h^{-1}]	S_0 [g l^{-1}]	$Y_{X/S}$*
B-Mix	0,03	1,51	0,44
B-Mix	0,09	1,55	0,44
B-Mix	0,17	1,55	0,44
B-Mix	0,22	1,51	0,44
B-Mix	0,24	1,51	0,44
B-Mix	0,27	1,54	0,44

3.5.2. Massenbilanzen

Tab.14.: Massenbilanzen der kontinuierlichen Kultivierung von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P) auf einem Substratgemisch aus 3CB, 4CB und 4MB

D [h^{-1}]	Substrat	C_{rec}	Cl_{rec}	N_{rec}	O_{rec}	H_{rec}
0,03	Mix	0,94	1,03	0,89	0,97	0,66
0,09	Mix	0,96	1,00	0,96	0,84	0,74
0,17	Mix	0,96	1,07	0,95	0,86	0,75
0,22	Mix	0,92	1,02	0,92	0,81	0,73
0,24	Mix	0,96	1,04	0,93	0,82	0,76
0,27	Mix	0,94	n.g.	n.g.	0,81.	n.g
av		0,95	1,03	0,93	0,85	0,72
sdev		0,02	0,03	0,03	0,06	0,04

Die Massenbilanzen zeigen im Rahmen der analytischen Meßgenauigkeit eine vollständige Substratverwertung. Die Sauerstoff- (85%) und Wasserstoffbilanzen (72%) weisen auf die Bildung von Reaktionswasser hin. Durch Aufstellung der Reaktionsgleichung für die simultane Verwertung des Benzoesäuregemisches und Berechnung der theoretischen Koeffizienten wurde die Wertegüte der im Experiment ermittelten Daten überprüft. Für die Aufstellung der Reaktionsgleichung wurde das Substratgemisch,

welches sich aus zwei Teilen chlorierter und einen Teil methylierter Benzoesäure zusammensetzt, durch die Bildung des arithmetischen Mittels des stöchiometrischen Anteils der jeweiligen Atome zu einem Modellsubstrat mit der Summenformel $C_{7,33}H_6O_2Cl_{0,67}$ vereinfacht. Folgende Reaktionsgleichung wird, bei Vorgabe von $Y_{X/S}^{*}=0,44$ vorgeschlagen:

(40)

$$C_{7,33}H_6O_2Cl_{0,67} + 5,108O_2 + 0,551NH_3 \rightarrow 2,397CH_2O_{0,52}N_{0,23} + 4,936CO_2 + 0,667HCl + 1,097H_2O$$

Den Vergleich der experimentell und stöchiometrisch ermittelten Koeffizienten zeigt die Tabelle 15. Im Vergleich zu den Koeffizienten der Monosubstratversuche ergeben sich für den Simultanabbau von Benzoesäuregemischen einige Unterschiede zu den Einzelsubstraten, die auf den erhöhten Syntheseaufwand/Regulation des nun vollständig aktivierten Enzymsystems zurückzuführen sind.

Tab.15: Vergleich der theoretischen mit den experimentellen Yields (für $D>0,17h^{-1}$) bei kontinuierlicher Kultivierung von SN45P auf einem Substratgemisch 3CB/4CB/4MB

	$Y_{X/S}$ theor.	**$Y_{X/S}$ exp.**
$Y_{CO2/S}$	1,45	1,47
$Y_{O2/S}$	1,09	1,20
$Y_{X/CO2}$	0,30	0,28
$Y_{X/O2}$	0,40	0,33
RQ	0,96	0,86

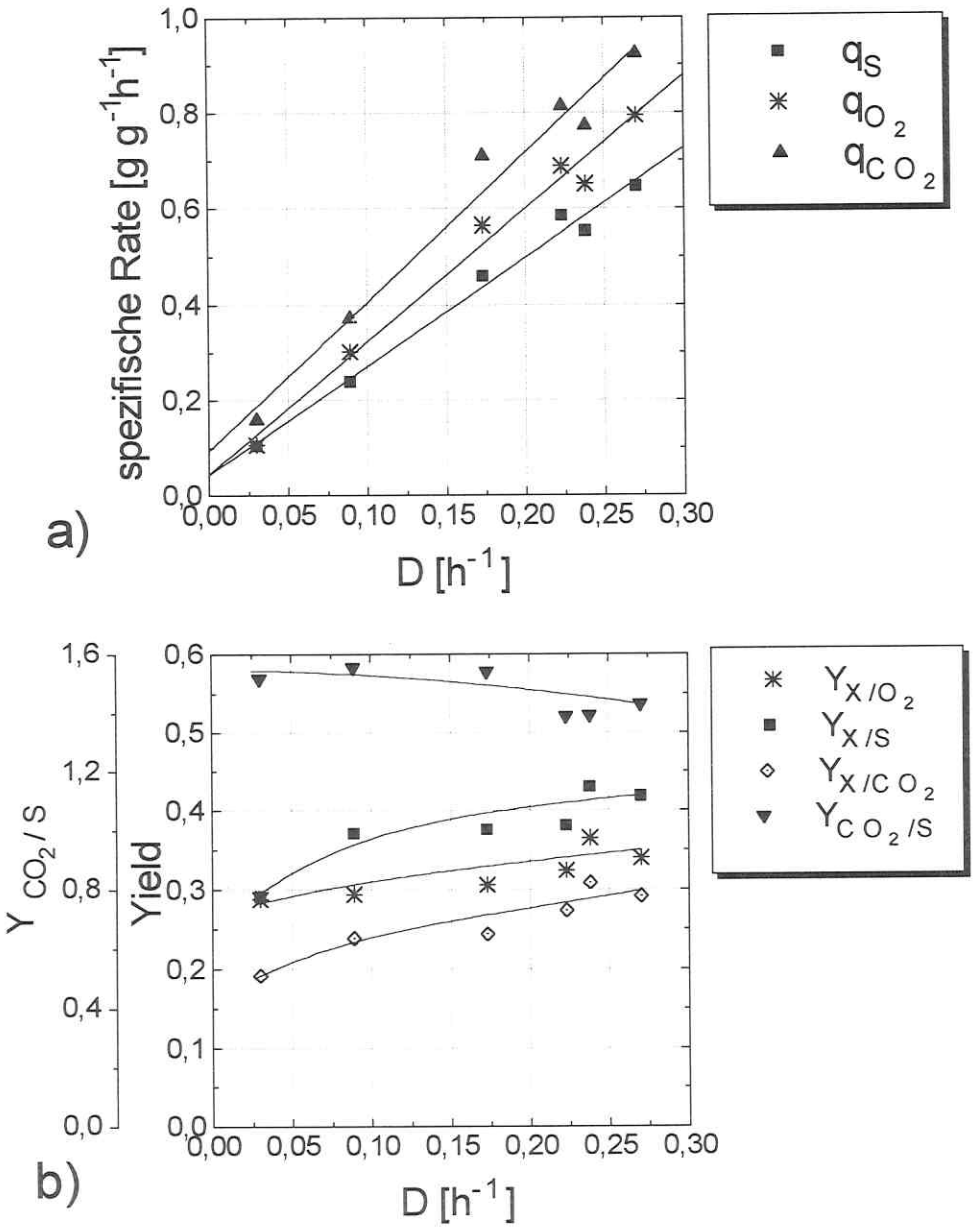


Abb. 26: Simultane Verwertung eines 3CB/4CB/4MB-Gemisches durch SN45P. a) spezifische Raten und b) errechnete Koeffizienten als Funktion der Verdünnungsrate.

4. Auswaschversuche: Bestimmung kinetischer Parameter

Diese Versuchsserie beschäftigt sich mit Untersuchungen zum dynamischen Verhalten von SN45P nach Erhöhung der Verdünnungsrate auf einen Wert oberhalb der maximalen Wachstumsrate. Auf eine Chemostatkultur können äußere Störungen in Form von Verweilzeitschwankungen und Konzentrationsänderungen im Zulauf einwirken. Die Mikroorganismen müssen in diesem Fall ihre spezifische Substratverbrauchsraten an die neuen Bedingungen anpassen. Prinzipiell ist dieses um so schwerer möglich, je mehr die Änderung der Verdünnungsrate in die Nähe der maximalen Wachstumsrate anzuordnen ist und/oder höher die Konzentrationsänderung des wachstumslimitierenden Substrates ist. Getestet wurde das Auswaschverhalten des Stammes sowohl bei Kultivierung mit den Einzelsubstraten 3CB, 4CB und 4MB. Die S_0-Ausgangskonzentration betrug bei allen Experimenten 10 mmol l^{-1}.

4.1. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB

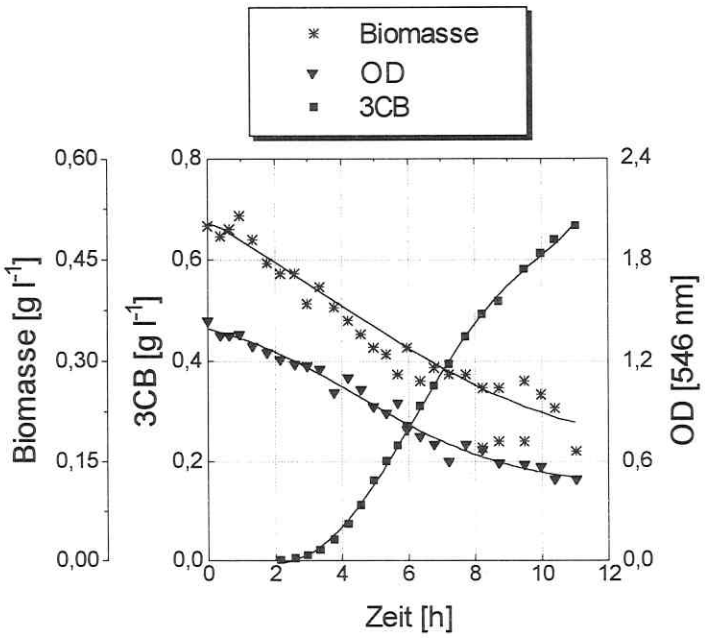


Abb. 27: Auswaschversuch von SN45P nach kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB; der Auswaschvorgang wurde durch Erhöhung der Verdünnungsrate von D = 0,32 h^{-1} auf D = 0,37 h^{-1} eingeleitet. Die Ausgleichskurve der Meßpunkte der Biomasse wurde über eine Korrelation mit der optischen Dichte bestimmt.

Die Abb. 27 zeigt den Auswaschvorgang von SN45P nach kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB. Der Auswaschvorgang wurde durch Erhöhung der Verdünnungsrate von D=0,32 h^{-1} auf D=0,37 h^{-1} eingeleitet. Insgesamt nimmt die BTM im Reaktor in den ersten 6 Stunden des Versuches von 0,5 g l^{-1} auf ca. 0,25 g l^{-1} ab. Bis zum Zeitpunkt t=2,5 h ist dieser Vorgang nicht mit eine Substratakkumulation gekoppelt, was zu größeren q_S-Werten führt. Bei kleineren Biomassekonzentrationen als 0,25 g l^{-1} werden die Meßwertschwankungen, bedingt durch die nur kleinen Probenvolumina von 10 ml, sehr groß. In der Abb. 27 wurde deshalb die Ausgleichskurve der Biomassedaten über eine OD-Korrelation ermittelt. Eine differentielle Bilanzierung der Elemente Kohlenstoff und Chlor sollte überprüfen, in wieweit das Auswaschen des Stammes von einer Intermediatakkumulation begleitet ist bzw. eine Akkumulation von dead-end-Metaboliten ausgeschlossen werden kann. In der Abb. 28 sind die Verläufe der Chlor- und der Kohlenstoffwiederfindung dargestellt. Die Chlor-Bilanz kann als erfüllt betrachtet

werden. In der Kohlenstoffbilanz tritt unmittelbar nach Beginn des Sprungversuches ein Massendefizit von 10 % auf. Diese für Auswaschexperimente nicht ungewöhnliche experimentelle Beobachtung ist biochemisch auf eine Anpassung des Enzymgehaltes, der Nukleinsäuren und anderer zellulärer Strukturen auf die Veränderung der Verdünnungsrate zurückzuführen (Pirt, 1975). Mit dem Einsetzen der 3CB-Akkumulation im Medium nach t=4 h wird das Massendefizit ausgeglichen.

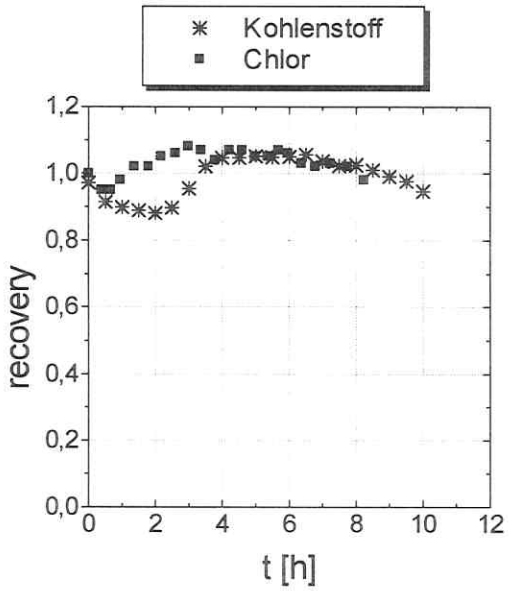


Abb. 28: Auswaschversuch 3CB: Kohlenstoff- und Chlorbilanzen.

Zur mathematischen Beschreibung von Substratinhibierungen kann häufig das Modell von Haldane Anwendung finden (Haldane, 1930). Unter der Vorraussetzung, daß die Substratkonzentration sehr viel größer als K_S ist, kann die Haldane-Gleichung wie folgt linearisiert werden:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{K_I \, \mu_{max}} S + \frac{1}{\mu_{max}} \qquad (41)$$

Die Anwendung dieser Gleichung auf die Daten des Auswaschversuches zeigt, daß die

Datensätze über weite Bereiche durch dieses Modell mit großen K_I-Werten beschrieben werden können (Abb. 29). Ein hoher K_I-Wert belegt das nur geringe toxische Potential der 3CB für SN45P und bestätigt die Ergebnisse der 3CB-Verwertung im adjusted batch Versuch. Aus der Geradengleichung können folgende kinetische Parameter berechnet werden:

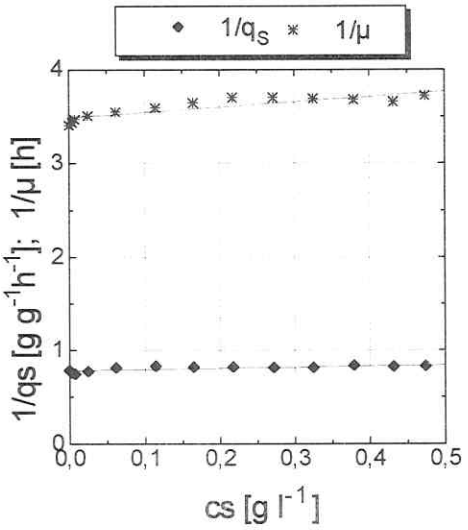


Abb. 29: Linearisierung der Haldane-Funktion: Bestimmung von μ_{max}, q_{Smax} und K_I für die 3CB-Verwertung durch SN45P aus der Geradengleichung.
μ_{max} = 0,29 h^{-1}; K_I = 6,2 g l^{-1} (r=0,87);
q_{Smax} = 1,28 g $g^{-1}h^{-1}$; K_I = 6,3 g l^{-1} (r=0,80).

Setzt man die erste Ableitung der Haldane Gleichung (Gleichung 41) gleich Null, so kann nach der Gleichung 42 der K_S-Wert abgeschätzt werden.

$$S^* = (K_I \, K_S)^{\frac{1}{2}} \qquad \textbf{(42)}$$

Im Gleichgewichtszustand wurde im Kulturüberstand kein 3CB nachgewiesen. Im Auswaschversuch akkumulierte erst nach 2,2 Stunden Substrat im Kulturüberstand des Bioreaktors. Zu diesem Zeitpunkt hat die BTM bereits deutlich abgenommen, was auf einen sehr niedrigen K_S-Wert hinweist. Nach t=2,2 h wurde eine 3CB Konzentration

von 0,0017 g l^{-1} bestimmt. Nach Gleichung 42 kann ein K_S-Wert kleiner oder gleich 0,0005 mg l^{-1} abgeschätzt werden. Dieser Wert ist im Vergleich zu Literaturangaben (Ulonska et al, 1995; Miethling et al., 1993) sehr gering und ist auf die doppelte Initialenzymausstattung des GEM zurückzuführen. Mit den so bestimmten bzw. abgeschätzten kinetischen Parameter K_I und K_S wurde in einer Computersimulation μ_{max}^* nach der Haldane-Gleichung bestimmt. Ein μ_{max}^* von 0,29 h^{-1} wurde errechnet.

Die vor dem Sprungversuch eingestellte Verdünnungsrate hat somit geringfügig über μ_{max} gelegen. Die im Chemostatversuch zuletzt eingestellte Verdünnungsrate von D=0,27 h^{-1} stellt somit eine Kultivierung auf oder in unmittelbarer Nähe von μ_{max} dar. Die Haldane -Inhibierungsfunktion für die 3CB-Verwertung durch SN45P wird durch die folgende Abbildung wiedergegeben (Abb. 30).

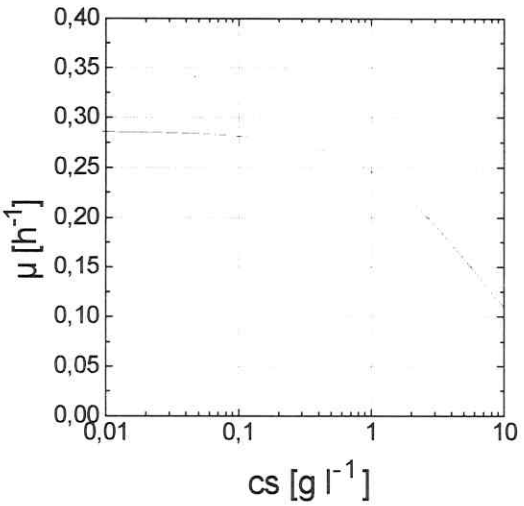


Abb. 30: Haldane-Inhibierungsfunktion für die 3CB-Verwertung durch SN45P: μ_{max}^*=0,29 h^{-1}; K_I=6,2 g l^{-1}; K_S=0,0047 mg l^{-1}.

In den adjusted batch Versuchen mit 3CB als Ausgangssubstrat wurde das Phänomen eines Substratumsatzes bei gleichbleibender BTM-Konzentration diskutiert. Als mögliche Ursache wurde die Arbeitshypothese eines hohen Maintenance-Bedarfes von SN45P und/oder eine Entkopplung von Substratverwertung und mikrobiellen Wachstum aufgestellt. Diese Hypothese kann nun mit den aus den Chemostat- und Auswasch-

versuchen zur Verfügung stehenden Parametern überprüft werden. Nach Gleichung 17 läßt sich mit $Y_{X/S}^{*}$ = 0,51 (Tab. 11); μ_{max}^{*} = 0,29 (Abb. 29) und q_{SM} = 0,02 g $g^{-1}h^{-1}$ (Tab. 10) ein qs_{max} von 0,59 g $g^{-1}h^{-1}$ errechnen. Ein hoher Maintenance-Bedarf kann demnach nicht das beschriebene Phänomen beschreiben. Im Auswaschversuch wurde mit q_{Smax}=1,28 g $g^{-1}h^{-1}$ eine deutlich größere spezifische Abbaurate bestimmt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ermöglicht eine Entkopplung der Substratverwertung vom Wachstum die hohen spezifischen Abbauraten des GEMs. Gleichzeitig bedingt ein sehr kleiner Ks-Wert bereits bei niedrigen Substratkonzentrationen eine hohe Substrataffinität des Stammes.

4.2. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 4CB

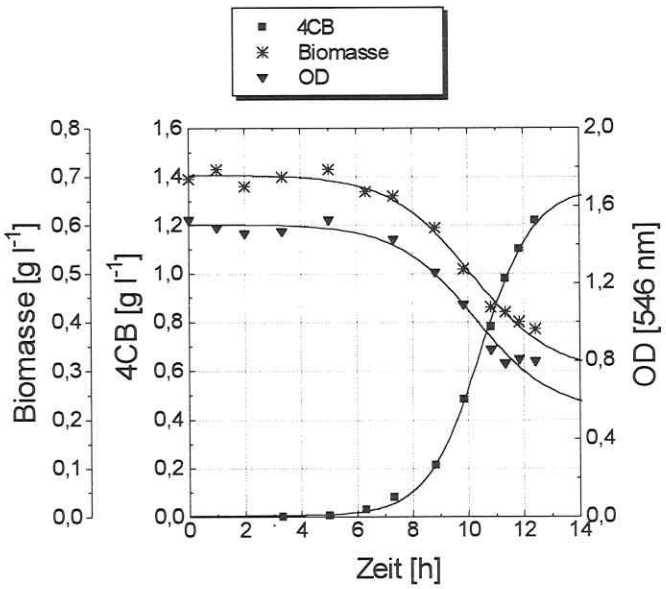


Abb. 31: Auswaschversuch von SN45P nach kontinuierlicher Kultivierung auf 4CB. Der Auswaschvorgang wurde durch Erhöhung der Verdünnungsrate von D = 0,30 h^{-1} auf D = 0,37 h^{-1} eingeleitet.

Durch eine Erhöhung der Verdünnungsrate von D=0,30 h^{-1} auf D=0,35 h^{-1} wurde die stationäre Kultivierung gestört und der Auswaschversuch eingeleitet (Abb. 31). Erst 5 Stunden nach Erhöhung der Verdünnungsrate nimmt die Biomassenkonzentration ab. Dieser Vorgang verläuft hier zeitgleich mit einer Substratakkumulation. Der Sprung auf

D=0,35 h^{-1} ist offensichtlich ein Sprung auf μ_{max}. In den ersten 5 Stunden stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein. Hier ist die Verdünnungsrate geringfügig kleiner als die kritische Verdünnungsrate. Das Einsetzten des Auswaschens zum Zeitpunkt t=5 h ist auf leichte Schwankungen der Verdünnungsrate zurückzuführen, wodurch die kritische Verdünnungsrate erreicht wird. Die spezifische Umsatzrate und Wachstumsrate liegen über weite Bereiche des Versuchszeitraums in der Nähe ihrer Maximalwerte.

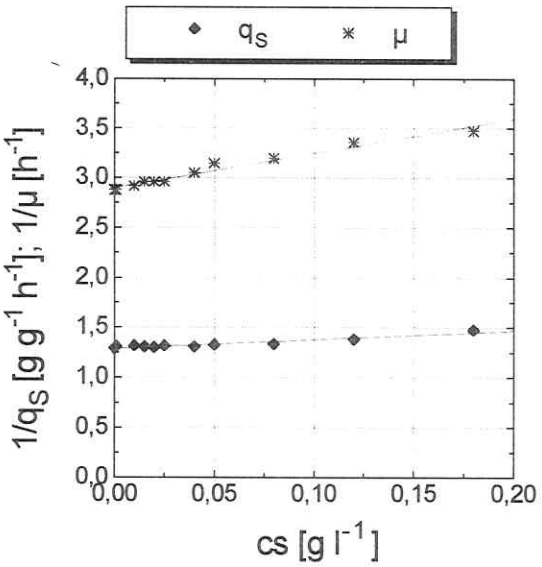


Abb. 32: Linearisierung der Haldane-Inhibierungsfunktion; Bestimmung von μ_{max}, q_{Smax} und K_i für den 4CB-Abbau durch SN45P:
μ_{max} = 0,35 h^{-1}; K_i = 0,83 g l^{-1} (r=0,98)
q_{Smax} = 0,78 g g^{-1} h^{-1}; K_i = 1,45 g l^{-1} (r=0,95)

Mit dem Einsetzen der 4CB-Akkumulation im Kulturüberstand nehmen die spezifischen Raten ab. Die spezifischen Raten q_S und μ lassen sich im 4CB-Konzentrationsbereich von 0 bis 0,2 g l^{-1} in der Haldane-Linearisierung nach Gleichung 41 darstellen. Ein μ_{max} von 0,35 h^{-1} und ein K_i von 0,83 g l^{-1} wurden aus der Geradengleichung errechnet. Im Gleichgewichtszustand wurde bei allen eingestellten Verdünnungsraten kein Ausgangssubstrat im Kulturüberstand nachgewiesen. Im Auswaschversuch wirkte eine 4CB-Konzentration von 0,003 g l^{-1} bereits inhibierend, was auf einen kleinen K_S-Wert hinweist. Die Abschätzung des K_S nach Gleichung 42 ergibt eine Halbsättigungskonstante

für 4CB von kleiner oder gleich 0,01 mg l^{-1}. Die Haldane-Inhibierungsfunktion für den 4CB-Abbau durch SN45P wird in der folgenden Abb. 33 wiedergegeben:

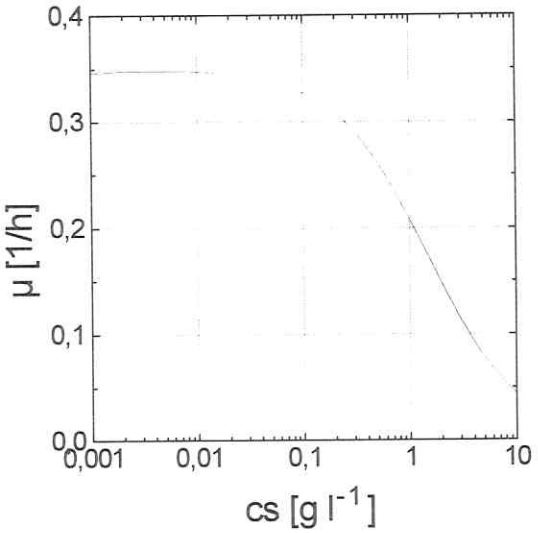


Abb. 33: Haldane-Inhibierungsfunktion für die 4CB-Verwertung durch SN45P: μ_{max}^{*} = 0,35 h^{-1}; K_I = 0,83 g l^{-1}; K_S = 0,01 mg l^{-1}.

Die Ergebnisse dieses Auswaschversuches deuten nicht auf eine Entkopplung der 4CB-Verwertung vom mikrobiellen Wachstum, wie bei dem Substrat 3CB beschrieben, hin. Nach Einsetzen der ermittelten kinetischen Parameter in Gleichung 17 errechnet sich ein q_{Smax} von 0,73 g $g^{-1}h^{-1}$, was empirisch im Auswaschexperiment mit einem q_{Smax} von 0,78 g $g^{-1}h^{-1}$ bestätigt wurde. Da dieses Experiment bei einer Verdünnungsrate nur geringfügig oberhalb von μ_{max} durchgeführt wurde, besteht die Möglichkeit, daß unter diesen Bedingungen wegen fehlender "Stress-Bedingungen" keine Entkopplung von Wachstum und Substratverwertung induziert wurde. Der Vergleich der q_{Smax}-Werte aus stationärer und instationärer Versuchsführung (adjusted batch und Auswaschversuche) zeigt jedoch Werte in der gleichen Größenordnung und läßt diese Hypothese als unwahrscheinlich erscheinen. Die 4CB-Verwertung lieferte somit keinen Hinweis auf eine Entkopplung von Substratverwertung und mikrobiellen Wachstum.

4.3. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 4MB

Der Sprungversuch mit 4MB als alleinige C- und Energiequelle wurde bei einer Verdünnungsrate von 0,41 h^{-1}, ausgehend von 0,34 h^{-1}, durchgeführt. Erst vier Stunden nach Einstellen der neuen Verdünnungsrate war 4MB im Ablauf des Reaktors nachzuweisen (Abb. 34a). Im gleichen Zeitraum hat die Biomasse bereits von 0,62 g l^{-1} auf 0,53 g l^{-1} abgenommen.

Zum Zeitpunkt t=13 h weichen die Meßwerte der Biomasse zunehmend von denen der OD ab. Ursache für diese Divergenz ist die am Ende des Auswaschversuches geringe Biomassekonzentration von 0,1 g l^{-1} . Bei der Bestimmung der Biomassekonzentration sind Meßwertschwankungen bei 10 ml Probenvolumina nicht zu vermeiden. Der Kurvenverlauf wurde in diesem Bereich mit der OD korrelliert. Aufgrund des nicht eindeutigen Kurvenverlaufs der Biomassedaten t>13h beschränken sich die folgenden Aussagen auf den Zeitraum t=0 h bis t=13 h. Die Kohlenstoffbilanz zeigt nach Störung des Fließgleichgewichtes im Zeitintervall t=0 h bis t= 5 h einen Kohlenstoff-Massendefekt von maximal 20 %. Dieses wird im weiteren Verlauf des Experimentes ausgeglichen.

Nach den Ergebnissen der adjusted batch Versuche war eine Beeinträchtigung von q_S erst bei hohen Substratausgangskonzentrationen zu erwarten. Im Haldane-Inhibierungsmodell spiegelt sich diese Tatsache durch hohe K_I Werte wieder. Die Anwendung der linearisierten Haldane-Funktion auf die Daten des Auswaschversuches zeigen, daß sich die Daten der spezifischen Wachstumsrate gut beschreiben lassen. In Abb. 35 sind die linearisierten Verläufe der Datensätze dargestellt. Aus der Geradengleichung wurde ein μ_{max} von 0,36 h^{-1} und ein K_I von 5,2 g l^{-1} errechnet.

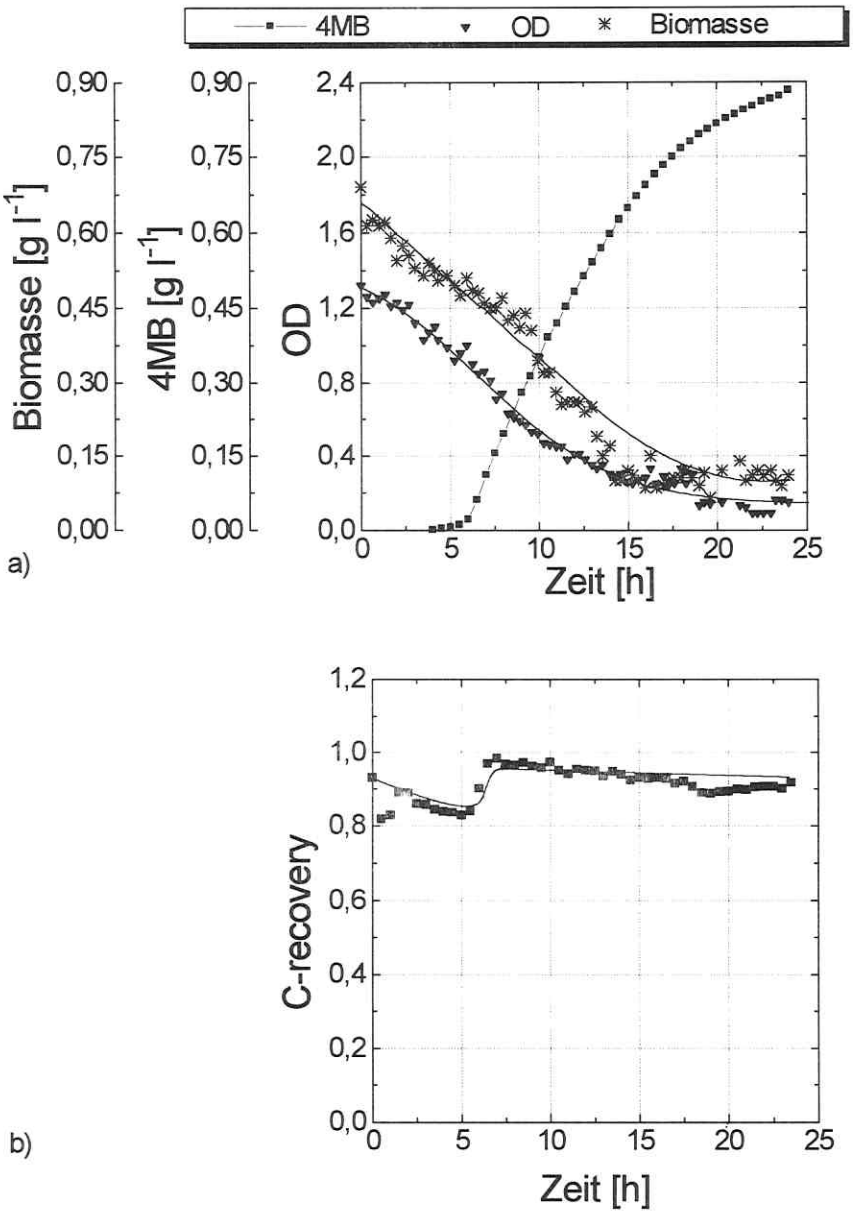


Abb. 34: Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf 4MB (a). Der Auswaschvorgang wurde durch Erhöhung der Verdünnungsrate von D = 0,34 h^{-1} auf D = 0,41 h^{-1} eingeleitet.

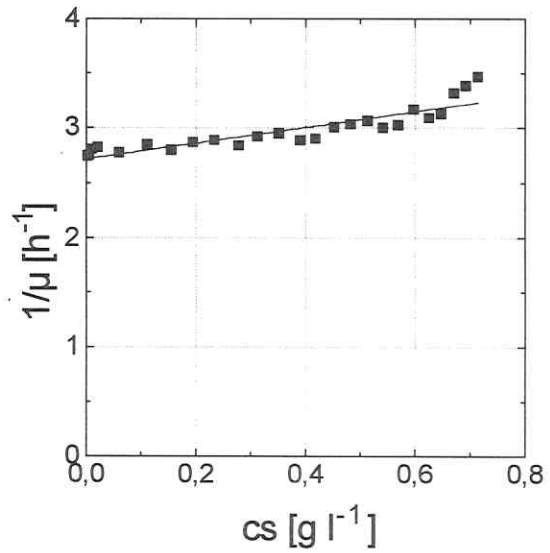


Abb. 35: Linearisierung der Haldane-Inhibierungsfunktion: Bestimmung von μ_{max} und K_I für die 4MB-Verwertung von SN45P.
μ_{max} = 0,36 h^{-1}; K_I = 5,2 g l^{-1}; (r=0,94).

Wie bei den anderen untersuchten Benzoesäuren wurde im Gleichgewichtszustand im Kulturüberstand kein 4MB nachgewiesen. Im Auswaschversuch ist erst nach 2,3 Stunden 4MB im Reaktor nachzuweisen. Zum Zeitpunkt t=2,3 h wurden 0,001 g l^{-1} 4MB in der HPLC-Analyse bestimmt. Mit Gleichung 42 kann ein K_S-Wert von 0,0002 mg l^{-1} abgeschätzt werden. In der Computersimulation zeigt sich bei Vorgabe von K_I und K_S, daß der wachstumshemmende Einfluß der 4MB keinen großen Einfluß auf μ_{max}^* besitzt. Durch Computeranpassung wurde ein μ_{max}^* von 0,35 h^{-1} bestimmt. Die daraus abgeleitete Haldane-Inhibierungsfunktion für den 4MB-Abbau durch SN45P zeigt Abb. 36.

Nach Gleichung 17 kann mit $Y_{X/S}^*$ = 0,79 (Tab. 10), μ_{max} = 0,36 h^{-1} (Abb. 35) und q_{SM} = 0,04 g l^{-1} (Tab. 10) eine maximale spezifische Abbaurate von q_{Smax} = 0,49 g $g^{-1}h^{-1}$ berechnet werden. Im Auswaschversuch wurde für das Substrat 4MB ein deutlich größeres q_{Smax} von 0,98 g $g^{-1}h^{-1}$ bestimmt. Wie schon beim 3CB-Versuch sind auch beim 4MB-Abbau die Zellen nach Störung des Fließgleichgewichtes, also unter mikrobiellen "Stress-Bedingungen", in der Lage, durch eine Entkopplung der Substratverwertung

vom Anabolismus auf die Störung des Fließgleichgewichtes zu reagieren. Bei der 4MB-Verwertung ist dieses mit einer temporären Intermediatakkumulation verbunden, wie der Abb. 34 b zu entnehmen ist.

Zu den in diesem Kapitel bestimmten K_S-Werten ist anzumerken, daß es sich um abgeschätzte Größen handelt, welche aufgrund der Bestimmungsmethode natürlich mit Fehlern behaftet sind. Ursache hierfür sind die im Vergleich zu anderen aromatischen Systemen hohen K_I-Werte, welche mit Variation der Steigung in der linearisierten Haldane-Gleichung Schwankungen unterliegen. Unter Berücksichtigung des weiteren Vorgehens der Abschätzung, nämlich der Quotientenbildung aus sehr niedrigen S^*-Konzentration und den großen K_I-Werten, geht hervor, daß sie lediglich die Größenordnung des Parameters angeben können.

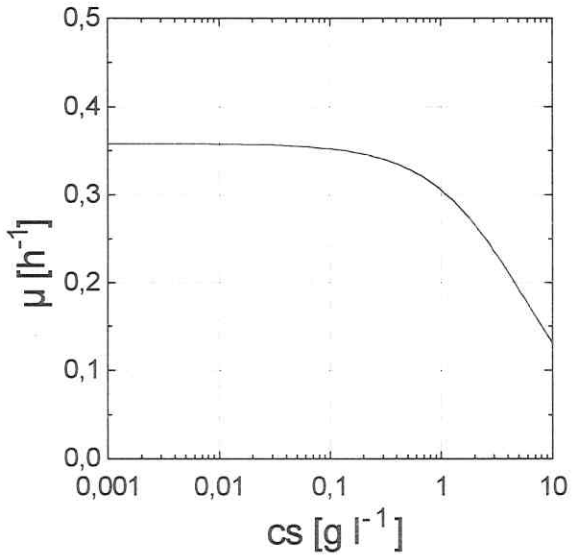


Abb. 36: Haldane Inhibierungsfunktion für die 4MB-Verwertung durch SN45P. $\mu_{max}^* = 0{,}35\ h^{-1}$; $K_S = 0{,}0002\ mg\ l^{-1}$; $K_I = 5{,}18\ g\ l^{-1}$.

5. Dynamische Versuche zur Charakterisierung des Simultanabbaus von 3CB/4CB/4MB-Gemischen durch SN45P im adjusted batch Versuch und im Auswaschversuch

5.1. Simultanabbau von Gemischen aus 3CB, 4CB und 4MB in diskontinuierlicher Kulturführung

Im folgenden werden die Ergebnisse des Abbaus von 3CB, 4CB und 4MB Gemischen im adjusted batch Versuch vorgestellt. Die Modellkomponenten wurden in der jeweiligen Testkonzentration im äquimolaren Mischungsverhältnis appliziert. Da es sich bei der 4MB um ein im Vergleich zu 3CB und 4CB energetisch höherwertiges Substrat handelt, war zunächst die Frage zu klären, ob wie im Chemostatversuch die Verwertung von Substratgemischen im simultanen Abbaumodus erfolgen würde. Der Abbau von Substratgemischen bietet die Möglichkeit, die Funktionalität aller Abbausequenzen sowie deren Regulation auf einfache Art und Weise zu überprüfen. Eine Akkumulation von dead-end Metaboliten würde sich in der Bilanzierung der Elemente Kohlenstoff und Chlor bemerkbar machen und sich auch optisch durch eine Medienschwarzfärbung und analytisch durch Bildung und Akkumulation substituierter Brenzkatechine zu erkennen geben. In dieser Versuchsserie wurde die Verwertung äquimolarer Substratgemische im Konzentrationsbeich von insgesamt 0,5 bis 3,8 g l^{-1} überprüft. Es gelten die gleichen Fragestellungen und Versuchsbedingungen, wie für die Einzelsubstrate in Kap. IV.2. beschrieben.

Die Tab. 16 gibt eine Übersicht über die eingesetzten Substratkonzentrationen der Substratgemische. Die Chlorbilanz deutet auch hier nach Umsatz der Ausgangssubstrate auf einen vollständigen Abbau der chlorierten Benzoesäuren hin. Die Ursachen für die relativ hohen Chlor-Wiederfindungen liegen in der schlechten flüssig-chromatographischen Trennung der 3CB von der 4CB. Der stöchiometrische Bezug des Chlors zu den entsprechenden Substratwerten ist als Folge dessen mit einem methodischen Fehler behaftet, der sich hier in permanent (10 %) zu hohen Chlorwiederfindung zu erkennen gibt.

Charakteristisch ist weiterhin, daß mit zunehmender Ausgangskonzentration eine Abnahme des integralen Ertragskoeffizienten auftritt. Ein vergleichbares Stammverhalten ist auch im 3CB-adjusted batch Experiment aufgetreten. μ_{max} bleibt davon unbeeinflußt.

Tab. 16: Übersicht über die Ausgangs- und Abbauparameter bei der Verwertung von äquimolaren Gemischen aus 3CB, 4CB und 4MB.

B-Mix [g l^{-1}]	B-Mix [mmol l^{-1}]	Zeit [h]	μ_{max} [h^{-1}]	q_{Smax} [mmol $g^{-1}h^{-1}$]	$Y_{X/S}$ [g g^{-1}]	Cl-recovery (%)
0,48	3,2	1,5	0,25	4,8	0,38	-
0,60	4,7	2,8	0,25	6,7	0,31	-
0,70	5,7	2,8	0,27	9,5	0,39	110
1,24	9,0	7,0	0,25	8,0	0,21	114
1,82	12,0	9,0	0,27	5,5	0,23	110

Es kann aufgrund des Datenmaterials nicht eindeutig zwischen einer lag-Phase bzw. einer Anlaufphase der bakteriellen Wachstumskurve unterschieden werden (Abb. 37). Die zeitliche Ausdehnung dieses Bereiches der Wachstumskurve ist deutlich länger als bei den Monosubstratversuchen (vgl. Abb. 9-11). Im folgenden wird der adjusted batch-Versuch mit einer S_0 von 12 mmol l^{-1} (3*4 mmol l^{-1}) ausführlich diskutiert.

Alle 3 Substrate werden simultan umgesetzt (Abb. 38 a), wobei 3CB am schnellsten und mit der größten volumetrischen Abbaurate transformiert wird. Zum Zeitpunkt t=6 h sind 3,25 mmol 3CB (0,51 g) umgesetzt; von den eingesetzten 4 mmol 4MB sind 2,2 mmol (0,3 g) und von der 4CB 1,1 mmol (0,17 g) transformiert. Eine große 3CB-Umsatzaktivität des GEMs ist somit auch in dieser Versuchsserie nachzuweisen. Die Ergebnisse der 3CB-und B-Mix Auswaschversuche sowie die der 3CB adjusted batch Versuche lassen eine bevorzugte Transformierung der 3CB durch die doppelte Initialenzymausstattung und die daraus resultierende hohe Affinität des GEMs zu diesem Substrat erwarten. Die Ergebnisse der Experimente mit dem B-Mix unterstützen diese experimentellen Befunde. Mit der Benzoat 1,2-Dioxygenase ist ein für 3CB hoch spezifisches Enzym aktiv. Die gleichzeitig aktive Toluat 1,2-Dioxygenase transformiert neben der

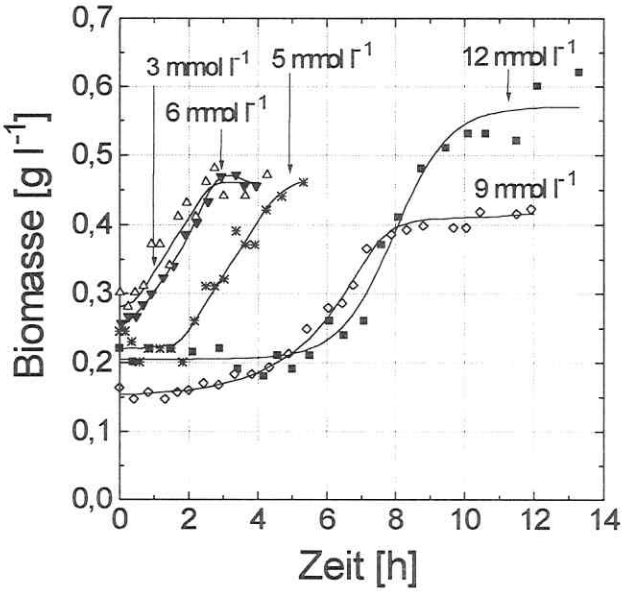


Abb. 37: Kinetik der Biomassebildung von SN45P nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen eines Benzoesäuregemisches.

3CB auch 4CB und 4MB, wobei hier neben unterschiedlicher Affinitäten auch ein kompetitiver Konkurrenzmechanismus der drei Benzoesäuren um die Enzymbindungsstelle möglich ist. Somit kann die 3CB hoch spezifisch durch die Benzoat 1,2-Dioxygenase und in Konkurrenz zu der 4CB/4MB durch die Toluat 1,2-Dioxygenase transformiert werden. Diese Tatsache spiegelt sich in dem sehr kleinen K_S-Wert wieder, welcher im Auswaschversuch mit 0,005 mg l^{-1} bestimmt bzw. abgeschätzt wurde. Für 4MB wurde im Auswaschexperiment ebenfalls ein sehr niedriger K_S-Wert abgeschätzt. Für den 4CB-Versuch lag der abgeschätzte K_S-Wert mit 0,01 mg l^{-1} um eine Zehnerpotenz höher. Zum Zeitpunkt t=6h entspricht die BTM-Konzentration noch der Ausgangskonzentration. Es stellt sich die Frage, wie in dieser Zeitspanne 6,5 mmol des Benzoesäuregemisches transformiert wurden. Nach den Ergebnissen der Chemostat- und Auswaschexperimente war eine Entkopplung von Substratverwertung und Wachstum (3CB und 4MB) sowie die temporäre Bildung von Stoffwechselmetaboliten zu erwarten. Im folgenden wird untersucht, in wieweit sich diese Ergebnisse in dieser Versuchsserie bestätigen lassen. Einen ersten Hinweis liefert die Betrachtung der CO_2 und O_2-Abluftwerte (Abb. 38 b).

Unmittelbar nach Applikation von 12 mmol l^{-1} des Substratgemisches sinken die O_2-Werte bei ansteigenden CO_2-Werten, was auf eine sofortige Transformation des Ausgangssubstrates hinweist. Bei gleichbleibender Biomassekonzentration werden die Substrate über einen Zeitraum von 4 Stunden mit gleichbleibenden Abluftwerten metabolisiert. Die Datenpunkte der Kohlenstoffwiederfindung belegen die gleichzeitige Bildung eines Metaboliten. Im Zeitintervall t=8 Stunden bis t=9 Stunden durchlaufen die Meßpunkte der Kohlenstoffbilanz mit einem Massendefizit von 30% ein Minimum. Im weiteren Verlauf der Zeitachse erfolgt eine Abreaktion der Metaboliten auf eine zuletzt 85 prozentige Wiederfindung des Kohlenstoffs, was zeitlich mit dem Beginn der stationären Wachstumsphase der Mikroorganismen zusammenfällt. Die Bilanzierung des Elementes Chlor unterstützt diese Beobachtung nicht, so daß es sich in Analogie zum 4MB-Experiment um die Akkumulation eines nicht- halogenierten Substrates handelt.

Die mit zunehmender Ausgangskonzentration des Benzoesäuregemisches kleiner werdenden Ertragskoeffizienten (Tab. 16) deuten auf eine zusätzliche Beeinflussung durch eine Entkopplung von Substratverwertung und Wachstum und/oder Erhaltungsstoffwechsels hin. Im folgenden soll die Größenordnung eines möglichen Maintenance-Einflusses durch Auftragung der ermittelten q_s-Werte über der Wachstumsrate abgeschätzt werden (Abb. 39). Trotz eines schlechten Korrelationskoeffizienten wird tendenziell deutlich, daß, wie schon bei den 3CB-Versuchen, der graphisch bestimmte q_{sM} sehr hoch in einer Größenordnung von 0,7 - 0,9 g $g^{-1}h^{-1}$ anzusetzen ist. Unterschiedliche Ertragskoeffizienten (Steigungen) weisen auch hier auf weitere Effekte hin. Die Ergebnisse der Monosubstratversuche lassen auch für die Verwertung von Benzoesäuregemischen eine Entkopplung von Substratverwertung und mikrobiellen Wachstum erwarten. Ein höherer Maintenance-Anteil als bei den Monosubstratversuchen ist allerdings anzunehmen, da bei der Verwertung von Benzoesäuregemischen die vollständig aktivierten Enzymsysteme für die ortho-1 und ortho-2-Abbausequenzen und deren Regulation aktiv sind.

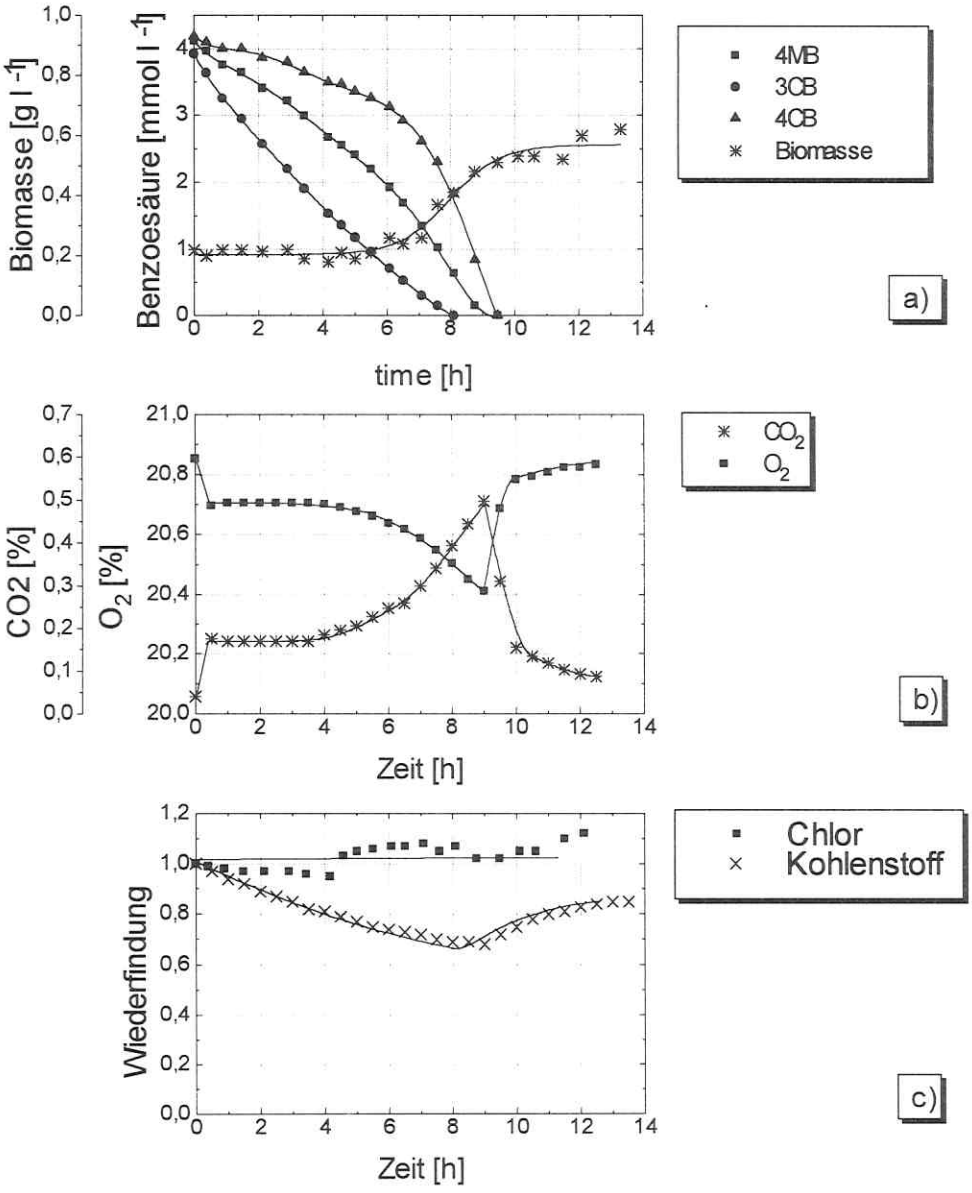


Abb. 38: Simultane Verwertung eines Benzoesäuregemisches aus 3*4 mmol l^{-1} 3CB, 4CB und 4MB. a) Substrat- und Wachstumskinetik; b) Abluftwerte als Funktion der Zeit; c) Wiederfindung der Elemente Kohlenstoff und Chlor.

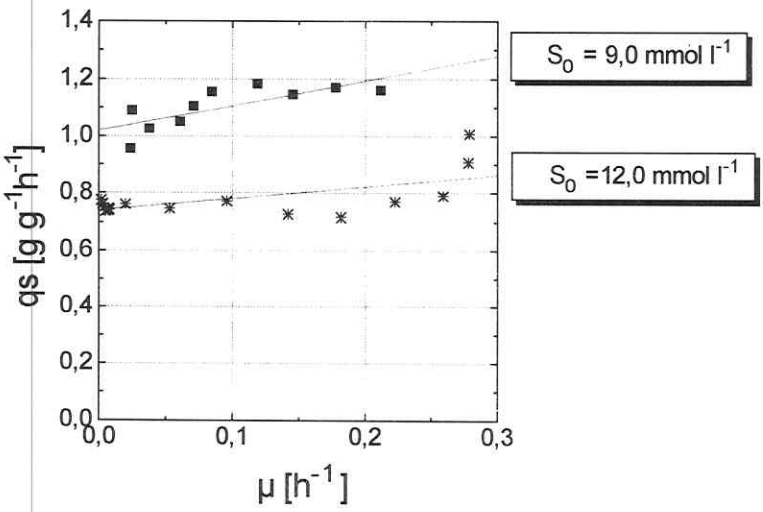


Abb. 39: Abschätzung von q_{SM} und $Y_{X/S}$*für die adjusted batch Versuche mit einer S_0 von 9,0 und 12 mmol l^{-1}. Folgende Parameter wurden bestimmt:
S_0=9 mmol l^{-1}: q_{SM}=0,9 g $g^{-1}h^{-1}$; $Y_{X/S}$*=0,71 g g^{-1}; r=0,7.
S_0=12 mmol l^{-1}: q_{SM}=0,7 g $g^{-1}h^{-1}$; $Y_{X/S}$*=>2; r=0,6.

Ausgehend von einem "apparenten" q_{SM} von 0,7 g $g^{-1}h^{-1}$ und bei Berücksichtigung einer bis zum Zeitpunkt t=6 h gleichbleibenden Biomasse von 0,2 g l^{-1}, würden in 6 Stunden 0,84 g (5,27 mmol) Benzoesäuregemisch (~3,5 mmol/l der chlorierten Substrate; 1,8 mmol 4MB) transformiert, die den Zellen nicht mehr für den Anabolismus zur Verfügung stehen. Diese Abschätzung entspricht der beobachteten Substrattransformation in Abb. 38.

Der stofflichen Ursache des Kohlenstoff-Massendefizits konnte im adjusted batch Experiment aus zeitlichen Gründen nicht nachgegangen werden. Im Chemostatversuch (vgl. Kap. IV. 3.) konnte bei kontinuierlicher Zudosierung von 4MB 3-Methyl-2 -En-lakton als Intermediat nachgewiesen werden. Da die Chlor-Bilanz keinen Massendefekt aufweist, ist zu erwarten, daß das Intermediat des 4MB-Stoffwechsels auch hier an dem Massendefizit beteidigt ist.

Die Abb. 40 gibt einen Überblick der q_{Smax}-Werte als Funktion der Konzentration des Substratgemisches. Dazu wurden die Benzoesäuren als ein idealisiertes Substrat betrachtet, welches sich aus der Summe der Konzentrationen der drei Benzoesäuren zusammensetzt. Der Verlauf der Meßwerte wurde geglättet und q_{Smax} aus dem Kurvenverlauf bestimmt.

Tab. 17: Beeinflussung von q_{Smax} von der S_0-Konzentration.

B-Mix [**mmol l^{-1}**]	**q_{Smax}** [**mmol $g^{-1}h^{-1}$**]
3,2	4,5
4,7	6,0
5,7	9,0
6,9	7,5
12,5	6,0

Trotz der starken Vereinfachung wird deutlich, daß die Verläufe der q_S-Werte als Funktion der Substratkonzentration denen der Monosubstratversuche mit 3CB und 4MB als Substrat ähneln. Auch hier durchläuft q_{Smax} mit zunehmender S_0-Konzentration ein Maximum (9,0 mmol $g^{-1}h^{-1}$). Bei weiterer Erhöhung von S_0 sinkt q_{Smax} auf 6 mmol $g^{-1}h^{-1}$. Für das Absinken von q_{Smax} bei einer Konzentration von 12,5 mmol l^{-1} ist die Bildung eines Intermediates wahrscheinlich.

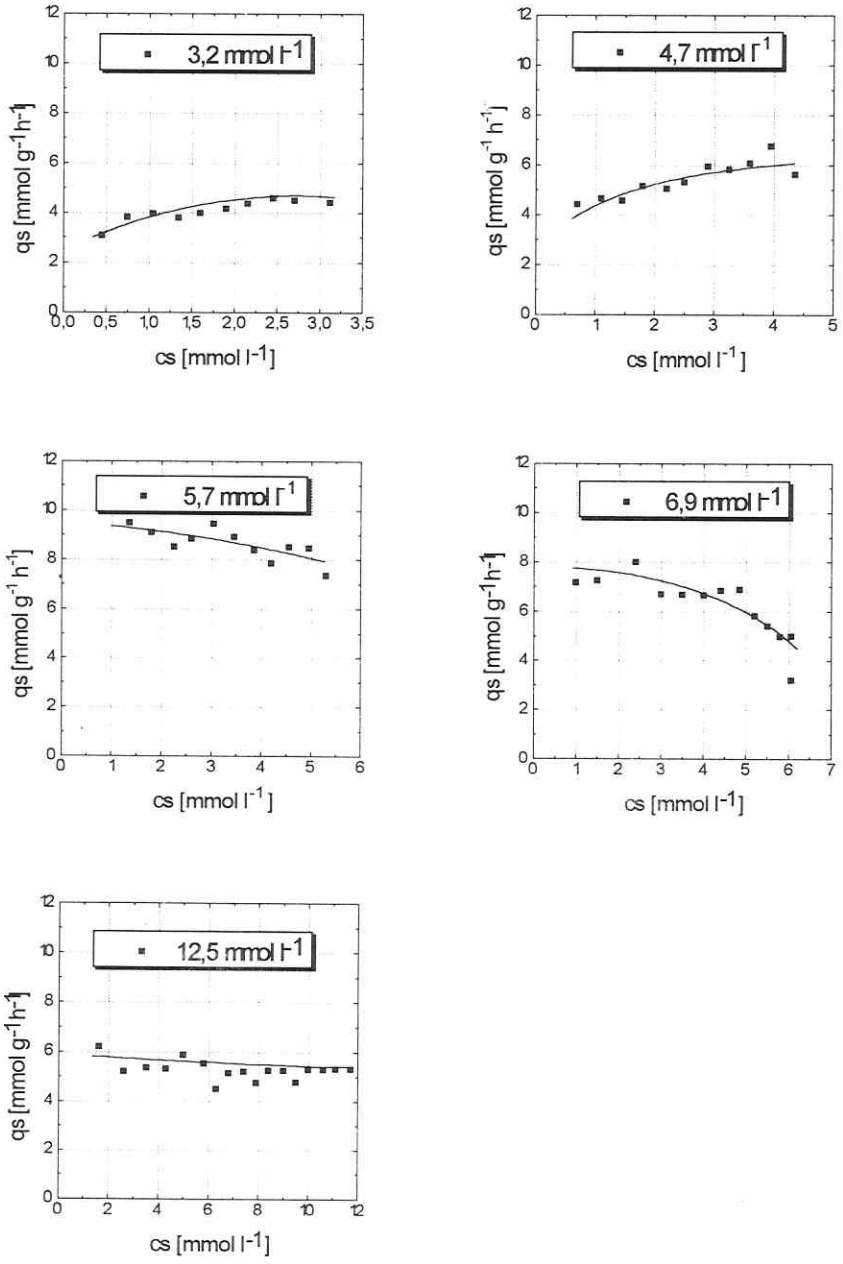


Abb. 40: Spezifische B-Mix Abbauraten als Funktion der Substratkonzentration.

4.4. Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung auf dem Substratgemisch

Der Auswaschversuch mit einem in der Summe 10 mmol l^{-1} Substratgemisch aus gleichen molaren Anteilen 3CB, 4CB und 4MB wurde durch Erhöhung der Verdünnungsrate von D = 0,28 h^{-1} auf D = 0,41 h^{-1} eingeleitet. Durch Untersuchung des Auswaschverhaltens nach kontinuierlicher Kultivierung auf dem Benzoesäuregemisch sollte überprüft werden, in wieweit sich die kinetischen Daten der Monosubstratversuche (adjusted batch und Auswaschversuch) in diesem Experiment bestätigen lassen. Abb. 41 zeigt, daß die Benzoesäuren in der Reihenfolge 4CB>4MB>3CB, also in einer dem Satzversuch entsprechenden -umgekehrten- Reihenfolge akkumulieren. Die Abb. 42 weist einen Anstieg der q_s-Werte innerhalb der ersten 8 Stunden nach Erhöhung der Verdünnungsrate auf. Dieses Phänomen weist auf eine Entkopplung der Substratverwertung vom mikrobiellen Wachstum hin. Wie der Abb. 41 zu entnehmen ist, hat die Biomasse nach 6,5 h um 50 % abgenommen. In dieser Zeitspanne wurden im Kulturüberstand keine Ausgangssubstrate nachgewiesen. Aus Abb. 43 geht hervor, daß die Kohlenstoffbilanz des Auswaschversuches ein Defizit aufweist. Zehn Stunden nach Versuchsbeginn ist ein Massendefekt von 30 % zu verzeichnen. Dieses C-Defizit trat im adjusted batch-Versuch nach Applikation von äquimolaren Benzoesäurengemischen ebenfalls auf. Nach vollständigem Substratumsatz verbesserte sich im Satzversuch die Kohlenstoffwiederfindung auf zuletzt 82%. Im Auswaschexperiment erhöht sich die Kohlenstoffwiederfindung 10 Stunden nach Versuchsbeginn auf 90 %, was dem Ausgangsniveau entsprach.

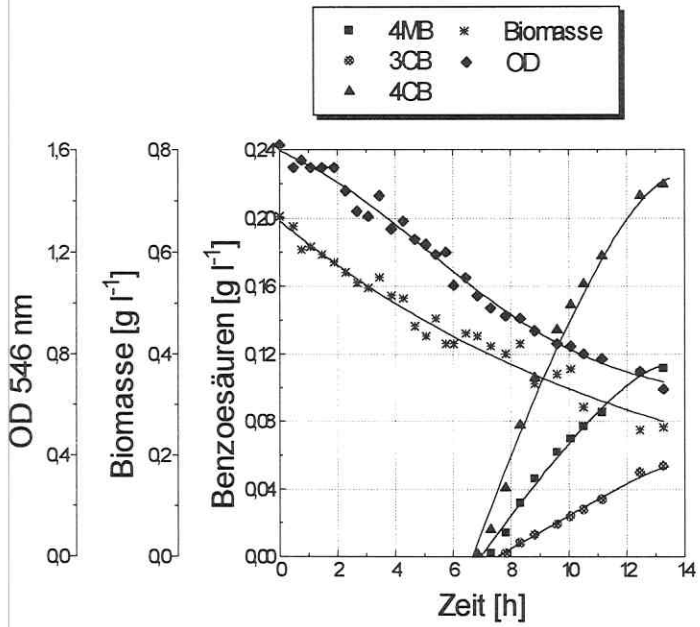


Abb. 41: Auswaschversuch nach kontinuierlicher Kultivierung von SN45P auf einem äquimolaren Gemisch aus 3CB, 4CB und 4MB. Der Auswaschvorgang wurde durch Erhöhung der Verdünnungsrate von D= 0,28 h^{-1} auf D=0,41 h^{-1} eingeleitet.

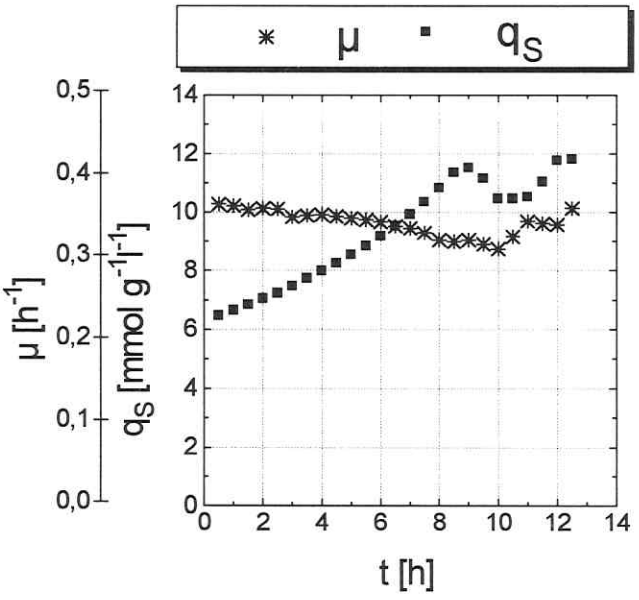


Abb. 42: Spezifische Substratumsatzrate und Wachstumsrate als Funktion der Auswaschzeit.

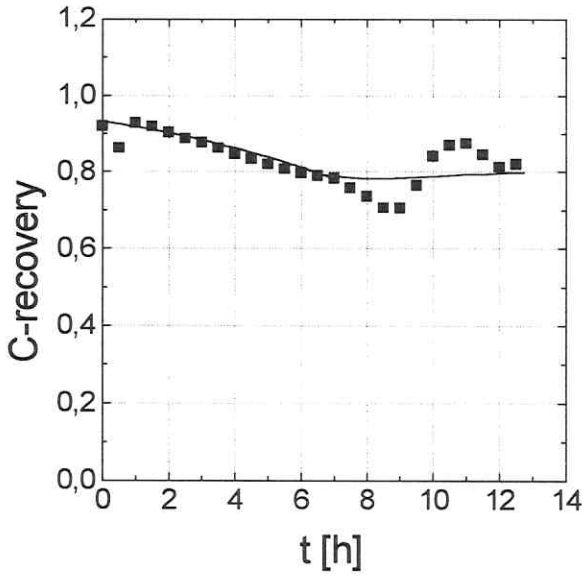


Abb. 43: Bilanzierung des Elementes Kohlenstoff im Auswaschversuch.

Da die q_S und μ-Datensätze sehr wahrscheinlich mit der Zusammensetzung des Substratgemisches variieren werden, kann Abb. 42 nur eine Abschätzung der maximalen Umsatzraten bieten. Die in der Computeranpassung ermittelte μ_{max}-Wert von 0,33 h^{-1} und qs_{max} von 11,1 mmol $g^{-1}h^{-1}$ (1,66 g $g^{-1}h$) ordnen sich jedoch sinnvoll in das Datenmaterial der vorangegangenen Versuche ein. Auch hier liegen die im Auswaschversuch bestimmten maximalen Substratumsatzraten deutlich oberhalb der Werte, die sich entsprechend der Gleichung 17 berechnen lassen (mit $Y^*_{X/S}$=0,44 (Tab. 12); q_{SM}=0,043 g $g^{-1}h^{-1}$ (Tab. 12) μ_{max}=0,33 h^{-1} (Abb. 42)). Die im 3CB und 4MB aufgetretenen Entkopplungseffekte finden sich somit auch im Auswaschversuch mit dem Substratgemisch wieder.

5.3 Diskussion der Entkopplungsphänomene

Die Auswaschexperimente haben somit gezeigt, daß in dem GEM ein großes Abbaupotential steckt, welches produktiv in der Abwasserreinigung eingesetzt werden kann. Vor

allem die Kultivierung im Chemostaten ist hierfür geeignet, da einerseits eine gute Nährstoffversorgung aufrecht erhalten werden kann, andererseits durch einen Abtransport von Reaktionsprodukten wie bsw. Chlorid oder temporären Intermediaten suboptimale Wachstumsbedingungen vermieden werden können.

Ein Überschreiten der maximalen Wachstumsrate wird meßtechnisch leicht durch Abnahme der BTM-Konzentration, Anstieg der CTR und Abnahme der OTR erkennbar. Wie die hohen berechneten K_i-Werte der Auswaschversuche gezeigt haben, sind die Benzoesäuren für den GEM über weite Konzentrationsbereiche nicht / wenig toxisch. Somit kann bei ungewollter Störung des Gleichgewichtzustandes durch Verlängerung der Verweilzeit dem Überschreiten von μ_{max} und einem damit verbundenen Auswaschen des Stammes entgegengewirkt werden. Eine irreversible Vergiftung des biologischen Systems trat in den untersuchten Konzentrationsbereichen nicht auf.

Eine Steigerung der Abbauleistung des GEMs läßt sich erreichen, wenn eine Verdünnungsrate $D>\mu_{max}$ eingestellt wird. Unter diesen Bedingungen wurde für die 3CB, 4MB und dem Benzoesäuregemisch eine Entkopplung der Benzoesäureverwertung vom mikrobiellen Wachstum nachgewiesen. Durch eine Kultivierung von SN45P auf Trägermaterialien sollte eine stabile Kultivierung des Stammes unter diesen Bedingungen möglich sein. So beschreibt z.B. Ulonska (1993), den Abbau von Chinolin mit einem passiv immobilisierten biologischen System (*Comamonas acidovorans)*. Unter diesen Bedingungen war der Airlift-Schlaufenreaktor in der Lage, Konzentrations- und Durchflußratenschwankungen in weiten Grenzen abzufangen. Auch unter dem Aspekt der biologischen Sicherheit (L2-Stamm) ist eine trägerfixierte Kultivierung mit nachgeschalteter Zellrückhaltung sinnvoll und würde die politische Akzeptanz dieser Technologie erleichtern.

Greift man die ursprüngliche Fragestellung der adjusted batch Versuche hinsichtlich des Phänomens der Substratverwertung bei gleichbleibender BTM-Konzentration bzw. OD-Werten für die 3CB, 4MB und B-Mix Versuche auf, so konnte gezeigt werden, daß ein hoher Maintenance-Bedarf des Stammes nicht die alleinige Ursache dieses Abbauphä-

nomens sein kann. Vielmehr stellt der GEM nach einer mikrobiellen Stressbelastung, wie sie die Applikation großer Konzentrationen des Ausgangssubstrates oder die Kultivierung oberhalb μ_{max} darstellen, seinen Stoffwechsel auf eine erhöhte Substratumsatzrate um. Dieses ist für die Verwertung der 4MB überlagert von einem temporären C-Massendefizit, während für 3CB die C-Bilanz ausgeglichen ist. Derartige Entkopplungsphänomene wurden auch von anderen Autoren für den Abbau von Chinolin beschrieben (Miethling, 1993; Ulonska, 1993).

Über die biochemischen Hintergründe einer Entkopplung und die Bedeutung für das biologische System kann an dieser Stelle nur hypothetisch diskutiert werden. Möglich wäre, daß 3CB bei Kultivierung des GEMs unter optimalen Wachstumsbedingungen, wie Chemostat-Kultivierung bei $D<\mu_{max}$, nicht die Bildung der Benzoat 1,2-Dioxygenase induziert. Wenn erst bei sprunghaften Veränderung dieses Zustandes, wie das Einstellen einer Verdünnungsrate von $D>\mu_{max}$ oder die Applikation von 3CB im hohen S_0-Bereichen, die Benzoat 1,2 Dioxygenase induziert würde, wäre ein Stammverhalten wie das in den vorherigen Kapitels diskutierte, möglich.

Für die 4MB-Versuche wurde im Chemostatexperiment nicht der Nachweis eines Massendefizites für das Element Kohlenstoff erbracht. Erst unter den Bedingungen einer adjusted batch Kultivierung oder im Auswaschversuch traten Kohlenstoff-Massendefekte auf. Unter mikrobiellen Stressfaktoren verfolgt das biologische System offensichtlich eine andere Strategie des Substratumsatzes als bei Umsatz der 3CB: Während beim chlorierten Ausgangssubstrat eine Anreicherung chlorierter Intermediate oder von Chlorid in der Zelle zu erheblichen Schädigungen führen würde, so stellen die nicht halogenierten Intermediate des 4MB-Katabolismus für SN45P offensichtlich kein großes toxisches Potential dar. Bei suboptimalen Wachstumsbedingungen akkumulieren hier Metabolite, welche in einer Abreaktion zu einem späteren Zeitpunkt weiter umgesetzt werden.

6. Abbau der 3CB: Stammvergleich von SN45P mit dem Parentalstamm Pseudomonas spec B13

Gegenstand dieses Kapitels ist der Vergleich der Abbaukapazitäten des rekombinanten SN45P mit *Pseudomonas spec.* B13, dem Donor der ortho-Abbausequenzen (Wildstamm). Es wird zunächst über die Ergebnisse einer kontinuierlichen Kultivierung in einem Zeitraum von 500 Stunden bei unterschiedlichen Verdünnungsraten berichtet. Die zweite Versuchsserie beschreibt das Stammverhalten in diskontinuierlicher Kultivierung. Hier wurde das Abbaupotential beider Stämme gegenüber steigenden 3CB-Konzentrationen untersucht.

6.1. Stammvergleich bei kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB

Beide Stämme wurden 500 Stunden kontinuierlich auf 3CB kultiviert. Gegenstand der Untersuchungen war die Bilanzierung der Substratverwertung hinsichtlich der Elemente Kohlenstoff und Chlor, der Vergleich spezifischer Raten und Koeffizienten sowie der zeitliche Vergleich der Abbauversuche. In der Abb. 44 und 45 sind die Kultivierungsverläufe vom Wildstamm (Flores, 1994) und vom GEM vergleichend dargestellt. Der Kultivierungsverlauf des rekombinanten Stammes wurde bereits in Kap. IV.3. diskutiert. Beide Stämme zeigen im Chemostaten grundlegend verschiedene Kultivierungsverhalten. Bei SN45P stellt sich bei allen eingestellten Verdünnungsraten eine BTM*-Konzentration entsprechend der Abb. 45 ein. Rechnerisch wurde eine nur geringe Beeinflussung der Biomassenkonzentration durch einen q_{SM} von 0,02 g $g^{-1}h^{-1}$ festgestellt (Abb. 23). Beim B13 Wildstamm wird der Kurvenverlauf der BTM durch den Erhaltungsstoffwechsels stark beeinflußt. Durch Auftragung der spezifischen Raten als Funktion der Verdünnungsrate kann der Maintenance-Anteil nach Gleichung 17 bestimmt werden (Abb. 46a).

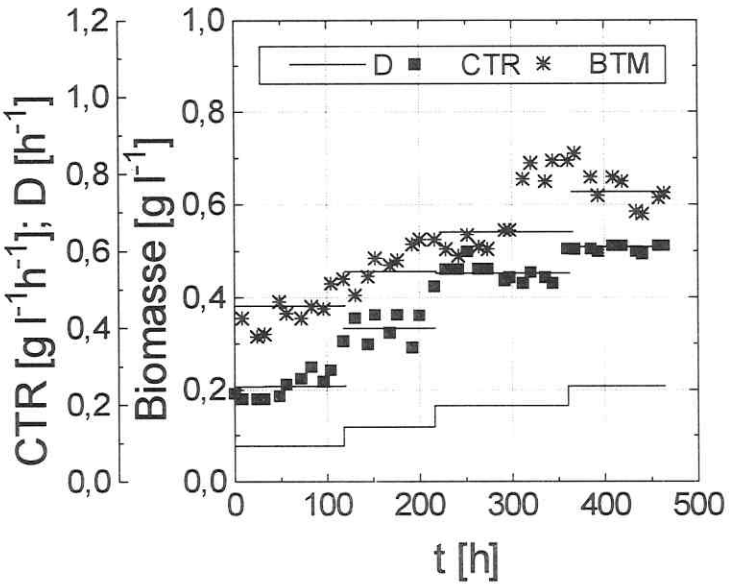


Abb. 44: Kontinuierliche Kultivierung von *Pseudomonas spec.* B13 auf 3CB über einen Zeitraum von 450 Stunden.

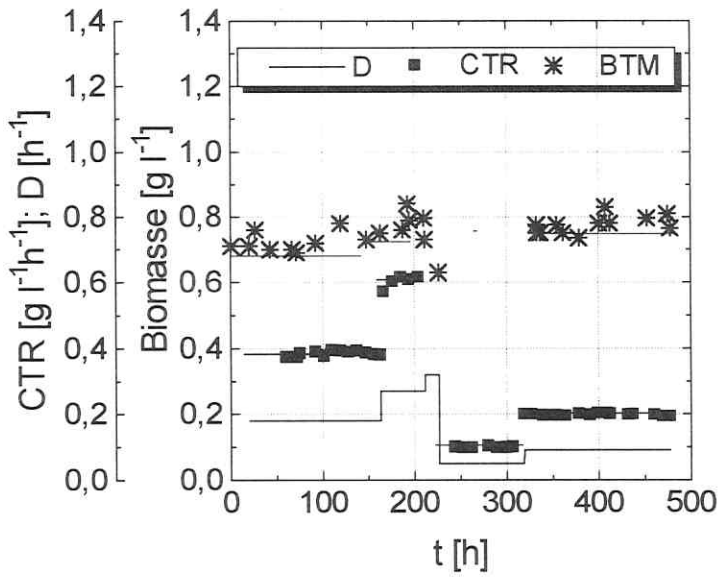


Abb. 45: Kontinuierliche Kultivierung von SN45P auf 3CB über einen Zeitraum von 500 Stunden.

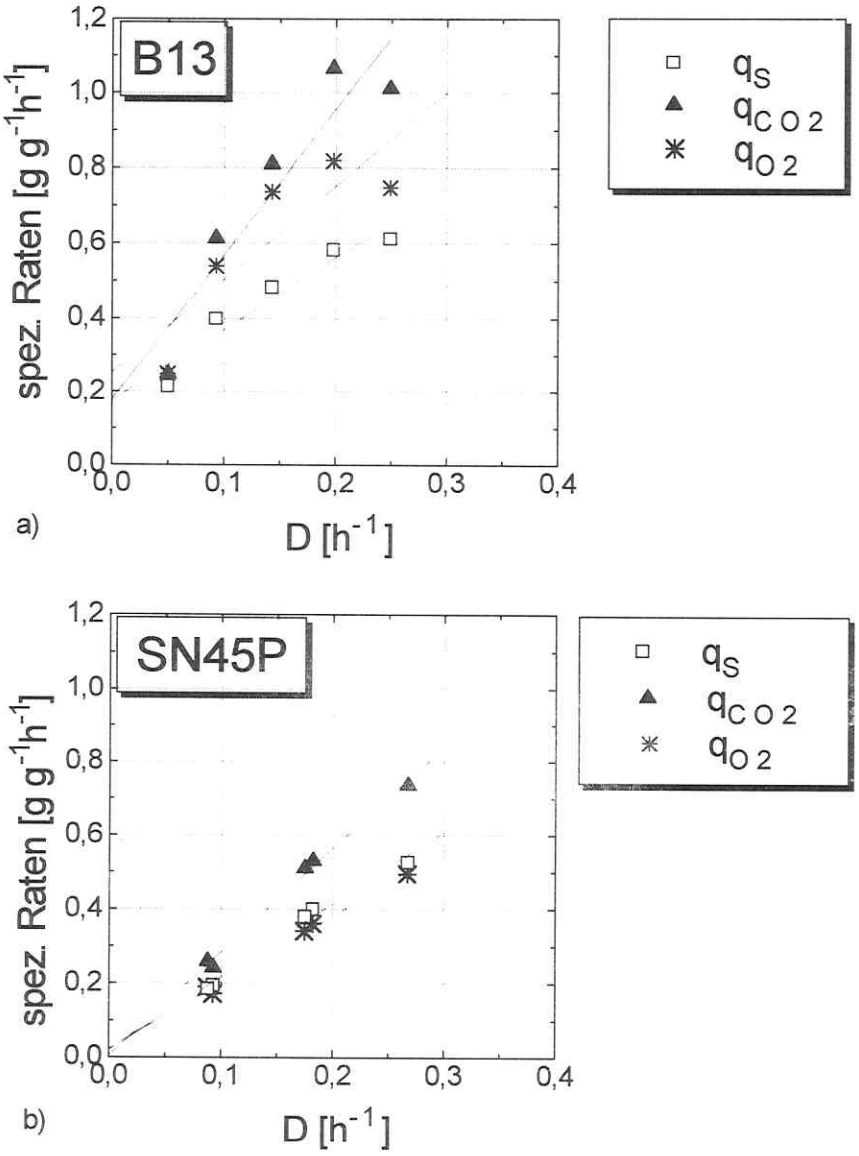


Abb. 46: Vergleich der spezifischen Raten der Chemostatkulturen vom B13-Wildstamm (a) und SN45P (b).

Folgende Parameter wurden über die Geradengleichung berechnet:

Tab. 17: Vergleich des Erhaltungsstoffwechsels anhand der spezifischen Raten von SN45P und B13

Stamm	q_{SM} [g g^{-1}h^{-1}]	r	q_{CO2M} [g g^{-1}h^{-1}]	r	q_{O2M} [g g^{-1}h^{-1}]	r
B13	0,18	0,957	0,18	0,93	0,25	0,857
SN45P	0,02	0,993	0,01	0,996	0,02	0,996

Tab. 18: Parameter zur Beschreibung des Kurvenverlaufes der Biomasse als Funktion der Verdünnungsrate nach Gleichung 39. (q_{SM} = 0,18 g g^{-1}h^{-1}).

Substrat	D [h^{-1}]	S_0 [g l^{-1}]	$Y_{X/S}^*$
3CB	0,050	1,57	0,51
3CB	0,093	1,56	0,51
3CB	0,142	1,55	0,51
3CB	0,198	1,59	0,51
3CB	0,249	1,54	0,51

Die Datenauswertung ergibt als Ursache für das unterschiedliche Kultivierungsverhalten von *Pseudomonas spec.* B13 und SN45P einen vergleichsweise großen Maintenance-Bedarf des B13-Stammes. Der "wahre" Ertragskoeffizient liegt bei beiden Stämmen bei $Y_{X/S}^*$=0,51. Da die Meßwerte der B13-Kultivierung zum Teil einen hohen Datenscatter aufweisen, wurde in einer Computersimulation nach Gleichung 39 der Verlauf der BTM*-Werte als Funktion der Verdünnungsrate überprüft. Der der Simulationsrechnung zugrunde liegende Kurvenverlauf in Abb. 47 mit den Parametern der Tab. 18 liegt über weite Bereiche unterhalb der empirisch bestimmten BTM*-Meßwerte. Daher wurde der Maintenance-Term in Gleichung 39 an die Meßwerte bei vorgegebenen D, $Y_{X/S}^*$ und S_0-Konzentrationen angepaßt. Die Computeranpassung ergab einen Wert von 0,13 g g^{-1}h^{-1}. Gleichung 17 ermöglicht die Überprüfung dieser Werte mit denen aus der Literatur (Schreiber et al; 1980). Einsetzen des Literaturwertes für μ_{max} = 0,308 h^{-1} mit den oben

bestimmten Parametern $Y_{X/S}^{*}$ = 0,51 (Tab. 18), und q_{SM} = 0,13 g $g^{-1}h^{-1}$ (Abb. 46) ergibt einen q_{Smax} von 0,73 g $g^{-1}h^{-1}$, welcher in dieser Arbeit empirisch bestimmten q_S-Werte (Abb. 46 b) sinnvoll ergänzt.

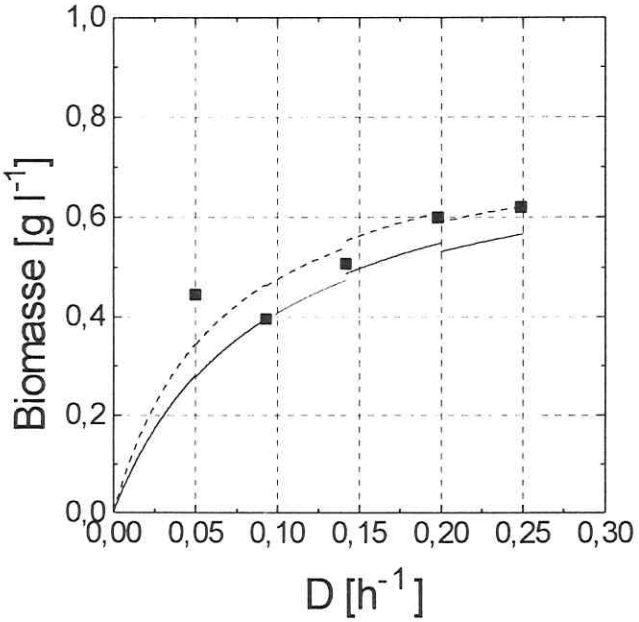


Abb. 47: Simulation der Verläufe der Biomasse als Funktion der Verdünnungsrate mit den Parametern der Tab. 18 nach Gleichung 39. Die durchgezogene Linie stellt den Verlauf mit dem experimentell bestimmten q_{SM} dar; bei der gestrichelten Linie wurde q_{SM} durch Computeranpassung bestimmt. Dabei wurde D, S, und $Y_{X/S}^{*}$ bei variablen q_{SM} vorgegeben. Ein q_{SM} von 0,13 wurde in der Computeranpassung bestimmt. Der unterbrochene Kurvenverlauf ist auf Schwankungen der S_0 durch unterschiedlich lange Autoklavierzyklen zurückzuführen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Stämmen ist die Tatsache, daß mit *Pseudomonas spec.* B13 über weite Bereiche der kontinuierlichen Experimente 3CB im Reaktorablauf nachzuweisen war (5 mg l^{-1} bei D=0,25 h^{-1}). Dieses Stammverhalten würde auf eine durch einen hohen K_S-Wert bedingte geringe Affinität des Wildstammes für die 3CB hinweisen. Wahrscheinlicher ist allerdings die These, daß es sich hierbei um ein Artefakt durch eine Hersteller-bedingte Verunreinigung der 3CB mit 4CB handelt. Da B13 4CB nicht verwerten kann, ist erst nach Umsatz der 3CB die Kontamination analytisch erkennbar.

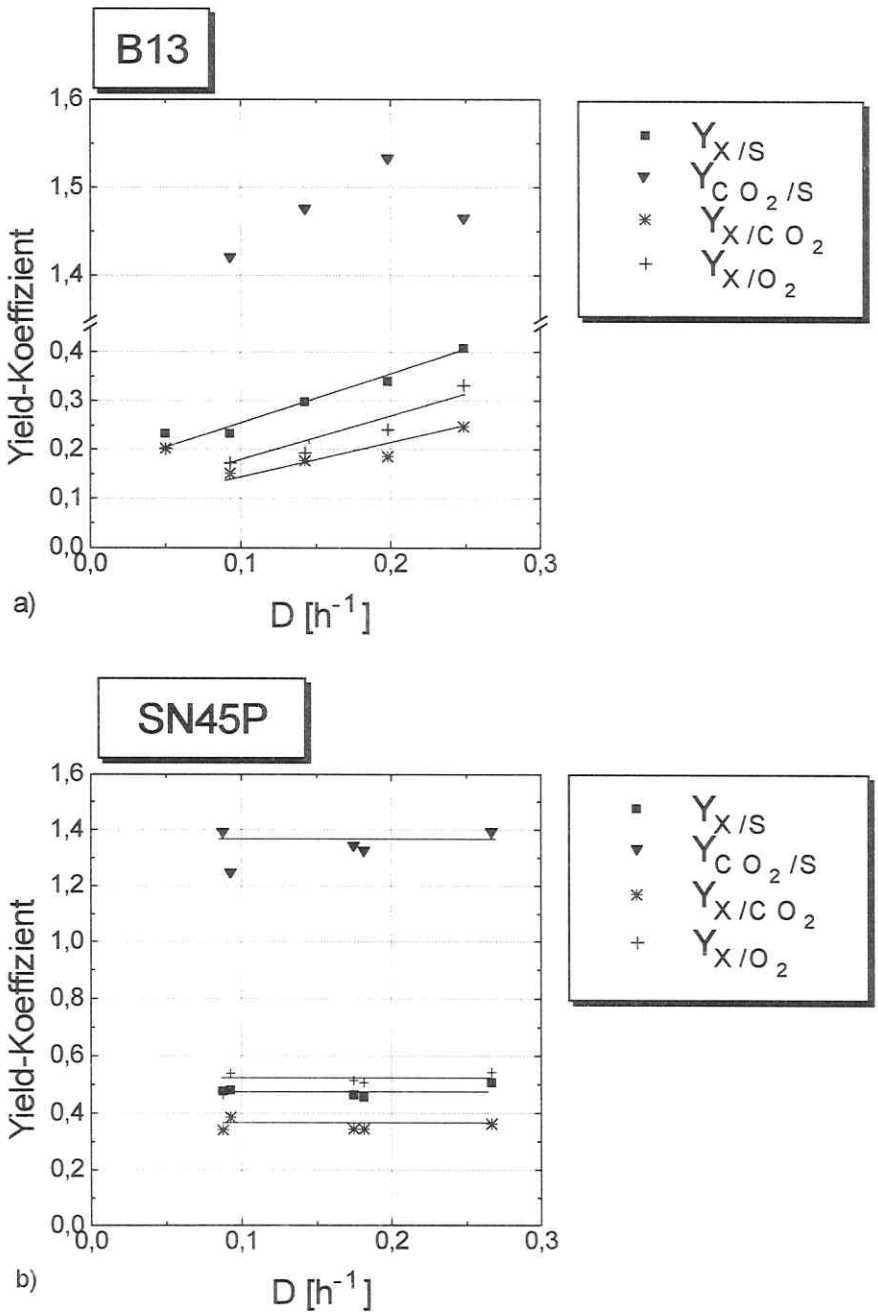


Abb. 48: Vergleichende Darstellung der Koeffizienten nach kontinuierlicher Kultivierung auf 3CB: a) B13; b) SN45P.

Durch C-und Cl-Bilanzierung wurde überprüft, ob beim B13 Stamm ein Massendefekt auf die Bildung von Intermediaten hinweist. Tab. 19 zeigt die Ergebnisse dieser Elementarbilanz; zum Vergleich sind noch einmal die Bilanzen der Versuche mit dem rekombinanten Stamm aufgeführt. Bei allen getesteten Verdünnungsraten wurden die Elemente Kohlenstoff und Chlor vollständig wiedergefunden.

Tab.19: Vergleichende Bilanzierung der Chemostatversuche anhand der Elemente Kohlenstoff und Chlor mit B13 und SN45P.

Element	**Stamm**		**sdev**	
	B13	SN45P	B13	SN45P
C	1,09	1,11	0,09	0,03
Cl	1,04	1,07	0,03	0,09

Den Vergleich der Koeffizienten $Y_{X/S}$, $Y_{CO2/S}$, $Y_{X/CO2}$, $Y_{X/O2}$ zeigt die graphische Gegenüberstellung in Abb. 48. Aufgrund der bereits diskutierten Beeinflussung durch q_{SM} ergibt sich für B13 eine Zunahme der aufgetragenen Koeffizienten mit zunehmender Verdünnungsrate. Der Verlauf von $Y_{CO2/S}$ kann wegen Meßwertschwankungen nicht eindeutig beurteilt werden. Theoretisch müßte der $Y_{CO2/S}$ bei Nachweis einer Maintenance-Beeinflussung mit zunehmendem D abnehmen.

6.2. Stammvergleich unter diskontinuierlichen Versuchsbedingungen

In diesem Kapitel sollen die beiden Stämme unter kinetischer Fragestellung nach Applikation von 3CB im unterschiedlichen S_0-Bereichen miteinander verglichen werden. Zur zeitlichen Gegenüberstellung der Stämme wurden zwei Satzversuche ausgewählt, die zu Versuchsbeginn die gleiche Biomasse-Konzentration aufwiesen. Der Abbau von 0,78 g l^{-1} und 2,35 g l^{-1} 3CB durch beide Stämme wird im folgenden beschrieben:

In der Abb. 49 ist die Abbaukinetik von 0,78 g l^{-1} 3CB und in Abb. 50 die von 2,35 g l^{-1}

3CB sowie das Wachstum der Mikroorganismen als Funktion der Zeit vergleichend dargestellt. Während in Abb. 49 die Kurven der Substratverwertung und Biotrockenmasse für beide Stämme nahezu deckungsgleich verlaufen, zeigt Abb. 50 in der gleichen Auftragung Unterschiede im Bereich großer Konzentrationsbereiche. B13 baut das Substrat sofort und über weite Konzentrationsbereiche mit konstanter spezifischer Wachstumsrate ab. Bei einer S_0-Konzentration von 2,35 g l^{-1} setzt der B13-Stamm 3CB schneller und mit höherem Ertragskoeffizienten um als SN45P. Als Ursache ist eine längere lag-Phase in der Wachstumskurve des GEMs anzuführen, während B13 die 3CB ohne erkennbare lag-Phase und mit größerem $Y_{X/S}$ transformiert.

An dieser Stelle soll auf einen Unterschied in der Kultivierung beider Stämme hingewiesen werden, welcher das Stammverhalten beeinflussen könnte. Während B13 zwischen den Satzversuchen kontinuierlich auf 3CB kultiviert wurde, wurde SN45P in den kontinuierlichen Phasen auf einem Gemisch aus 3CB, 4CB und 4MB kultiviert. Zum Zeitpunkt t=0 jedes Satzversuches war somit das komplette Enzymsystem des Benzoesäurekatabolismus aktiviert. Nach Zugabe großer 3CB-Konzentrationen muß sich der rekombinante Stamm an diese Milieuveränderungen durch verstärkte Bildung 3CB-spezifischer Enzymsequenzen anpassen. Die Enzymsequenzen auf der Basis des TOL-Plasmids sollten aufgrund der großen Affinität zur 3CB hierbei keinen Einfluß haben. Wie die Kinetiken der Auswaschversuche gezeigt haben, induzieren bereits geringe Substratkonzentrationen hohe Abbauaktivitäten bei vollständiger Substratumsetzung. Mögliche Ursache könnte vielmehr in der Induktion der Benzoat-Dioxygenase des ortho-1-Abbauweges zu suchen sein.

Um den Einfluß einer steigenden 3CB-Konzentration auf den Reaktionsverlauf für B13 modellhaft beschreiben zu können, wurden in doppelt reziproker Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm $q_{S max}$ und K_S bestimmt. In der Abb. 51 sind die Graphen aller Kultivierungen dargestellt.

Tabelle 20 zeigt die berechneten $q_{S max}$ und K_S-Werte mit den entsprechenden Korrelationskoeffizienten. Demnach nimmt $q_{S max}$ mit zunehmender S_0-Konzentration bei

ansteigendem K_S-Wert ab. Eine Eadie Hofstee-Auftragung (Abb. 52) bestätigt die Ergebnisse der Lineweaver-Burk-Darstellung bei nur geringfügig schlechteren Korrelationskoeffizienten. Der Ansatz mit einer S_0 von 0,7 g l^{-1} zeigt dabei große Schwankungen der Meßwerte, die sich in beiden Linearisierungsverfahren in niedrigen Korrelationskoeffizienten wiederspiegelt. Auch in der Eadie-Hoffstee-Darstellung werden q_{Smax} und K_S von der 3CB-Ausgangskonzentration beeinflußt. Tab. 21 zeigt die berechneten K_S und q_{Smax}-Werte sowie die dazugehörigen Korrelationskoeffizienten.

Formell beschreibt der Modellansatz der kompetitiven Hemmung die experimentellen Daten. Dieses Modell setzt die Bildung eines Intermediates voraus. Um dieses zu überprüfen, wurde in den adjusted batch-Versuchen eine Kohlenstoff- und Chlor-Bilanz durchgeführt. Wie den Tab. A 16- und A17 im Anhang zu entnehmen ist, geben die Chlor-Bilanzen keinen Hinweis auf die Bildung eines chlorierten Intermediates. Die Kohlenstoff-Bilanzen zeigen dagegen, daß ein maximal 10-15 prozentiges Massendefizit des Elementes Kohlenstoffs auftritt.

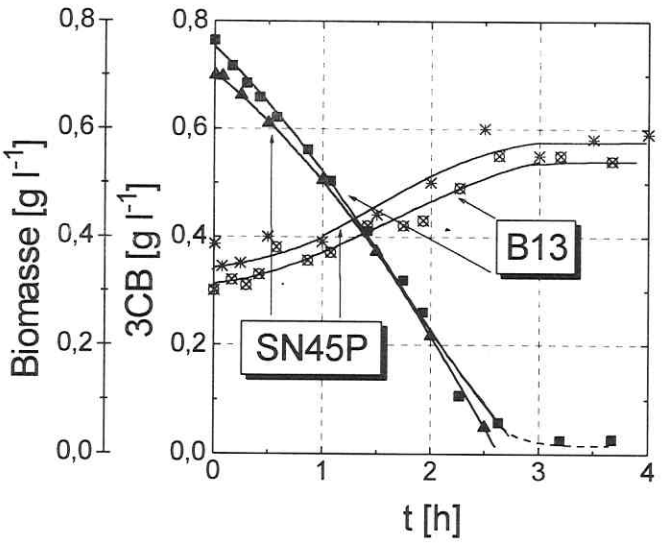


Abb. 49: Abbau der 3CB durch B13 und SN45P: S_0=0,78 g l^{-1}.

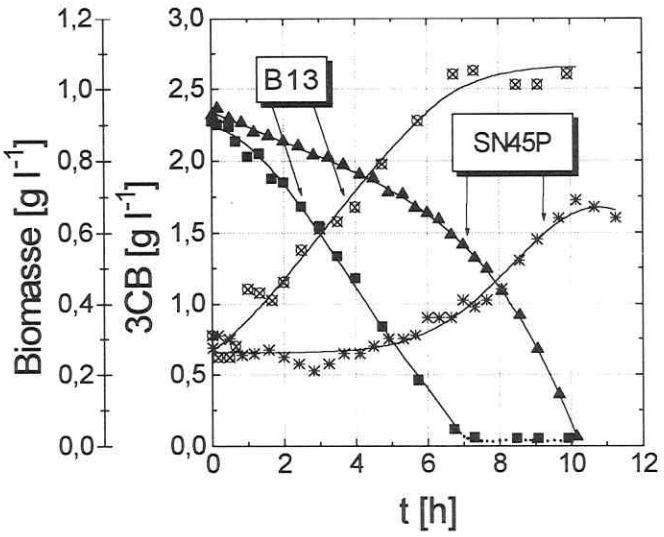


Abb. 50: Abbau der 3CB durch B13 und SN45P: S_0 = 2,35 g l^{-1}.

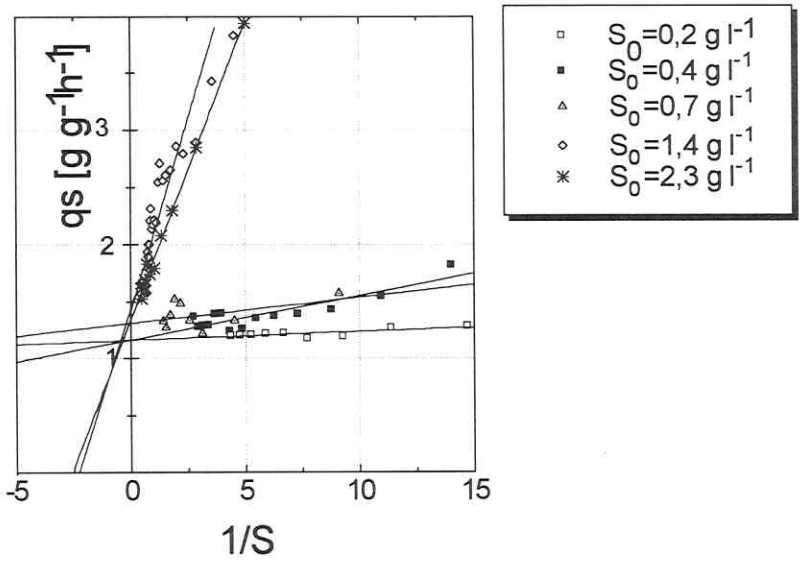


Abb. 51: Doppelt reziproke Darstellung von q_S und S im Lineweaver-Burk plot. Untersucht wurde im batch-Versuch die 3CB-Verwertung durch B13.

Tab. 20: Berechnete $q_{S_{max}}$ und K_S-Werte aus Abb. 51.

S_0 [g l^{-1}]	$q_{S_{max}}$	K_S [g l^{-1}]	r	sdev
0,2	0,90	0,01	0,90	0,04
0,4	0,86	0,03	0,89	0,07
0,8	0,76	0,02	0,47	0,11
1,4	0,71	0,47	0,98	0,30
2,3	0,76	0,40	0,99	0,05

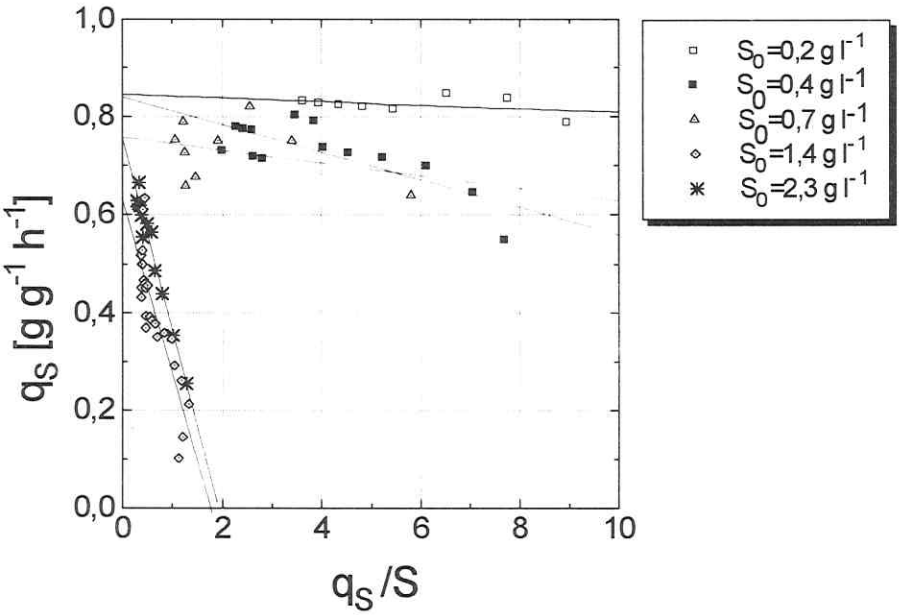


Abb. 52: Verwertung der 3CB durch B13 in der Eadie-Hofstee Auftragung.

Tab. 21: Berechnung der K_S und q_{Smax}-Werte aus der Eadie-Hofstee-Auftragung (Abb. 52).

S_0-3CB [g l^{-1}]	K_S [g l^{-1}]	q_{Smax} [g $g^{-1}h^{-1}$]	r
0,2	0,01	0,89	0,84
0,4	0,03	0,84	0,78
0,8	0,01	0,76	0,33
1,4	0,36	0,63	0,87
2,3	0,39	0,76	0,98

Im q_S=f(S)-Diagramm wurde in der Computersimulation das Modell auf Anwendbarkeit auf das Datenmaterial überprüft (Abb. 53). Dazu wurden die bei der geringsten S_0-Konzentration graphisch bestimmten q_{Smax} (0,9 g $g^{-1}h^{-1}$) und K_S-Werte (0,014 g l^{-1}) vorgegeben. Ein K_I-Wert wurde abgeschätzt.

Tab.22: Parameter für die Computersimulation zum 3CB -Abbau durch Anpassen der Inhibitorkonzentration. Modell: Kompetitive Hemmung; Vorgabe: q_{Smax}=0,9 g $g^{-1}h^{-1}$; K_S=0,014 g l^{-1}; K_I=0,007 g l^{-1}.

S_0 [g l^{-1}]	cs I [g l^{-1}]	chi^2-Test
0,2	0,01	0,001
0,4	0,06	0,002
0,7	0,15	0,009
1,4	0,3	0,002
2,3	0,35	0,001

Abb. 53 zeigt, daß die Meßwerte der 3CB-Verwertung durch B13 im getesteten Konzentrationsbereich mit dem kompetitiven Inhibierungsmodell beschrieben werden können.

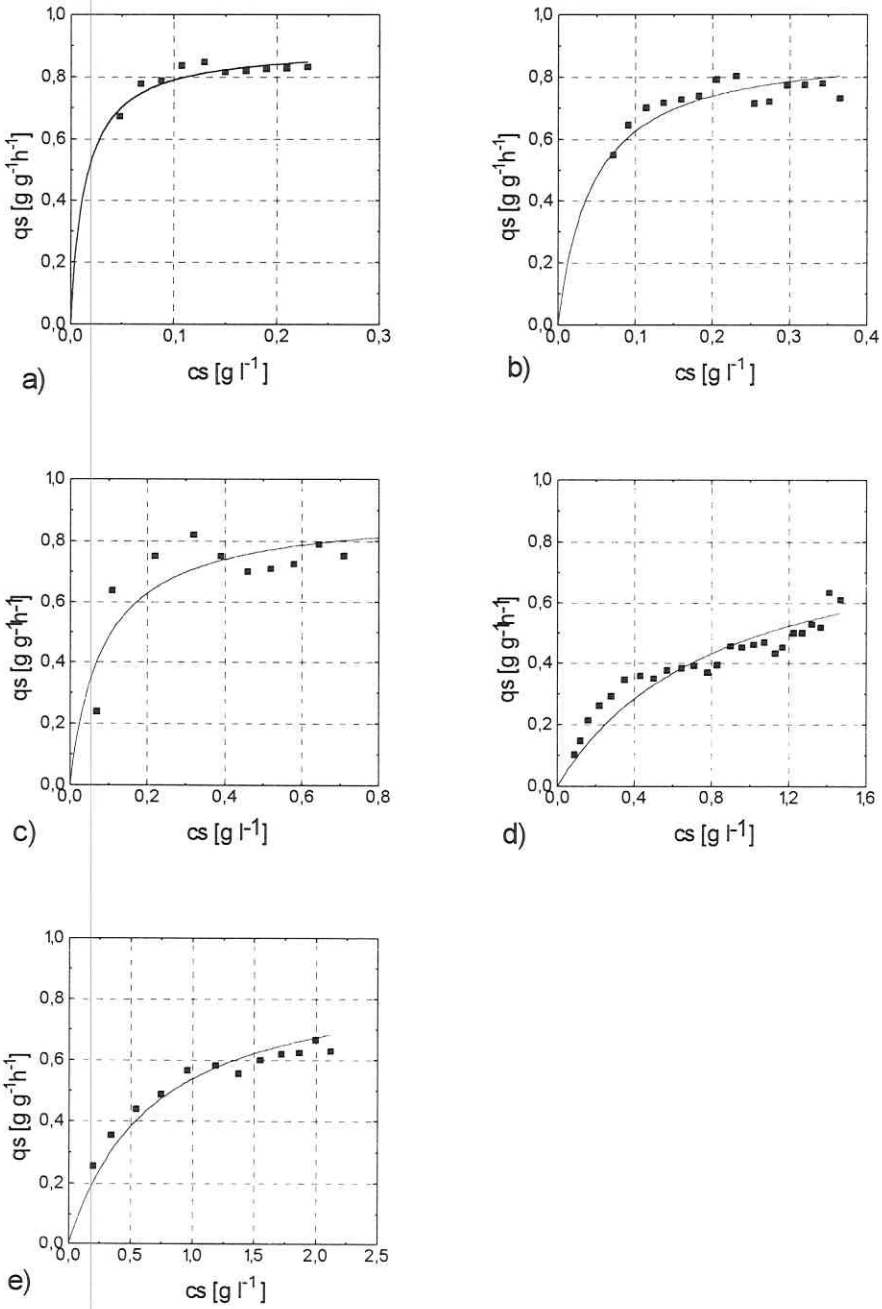


Abb. 53: Abbau der 3CB durch B13 mit folgenden S_0-Konzentrationen: a) 0,2 g l^{-1}, b) 0,4 g l^{-1}, c) 0,7 g l^{-1}, d) 1,4 g l^{-1} und e) 2,3 g l^{-1}. Modellsimulation zur kompetitiven Hemmung. Vorgabe: q_{Smax}=0,9 g g^{-1} h^{-1}; K_S=0,014 g l^{-1}; K_I=0,007 g l^{-1}. Die Inhibitorkonzentation wurde durch Computersimulation angepaßt (vgl. Parametersatz Tab. 22).

V. Zusammenfassung

Pseudomonas spec. B13 FR1 (SN45P), ein mit gentechnischen Methoden optimierter Abbauspezialist, wird in dieser Arbeit hinsichtlich seines Abbaupotentials zur Verwertung unterschiedlich substituierter Benzoesäuren untersucht. Ziel der Konstruktion des GEMs war es, das Substratspektrum des Stammes zu erweitern sowie die Verwertung chlorierter und methylierter Aromaten ausschließlich über ortho-Abbausequenzen ohne die Bildung von dead-end- oder suicide-Metaboliten zu ermöglichen. Die betreffenden Enzymsequenzen sind im Bakterienchromosom eingebracht und versprechen somit eine hohe Stabilität der Abbauleistung. Es wird überprüft, in wieweit die Strategie der horizontalen und vertikalen Expansion biochemischer Abbausequenzen einen Abbauspezialisten hervorbringen kann, welcher hinsichtlich der Kriterien Abbauleistung und Stabilität für eine Anwendung in dezentralen Abwasserbehandlungsanlagen geeignet ist. Dazu wurde SN45P mit verschiedenen Kultivierungstechniken (repeated batch, adjusted batch, Chemostatversuch und Auswaschversuch) kultiviert, die Abbaukapazitäten bestimmt und kinetische Daten ermittelt. Anhand der Verwertung der 3CB wird die Abbauleistung des GEMs mit der von *Pseudomonas spec.* B13, dem Donor der ortho-Abbausequenzen, im adjusted batch Versuch sowie in Chemostatkultur verglichen.

In **Schüttelkolbenversuchen** wurde das Spektrum verwertbarer methylierter und chlorierter Benzoesäuren durch SN45P bestimmt. 3CB, 4CB, 4MB und unsubstituierte Benzoesäure werden transformiert. 2CB und 2MB werden nicht verwertet. Die 3MB (3-Methylbenzoesäure)-Verwertung sowie Experimente mit 3CB-Ausgangskonzentrationen über 3,0 g l^{-1} sind im Schüttelkolben von einer Medienschwarzfärbung begleitet, welche auf die Bildung von Autoxidationsprodukten hinweist. Die höchsten getesteten Ausgangskonzentrationen von 3CB (5,4 g l^{-1}), 4CB (4,5 g l^{-1}) und 4MB (3,6 g l^{-1}) führen zu einer Verlängerung der lag-Phasen, nicht aber zu irreversiblen Vergiftungserscheinungen der im Schüttelkolben suspendierten Kultur.

Um reproduzierbare Versuchsstartbedingungen für die Überprüfung des Einflusses unterschiedlicher Substratausgangskonzentrationen auf die Benzoesäureverwertung zu gewährleisten, wurde eine **adjusted batch** Kultivierungstechnik entwickelt. Die ortho-Abbausequenzen haben sich im getesteten Konzentrationsbereich als funktionell erwie-

sen. Bei Ausgangskonzentrationen von 1,5 bis 30 mmol l^{-1} werden 3CB, 4CB und 4MB ohne verbleibende Restkonzentrationen und ohne die Bildung von dead-end oder suicide-Produkten umgesetzt. Je nach eingesetzter Benzoesäure werden charakteristische Unterschiede im Abbauverhalten des biologischen Systems deutlich. Mit steigender Startkonzentration ändert sich der Ertragskoeffizient in Abhängigkeit vom Ausgangssubstrat. Bei den höchsten getesteten Ausgangskonzentrationen (3CB: 4,23 g l^{-1}; 4CB: 4,67 g l^{-1}; 4MB: 3,65 g l^{-1}) ergibt sich eine abfallende Reihenfolge der Ertragskoeffizienten mit 4MB (0,43)>4CB (0,2)> 3CB (0,17). In den Satzversuchen mit 3CB, 4MB sowie mit dem Benzoesäuregemisch tritt das Phänomen eines volumetrischen Substratumsatzes bei gleichbleibender BTM-Konzentration auf. Die Bilanzierung der Elemente Kohlenstoff und Chlor (bei den chlorierten Substraten) in dem diesbezüglich entscheidenden Zeitintervall zeigt, daß auch hier substratspezifische Unterschiede auftreten. Für Experimente mit 3CB als Ausgangssubstrat treten keine Massendefizite in der Bilanz auf, was auf eine Verschiebung der Verhältnisse der Reaktionsprodukte in Richtung CO_2 hinweist. Die Transformation der 4MB ist begleitet von einer temporären Intermediatakkumulation. Zu dem Zeitpunkt, wo im Kulturüberstand analytisch keine 4MB mehr nachzuweisen ist, tritt ein Kohlenstoff-Defizit von max. 40% auf. Die Kultur befindet sich zu dieser Zeit noch in der exponentiellen Wachstumsphase. Im stationären Bereich der Wachstumskurve wird dieser Massendefekt auf 90 % ausgeglichen.

Die Abbaukinetiken der Benzoesäuren durch SN45P sind komplex reguliert. Einfache Inhibierungsmodelle sind nicht zur Beschreibung der batch-Kinetiken geeignet.

Die Verwertung von Benzoesäuregemischen wurde sowohl im batch- als auch im adjusted batch Versuch überprüft. Im **batch** Versuch wird ein 3CB / 4MB Gemisch in einer Gesamtkonzentration von 7,1 g l^{-1} simultan mit einer spezifischen Abbaurate von 0,9 g $g^{-1}h^{-1}$ verwertet. Die Substrattransformation ist dabei von einem temporären Chlor-Defizit begleitet, welches am Ende des Versuches ausgeglichen wird. 3CB wird von SN45P mit größerer Affinität und mit größerer Abbaurate umgesetzt als 4MB. In **adjusted batch** Experimenten wurde die Verwertung von äquimolaren Benzoesäuregemischen aus 3CB/4CB/4MB im S_0-Konzentrationsbereich von 0,5 bis 3,8 g l^{-1} untersucht. Alle drei Substrate werden simultan mit komplexen Abbaukinetiken umgesetzt. 3CB wird auch hier mit der höchsten Affinität zum GEM und mit der höchsten Umsatzrate transformiert. Mit zunehmender S_0-Konzentration nimmt der Ertragskoeffizient ab.

Im 3 l Rührkesselreaktor wurde SN45P auf den Substraten 3CB, 4CB und 4MB (jeweils als Einzelsubstrat appliziert) über einen Zeitraum von 2500 Stunden (680 Generationen) sowie 1350 Stunden (218 Generationen) auf einem äquimolaren Gemisch der drei Benzoesäuren im **Chemostatversuch** bei Verdünnungsraten von D = 0,09 h^{-1} bis 0,35 h^{-1} kultiviert. Im Kulturüberstand bleibt die Konzentration der Ausgangssubstrate bei allen eingestellten Verdünnungsraten unterhalb der analytischen Nachweisgrenze. Nach schrittweiser Annäherung der Verdünnungsrate an μ_{max} kann der GEM bei folgenden Verdünnungsraten noch im steady-state kultiviert werden: 3CB: D=0,27 h^{-1}; 4CB: D=0,30 h^{-1}; 4MB: D=0,35 h^{-1}; B-Mix: D=0,27 h^{-1}. Die Expression der Bildung der Toluat-1,2 Dioxygenase (xylXYZ), der Dihydrodihydroxybenzoat-Dehydrogenase (xylL) des positiven Regulators (xylS) und der 4-Carboxymethyl-4-Methylbut-2-ene-1,4-olid-Isomerase (mli-Gene) hat sich während der Kultivierung als stabil erwiesen. Für die Verwertung der 3CB, 4CB, 4MB und des Benzoesäuregemisches als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle können Elementarbilanzen der Elemente Kohlenstoff, Chlor (3CB/4CB), Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff aufgestellt werden. Die überprüften Benzoesäuren werden im Chemostatversuch vollständig abgebaut. Bei kontinuierlicher Kultivierung auf dem Mineralmedium entstehen aus der jeweiligen Benzoesäure, Sauerstoff und Ammonium die Produkte Biomasse, CO_2, H_2O und HCl (bei chloriertem Ausgangssubstrat). Der Abbau der Benzoesäuren läßt sich mit den folgenden Reaktionsgleichungen beschreiben:

1) 3CB und 4CB:

$$C_7H_5O_2Cl + 4{,}117\,O_2 + 0{,}620\,NH_3 \rightarrow 2{,}7\,CH_2O_{0{,}52}N_{0{,}23} + 4{,}3\,CO_2 + HCl + 0{,}23\,H_2O$$

2) 4MB:

$$C_8H_8O_2 + 5{,}299\,O_2 + 0{,}797\,NH_3 \rightarrow 3{,}467\,CH_2O_{0{,}52}N_{0{,}23} + 4{,}533\,CO_2 + 1{,}729\,H_2O$$

3) 3CB/4CB/4MB-Gemisch:

$$C_{7{,}33}H_6O_2Cl_{0{,}67} + 5{,}108\,O_2 + 0{,}551\,NH_3 \rightarrow 2{,}397\,CH_2O_{0{,}52}N_{0{,}23} + 4{,}936\,CO_2 + 0{,}667\,HCl + 1{,}097\,H_2O$$

Die spezifischen Abbauraten nehmen mit steigender spezifischer Wachstumsrate für

$D<\mu_{max}$ linear zu. Folgende Maintenance-Koeffizienten lassen sich für die jeweiligen Benzoesäuren errechnen: 3CB: 0,02 g $g^{-1}h^{-1}$ (0,13 mmol/g*h); 4CB: 0,02 g $g^{-1}h^{-1}$ (0,13 mmol/g*h); 4MB: 0,04 g $g^{-1}h^{-1}$ (0,29 mmol/g*h); 3CB/4CB/4MB: 0,04 g $g^{-1}h^{-1}$ (~0,27 mmol/g*h).

Im **Auswaschversuch** kann der Verlauf der q_S-Werte als Funktion der Substratkonzentration mathematisch mit der linearisierten Haldane-Funktion beschrieben werden. Aus den Geradengleichungen lassen sich die K_i-Werte bestimmen und K_S abschätzen.

	3CB	4CB	4MB
μ_{max}^* [h^{-1}]	0,29	0,35	0,35
q_{Smax} [g $g^{-1}h^{-1}$]	1,28	0,78	0,97
K_i [g l^{-1}]	6,20	0,83	5,20
K_S [mg l^{-1}]	~0,0005	~0,01	~0,0002

Die 3CB, 4MB und B-Mix Verwertung ist durch eine Entkopplung der Substratverwertung vom mikrobiellen Wachstum gekennzeichnet. Die Kohlenstoff- und Chlor-Bilanz des 3CB Auswaschversuches ergab keine Hinweise auf einen Massendefekt der Elemente, was auf eine Verschiebung zu den gasförmigen Reaktionsprodukten hinweist. Das 4MB-Experiment ist dagegen von einer temporären Akkumulation von Intermediaten begleitet.

Im Auswaschversuch nach Kultivierung auf dem Benzoesäuregemisch akkumulieren die Ausgangssubstrate in der Reihenfolge 4CB, 4MB und 3CB. Diese Reihenfolge ergibt sich aus den unterschiedlichen Affinitäten von SN45P zu den einzelnen Benzoesäuren sowie aus unterschiedlichen, von der Art des Substrates anhängigen spezifischen Abbauraten.

SN45P wurde hinsichtlich der Verwertung von 3CB mit *Pseudomonas spec.* B13 im Chemostaten und im adjusted batch Versuch verglichen. Beide Stämme wurden im Chemostaten 500 Stunden kultiviert. Für dem B13-Wildstamm zeigt die mit der Verdünnungsrate ansteigende Biomassenkonzentration eine Beeinflussung durch den Erhaltungsstoffwechsel. Ein Maintenance-Anteil von 0,13 g $g^{-1}h^{-1}$ 3CB wurde durch eine Computersimulation bestimmt. Der Ertragskoeffizient liegt bei einer Verdünnungsrate von $D=0,25\ h^{-1}$ mit $Y_{X/S}=0,4$ g g^{-1} niedriger als bei SN45P. Die adjusted batch Versuche mit *Pseudomonas spec.* B13 bei Ausgangskonzentrationen von 0,2 bis 2,3 g l^{-1} sind formell mit dem Modell der kompetitiven Hemmung zu beschreiben.

VI. Literaturhinweise

Andrews, J.A.
A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnol. Bioeng. 10: 702-723; 1968.

Bartels, I.; Knackmuss, H-J.; Reinecke, W.
Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from Pseudomonas putida mt-2 by 3-halocatechols. Appl. Environ. Microbiol. 47: 500-505; 1984.

Bock, M.; Schoberth, S.M.; Sahm, H.
Kontinuierlicher anaerober Abbau von 3-Chlorbenzoesäure in Festbettumlaufreaktoren. Chem. -Ing. Tech. 63: 1238-1240; 1991.

Boyd, S.A.; Shelton, D.R.
Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 47: 272-277; 1984.

Burlage, R.S.; Hooper, S.W.; Sayler, G.S.
The TOL (pWWO) catabolic plasmid. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1323-1328; 1989.

Commandeur, L.C.M.; Parsons, J.R.
Degradation of halogenated aromatic compounds. Biodegradation 1: 207-220; 1990.

Dorn, E.; Hellwig, M.; Reineke, W.; Knackmuss, H-J.
Isolation and characterisation of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. Arch. Microbiol. 99: 61-70; 1974.

Dorn, E.; Knackmuss, H-J.
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds; two catechol 1,2-dioxygenases from a 3CB-grown pseudomonad. Biochem. J. 174: 73-84; 1978.

Edwards, V.H.
The Influence of High Substrate Concentrations on Microbial Kinetics. Biotechnol. Bioeng. 12: 679-712; 1970.

Engesser, K.H.; Schmidt, E.; Knackmuss, H-J.
Adaptation of Alcaligenes eutrophus B9 and Pseudomonas sp. B13 to 2-fluorobenzoate as growth substrate. Appl. Environ. Microbiol. 39: 68-73; 1980.

Flores, J.-L.
1. Arbeitsbericht in der Abteilung Umweltbioverfahrenstechnik der GBF; 1994

Gibson, D.T.
Microbial metabolism. In: Hutzinger, O., ed. The handbook of environmental chemistry; part A: Reactions and processes . Berlin: Springer Verlag; 1980: p. 161-192.

Haigler, B.E.; Nishino, S.F.; Spain, J.C.
Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a Pseudomonas sp. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1988.

Haldane, J.B.S.
Enzymes. London: Longmans; 1930.

Heuer, H.
Wachstum und Schadstoffabbau von *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (pFRC20P) in Sediment-Mikrokosmen und Reinkultur. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig; 1991.

Heuer, H.; Dwyer, D.F.; Timmis, K.N.; Wagner-Döbler, I.
Efficacy in aquatic microcosms of a genetically engineered pseudomonad applicable for bioremediation. Eingereicht in Microbiol. Ecol.; 1994. (Kontaktaddresse: Abt. Mikrobiol.; GBF)

Hickey, W.J.; Focht, D.D.
Degradation of mono-, Di-, and trihalogenated benzoic acids by Pseudomonas aeroginosa JB2. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3842-3850; 1990.

Higson, F.K.; Focht, D.D.
Degradation of 2-bromobenzoic acid by a strain of Pseudomonas aeroginosa. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1615-1619; 1990.

Horowitz, A.; Suflita, J.M.; Tiedje, J.M.
Reductive dehalogenations of halobenzoates by anaerobic lake sediment microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1459-1461; 1983.

Keil, H.; Klages, U.; Lingens, F.
Degradation of 4-Chlorobenzoate by Pseudomonas sp. CBS 3: Induction of catabolic enzymes. FEMS Microbiol. Letters 10: 213-215; 1981.

Knackmuss, H.-J.; Hellwig, M.; Lackner, H.; Otting, W.
Cometabolism of 3-methylbenzoate and methylcatechols by a 3-Chlorobenzoate utilizing Pseudomonas: Accumulation of (+)-2,5-dihydro-4-methyl- and 2,5-dihydro-2-methyl-5-oxo-furan-2-acetic acid. Eur. J. Appl. Microbiol. 2: 267-276; 1976.

Knackmuss, H.-J.
Konstruierte Bakterienstämme zur Entfernung von Chemikalien mit Fremdstoffcharakter aus Industrieabwässern. In: Karin Dohmen, (ed.: Biotechnologie; Vorträge

auf der 74. Hauptversammlung MNU in Tübingen. Stuttgart: J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung; 1983: p. 158-170.

Knackmuss, H.-J.
Xenobiotic degradation in industrial sewage: Haloaromatics as target substrates. In: Phelps, C. F.; Clarke, P. H., eds. Biotechnology. London: The Biochemical Society; 1983: p. 173-190.

Knackmuss, H.-J.
Reduktive Schadstofftransformation zur Reinigung kontaminierter Böden und Grundwasserleiter. In: VEGAS Workshop vom 13. und 14. Oktober 1994. Veranstalter: VEGAS Leitung; Inst. f. Wasserbau der Universiversität Stuttgart.

Lehninger, A. L.
Biochemie. Weinheim: Verlag Chemie; 1987

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.
Molecular cloning: a lab manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory / Cold Spring Harbour; 1982.

Mermod, N.; Lehrbach, P. L.; Reinecke, W.; Timmis, K.N.
EMBO J. 3: 2461-2466; 1984

Miethling, R; Hecht, V.; Deckwer, W.-D.
Microbial Degradation of Quinoline: Kinetic studies with *Comamonas acidovorans* DSM 6426. Biotechnol. Bioeng. 42: 589-595; 1993

Miethling, R.
Reaktionskinetische Untersuchungen zum Abbau von Chinolin durch Comamonas acidovorans. Dissertation: Naturwissenschaftliche Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; 1993.

Müller, R.; Lingens, F.
Mechanismen der mikrobiellen Dehalogenierung von CKW. GIT-Supplement 5: 4-9; 1987.

Müller, R.; Thiele, J.; Klages, U.; Lingens, F.
Incorporation of [$^{18}OH_2O$] water into 4-hydroxybenzoic acid in the reaction of 4-chlorobenzoate dehalogenase from Pseudomonas spec. CBS3. Biochem. Biophys. Res. Commun. 124: 178-182; 1984.

Negoro, S.; Rojo, F.; Dwyer, D.; Engesser, K-H.; Knackmuss, H-J.; Timmis, K.N.
Influence of chromosomal and extrachromosomal location and genetic organization of catabolic genes on the stability and functioning of a constructed ortho cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates. unveröffentlicht; Kontaktadresse: GBF Braunschweig

Nüßlein, K.; Maris, D.; Timmis, K.; Dwyer, F.
Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by pseudomonas spp. introduced into activated sludge microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3380-3386; 1992.

Nüßlein, K.
Entwicklung und Anwendung von Belebtschlamm-Mikrokosmen zur Vorhersagbarkeit des in-situ Verbleibs von Mikroorganismen, die für den Abbau substituierter Aromaten genetisch verändert wurden. Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg; Abteilung für Biologie, Lehrstuhl für Limnologie; 1990.

Pieper, D.
Metabolismus von substituierten Phenoxyacetaten, Phenolen und Benzoaten durch Alcaligenes eutrophus JMP134 und Derivate. Dissertation; Fachbereich Naturwissenschaften II der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal; 1986.

Pieper, D.H.; Engesser, K.H.; Don, R.H.; Timmis, K.N.; Knackmuss, H-J.
Modified ortho-cleavage pathway in Alcaligenes eutrophus JMP134 for the degradation of 4-methylcatechol. FEMS Microbiol. Letters 29: 63-67; 1985.

Pirt, S.J.
Principles of microbe and cell cultivation. Oxford: Blackwell Scientific Publications / Osney Mead; 1975.

Ramos, J.L.; Stolz, A.; Reineke, W.; Timmis, K.N.
Altered effector specifities of gene expression: TOL plasmid xylS mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8467-8471; 1986.

Ramos, J.L.; Timmis, K.N.
Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. Microbiol. Sci. 4: 228-237; 1987.

Reineke, W.; Otting, W.; Knackmuss, H-J.
Cis-Dihydrodiols microbially produced from halo- and methylbenzoic acids. Tetradedron 34: 1707-1714; 1978

Reineke, W.; Knackmuss, H-J.
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds: Substituent effects on 1,2-dioxygenation of benzoic acid. Biochim. et Biophys. Acta 542: 412-423; 1978.

Reineke, W.; Knackmuss, H-J.
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds: Substituent effects on dehydrogenation of 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxlic acid. Biochim. et Biophys. Acta 542: 424-429; 1978.

Reineke, W.; Knackmuss, H-J.
Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in Pseudomonas sp. B13 derivatives. J. Bacteriol. 142: 467-473; 1980.

Renganathan, V.
Possible involvement of toluene-2,3-dioxygenase in defluorination of 3-fluoro-substituted benzenes by toluene-degrading Pseudomonas sp. strain T-12. Appl. Environ. Microbiol. 55: 330-334; 1989.

Roels, J.A.
Energetics and kinetics in biotechnology. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press; 1983.

Rojo, F.; Ramos, JL.; Pieper, D.; Engesser, K-H.; Knackmuss, H-J.; Timmis, K.N.
Laboratory evolution of catabolic pathways. Biotech. 2: 65-74; 1988.

Rojo, F.; Pieper, D.H.; Engesser, K-H.; Knackmuss, H-J.; Timmis, K.N.
Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- amd methylaromatics. Science 238: 1395-1398; 1987.

Sahasrabudhe, S.R.; Modi, A.J.; Modi, V.V.
Dehalogenation of 3-Chlorobenzoate by Immobilized Pseudomonas sp. B13 Cells. Biotechnol. Bioeng. 31: 889-893; 1987.

Schmidt, E.; Bartels, I.; Knackmuss, H-J.
Degradation of 3-chlorobenzoate or 3-methylbenzoate-utilising cultures. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 381-389; 1985.

Schmidt, E.; Knackmuss, H-J.
Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds: Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. Biochem. J. 192: 339-347; 1980.

Schraa, G.; Boone, M.L.; Jetten, M.S.M.; van Neerven, A.R.W.; Colberg, P.J.; Zehnder, A.J.B.
Degradation of 1,4-dichlorobenzene by Alcaligenes sp. strain A 175 . Appl. Environ. Microbiol. 52: 1374-1381; 1986.

Schreiber, A.; Hellwig, M.; Dorn, E.; Reineke, W.; Knackmuss, H-J.
Critical reactions in fluorobenzoic acid degradation by Pseudomonas sp. B13. Appl. Environ. Microbiol. 39: 58-67; 1980.

Simon, R.; Priefer, U.; Pühler, A.
A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotech. 1: 784-794; 1983.

Stouthamer, A.H.; Bettenhausen, C.
Biochim. et biophys. Acta 301: 53; 1973.

Strothmann, U.; Weisbrodt, W.; Zimmer, G.
Aspekte und Perspektiven der Behandlung von Abwasser aus chemischen Produktionen. In: Berlin, TU, ed. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung: Biologischer Abbau von Chlorkohlenwasserstoffen; Kolloquium an der TU Berlin.; 1992: p. 17-31.

Taeger, K.; Knackmuss, H.-J.; Schmidt, E.
Biodegradability of mixtures of chloro- and methysubstituted aromatics: Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and 3-methylbenzoate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 603-608; 1988

Thiele, J.; Müller, R.; Lingens, F.
Initial characterization of 4-chlorobenzoate dehalogenase from Pseudomonas sp. CBS3. FEMS Microbiol. Lett. 41: 115-119; 1987.

Timmis, K.N.; Rojo, F.; Ramos, J.L.(a)
Prospects for laboratory engineering of bacteria to degrade pollutants in Environment biotechnology: Reducing risks from Environmental Chemicals through Biotechnology.. In: Omenn (ed.), G. S., ed. New York: Plenum Press; 1988: p. 61-81.

Timmis, K.N.; Rojo, F.; Ramos, J.L.; Krumme, M.L.; Dwyer, D.F.
Laboratory engineering of bacteria designed to degrade pollutants. Schr.-Reihe Verein WaBoLu . Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1988: p. 251-265.

Ulonska, A.
Verfahrenstechnische Untersuchungen zum aeroben mikrobiellen Abbau von Chinolin in einem 3-Phasen-Airliftreaktor. Dissertation: Fakultät für Maschinenbau und Elektrotechnik der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig; 1993.

Ulonska, A.; Deckwer, W.-D.; Hecht, V.
Degradation of quinoline by immobilized *Comamonas acidovorans* in a three-phase airlift reactor. Biotechnol. Bioeng. 46: 80-87; 1995.

van der Meer, J.R.; Roelofsen, W.; Schraa, G.; Zehnder, A.J.B.
Degradation of low concentrations of dichlorobenzenes and 1,2,4-Trichlorobenzene by Pseudomonas sp. P51 in nonsterile soil columns. FEMS Microbiol. Ecol. 45: 333-341; 1987.

van der Tweel, W.J.J.; Kok, J.B.; De Bont, J.A.M.
Reductive dechlorination of 2,4-dichlorobenzoate to 4-chlorobenzoate and hydrolytic dehalogenation of 4-chloro-, 4-bromo-, and 4-iodobenzoate by Alcaligenes denitrificans NTB-1. Appl. Environ. Microbiol. 53: 810-815; 1987.

Worsey, M.J.; Williams, P.A.
Metabolism of toluene and xylenes by Pseudomonas putida (arvilla) mt-c2: evidence for a new function of the TOL-Plasmid. J. Bacteriol. 124: 7-13; 1975.

Yang, der R.; Humphrey, A.E.
Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnol. Bioeng. 17: 1211-1235; 1975.

Zaitsev, G.M.
Utilization of 2-chlorobenzoic acid by Pseudomonas cepacia. Mikrobiologiya 53: 75-80; 1982.

VII. Anhang

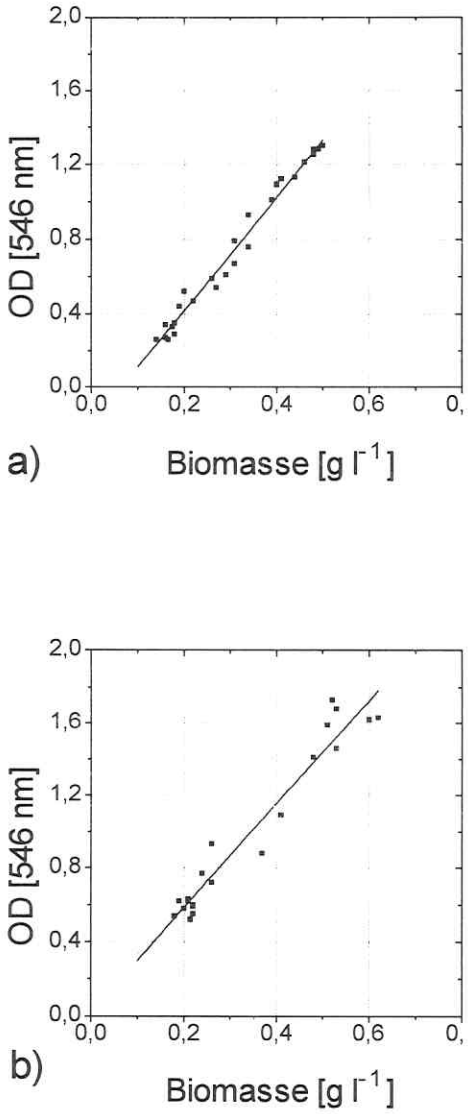


Abb.54: Korrelation der optischen Dichte mit der BTM-Konzentration anhand der Wertepaare aus den adjusted batch-Versuchen mit einer S_0-Konzentration von
a) *Pseudomonas spec.* B13: r=0,990; sdev=0,05
b) SN45P (Substrat: B-Mix): r=0,972; sdev=0,10

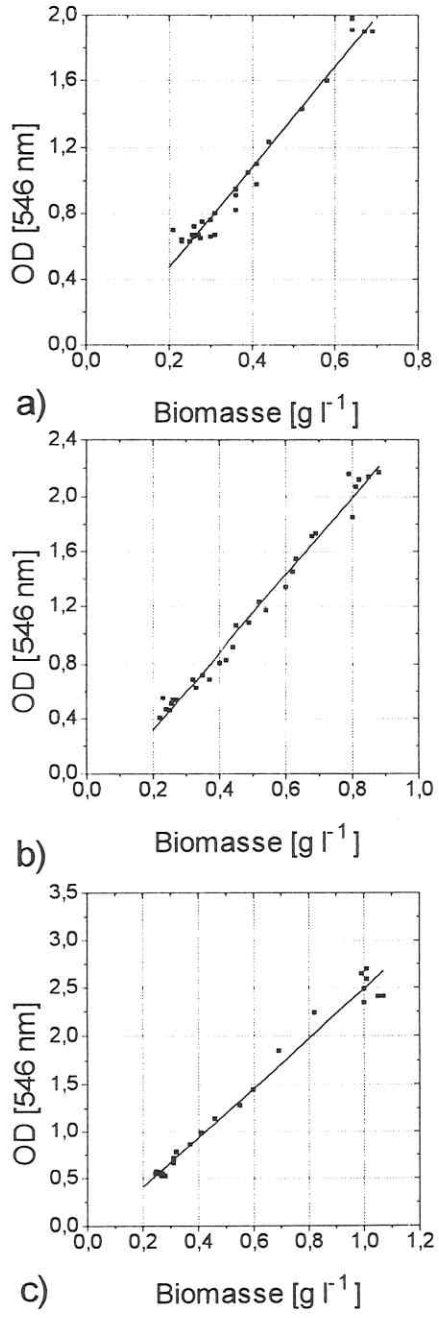


Abb. 55: Korrelation der optischen Dichte bei 249 nm mit der BTM von SN45P; a) Substrat 3CB: r=0,984; sdev=0,08; b) Substrat 4CB: r=0,992; sdev=0,07; c) Substrat 4MB: r=0,991; sdev=0,11.

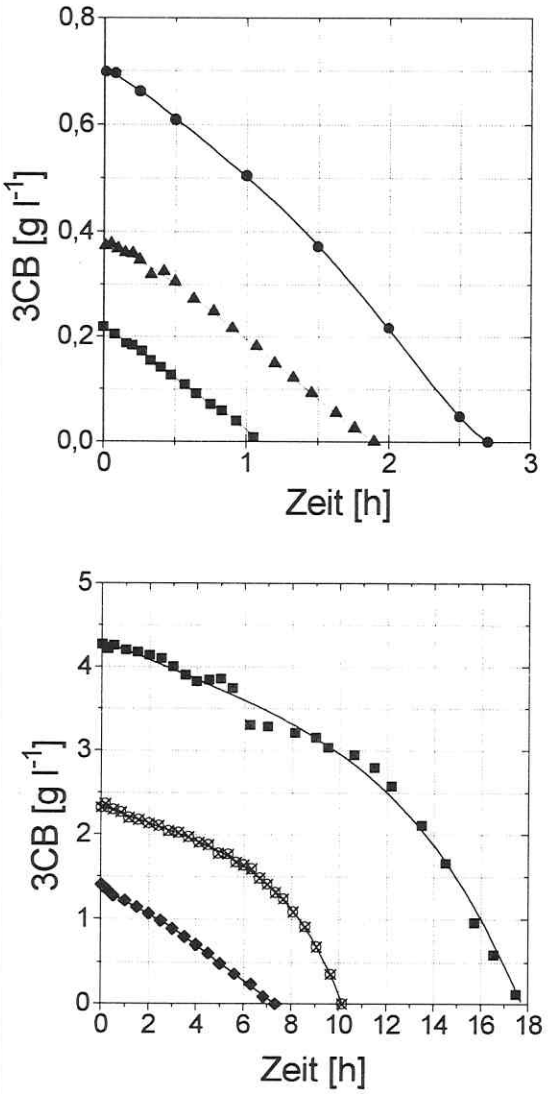


Abb. 56: Kinetik der 3CB-Verwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch.

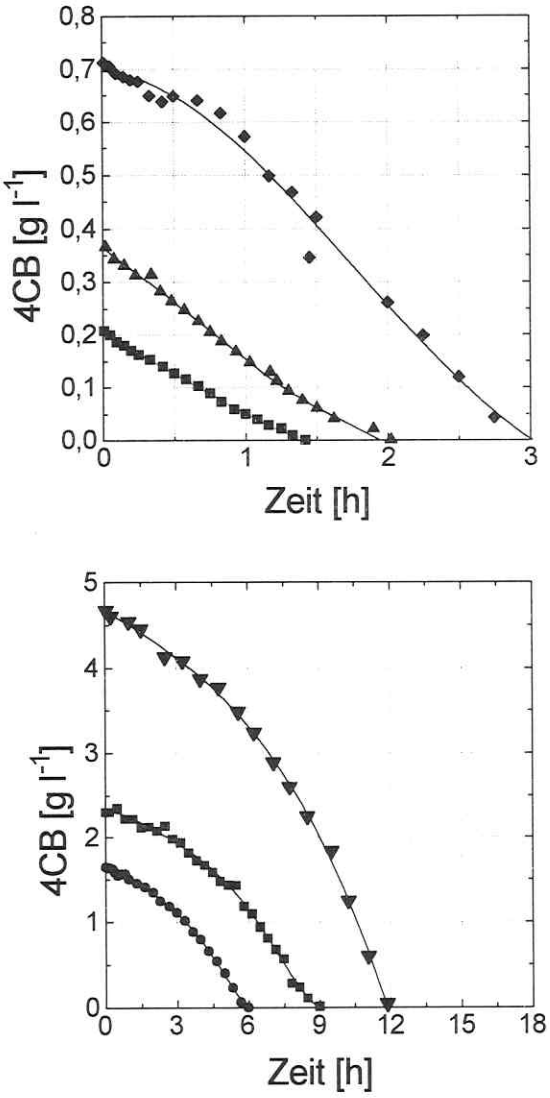


Abb. 57: Kinetik der 4CB-Verwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch.

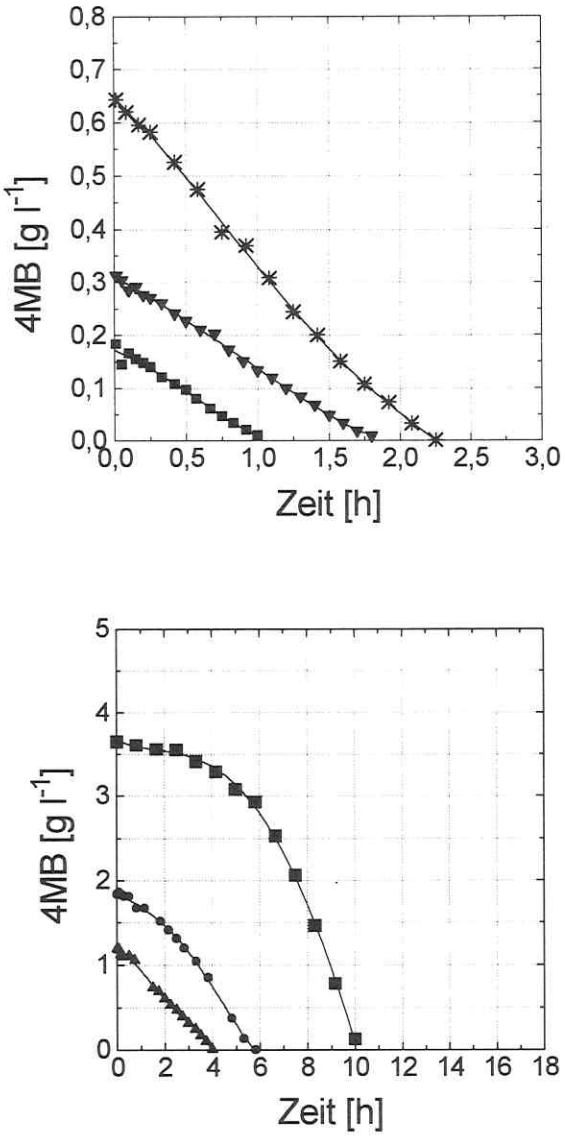


Abb. 58: Kinetik der 4MB-Verwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch.

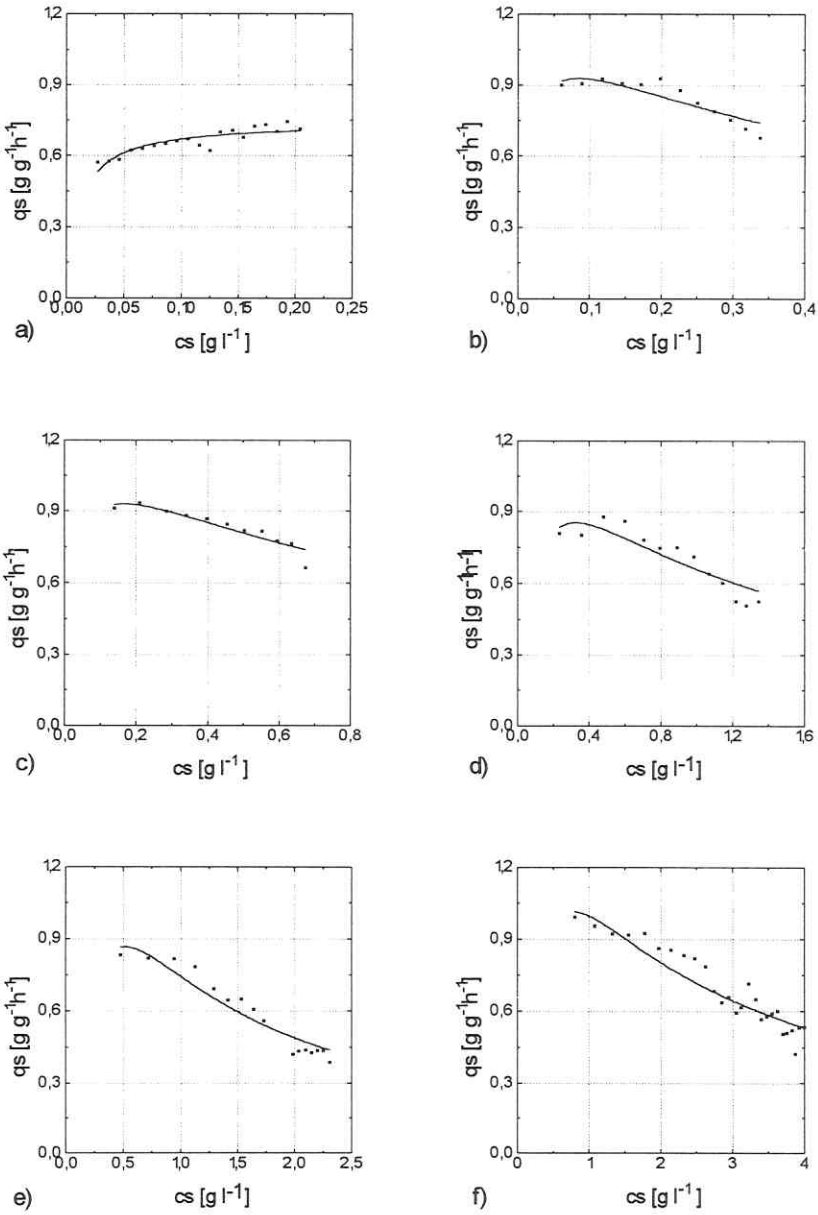


Abb. 59: Spezifische 3CB Umsatzraten von SN45P als Funktion der Substratkonzentration. S_0-Konzentrationen: a) 0,22 g l^{-1}; b) 0,36 g l^{-1}; c) 0,69 g l^{-1}; d) 1,46 g l^{-1}; e) 2,35 g l^{-1}; f) 4,28 g l^{-1}.

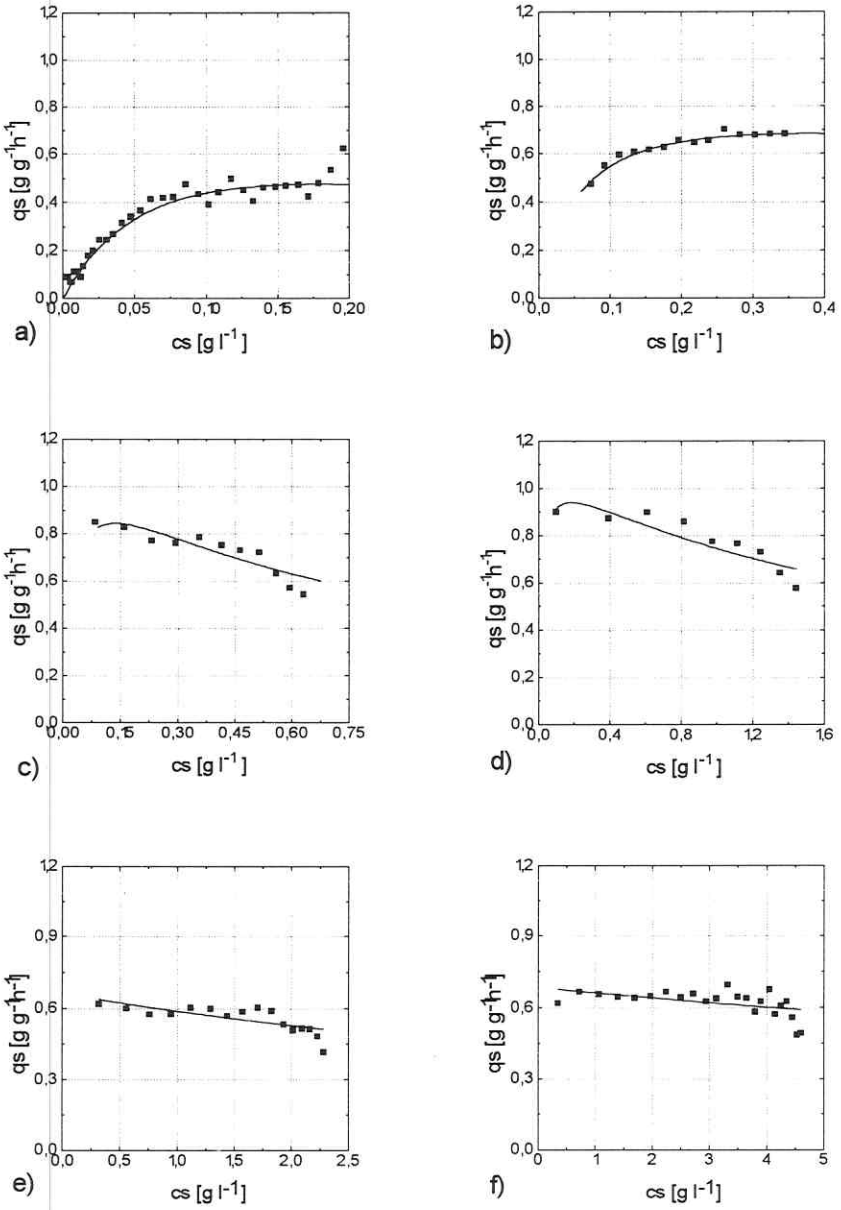


Abb. 60: Spezifische 4CB-Umsatzraten als Funktion der Substratkonzentration. S_0-Konzentrationen: a) 0,21 g l^{-1}; b) 0,40 g l^{-1}, c) 0,71 g l^{-1}; d) 1,65 g l^{-1}; e) 2,33 g l^{-1}; e) 4,68 g l^{-1}.

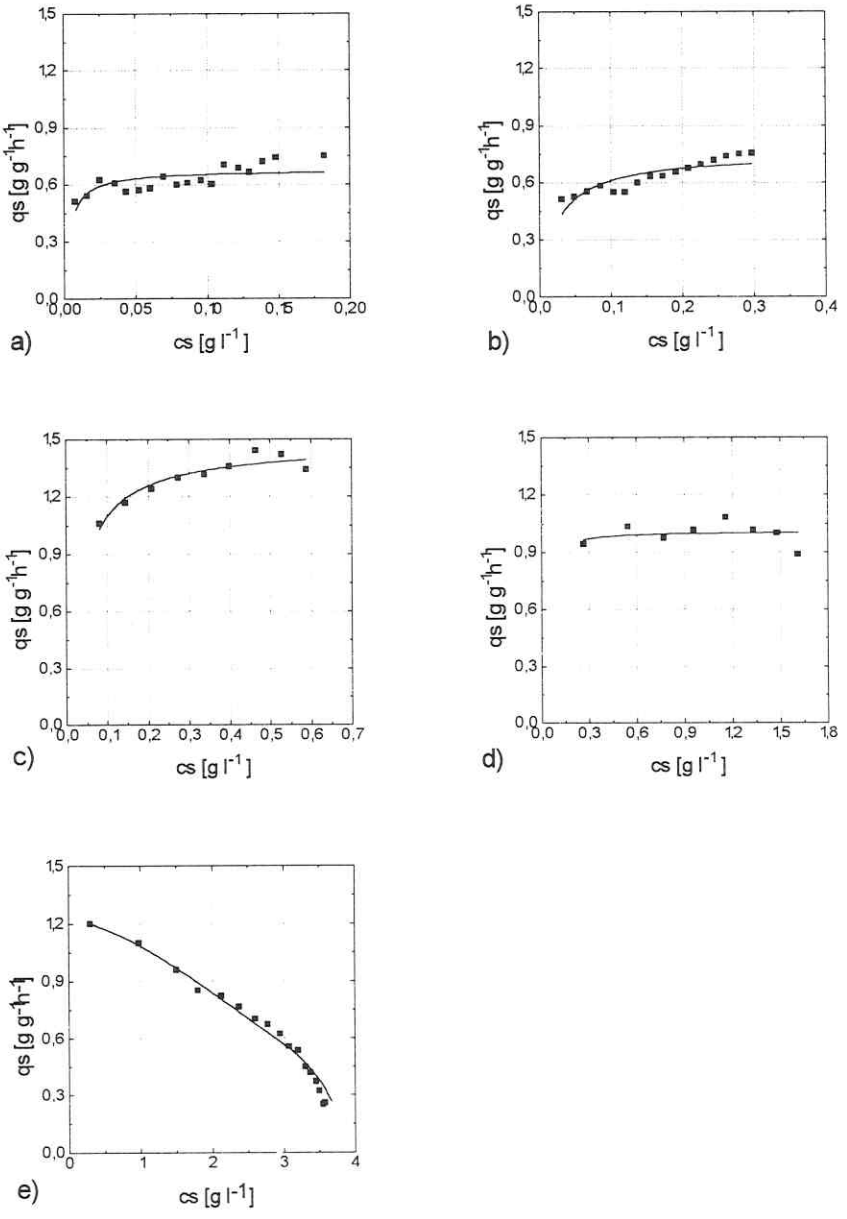
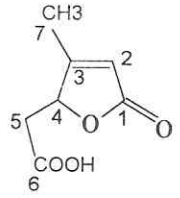


Abb. 61: Spezifische 4MB-Umsatzraten als Funktion der Substratkonzentration. S_0-Konzentrationen: a) 0,19 g l^{-1}; b) 0,32 g l^{-1}; c) 0,65 g l^{-1}; d) 1,85 g l^{-1}; e) 3,65 g l^{-1}.



m/z= 156 (M^+, 8), 138 (M^+-18, 20), 128 (M^+-28,4), 110 (M^+-18-28, 100), 97 (57), 69 (80), 68 (25), 41(35)

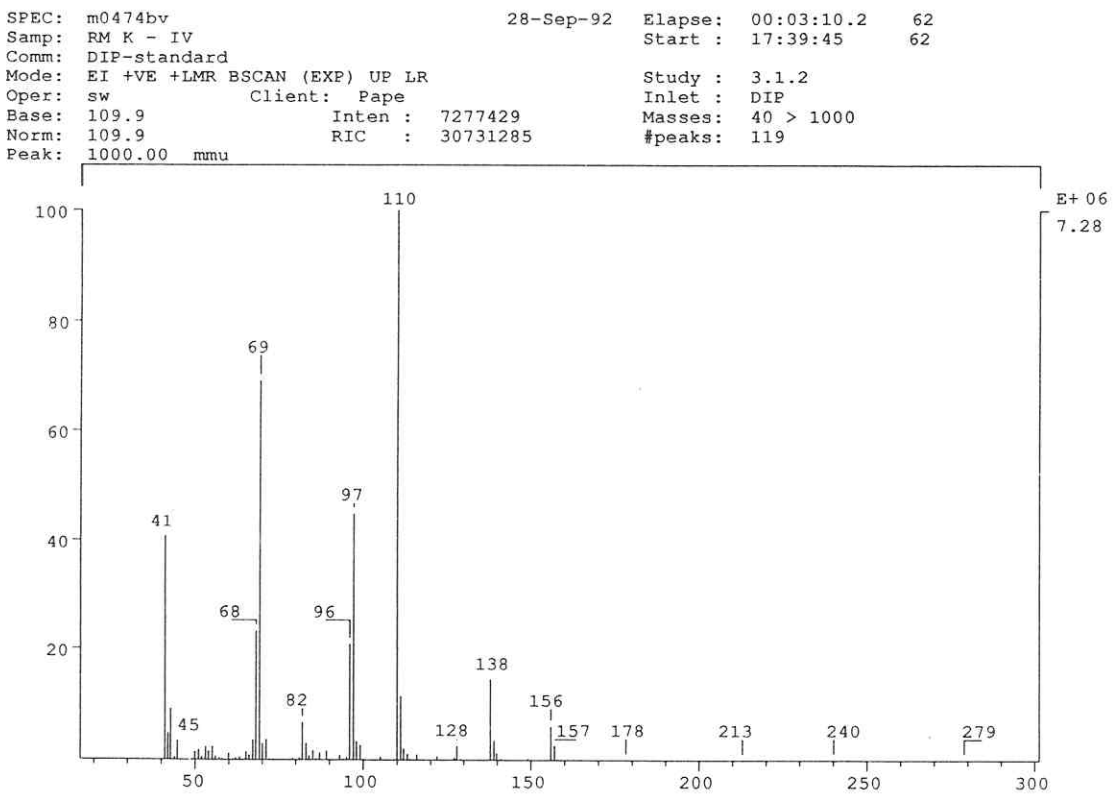
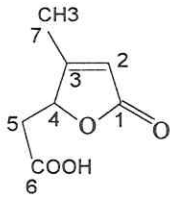


Abb. 62: Massenspektrum von 4-Carboxymethyl-3-Methyl-but-2-en-1,4-olid.



^{1}H-NMR (300 MHz): δ = 2,17 (s, 3H,-CH_3); 2,56 (dd, 1H,-CH-COOH); 3,00 (dd, 1H,-CH_2-COOH); 5,38 (m, 1H,>CH-O-); 5,92 (s, 1H, =CH-C=O).

^{13}C-NMR (150 MHz): δ = 13,9 (C7); 37,9 (C5); 83,3 (C4); 118,1 (C2); 171,5 (C3); 172,9 (C6); 175,3 (C1)

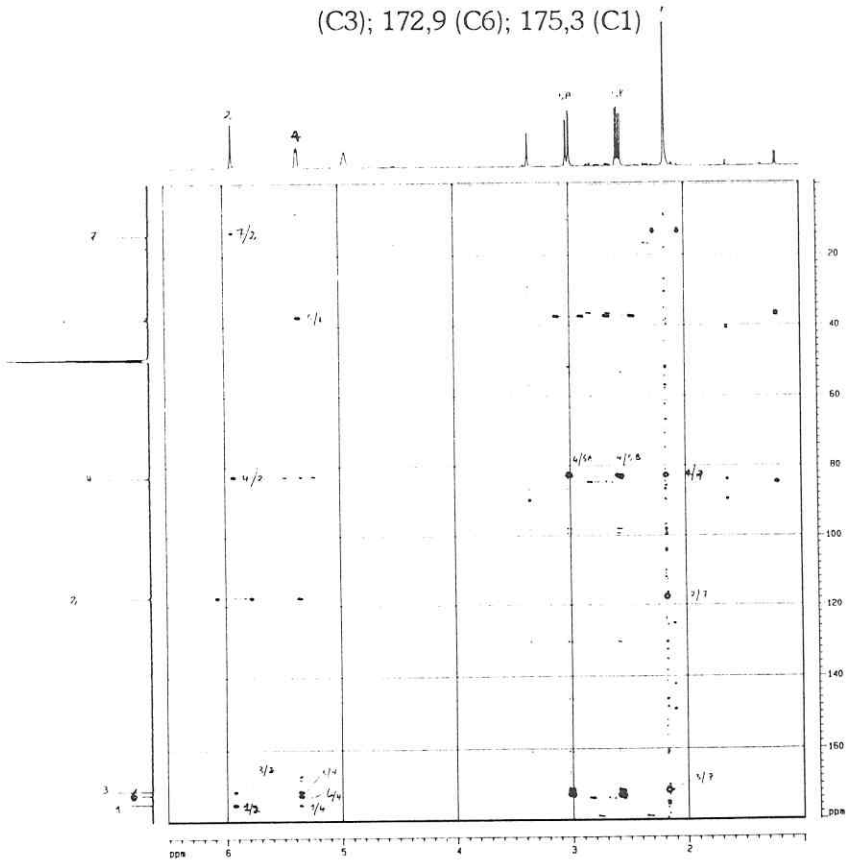


Abb. 63: NMR-Spektrum von 4-Carboxymethyl-3-Methyl-but-2-en-1,4-olid.

Tab. A1: 3CB-Verwertung von SN45P im adjusted batch Versuch

Startkonzentration: 0,22 g/l				Startkonzentration: 0,36 g/l				Startkonzentration: 0,70g/l						
Zeit	BTM [g/ l]	3CB [g /l]	OD	Zeit	BTM [g/ l]	3CB [g /l]	OD	Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/ l]	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,01	0,25	0,218	0,60	0,01	0,28	0,363	0,62	0,01	0,25	0,698	0,60	0,00	0,026	0,020
0,08	0,27	0,204	0,60	0,05	0,30	0,366	0,60	0,08	0,24	0,695	0,58	0,20	0,202	0,194
0,16	0,28	0,187	0,66	0,10	0,31	0,353	0,59	0,25	0,26	0,661	0,63	0,40	0,273	0,219
0,20	0,27	0,183	0,66	0,15	0,29	0,341	0,60	0,50	0,26	0,609	0,63	0,60	0,315	0,245
0,27	0,28	0,172	0,64	0,20	0,31	0,333	0,60	1,00	0,30	0,504	0,77	0,80	0,334	0,242
0,33	0,27	0,154	0,65	0,25	0,30	0,321	0,62	1,50	0,34	0,371	0,90	1,00	0,339	0,253
0,40	0,28	0,141	0,65	0,30	0,29	0,308	0,63	2,00	0,38	0,217	1,03	1,20	0,339	0,253
0,47	0,30	0,126	0,66	0,38	0,29	0,289	0,60	2,50	0,45	0,048	1,24	1,40	0,343	0,266
0,57	0,31	0,108	0,70	0,47	0,29	0,283	0,60	3,00	0,46	0,004	1,27	1,60	0,366	0,279
0,65	0,30	0,090	0,76	0,55	0,29	0,260	0,61	3,50	0,46	0,000	1,27	1,80	0,396	0,296
0,75	0,30	0,070	0,75	0,63	0,29	0,239	0,61	4,00	0,46		1,27	2,00	0,426	0,317
0,83	0,32	0,059	0,85	0,72	0,28	0,219	0,60					2,20	0,436	0,333
0,93	0,33	0,039	0,87	0,85	0,29	0,185	0,64					2,40	0,452	0,318
1,05	0,34	0,017	0,83	0,98	0,30	0,152	0,61					2,60	0,390	0,259
1,13	0,31	0,007	0,92	1,12	0,31	0,115	0,63					2,80	0,165	0,048
1,23	0,32	0,001	0,88	1,25	0,29	0,079	0,65					3,00	0,049	0,014
1,32	0,34	0,000	0,87	1,38	0,31	0,041	0,63					3,20	0,018	0,013
1,42	0,34		0,84	1,48	0,33	0,009	0,70					3,40	0,010	0,012
1,50	0,31		0,86	1,65	0,34		0,70					3,60	0,007	0,013
				1,82	0,32		0,72					3,80	0,005	0,013
				1,98	0,33		0,71							
				2,15	0,33		0,73							
				2,32	0,34		0,74							
				2,48	0,33		0,75							
				2,65	0,34		0,78							
				2,97	0,34		0,77							

Tab. A2: 3CB-Verwertung von SN45P im adjusted batch Versuch

Startkonzentration: 1,46 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/ l]	OD	Zeit	PR [g/ l*	TR [g/ l*h]
0,01	0,27	1,456	0,66	0,00		
0,25	0,26	1,369	0,65	0,50	0,212	0,174
0,50	0,26	1,367	0,65	1,00	0,230	0,178
1,00	0,25	1,272	0,62	1,50	0,247	0,184
1,50	0,25	1,164	0,61	2,00	0,255	0,185
2,00	0,25	1,090	0,62	2,50	0,264	0,187
2,50	0,26	1,007	0,64	3,00	0,267	0,189
3,00	0,23	0,924	0,56	3,50	0,271	0,191
3,50	0,24	0,822	0,58	4,00	0,288	0,202
4,00	0,26	0,756	0,63	4,50	0,303	0,212
4,50	0,27	0,662	0,68	5,00	0,329	0,221
5,00	0,27	0,576	0,68	5,50	0,343	0,239
5,50	0,25	0,439	0,62	6,00	0,379	0,257
6,30	0,34	0,279	0,88	6,50	0,424	0,294
6,83	0,36	0,135	0,96	7,00	0,488	0,340
7,33	0,41	0,000	1,11	7,50	0,324	0,129
7,83	0,43		1,18	8,00	0,160	0,069
8,33	0,44		1,2	8,50	0,075	0,028
8,90	0,46		1,26	9,00	0,042	0,026
9,60	0,45		1,24	9,50	0,034	0,023
				10,00	0,035	0,021

Startkonzentration: 2,35 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/ l]	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,01	0,28	2,32	0,65	0,00		
0,17	0,31	2,36	0,67	0,50	0,148	0,120
0,50	0,30	2,29	0,66	1,00	0,151	0,118
0,83	0,26	2,26	0,67	1,50	0,152	0,119
1,17	0,26	2,19	0,67	2,00	0,156	0,122
1,58	0,27	2,17	0,67	2,50	0,158	0,124
2,00	0,25	2,13	0,63	3,00	0,160	0,125
2,42	0,23	2,10	0,64	3,50	0,172	0,134
2,83	0,21	2,04	0,70	4,00	0,184	0,143
3,25	0,23	2,02	0,63	4,50	0,200	0,154
3,67	0,26	1,97	0,66	5,00	0,219	0,172
4,12	0,26	1,90	0,72	5,50	0,243	0,190
4,50	0,28	1,87	0,75	6,00	0,255	0,224
4,92	0,30	1,78	0,76	6,50	0,310	0,259
5,33	0,30	1,76	0,76	7,00	0,353	0,296
5,67	0,31	1,67	0,80	7,50	0,406	0,339
6,00	0,36	1,63	0,82	8,00	0,484	0,395
6,33	0,36	1,59	0,91	8,50	0,570	0,457
6,67	0,36	1,48	0,95	9,00	0,683	0,538
7,00	0,41	1,41	0,98	9,50	0,787	0,629
7,33	0,39	1,31	1,05	10,00	0,887	0,793
7,67	0,41	1,24	1,14	10,50	0,281	0,086
8,08	0,44	1,09	1,23	11,00	0,049	0,038
8,58	0,52	0,91	1,43	11,50	0,037	0,036
9,08	0,58	0,68	1,60	12,00		
9,67	0,64	0,36	1,98	12,50		
10,16	0,69	0,06	1,90	13,00		
10,67	0,67		1,90			
11,27	0,64		1,91			

Startkonzentration: 4,27 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/ l]	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,01	0,24	4,271	0,52	0,0		
0,25	0,22	4,201	0,52	0,5	0,117	0,109
0,50	0,22	4,258	0,54	1,0	0,137	0,111
1,00	0,23	4,199	0,54	1,5	0,148	0,115
1,50	0,23	4,170	0,55	2,0	0,149	0,116
2,00	0,23	4,136	0,55	2,5	0,151	0,118
2,50	0,23	4,096	0,55	3,0	0,153	0,119
3,00	0,23	4,000	0,57	3,5	0,155	0,120
3,50	0,24	3,897	0,56	4,0	0,157	0,122
4,00	0,24	3,822	0,58	4,5	0,163	0,127
4,50	0,24	-	0,57	5,0	0,171	0,127
5,00	0,24	3,854	0,58	5,5	0,178	0,137
5,50	0,24	3,737	0,60	6,0	0,185	0,147
6,25	0,25	3,349	0,63	6,5	0,196	0,150
7,00	0,26	3,334	0,65	7,0	0,209	0,159
8,13	0,26	3,202	0,69	7,5	0,219	0,162
9,00	0,28	3,147	0,69	8,0	0,230	0,170
9,53	0,25	3,030	0,73	8,5	0,244	0,184
10,65	0,29	2,941	0,87	9,0	0,258	0,189
11,50	0,33	2,790	1,00	9,5	0,274	0,191
12,23	0,37	2,575	1,11	10,0	0,289	0,201
13,50	0,41	2,103	1,15	10,5	0,294	0,220
14,51	0,45	1,657	1,23	11,0	0,322	0,240
15,75	0,45	0,959	1,24	11,5	0,363	0,269
16,55	0,59	0,583	1,68	12,0	0,386	0,285
17,50	0,66	0,111	1,90	12,5	0,431	0,306
18,62	0,65	0,010	1,88	13,0	0,475	0,338
19,70	0,66	0,005	1,90	13,5	0,567	0,403
				14,0	0,627	0,423
				14,5	0,696	0,483
				15,0	0,769	0,534
				15,5	0,840	0,606
				16,0	0,928	0,622
				16,5	1,040	0,663
				17,0	1,093	0,653
				17,5	0,846	0,328
				18,0	0,394	0,209
				18,5	0,235	0,092
				19,0	0,145	0,053

Tab. A3: 4CB-Verwertung von SN45P im adjusted batch Versuch

Startkonzentration: 0,20 g/l				Startkonzentration: 0,40 g/l				Startkonzentration: 0,71g/l						
Zeit	BTM [g/l]	4CB [g/l]	OD	Zeit	BTM [g/l]	4CB [g /l]	OD	Zeit	BTM [g /l]	4CB	OD	Zeit	CPR [g/ l*h	OTR [g/ l*h]
0,01	0,33	0,196	0,66	0,01	0,26	0,396	1,62	0,01	0,33	0,71	0,66	0,00		
0,10	0,33	0,187	0,68	0,05	0,30	0,385	1,62	0,05	0,32	0,71	0,65	0,20	0,165	0,086
0,15	0,33	0,179	0,66	0,10	0,30	0,383	1,60	0,10	0,32	0,69	0,63	0,40	0,213	0,108
0,20	0,34	0,172	0,70	0,15	0,30	0,382	1,61	0,15	0,31	0,69	0,62	0,60	0,229	0,133
0,25	0,34	0,165	0,70	0,20	0,28	0,362	1,60	0,20	0,31	0,68	0,62	0,80	0,250	0,136
0,33	0,34	0,156	0,70	0,25	0,29	0,352	1,60	0,25	0,30	0,68	0,60	1,00	0,274	0,158
0,42	0,35	0,149	0,72	0,33	0,30	0,327	1,58	0,33	0,30	0,65	0,60	1,20	0,299	0,176
0,50	0,35	0,140	0,73	0,42	0,30	0,315	1,60	0,42	0,30	0,64	0,59	1,40	0,321	0,209
0,58	0,36	0,133	0,75	0,50	0,30	0,29	1,60	0,50	0,31	0,65	0,61	1,60	0,350	0,277
0,67	0,35	0,126	0,73	0,58	0,32	0,264	1,60	0,67	0,30	0,64	0,59	1,80	0,369	0,279
0,75	0,36	0,117	0,76	0,67	0,32	0,245	1,60	0,83	0,30	0,62	0,59	2,00	0,382	0,282
0,83	0,36	0,109	0,77	0,75	0,31	0,218	1,61	1,00	0,30	0,57	0,59	2,20	0,381	0,286
0,92	0,38	0,102	0,82	0,83	0,31	0,198	1,61	1,17	0,33	0,50	0,68	2,40	0,376	0,287
1,00	0,39	0,095	0,83	0,97	0,30	0,156	1,61	1,33	0,33	0,47	0,68	2,60	0,375	0,292
1,08	0,38	0,086	0,82	1,10	0,31	0,116	1,62	1,50	0,34	0,42	0,70	2,80	0,374	0,270
1,16	0,41	0,077	0,90	1,23	0,31	0,066	1,62	1,75	0,38	0,35	0,82	3,00	0,320	0,203
1,25	0,40	0,070	0,88	1,37	0,33	0,023	1,66	2,00	0,41	0,26	0,89	3,20	0,166	0,045
1,33	0,38	0,061	0,82	1,50	0,35	0,000	1,65	2,25	0,44	0,20	0,99	3,40	0,066	0,010
1,42	0,39	0,054	0,85	1,67	0,37		1,65	2,50	0,47	0,12	1,06	3,60	0,036	0,004
1,50	0,38	0,047	0,82	1,83	0,37		1,65	2,75	0,48	0,04	1,11	3,80	0,024	0,007
1,58	0,39	0,041	0,83	2,00	0,37		1,71	3,02	0,50		1,14	4,00	0,024	0,007
1,67	0,38	0,035	0,81	2,17	0,39		1,73	3,25	0,51		1,17			
2,62	0,40	0,031	0,86	2,33	0,39		1,73	3,50	0,51		1,19			
				2,50	0,39		1,74	4,13	0,52		1,21			
				2,75	0,40		1,75							
				3,00	0,39		1,75							

Tab. A4: 4CB-Verwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch

Startkonzentration: 1,65 g/l

Zeit	BTM [g /l]	4CB	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,01	0,32	1,64	0,64	0,0		
0,10	0,31	1,63	0,63	0,5	0,161	0,121
0,20	0,34	1,63	0,69	1,0	0,176	0,133
0,30	0,31	1,62	0,62	1,5	0,198	0,163
0,40	0,33	1,59	0,66	2,0	0,239	0,192
0,50	0,30	1,55	0,58	2,5	0,278	0,221
0,67	0,30	1,57	0,60	3,0	0,317	0,250
0,83	0,30	1,57	0,58	3,5	0,347	0,272
1,00	0,29	1,50	0,55	4,0	0,395	0,313
1,33	0,29	1,45	0,55	4,5	0,451	0,353
1,67	0,27	1,41	0,49	5,0	0,499	0,405
2,00	0,32	1,35	0,64	5,5	0,522	0,411
2,30	0,30	1,25	0,60	6,0	0,263	0,114
2,67	0,34	1,18	0,69	6,5	0,050	0,031
3,00	0,34	1,11	0,70	7,0	0,038	0,028
3,33	0,41	1,01	0,91	7,5	0,032	0,029
3,67	0,42	0,88	0,92	8,0	0,028	0,018
4,00	0,46	0,79	1,03	8,5	0,028	0,018
4,33	0,45	0,66	1,00	9,0	0,025	0,019
4,67	0,50	0,54	1,15	9,5	0,026	0,019
5,00	0,55	0,40	1,29	10,0		
5,33	0,54	0,23	1,27	10,5		
5,67	0,57	0,06	1,36	11,0		
6,00	0,60		1,45	11,5		
6,17	0,65		1,58	12,0		
6,33	0,65		1,59	12,5		
6,50	0,65		1,59	13,0		
9,17	0,64		1,56	13,5		

Startkonzentration: 2,33 g/l

Zeit	BTM [g /l]	4CB	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,0	0,27	2,29	0,54	0,0		
0,2	0,26	2,30	0,51	0,5	0,011	0,015
0,5	0,25	2,34	0,46	1,0	0,095	0,103
0,8	0,22	2,22	0,41	1,5	0,135	0,123
1,2	0,24	2,22	0,47	2,0	0,159	0,145
1,5	0,26	2,11	0,54	2,5	0,176	0,149
1,8	0,23	2,12	0,55	3,0	0,201	0,172
2,2	0,33	2,07	0,63	3,5	0,230	0,189
2,5	0,32	2,13	0,69	4,0	0,269	0,222
2,8	0,37	1,98	0,69	4,5	0,294	0,251
3,2	0,35	1,93	0,72	5,0	0,353	0,279
3,5	0,40	1,81	0,81	5,5	0,398	0,301
3,8	0,42	1,72	0,83	6,0	0,432	0,337
4,2	0,44	1,67	0,91	6,5	0,486	0,365
4,5	0,45	1,58	1,06	7,0	0,548	0,406
4,8	0,49	1,47	1,08	7,5	0,594	0,427
5,2	0,49	1,43	1,08	8,0	0,637	0,447
5,5	0,54	1,43	1,17	8,5	0,624	0,437
5,8	0,52	1,18	1,23	9,0	0,558	0,371
6,2	0,60	1,09	1,34	9,5	0,305	0,181
6,5	0,62	0,94	1,45	10,0	0,078	0,041
6,8	0,63	0,81	1,55	10,5		
7,2	0,68	0,67	1,71	11,0		
7,5	0,69	0,56	1,73	11,5		
7,8	0,80	0,28	1,85	12,0		
8,2	0,81	0,24	2,07			
8,5	0,82	0,11	2,12			
9,0	0,79	0,01	2,16			
9,5	0,85	0,00	2,14			
10,0	0,88		2,17			

Startkonzentration: 4,68 g/l

Zeit	BTM [g /l]	4CB	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,05	0,35	4,68	0,62	0,0	0,026	0,002
0,25	0,32	4,61	0,60	0,5	0,070	0,095
1,00	0,29	4,55	0,55	1,0	0,146	0,106
1,50	0,32	4,46	0,53	1,5	0,182	0,141
2,50	0,32	4,13	0,59	2,0	0,222	0,169
3,25	0,42	4,08	0,69	2,5	0,238	0,180
4,00	0,45	3,87	0,77	3,0	0,267	0,206
4,75	0,44	3,77	0,88	3,5	0,294	0,225
5,58	0,48	3,49	1,19	4,0	0,325	0,243
6,25	0,55	3,25	1,38	4,5	0,347	0,267
7,08	0,67	2,89	1,59	5,0	0,379	0,294
7,75	0,76	2,60	1,75	5,5	0,416	0,325
8,50	0,82	2,25	2,02	6,0	0,453	0,351
9,50	0,96	1,83	2,40	6,5	0,501	0,386
10,22	0,99	1,25	2,50	7,0	0,559	0,428
11,05	1,15	0,60	2,86	7,5	0,607	0,462
11,85	1,16	0,05	3,30	8,0	0,662	0,510
12,73	1,23		3,20	8,5	0,734	0,548
13,48	1,15		3,25	9,0	0,807	0,614
14,25	1,24		3,35	9,5	0,864	0,710
15,00	1,29		3,25	10,0	0,845	0,700
				10,5	0,838	0,690
				11,0	0,832	0,689
				11,5	0,812	0,597
				12,0	0,441	0,228
				12,5	0,132	0,040
				13,0	0,066	0,024
				13,5	0,051	0,023
				14,0	0,040	0,019
				14,5	0,030	0,011
				15,0	0,031	0,011
				15,5	0,031	0,011

Tab. A5: 4MB-Verwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch

Startkonzentration: 0,19 g/l

Zeit	X [g l-1]	4MB [g l-1	OD
0,01	0,24	0,18	0,59
0,05	0,25	0,14	0,60
0,10	0,25	0,17	0,62
0,15	0,25	0,16	0,60
0,20	0,26	0,15	0,64
0,25	0,25	0,14	0,60
0,33	0,26	0,12	0,64
0,42	0,27	0,11	0,66
0,50	0,27	0,10	0,66
0,57	0,28	0,08	0,69
0,67	0,29	0,06	0,72
0,75	0,30	0,05	0,75
0,83	0,30	0,03	0,76
0,92	0,31	0,02	0,78
1,00	0,31	0,01	0,78
1,08	0,32	0,00	0,81
1,17	0,33		0,82
1,25	0,33		0,83
1,33	0,33		0,83
1,42	0,33		0,84

Startkonzentration: 0,32 g/l

Zeit	BTM [g /l]	4MB	OD
0,01	0,27	0,31	0,58
0,05	0,27	0,30	0,61
0,10	0,26	0,29	0,56
0,15	0,27	0,29	0,59
0,20	0,28	0,28	0,55
0,25	0,27	0,27	0,57
0,33	0,24	0,26	0,59
0,42	0,27	0,24	0,60
0,50	0,25	0,23	0,62
0,60	0,30	0,21	0,66
0,70	0,26	0,20	0,70
0,80	0,31	0,17	0,72
0,90	0,30	0,15	0,73
1,00	0,30	0,13	0,75
1,10	0,32	0,12	0,75
1,20	0,35	0,10	0,78
1,30	0,36	0,08	0,82
1,40	0,37	0,07	0,82
1,50	0,37	0,05	0,85
1,60	0,37	0,03	0,87
1,70	0,37	0,02	0,90
1,80	0,37	0,01	0,90
1,90	0,37	0,00	0,96
2,00	0,34	0,00	0,96
2,10	0,37	0,00	0,93
2,20	0,38	0,00	0,94
2,30	0,38	0,00	0,94

Zeit	CPR [g/ l*h	OTR [g/ l*h
0,00	0,025	0,008
0,10	0,088	0,170
0,20	0,133	0,186
0,30	0,154	0,202
0,40	0,183	0,223
0,50	0,194	0,243
0,60	0,214	0,248
0,70	0,222	0,250
0,80	0,231	0,252
0,90	0,236	0,240
1,00	0,239	0,236
1,10	0,238	0,232
1,20	0,238	0,240
1,30	0,234	0,235
1,40	0,227	0,234
1,50	0,220	0,226
1,60	0,212	0,228
1,70	0,205	0,200
1,80	0,187	0,162
1,90	0,146	0,116
2,00	0,116	0,078
2,10	0,084	0,038
2,20	0,063	0,025
2,30	0,041	0,029

Startkonzentration: 0,65g/l

Zeit	BTM [g /l]	4MB	OD
0,01	0,25	0,54	0,52
0,08	0,24	0,52	0,52
0,17	0,25	0,50	0,51
0,25	0,24	0,58	0,51
0,42	0,26	0,53	0,52
0,58	0,25	0,48	0,54
0,75	0,25	0,40	0,55
0,92	0,25	0,37	0,57
1,08	0,25	0,31	0,59
1,25	0,25	0,24	0,59
1,42	0,26	0,20	0,64
1,58	0,27	0,15	0,69
1,75	0,25	0,11	0,71
1,92	0,34	0,07	0,76
2,08	0,33	0,03	0,84
2,25	0,35	0,00	0,88
2,42	0,41	0,00	0,93
2,58	0,38	0,00	0,97
2,75	0,44		1,00
2,92	0,40		1,01
3,08	0,42		1,01
3,25	0,40		1,04
3,42	0,39		1,01
4,60	0,39		0,98

Zeit	CPR [g/ l*h	OTR [g/ l*h]
0,00	0,029	0,004
0,25	0,158	0,225
0,50	0,218	0,238
0,75	0,244	0,258
1,00	0,220	0,301
1,25	0,310	0,337
1,50	0,363	0,371
1,75	0,404	0,397
2,00	0,434	0,409
2,25	0,452	0,417
2,50	0,471	0,432
2,75	0,490	0,447
3,00	0,523	0,466
3,25	0,543	0,476
3,50	0,577	0,490
3,75	0,613	0,472
4,00	0,622	0,440
4,25	0,518	0,253
4,50	0,210	0,065
4,75	0,126	0,056
5,00	0,114	0,060
5,25	0,101	0,050
5,50	0,093	0,052
5,75	0,086	0,039
6,00	0,078	0,041
6,25	0,070	0,032

Tab. A6: 4MB-Verwertung durch SN45P im adjusted batch Versuch

Startkonzentration: 1,85 g/l

Zeit	X [g /l]	4MB [g/l]	OD	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,0	0,26	1,839	0,56	0,0	0,004	0,020
0,1	0,25	1,863	0,55	0,5	0,020	0,004
0,2	0,27	1,832	0,54	1,0	0,114	0,135
0,3	0,27	1,813	0,53	1,5	0,159	0,163
0,5	0,26	1,810	0,55	2,0	0,203	0,222
0,8	0,27	1,676	0,55	2,5	0,256	0,265
1,2	0,25	1,675	0,57	3,0	0,313	0,307
1,5	0,26	--	0,55	3,5	0,343	0,329
1,8	0,28	1,512	0,53	4,0	0,379	0,365
2,2	0,31	1,411	0,66	4,5	0,442	0,430
2,5	0,31	1,314	0,71	5,0	0,524	0,484
2,8	0,32	1,200	0,78	5,5	0,618	0,532
3,3	0,37	1,043	0,86	6,0	0,681	0,577
3,8	0,41	0,850	0,98	6,5	0,757	0,612
4,3	0,46	--	1,14	7,0	0,870	0,611
4,8	0,55	0,373	1,28	7,5	0,211	0,053
5,3	0,60	0,133	1,44	8,0	0,120	0,045
5,8	0,69	0,000	1,85			
6,3	0,82		2,24			
6,8	1,01		2,59			
7,3	1,01		2,70			
7,8	0,99		2,65			
8,3	1,00		2,34			
8,8	1,05		2,41			

Startkonzentration: 3,65 g/l

Zeit	BTM [g /l]	4MB [g/ l]	OD
0,0	0,280	3,65	0,54
0,8	0,280	3,61	0,57
1,7	0,285	3,55	0,70
2,5	0,280	3,55	0,79
3,3	0,350	3,41	0,97
4,2	0,420	3,29	1,07
5,0	0,460	3,08	1,14
5,8	0,480	2,93	1,25
6,7	0,580	2,52	1,49
7,5	0,710	2,06	1,73
8,3	0,810	1,46	2,17
9,2	0,990	0,78	2,66
10,0	1,380	0,13	3,47
10,8	1,800		4,52
11,7	1,860		4,32
12,5	1,760		4,26
14,3	1,780		4,17

Zeit [h]	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]
0,0	0,022	0,00
0,5	0,064	0,07
1,0	0,091	0,11
1,5	0,146	0,15
2,0	0,201	0,19
2,5	0,224	0,21
3,0	0,250	0,23
3,5	0,270	0,25
4,0	0,291	0,27
4,5	0,313	0,29
5,0	0,339	0,32
5,5	0,373	0,35
6,0	0,400	0,37
6,5	0,479	0,43
7,0	0,539	0,49
7,5	0,620	0,56
8,0	0,708	0,64
8,5	0,823	0,74
9,0	0,944	0,83
9,5	1,091	0,97
10,0	1,287	1,04
10,5	1,524	1,06
11,0	1,217	0,30
11,5	0,457	0,14
12,0	0,316	0,14
12,5	0,299	0,13
13,0	0,299	0,11
13,5	0,180	0,12
14,0	0,137	0,12
14,5	0,107	0,11

Tab. A7: Auswaschversuche Stamm: SN45P

Substrat: 3CB
Erhöhung der Verdünnungsrate von D=0,32 [1/h] auf D=0,37 [1/h]

Zeit [h]	BTM [g/l]	3CB [g/l]	µ [1/h]	qS [g/g*h]	OTR [g/l*h]	CPR [g/l*h]
0,0	0,51	0,000				
0,5	0,50	0,000	0,29	1,14	0,559	0,709
1,0	0,48	0,000	0,30	1,19	0,561	0,699
1,5	0,46	0,000	0,30	1,23	0,542	0,684
2,0	0,44	0,004	0,29	1,26	0,538	0,679
2,5	0,42	0,008	0,29	1,30	0,540	0,669
3,0	0,41	0,025	0,29	1,31	0,533	0,659
3,5	0,39	0,062	0,29	1,26	0,533	0,659
4,0	0,37	0,115	0,28	1,18	0,519	0,659
4,5	0,35	0,165	0,28	1,15	0,493	0,629
5,0	0,33	0,218	0,27	1,15	0,455	0,594
5,5	0,31	0,272	0,27	1,14	0,438	0,564
6,0	0,29	0,325	0,27	1,13	0,412	0,539
6,5	0,28	0,379	0,27	1,12	0,395	0,509
7,0	0,26	0,432	0,27	1,11	0,372	0,484
7,5	0,26	0,474	0,27	1,14	0,366	0,469
8,0	0,26	0,515	0,27	1,18	0,360	0,454
8,5	0,26	0,556	0,28	1,17	0,337	0,434
9,0	0,26	0,589	0,28	1,21	0,326	0,419
9,5	0,25	0,618	0,28	1,25	0,306	0,404
10,0	0,25	0,642	0,29	1,29	0,300	0,389
10,5	0,25	0,659			0,293	0,379
11,0	0,24				0,288	0,359

Substrat: 4CB
Erhöhen der Verdünnungsrate von D=0,30 [1/h] auf D=0,37][1/h]

Zeit	BTM [g/l]	4CB [g/l]	µ [1/h]	qS [g/g*h]
0,0	0,70	0,000		
0,5	0,70	0,000	0,35	0,78
1,0	0,70	0,000	0,35	0,78
1,5	0,70	0,000	0,35	0,78
2,0	0,70	0,000	0,35	0,78
2,5	0,70	0,000	0,35	0,78
3,0	0,70	0,000	0,35	0,78
3,5	0,70	0,000	0,35	0,77
4,0	0,70	0,001	0,35	0,76
4,5	0,70	0,010	0,34	0,76
5,0	0,70	0,015	0,34	0,77
5,5	0,69	0,020	0,34	0,77
6,0	0,69	0,025	0,34	0,76
6,5	0,68	0,040	0,33	0,77
7,0	0,67	0,050	0,32	0,76
7,5	0,65	0,080	0,31	0,75
8,0	0,63	0,110	0,30	0,72
8,5	0,60	0,180	0,29	0,68
9,0	0,57	0,270	0,29	0,62
9,5	0,54	0,410	0,29	0,58
10,0	0,51	0,550	0,29	0,58
10,5	0,48	0,700	0,29	0,59
11,0	0,45	0,850	0,28	0,63
11,5	0,42	0,990	0,29	0,67
12,0	0,39	1,130	0,30	0,77
12,5	0,37	1,230	0,31	0,91
13,0	0,36	1,260	0,32	1,03
13,5	0,34	1,300	0,32	1,10
14,0	0,33	1,310	0,32	1,17
14,5	0,32	1,330	0,33	1,23
15,0	0,31	1,340		

Substrat: 4MB
Erhöhen der Verdünnungsrate von D=0,34 [1/h] auf D=0,41 [1/h]

Zeit [h]	BTM [g/l]	4MB [g/l]	µ [h-1]	qS [g/g*h]	OTR [g/l*h]	CPR [g/l*h]
0,00	0,66	0,000				
0,50	0,65	0,000	0,37	0,799	0,766	0,729
1,00	0,63	0,000	0,36	0,816	0,715	0,759
1,50	0,62	0,000	0,36	0,825	0,714	0,764
2,00	0,60	0,001	0,35	0,844	0,710	0,739
2,50	0,58	0,001	0,36	0,864	0,704	0,745
3,00	0,57	0,001	0,35	0,895	0,703	0,730
3,50	0,55	0,001	0,36	0,926	0,686	0,720
4,00	0,54	0,002	0,35	0,944	0,695	0,725
4,50	0,52	0,004	0,35	0,941	0,677	0,720
5,00	0,51	0,006	0,35	0,995	0,669	0,715
5,50	0,49	0,008	0,34	1,013	0,688	0,710
6,00	0,47	0,022	0,34	0,962	0,647	0,690
6,50	0,46	0,061	0,35	0,885	0,625	0,661
7,00	0,44	0,112	0,35	0,861	0,595	0,631
7,50	0,43	0,156	0,33	0,899	0,546	0,601
8,00	0,41	0,196	0,33	0,910	0,545	0,557
8,50	0,40	0,240	0,33	0,900	0,503	0,542
9,00	0,38	0,277	0,33	0,929	0,490	0,512
9,50	0,37	0,313	0,33	0,935	0,441	0,483
10,00	0,35	0,352	0,32	0,932	0,445	0,463
10,50	0,33	0,391	0,32	0,970	0,396	0,433
11,00	0,32	0,419	0,32	1,012	0,382	0,413
11,50	0,30	0,453	0,30	1,009	0,359	0,389
12,00	0,29	0,486	0,30	1,026	0,344	0,374
12,50	0,27	0,514	0,29	1,019	0,328	0,359
13,00	0,26	0,542	0,28	1,043	0,304	0,344
13,50	0,24	0,576	0,25	1,025	0,286	0,294
14,00	0,22	0,598	0,26	1,039	0,277	0,294
14,50	0,21	0,626	0,27	1,027	0,263	0,295
15,00	0,19	0,648	0,24	1,071	0,246	0,265
15,50	0,17	0,671	0,22	1,040	0,237	0,265
16,00	0,16	0,693	0,23	1,055	0,228	0,265
16,50	0,14	0,715	0,21	1,055	0,230	0,255
17,00	0,13	0,732	0,22	1,075	0,221	0,255
17,50	0,12	0,749	0,20	1,080	0,209	0,245
18,00	0,10	0,766	0,25	1,074	0,205	0,245
18,50	0,10	0,782	0,41	1,087	0,216	0,235
19,00	0,10	0,794	0,41	1,093	0,207	0,235
19,50	0,10	0,805	0,41	1,110	0,199	0,225
20,00	0,10	0,816	0,41	1,188	0,199	0,225

Tab. A8: Daten zum Chemostatversuch mit SN45P

Substrat	D [1/h]	BTM* [g/l]	CO2 (%)	O2 (%)	S_o [g/l]	Cl-S_o [g/l]	NH3 S_o [g/l]	NH3-Ablauf [g/l]	Cl-Ablauf [g/l]
3CB	0,09	0,74	0,233	20,75	1,550	0,40	0,29	0,20	0,73
3CB	0,18	0,71	0,452	20,55	1,550	0,40	0,29	0,20	0,81
3CB	0,18	0,72	0,467	20,54	1,566	0,39	0,32	0,20	0,76
3CB	0,27	0,79	0,722	20,30	1,566	0,39	0,33	0,21	0,78
3CB	0,09	0,74	0,258	20,72	1,566	0,39	0,32	0,18	0,78
4CB	0,09	0,69	0,263	20,73	1,534	0,37	0,32	0,21	0,74
4CB	0,13	0,72	0,338	20,65	1,550	0,33	0,32	0,22	0,71
4CB	0,18	0,73	0,464	20,55	1,553	0,38	0,31	0,24	0,73
4CB	0,25	0,73	0,603	20,40	1,566	0,33	0,32	0,21	0,66
4CB	0,27	0,80	0,668	20,38	1,622	0,34	0,31	0,21	0,69
4CB	0,29	0,73	0,703	20,31	1,523	0,33	0,32	0,22	0,67
4MB	0,09	0,88	0,247	20,70	1,363		0,33	0,19	
4MB	0,18	0,87	0,440	20,49	1,312		0,32	0,17	
4MB	0,27	0,90	0,640	20,26	1,326		0,32	0,20	
4MB	0,32	0,94	0,755	20,14	1,306		0,30	0,20	
4MB	0,35	0,99	0,839	20,05	1,311		0,32	0,19	

Tab. A9: Daten zum Chemostatversuch mit SN45P

Substrat	D [1/h]	OTR [g/l*h]	CTR [g/l*h]	RQ	C-rec.	O-rec.	N-rec.	H-rec	Cl-rec
3CB	0,09	0,12	0,17	1,02	1,00	0,96	1,05	0,97	0,94
3CB	0,18	0,24	0,36	1,07	1,01	1,00	1,01	0,94	1,17
3CB	0,18	0,25	0,37	1,09	1,06	1,01	0,94	0,89	1,04
3CB	0,27	0,39	0,58	1,09	1,12	1,03	0,98	0,97	1,10
3CB	0,09	0,14	0,19	0,99	1,10	0,94	0,89	0,87	1,09
4CB	0,09	0,13	0,20	1,08	1,09	1,01	0,96	0,88	1,06
4CB	0,13	0,18	0,26	1,04	1,06	0,97	1,02	0,95	1,07
4CB	0,18	0,24	0,37	1,11	1,06	1,03	1,10	1,01	1,00
4CB	0,25	0,33	0,48	1,06	1,00	0,98	1,00	0,91	0,94
4CB	0,27	0,34	0,54	1,16	1,02	1,07	1,04	0,98	0,96
4CB	0,29	0,39	0,57	1,07	1,04	1,00	1,02	0,95	0,99
4MB	0,09	0,16	0,18	0,84	0,98	0,84	0,96	0,61	
4MB	0,18	0,29	0,35	0,87	0,99	0,87	0,92	0,38	
4MB	0,27	0,44	0,51	0,86	0,98	0,86	1,02	0,46	
4MB	0,32	0,51	0,61	0,87	1,02	0,88	1,09	0,55	
4MB	0,35	0,57	0,68	0,88	1,04	0,89	1,03	0,64	

Tab. A 10: Daten zum Chemostatversuch mit SN45P

Substrat	D [1/h]	qs [g/g*h]	q O_2 [g/g*h]	q CO_2 [g/g*h]	Y X/CO_2	Y X/O_2	Y X/S	Y O_2/S	Y CO_2/S
3CB	0,09	0,19	0,16	0,23	0,40	0,57	0,48	0,85	1,19
3CB	0,18	0,40	0,34	0,50	0,36	0,53	0,46	0,86	1,26
3CB	0,18	0,38	0,34	0,51	0,34	0,51	0,46	0,90	1,35
3CB	0,27	0,53	0,49	0,74	0,36	0,54	0,51	0,94	1,40
3CB	0,09	0,19	0,19	0,26	0,34	0,46	0,48	1,02	1,40
4CB	0,09	0,20	0,19	0,29	0,31	0,47	0,45	0,96	1,42
4CB	0,13	0,27	0,25	0,36	0,35	0,50	0,47	0,93	1,33
4CB	0,18	0,38	0,33	0,50	0,35	0,53	0,47	0,88	1,34
4CB	0,25	0,54	0,46	0,67	0,38	0,55	0,46	0,85	1,23
4CB	0,27	0,55	0,42	0,68	0,40	0,64	0,49	0,77	1,22
4CB	0,29	0,61	0,53	0,78	0,37	0,54	0,48	0,88	1,29
4MB	0,09	0,14	0,18	0,21	0,43	0,50	0,65	1,31	1,51
4MB	0,18	0,27	0,33	0,40	0,45	0,53	0,66	1,25	1,49
4MB	0,27	0,40	0,49	0,57	0,47	0,55	0,68	1,22	1,45
4MB	0,32	0,44	0,54	0,65	0,49	0,59	0,72	1,22	1,47
4MB	0,35	0,46	0,57	0,69	0,51	0,61	0,75	1,23	1,49

Tab. A11-A13: Daten zum Chemostatversuch: Kontinuierliche Kultivierung von SN45P auf einem äquimolarem Substratgemisch aus 3CB/4C

Tab. A11

D [1/h]	BTM* [g/l]	CO_2 (%)	O_2 (%)	S_0 [g/l]	Cl-S_0 [mg/l]	NH_4-S_0 [mg/l]	NH_4-Ablauf [mg/l]	Cl-Ablauf [mg/l]
0,03	0,45	0,10	20,88	1,51	321,58	326,04	220,11	571,29
0,09	0,56	0,23	20,75	1,55	321,30	320,19	224,24	567,13
0,17	0,57	0,41	20,54	1,55	241,80	331,81	230,36	506,63
0,22	0,57	0,47	20,45	1,51	210,50	348,26	233,14	458,87
0,24	0,65	0,50	20,42	1,51	327,80	348,99	226,89	580,46
0,27	0,63	0,58	20,32	1,54				

Tab. A12

D [1/h]	OTR (g/l*h)	CTR (g/l*h)	RQ	C-rec.	O-rec.	N-rec.	H-rec	Cl-rec
0,03	0,05	0,07	1,09	0,94	0,97	0,88	0,66	1,03
0,09	0,17	0,21	0,90	0,96	0,84	0,96	0,74	1,00
0,17	0,32	0,40	0,91	0,96	0,86	0,95	0,75	1,07
0,22	0,40	0,47	0,86	0,92	0,81	0,92	0,73	1,02
0,24	0,42	0,50	0,86	0,96	0,82	0,93	0,76	1,04
0,27	0,50	0,58	0,85	0,94	0,81			

Tab. A13

D [1/h]	Y X/S	Y CO_2/S	Y O_2/S	Y X/CO_2	Y X/O_2	qs [g/g*h]	q CO_2 [g/g*h]	q O_2 [g/g*h]
0,03	0,29	1,52	1,01	0,19	0,29	0,10	0,16	0,11
0,09	0,37	1,55	1,26	0,24	0,29	0,24	0,37	0,30
0,17	0,38	1,54	1,23	0,24	0,31	0,46	0,71	0,57
0,22	0,38	1,39	1,18	0,27	0,32	0,59	0,81	0,69
0,24	0,43	1,39	1,18	0,31	0,36	0,55	0,77	0,65
0,27	0,42	1,43	1,23	0,29	0,34	0,65	0,92	0,79

Tab. A 14: Auswaschversuch nach Kultivierung auf einem Benzoesäuregemisch
Substrat: 3CB/4CB/4MB
Erhöhen der Verdünnungsrate von D=0,28 [1/h] auf D=0,41 [1/h]

Zeit [h]	BTM [g/l]	3CB [mg/l]	4CB [mg/l]	4MB [mg/l]	B-Mix [mg/l]	Zeit [h]	µ [1/h]	qs [g/g*h]	qs [mmol/g*h]	OTR	CPR
0,0	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00				0,52	0,61
0,5	0,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,36	0,98	6,47	0,72	0,83
0,8	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,36	1,01	6,65	0,72	0,83
1,1	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,36	1,04	6,83	0,71	0,80
1,5	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,36	1,07	7,05	0,71	0,80
1,9	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	0,36	1,10	7,23	0,71	0,80
2,3	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,35	1,14	7,47	0,71	0,79
2,7	0,54	0,00	0,00	0,00	0,00	3,50	0,35	1,18	7,74	0,70	0,78
3,1	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	0,35	1,21	7,99	0,70	0,78
3,5	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	4,50	0,35	1,25	8,25	0,70	0,77
3,9	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,35	1,30	8,54	0,70	0,76
4,3	0,51	0,00	0,00	0,00	0,00	5,50	0,34	1,34	8,84	0,70	0,75
4,7	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	6,00	0,34	1,39	9,17	0,70	0,75
5,1	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	6,50	0,34	1,43	9,52	0,70	0,75
5,4	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	7,00	0,33	1,42	9,92	0,70	0,76
5,8	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	7,50	0,33	1,34	10,34	0,69	0,77
6,0	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	8,00	0,32	1,30	10,82	0,64	0,72
6,5	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00	8,50	0,32	1,32	11,35	0,62	0,67
6,9	0,44	0,00	1,30	0,00	1,30	9,00	0,32	1,38	11,51	0,60	0,66
7,3	0,42	0,00	15,77	2,31	18,08	9,50	0,31	1,45	11,16	0,58	0,64
7,8	0,40	2,07	40,49	14,14	56,71	10,00	0,31	1,51	10,45	0,58	0,63
8,3	0,42	8,23	77,54	31,65	117,42	10,50	0,32	1,58	10,45	0,56	0,62
8,8	0,34	12,97	105,30	46,00	164,27	11,00	0,34	1,61	10,53	0,55	0,61
9,6	0,36	19,03	133,84	61,83	214,69	11,50	0,34	1,64	11,04	0,54	0,60
10,1	0,37	23,61	148,50	69,65	241,76	12,00	0,34	1,68	11,76	0,54	0,56
10,5	0,30	27,65	160,98	76,88	265,51	12,50	0,36	1,72	11,81	0,51	0,55
11,2	0,29	33,89	177,22	85,36	296,47						
12,5	0,25	49,68	212,52	108,59	370,79						
13,3	0,26	53,49	219,08	111,44	384,00						

Tab. A15: Rohdaten zum Chemostatversuch mit *Pseudomonas spec*. B13 (aus Flores, 1994)

D [1/h]	OTR [g/l*h]	CPR [g/l*h]	BTM [g/l]	NaCl [g/l]	3CB-Auslauf [g/l]	3CB-So [g/l]	NaCl-SO	Cl-rec	C-rec
0,05	0,09	0,09	0,45	1,20	0,00	1,57	0,75	0,89	0,81
0,09	0,20	0,22	0,37	1,11	0,01	1,56	0,53	1,00	0,97
0,14	0,34	0,37	0,46	1,17	0,00	1,56	0,53	1,06	1,08
0,20	0,44	0,55	0,54	1,19	0,00	1,59	0,52	1,07	1,17
0,25	0,47	0,61	0,62	1,14	0,00	1,54	0,52	1,05	1,14

'ab. A16: 3CB-Verwertung von B13 im adjusted batch Versuch

tartkonzentration: 0,76 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/l]	Cl-Bilanz	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]	C-Bilanz
0,0	0,30	0,763	1,00	0,00			
0,2	0,32	0,716	0,96	0,25	0,21	0,26	0,97
0,3	0,31	0,683	1,14	0,50	0,25	0,27	0,95
0,4	0,33	0,658	1,10	0,75	0,26	0,26	0,93
0,6	0,38	0,620	1,16	1,00	0,27	0,27	0,92
0,9	0,36	0,561	1,06	1,25	0,27	0,28	0,91
1,1	0,37	0,502	1,08	1,50	0,29	0,30	0,89
1,4	0,42	0,410	1,06	1,75	0,32	0,33	0,87
1,8	0,42	0,319	1,07	2,00	0,33	0,33	0,83
1,9	0,43	0,261	1,09	2,25	0,34	0,33	0,79
2,3	0,49	0,106	1,07	2,50	0,31	0,29	0,82
2,6	0,55	0,056	1,09	2,75	0,24	0,19	0,86
3,2	0,55	0,024	1,14	3,00	0,12	0,06	0,87
3,7	0,54	0,025	1,15	3,25	0,04	0,02	0,88
4,1	0,54	0,024	1,17	3,50	0,02	0,02	0,88
				3,75	0,02	0,02	0,88

Startkonzentration: 1,51 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/l]	Cl-Bilanz	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]	C-Bilanz
0,0	0,17	1,51	1,00	0,00			
0,2	0,14	1,49	1,06	0,50	0,10	0,10	0,99
0,5	0,16	1,46	1,05	1,00	0,11	0,10	0,97
0,8	0,18	1,43	1,05	1,50	0,12	0,11	0,96
1,0	0,18	1,41	1,05	2,00	0,13	0,12	0,96
1,5	0,18	1,36	1,08	2,50	0,13	0,13	0,95
2,1	0,16	1,32	1,15	3,00	0,14	0,14	0,95
2,9	0,19	1,26	1,15	3,50	0,14	0,15	0,94
3,5	0,22	1,19	1,17	4,00	0,15	0,15	0,95
4,0	0,20	1,12	1,20	4,50	0,16	0,15	0,95
4,5	0,27	1,10	1,24	5,00	0,16	0,16	0,94
5,0	0,26	1,01	1,22	5,50	0,17	0,16	0,94
5,5	0,29	0,96	1,12	6,00	0,18	0,17	0,94
6,0	0,31	0,89	1,13	6,50	0,18	0,17	0,94
6,8	0,34	0,80	1,23	7,00	0,19	0,17	0,95
7,4	0,31	0,73	1,23	7,50	0,19	0,18	0,94
8,2	0,34	0,61	1,23	8,00	0,20	0,18	0,94
9,3	0,39	0,46	1,23	8,50	0,20	0,19	0,94
10,2	0,40	0,31	1,12	9,00	0,20	0,19	0,93
10,6	0,44	0,26	1,11	9,50	0,21	0,18	0,93
11,8	0,46	0,26	1,25	10,00	0,21	0,18	0,92
12,3	0,48	0,11	1,26	10,50	0,20	0,18	0,92
13,0	0,50	0,06	1,08	11,00	0,20	0,17	0,92
13,8	0,48	0,04	1,09	11,50	0,18	0,15	0,92
14,3	0,49	0,04	1,09	12,00	0,15	0,12	0,92
24,0	0,41	0,04	1,33	12,50	0,10	0,07	0,93
				13,00	0,05	0,04	0,93
				13,50	0,03	0,01	0,93
				14,00	0,02	0,01	0,92

Tab. A17: 3CB-Verwertung von B13 im adjusted batch Versuch

Tab. A17: Startkonzentration: 2,27 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/l]	CI-Bilanz	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]	C-Bilanz
0,0	0,31	2,270	1,00	0,00			1,00
0,2	0,25	2,247	0,98	0,50	0,24	0,29	1,00
0,5	0,25	2,232	0,99	1,00	0,35	0,29	1,00
0,7	0,28	2,130	1,00	1,50	0,34	0,26	1,00
1,0	0,44	2,028	0,99	2,00	0,35	0,27	1,00
1,3	0,43	2,046	1,03	2,50	0,36	0,27	1,00
1,7	0,41	1,875	1,00	3,00	0,36	0,30	0,99
2,0	0,46	1,850	1,03	3,50	0,38	0,31	0,98
2,5	0,55	1,680	1,02	4,00	0,40	0,32	0,96
3,0	0,61	1,543	1,02	4,50	0,41	0,33	0,94
3,5	0,63	1,333	1,05	5,00	0,43	0,35	0,92
4,0	0,67	1,175	1,02	5,50	0,40	0,34	0,90
4,8	0,79	0,834	1,02	6,00	0,41	0,32	0,88
5,8	0,91	0,458	1,03	6,50	0,39	0,30	0,88
6,8	1,04	0,114	1,02	7,00	0,32	0,23	0,87
7,3	1,05	0,056	1,01	7,50	0,14	0,05	0,88
8,5	1,01	0,051	1,03	8,00	0,04	0,01	0,89
9,1	1,01	0,051	1,05	8,50	0,03	0,00	0,89
9,9	1,04	0,052	1,06	9,00	0,03	0,01	0,89
				9,50	0,03	0,01	0,90

Startkonzentration: 4,29 g/l

Zeit	BTM [g /l]	3CB [g/l]	Zeit	CPR [g/ l*h]	OTR [g/ l*h]	C-Bilanz	CI-Bilanz
0,02	0,50	4,283	0,00	0,13	0,18	1,00	1,00
0,50	0,50	4,167	0,50	0,21	0,18	0,98	1,00
1,00	0,53	4,045	1,00	0,29	0,21	0,97	1,00
1,50	0,52	3,896	1,50	0,38	0,32	0,96	1,00
2,00	0,53	3,781	2,00	0,45	0,38	0,96	1,00
2,50	0,58	3,621	2,50	0,54	0,41	0,96	1,04
3,00	0,68	3,460	3,00	0,62	0,47	0,96	1,06
3,50	0,67	3,273	3,50	0,70	0,53	0,96	1,06
4,00	0,71	3,017	4,00	0,73	0,56	0,96	1,07
4,50	0,73	2,756	4,50	0,82	0,63	0,96	1,08
5,00	0,86	2,486	5,00	0,88	0,66	0,95	1,11
5,50	0,89	2,135	5,50	0,93	0,71	0,92	1,08
6,00	0,99	1,528	6,00	0,98	0,74	0,91	1,07
6,50	1,06	1,182	6,50	1,03	0,77	0,89	1,07
7,00	1,17	0,730	7,00	1,06	0,78	0,89	1,05
7,63	1,25	0,737	7,50	1,06	0,78	0,90	1,08
8,00	1,32	0,467	8,00	1,00	0,72	0,93	1,09
8,55	1,48	0,182	8,50	0,82	0,61	0,95	1,10
9,00	1,48	0,086	9,00	0,36	0,15	0,97	1,14
9,55	1,42	0,084	9,50	0,11	0,06	0,97	1,14
10,00	1,37	0,081	10,00	0,09	0,05	0,96	1,10
10,58	1,35	0,078	10,50	0,07	0,04	0,96	1,06
11,58	1,35	0,079	11,00	0,06	0,04	0,96	1,11

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name	Roland Arno Müller
Geburtsdatum	14.07.1963
Geburtsort	Jülich
Verheiratet seit dem	26.05.1995

Ausbildung

Abitur	Gymnasium Zitadelle Jülich
1984 - 1990	Studium der Biologie an der TU-Braunschweig
1991	Diplomarbeit mit dem Thema: Entwicklung von drei mikrobiologischen Testverfahren zur ökotoxikologischen Beurteilung kontaminierter Luftproben (bioecological monitoring) Abschluß: Diplom-Biologe
1991 - 1993	Anfertigung der Dissertation im Bereich Bioverfahrenstechnik an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig Thema: Kinetische Untersuchungen zum Abbau chlorierter und methylierter Benzoesäuren durch *Pseudomonas spec.* B13 FR1 (SN45P)

Berufliche Tätigkeit

1986 - 1990	Studentischer Mitarbeiter am Institut für technische Mikrobiologie der TU Braunschweig
1990 - 1993	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
seit Mai 1994	Wissenschaftlicher Leiter des Technikums des Umweltbiotechnologischen Zentrums *(UbZ)* am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Die Arbeit wurde angefertigt an der

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)
Abteilung Bioverfahrenstechnik
Mascheroder Weg 1
38124 Braunschweig

Autor:

Roland A. Müller
Sektion Sanierungsforschung / Umweltbiotechnologisches Zentrum
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Permoserstraße 15
04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2906
Telefax 0341/235-2492