

UFZ-Bericht

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

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 18/1998

Workshop-Bericht

Bioremediation of polluted areas

Luise Berthe-Corti (Hrsg.)

Workshop im Rahmen der Wissenschaftlich-
Technischen Zusammenarbeit (WTZ)
zwischen Deutschland und Argentinien

Workshop en el margen de la cooperación
científica y tecnológica
entre Alemania y Argentina

La Plata, am 6. und 7. November 1997

ISSN 0948-9452

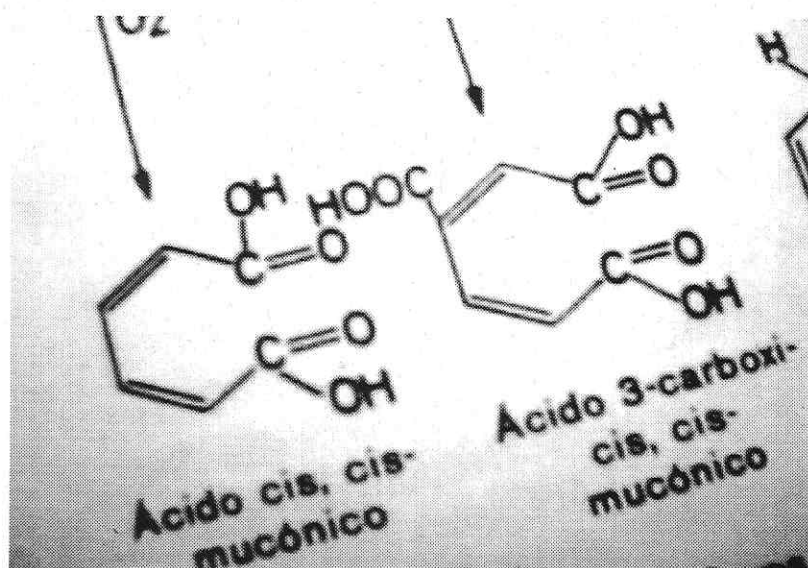
Workshop-Bericht

Bioremediation of polluted areas

La Plata, am 6. und 7. November 1997

Workshop im Rahmen der wissenschaftlich-technischen Zusammenarbeit (WTZ)
zwischen Deutschland und Argentinien

Workshop en el margen de la cooperación científica y tecnologica (WTZ)
entre Argentina y Alemania



Luise Berthe-Corti (Hrsg.)

Vorwort

B. GROßER

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Permoserstraße 15,
04318 Leipzig, Deutschland

Der Regionalverbund „Microbial degradation of hydrocarbon contaminated media – Bioremediation of liquid-solid and solid systems“ ist ein Projektverbund, der im Rahmen der bilateralen wissenschaftlich-technischen Zusammenarbeit zwischen Argentinien und Deutschland in der gegenwärtigen Form seit 1993 besteht. Träger der Kooperation sind SECyT, Buenos Aires, und das Internationale Büro der DLR, Bonn, (bis 1995 das Internationale Büro der GKSS Geesthacht) im Auftrag des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie.

Bereits vor 1993 wurden gemeinsame Projekte von der Universität La Plata auf argentinischer Seite sowie den Universitäten in Jena und Oldenburg auf deutscher Seite bearbeitet. Erweitert um die Universitäten in Comodoro Rivadavia und Mendoza sowie das UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, ging aus dieser Zusammenarbeit ein Verbund hervor, in dem alle Partner an den Ergebnissen der jeweilig anderen Gruppen partizipieren und ihre Arbeiten gegenseitig abstimmen konnten. Mit der Bildung dieses Verbundes sollte versucht werden, das Problem der Kohlenwasserstoff-Kontamination von Wasser und Böden, vor allem verursacht durch die Mineralölindustrie, durch abgestimmte Forschungsvorhaben einer Lösung näher zu bringen. Dabei standen und stehen neben der Grundlagenforschung auch anwendungsorientierte Fragestellungen im Zentrum des Interesses.

Im Jahr 1994 wurden durch den damaligen Bundesminister für Forschung und Technik Dr. Paul Krüger bei seinem Besuch in La Plata Analysengeräte als deutsches Geschenk übergeben, als Grundstock für ein Labor, das vorrangig die bilateralen Projekte nutzen sollten.

Der vom 5. bis 7. November 1997 in La Plata durchgeführten Workshop widmete sich zum einen den Ergebnissen der durchgeführten Arbeiten, zum anderen wurde die mögliche weitere Zusammenarbeit diskutiert.

Den Organisatoren des Workshops muß an dieser Stelle herzlich für die Vorbereitungen gedankt werden. Insbesondere gebührt dieser Dank SECyT für die Unterstützung der Veranstaltung. Ein besonderer Dank gilt auch den beiden Koordinatorinnen des Verbundes, Frau Professor Arambarri, La Plata, und Frau Dr. Berthe-Corti, Oldenburg, ohne deren tatkräftige Arbeit dieses Treffen nicht zustande gekommen wäre.

Anfang April 1997 fand in Buenos Aires eine Sitzung der gemischten Kommission Argentinien-Deutschland im Rahmen der Zusammenarbeit in Forschung, Wissenschaft und technologischer Entwicklung statt. Auf dieser Sitzung wurde einerseits Bilanz über alle Projekte gezogen und andererseits diskutiert, wo zukünftig die inhaltlichen Schwerpunkte bei der bilateralen Forschungskooperation gesetzt werden. Es bestand Einigkeit darüber, daß Umweltforschung, Umwelttechnologien und Biotechnologie auch weiterhin zu den wichtigsten Kooperationsfeldern gehören sollen.

Bei den Beratungen wurde besonders hervorgehoben, daß der industriellen Beteiligung im Rahmen der Kooperation ein hoher Stellenwert zukommt. Die Kontaktmöglichkeiten zwischen klein- und mittelständischen Unternehmen beider Länder sollen gefördert werden, wobei allerdings davon auszugehen ist, daß die Unternehmen, ebenso wie die Forschung, einen finanziellen Eigenbeitrag zu leisten haben.

Es wurde klar herausgestellt, daß der Forschung im Umwelt- und Biotechnologiebereich — und hier sind die vorzustellenden Arbeiten angesiedelt — wachsende Bedeutung zukommt.

Da die Untersuchungen nicht zum „Wohlgefallen“ der Wissenschaft durchgeführt werden, sondern mit dem konkreten Ziel, Methoden für Sanierungsmaßnahmen zu erarbeiten, fand und findet auf beiden Seiten eine Zusammenarbeit mit der Industrie im nationalen Rahmen statt. Wie bereits erwähnt, haben beide Staaten auf ihrer gemeinsamen Sitzung erklärt, daß nunmehr der nächste Schritt getan werden soll, indem an den bilateralen wissenschaftlichen Kontakten auch die Industrie **beider** Länder beteiligt wird. Einen ersten Ansatz zur direkten Umsetzung bildet dieser Workshop, der erstmals auf diesem Gebiet Partner aus Wissenschaft und Industrie beider Länder zusammenbrachte. Die Vertreter der Industrie konnten sich darüber informieren, welche Ergebnisse vorliegen bzw. zu erwarten sind. Auf dieser Basis ergibt sich sicher eine Vielzahl weiterer Ansätze für Untersuchungen, die industrierelevant sind, jedoch einen Forschungsbedarf aufweisen, der allein durch die Unternehmen nicht zu leisten ist. Hieraus sollten sich zukünftige Schwerpunkte für Untersuchungen entwickeln, die in enger Kooperation zwischen Industrie und Wissenschaft realisiert werden. Dabei wird eine Bearbeitung als 2 + 2 Projekt angestrebt. Dieses Kooperationsform soll auf beiden Seiten Wissenschafts- und Industriepartner in einem Projekt zusammenführen. Dabei ist das 2 + 2 kein starres Schema: Es können sowohl mehrere Partner beteiligt sein als auch nur zwei Forschungseinrichtungen. Ziel dieser neuen Form der Zusammenarbeit ist die gemeinsame Entwicklung von innovativen Verfahren und Produkten mit guten Chancen auf eine wirtschaftliche Vermarktung.

Beide Seiten haben zugesagt, entsprechende Projekte flexibel und unbürokratisch zu fördern.

Erste Vertragsgespräche konnten im Anschluß an den Workshop bereits in La Plata und Mendoza stattfinden, und es bleibt zu hoffen, daß diese positiven Ansätze zu einer weiteren Belebung der Deutsch-Argentinischen Wissenschafts- und Industriekooperation führen werden.

INHALT

Vorwort	Seite 1
B. GROßER	
Projekt ENV 19: Microbial biocenoses	
<i>In situ</i> -Sanierung eines hochgradig mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Areals in Cerro Dragón, Patagonien, Argentinien.....	5
<i>O. H. PUCCI, M. A. BAK, S. R. PERESSUTTI, I. KLEIN, C. HÄRTIG, L. WÜNSCHE</i>	
Charakterisierung eines als Inokulum für die <i>in situ</i> -Sanierung eines hochgradig mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Bodens verwendeten Bakterienstammes.....	14
<i>S. R. PERESSUTTI, H. M. ALVAREZ, I. KLEIN, C. HÄRTIG, L. WÜNSCHE, O. H. PUCCI</i>	
Vorkommen von Plasmiden in marinen kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien.....	16
<i>F. O. GRAÑA, O. H. PUCCI</i>	
Projekt ENV 21: Intensive soil remediation	
Biologische Behandlung mineralölkontaminierter Schlämme.....	20
<i>A. NOKE, R. A. v. KOLCZYNSKI, R. A. MÜLLER, U. STOTTMEISTER</i>	
Intensive Behandlung von im Airliftreaktor biologisch sanierten Böden.....	33
<i>E. ERCOLI, J. GÁLVEZ, R. MÜLLER, U. STOTTMEISTER</i>	
Projekt ENV 23: Oil decomposition by fungi	
Das Potential der Pilze für die Bioremediation von Kohlenwasserstoff-Verunreinigungen.....	42
<i>W. FRITSCHKE, M. HOFRICHTER, U. SACK, K. SCHEIBNER, D. SCHLOSSER, A. ARAMBARRI, M. CABELLO</i>	
Phytoremediation und Landfarming von Kohlenwasserstoffkontaminierten Böden.....	50
<i>T. GÜNTHER, B. KIRSCHKE, M. LÄTZ, W. FRITSCHKE</i>	
Wachstum auf Pyren durch <i>Rhodotorula glutinis</i> , isoliert aus kontaminierten Arealen.....	58
<i>M. C. ROMERO, M. C. CAZAU, S. GIORGIERI, A. M. ARAMBARRI</i>	
Isolation and characterization of yeast hydrocarbon degraders.....	64
<i>M. C. ROMERO, E. M. GATTI, M. C. CAZAU, A. M. ARAMBARRI</i>	

Die Aktivität extrazellulärer ligninolytischer Oxidasen und Peroxidasen Aktivität von Mikromyceten, isoliert aus unterschiedlichen Regionen der Republik Argentinien.....	71
<i>M. C. N. SAPARRAT, A. M. M. BUCSINSKY, A. M. ARAMBARRI</i>	
Biotransformation von Pyren durch Pilze.....	76
<i>M. C. ROMERO, M. L. SALVIOLI, M. C. CAZAU, A. M. ARAMBARRI</i>	
Projekt ENV 24: Sludge remediation process	
Geschlossenes Bioreaktorsystem zur mikrobiellen Behandlung stark kohlenwasserstoffbelasteter Industrieschlämme.....	82
<i>L. BERTHE-CORTI, B. CONRADI, R. HULSCH, B. SINN</i>	
Biologische Sanierung von mit komplexen Kohlenwasserstoffgemischen kontaminierten Böden.....	92
<i>G. I. VECCHIOLI, O.R. COSTANZA, I.S. MORELLI, M.T. DEL PANNO, M. GARRÉ, M.T. PAINCEIRA</i>	
Analytische Methoden zur chemischen Charakterisierung komplexer Kohlenwasserstoffgemische.....	95
<i>O. R. COSTANZA, G. I. VECCHIOLI, S. A. GIORGIERI, M. T. PAINCEIRA</i>	
Charakterisierung der Toxizität komplexer Kohlenwasserstoffgemische.....	100
<i>I. S. MORELLI, G. I. VECCHIOLI, O. R. COSTANZA, M. T. DEL PANNO, M. I. GARRÉ, L. BERTHE-CORTI, M. T. PAINCEIRA</i>	
Mikrobielle Ökologie von mit komplexen Kohlenwasserstoffgemischen kontaminiertem Milieu.....	106
<i>M. T. DEL PANNO, O. R. COSTANZA, I. S. MORELLI, M. GARRÉ, G. I. VECCHIOLI, M.T. PAINCEIRA</i>	
Spanisch / Español.....ab	112

***In situ*-Sanierung eines hochgradig mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Areals in Cerro Dragón, Patagonien, Argentinien**

O. H. PUCCI¹, M. A. BAK¹, S. R. PERESSUTTI¹, I. KLEIN², C. HÄRTIG², L. WÜNSCHE²

¹CEIMA – Centro de Estudios e Investigaciones en Micorbiología Aplicada, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Geronimo Maliqueo 120, 9000 Comodoro Rivadavia, Argentinien

²UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Deutschland

1. Einleitung

In den Erdölfördergebieten Zentralpatagoniens können durch örtliche Havarien in den Förder- und Transportsystemen erhebliche Bodenkontaminationen mit Erdöl auftreten. Zur Sanierung der belasteten Flächen kommen in erster Linie mikrobiologische *in situ*-Verfahren in Betracht.

Als wesentliche Voraussetzung für deren effektive Anwendung ist zu untersuchen, ob dazu das Selbstreinigungspotential der autochthonen Mikroorganismen ausreicht, ob es möglich ist, durch kostengünstige und technologisch mit minimalem Aufwand realisierbare Maßnahmen die den Kohlenwasserstoffabbau katalysierenden Bakterien selektiv zu fördern, oder ob der Einsatz einer extern vermehrten Starterkultur mit hohem Abbaupotential Vorteile bietet.

2. Material und Methoden

Untersuchungsgebiet: Als Modellstandort für die *in situ*-Sanierung eines hochgradig mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Ökosystems unter Verwendung einer Starterkultur wurde ein Areal in einem Erdölfeld in Cerro Dragon, 120 km von der Stadt Comodoro Rivadavia (Patagonien, Argentinien) entfernt, ausgewählt. Dieses Areal war nach dem Bruch einer Erdölpipeline extrem mit Rohöl belastet.

Sanierungsmethodik: Die Untersuchungen wurden in zwei Etappen durchgeführt:

In der *ersten Etappe* (August 1995 – Dezember 1996) wurden zunächst Erdöl und Bodenmatrix intensiv mechanisch durchmischt, anschließend wurde der Boden mit Wasser und anorganischen Nährstoffen versorgt und mittels mechanischer Methoden aufgelockert/belüftet.

In der *zweiten Etappe* (Beginn Dezember 1996, noch nicht abgeschlossen) wurde ein Teil des kontaminierten und in der ersten Etappe bearbeiteten Areals in 4 Sektoren mit jeweils 16 m² unterteilt, die unterschiedlich behandelt wurden:

- | | |
|-------------|---|
| Sektor I: | Zugabe anorganischer Nährstoffe (Düngung) |
| Sektor II: | Beimpfung mit der Starterkultur |
| Sektor III: | Zugabe anorganischer Nährstoffe + Beimpfung |
| Sektor IV: | Kontrolle (ohne Düngung und Beimpfung) |

Als anorganische Nährstoffe wurden Na₂HPO₄, NH₄Cl und KNO₃ eingesetzt. Bei der Düngung wurden C:P- bzw. C:N- Verhältnisse von 800:1 bzw. 60:1 aufrechterhalten (DIBBLE und BARTHA 1979).

Als Starterkultur wurde der Stamm *Dietzia maris* CR-053 verwendet, der in Patagonien isoliert wurde (PERESSUTTI et al. diese Zeitschrift). Zur Herstellung des Inokulums wurde ein mit 0,25 g Hefeextrakt/l angereichertes mineralisches Medium (MBM; Bestandteile in g/l: NaCl 5; KH₂PO₄ 1; (NH₄)₂SO₄ 1; MgSO₄ 0,2; KNO₃ 3; pH-Wert 7) mit 0,5% Dieselöl als C- und Energiequelle verwendet. Das beimpfte Kulturmedium wurde in 4 l- Gefäßen bei Raumtemperatur bis zum Erreichen einer Zelldichte von 10⁷ cfu/ml inkubiert.

Probenahme und -bearbeitung: In der ersten Etappe wurden Proben aus dem kontaminierten Areal und einer nichtkontaminierten Vergleichsfläche entnommen, in der zweiten Etappe wurden Proben aus den vier Sektoren der Untersuchungsfläche analysiert. Alle Bodenproben wurden nach einem aleatorischen und systematischen Verfahren gezogen und anschließend im Labor homogenisiert (WEBSTER und OLIVER 1990).

Kohlenwasserstoffanalytik: Die Bodenproben wurden periodisch auf ihren Kohlenwasserstoffgehalt untersucht. Dazu wurden sie mit Chloroform extrahiert und anschließend die Gesamtkohlenwasserstoffgehalte gravimetrisch bestimmt. Zur Beurteilung der Verschiebungen im Kohlenwasserstoffspektrum während des Sanierungsprozesses wurden die Chloroformextrakte an einer Silicagel-Säule (Kieselgel 60, 35 - 70 mesh, Fa. Merck) fraktioniert. Die Hauptfraktionen Aliphate, Aromaten und Asphaltene wurden sukzessiv mit jeweils ca. 300 ml Hexan, Benzen und Chloroform/Methanol (1:1 v/v) eluiert. Die Fraktionen wurden in Portionen von 25 ml aufgefangen (insgesamt 33 Teilfraktionen), deren Kohlenwasserstoffgehalt nach Verdampfung des Lösungsmittels gravimetrisch bestimmt wurde (nach DIBBLE und BARTHA 1979, modifiziert).

Mikrobiologische Analytik: *Keimzahlen* wurden durch Ausstreichen entsprechend mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnter Bodensuspensionen auf festen Nährböden ermittelt. Die Gesamtkeimzahl aerober Bakterien wurde auf R2A-Agar (Zusammensetzung in g/l: Hefeextrakt 0,5; Pepton 0,5; Casamino acids 0,5; Glucose 0,5; Stärke 0,5; Natriumpyruvat 0,3; K₂HPO₄ 0,3; MgSO₄ 0,5; Agar 12; pH-Wert 7,2), der Gehalt an kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien auf agarverfestigtem MBM-Medium bestimmt. Auf der Oberfläche des MBM-Agars wurden jeweils 20 µl eines Erdöl- Dieselkraftstoff-Gemisches (1:1) verteilt.

Zur *Isolierung der Hauptkomponenten der Bakteriozönosen* wurden von allen zur Bestimmung der Gesamtkeimzahlen angelegten Agarplatten, die zwischen 30 und 300 Kolonien enthielten, koloniemorphologisch unterscheidbare Stämme abgeimpft und nach Kolonie- und Zellmorphologie, Gramverhalten und einem Minimum an physiologisch-biochemischen Daten (Anwesenheit von Katalase und Oxidase, Nitratreduktion, Wachstum auf Thioglycolat-, SIM- und OF-Medium; (MACFADIN 1980)) grob klassifiziert. Die *taxonomische Zuordnung der Isolate* wurde durch kombinierte Anwendung automatisierter Identifizierungssysteme (BIOLOG-System: BIOLOG Inc., Hayward, Calif., U.S.A. und Microbial Identification System MIS/SHERLOCK: MIDI Inc., Newark, Del., U.S.A.) unter Einbeziehung diagnostisch relevanter weiterer Kriterien (z.B. Zellmorphologie, chemische Zusammensetzung der Zellwand, physiologisch- biochemische Grundparameter) vorgenommen (WÜNSCHE et al. 1997). Die *Struktur und Dynamik der autochthonen Bakteriozönosen* wurden sowohl nach den auf GN- und GP- Mikrotiterplatten des BIOLOG-Systems aufgenommenen Substratverwertungsspektren der mit 0,2%iger Na₄P₂O₇-Lösung von der Bodenmatrix abgetrennten Bakterien abgeschätzt (WÜNSCHE et al. 1995) als auch über die taxonomische Einordnung der isolierten und kultivierbaren Hauptkomponenten bestimmt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Übersicht über den Verlauf des Sanierungsprozesses

Die Veränderungen im Gesamtkohlenwasserstoffgehalt und in der Besiedlungsdichte mit Bakterien, besonders mit kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien, charakterisieren den Verlauf des Sanierungsprozesses über den gesamten Untersuchungszeitraum (Abb. 1).

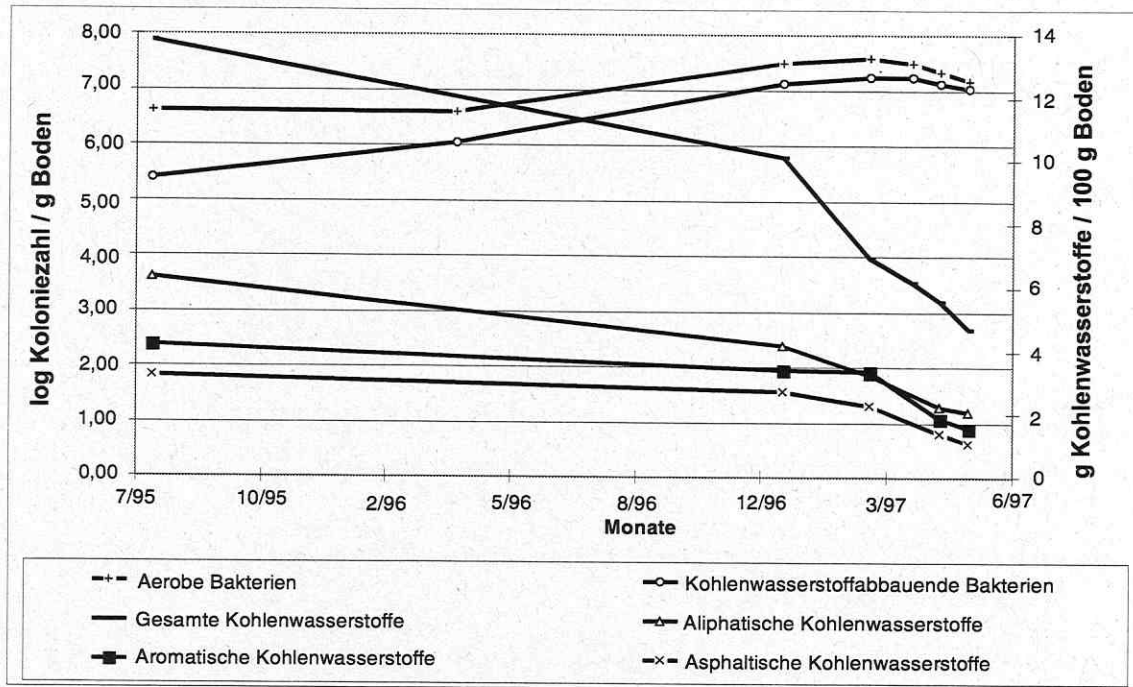


Abb. 1: Veränderungen im Gehalt an Kohlenwasserstoffen und kultivierbaren Bakterien während des Sanierungsprozesses (Erläuterungen im Text)

Die erste Sanierungsetappe (August 1995 - Dezember 1996) begann ca. 3 Monate nach der massiven Rohölkontamination (Mai 1995), Nährsalze und Wasser wurden nur zweimal (Anfang November 1995) zugeführt. Am Ende der Versuchsperiode (nach 16 Monaten Sanierungszeit) wurde eine Abnahme des Kohlenwasserstoffgehaltes des Bodens um ca. 25% festgestellt; in Anbetracht der Länge der Versuchsperiode und der zusätzlichen Kohlenwasserstoffverluste durch Verdunstung der leichtflüchtigen Komponenten des Erdöls eine nur geringfügige Verringerung der Kontamination. Überwiegend wurden in dieser Etappe aliphatische Kohlenwasserstoffe abgebaut, in deutlich geringerem Maße Aromaten und polare Kohlenwasserstoffe oder Asphaltene. Die Besiedlungsdichten mit kultivierbaren aeroben Bakterien (insgesamt) bzw. mit Kohlenwasserstoffabbauern stiegen um ein bis zwei Größenordnungen an.

Die zweite Etappe begann im Dezember 1996 und ist noch nicht abgeschlossen. Die Veränderungen im Kohlenwasserstoffgehalt und in der mikrobiellen Besiedlungsdichte im beimpften und gedüngten Sektor der Versuchsfläche sind in Abbildung 1 dargestellt. In dieser Etappe stiegen die bakteriellen Besiedlungsdichten (in der betrachteten Variante) nur noch geringfügig an. Dennoch erhöhte sich die Abbaurate erheblich, nach 6 Monaten waren 55% der zu Anfang dieser Etappe noch nachweisbaren Gesamtkohlenwasserstoffe abgebaut. In den übrigen

Sektoren wurden deutlich schlechtere Abbauleistungen gefunden (Abb. 2): Im unbeimpften und nicht gedüngten Sektor (Kontrolle) sank der Gesamtkohlenwasserstoffgehalt lediglich um 13%, im gedüngten, aber nicht beimpften Sektor um 16% und im beimpften, aber nicht gedüngten Sektor um 30%.

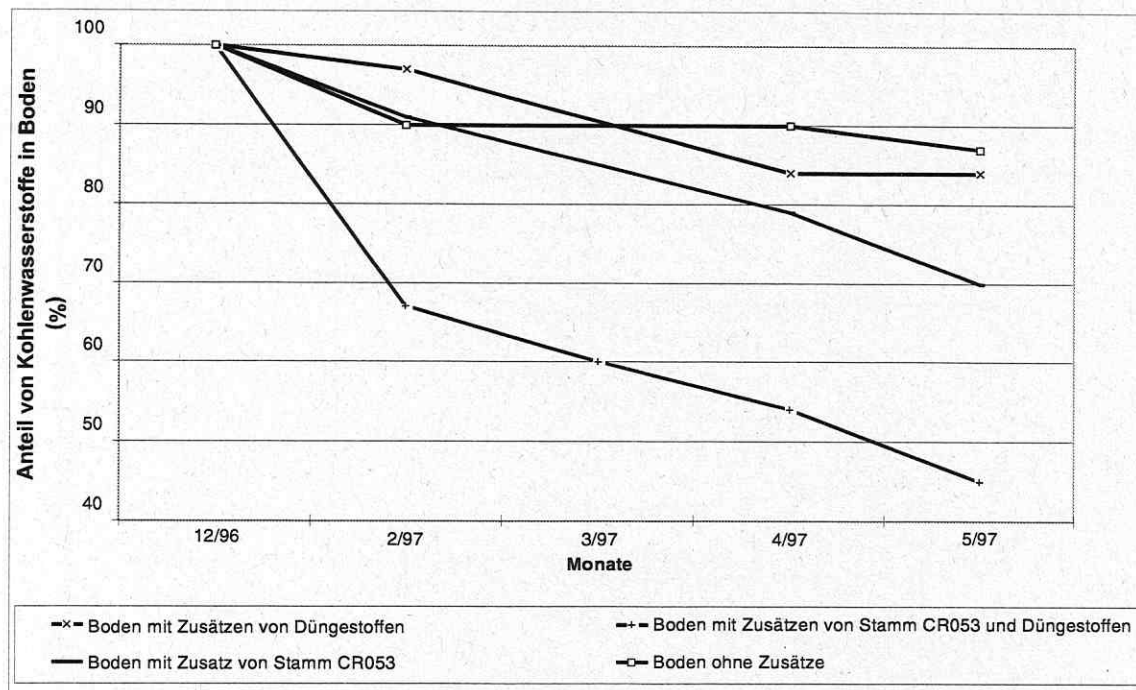


Abb. 2: Abnahme des Gesamtkohlenwasserstoffgehalts (Chloroformextrakt) der Böden in den vier Versuchsvarianten

Im gesamten Zeitraum des bisher kontrollierten Sanierungsexperiments (August 1995 bis Mai 1997) sank (unter optimierten Bedingungen in der zweiten Etappe) der Gesamtkohlenwasserstoffgehalt des Bodens auf ca. 30% des Ausgangswertes. Gegenwärtig wird untersucht, ob diese Restkonzentration unter den gegebenen Bedingungen weiter reduziert werden kann.

3.2 Abbau der Hauptfraktionen der Erdölkontamination unter optimierten Sanierungsbedingungen

Abbildung 3 zeigt die Verschiebungen in der Zusammensetzung des kontaminierenden Erdöls im Verlauf der Bioremediation unter optimierten Bedingungen (Beimpfung und Düngung). Die Ergebnisse der fraktionierten Säulenchromatographie zeigen, daß im Erdöl zum Zeitpunkt des Beginns des Sanierungsexperiments aliphatische Kohlenwasserstoffe dominierten. Es ist deutlich zu erkennen, daß im Verlauf des Sanierungsprozesses im beimpften und gedüngten Sektor der Versuchsfläche die Fraktion der aliphatischen Kohlenwasserstoffe am schnellsten abgebaut wurde, deutlich langsamer nahmen die Aromatenfraktion und, mit noch geringerer Rate, die Fraktion der polaren Kohlenwasserstoffe oder Asphaltene, ab. Die unterschiedlichen Abbauraten führten zu einem nahezu gleichen Anteil der untersuchten drei Hauptfraktionen am Restkohlenwasserstoffgehalt am (vorläufigen) Ende des Sanierungsprozesses.

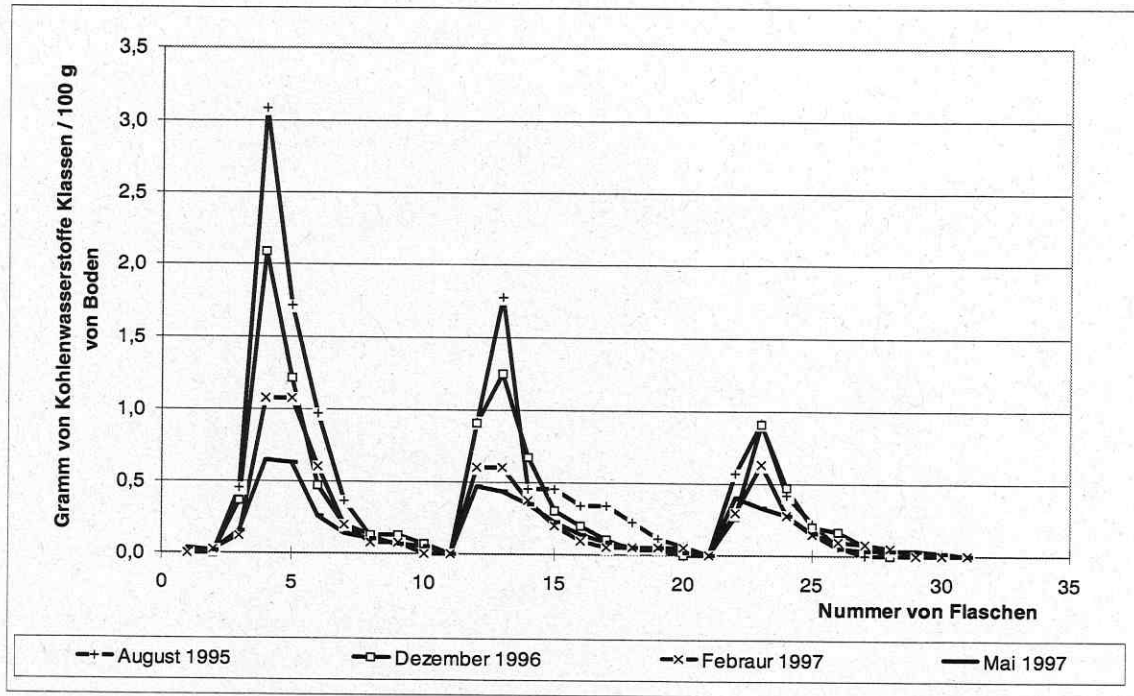


Abb. 3: Abbau unterschiedlicher Kohlenwasserstoff-Fractionen während des Sanierungsprozesses im gedüngten und beimpften Böden (Erläuterung im Text)

3.3 Entwicklung der autochthonen bakteriellen Biozönose im Verlauf des Sanierungsexperiments

3.3.1 Veränderungen im Substratverwertungsspektrum der gesamten Bakteriozönose

Die Anzahl der durch die gesamte Biozönose verwertbaren BIOLOG-Substrate stieg in den ersten vier Monaten der zweiten Sanierungsetappe (Dezember 1996 bis April 1997) in allen vier Sektoren der Versuchsfläche (einschließlich Kontrolle) kontinuierlich an (Abb. 4). Das weist auf signifikante Änderungen in der Zusammensetzung aller Biozönosen hin. Der Anstieg der Zahl der genutzten BIOLOG-Substrate ist durch das Aufkommen von Spezies mit anderem Substratverwertungsspektrum in den Biozönosen bedingt. Diese Erhöhung der taxonomischen Diversität könnte auf die Verfügbarkeit verwertbarer Kohlenwasserstoffe in allen Versuchsvarianten zurückzuführen sein.

Nach 4 - 5 Monaten stieg die Anzahl der genutzten BIOLOG-Substrate nicht mehr an. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Biozönosen jedoch bereits 80 - 90% der angebotenen 128 BIOLOG-Substrate verwerten. Damit können weitere Veränderungen in der Zusammensetzung der Biozönosen nur noch bedingt abgeschätzt werden. Andererseits ist es durchaus möglich, daß die Entwicklung der Biozönosen stagniert, da der mikrobiologisch zugängliche Anteil der Erdölkontamination, der als C-Quelle im Ökosystem dient, zu diesem Zeitpunkt größtenteils schon abgebaut ist.

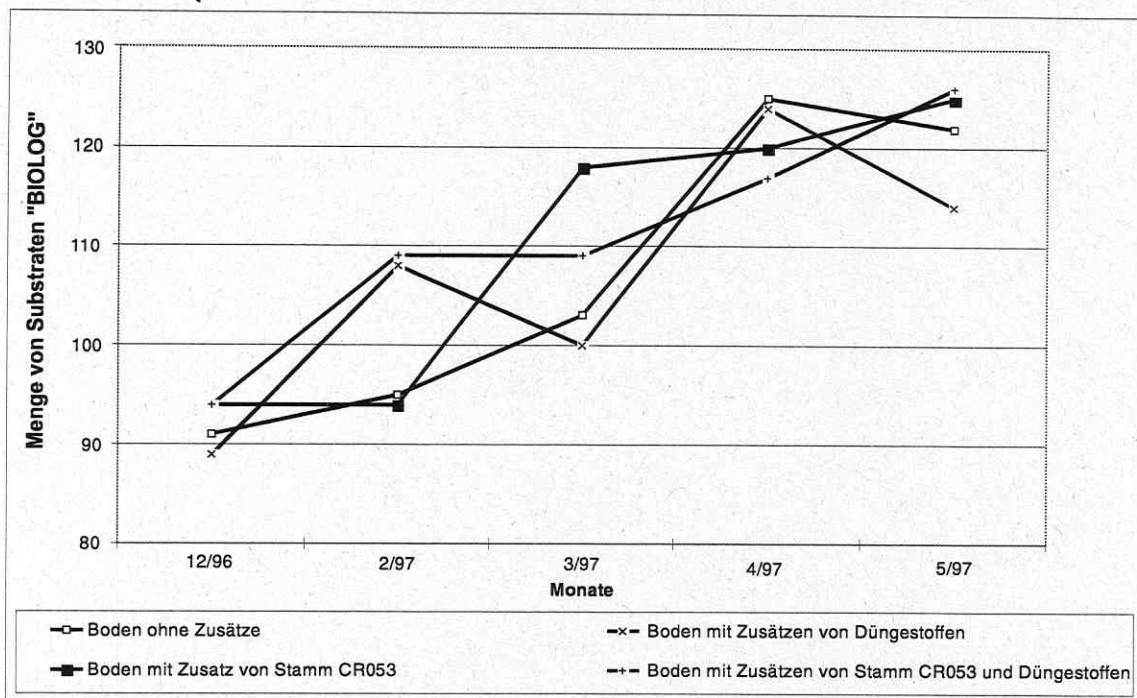


Abb. 4: BIOLOG-Substratverwertungsspektren der gesamten Biozönosen aller Versuchsvarianten in Abhängigkeit von der Sanierungszeit

Obwohl sich der Anzahl der genutzten BIOLOG-Substrate in allen Versuchsvarianten deutlich erhöhte, waren die Substratverwertungsspektren der Biozönosen aller Sektoren zum jeweils gleichen Zeitpunkt untereinander sehr ähnlich. Das zeigt sich in den hohen Ähnlichkeitskoeffizienten (S_j zwischen 0,813 und 0,860) beim direkten Vergleich der BIOLOG-Substratverwertungsspektren der Biozönosen, die sich in den drei behandelten Sektoren entwickelten, mit dem Substratverwertungsspektrum der Biozönose des Kontrollsektors (Tab. 1). Diese Befunde weisen darauf hin, daß sich die taxonomische Zusammensetzung der Biozönosen deutlich, aber in allen Versuchsvarianten in sehr ähnlicher Art und Weise ändert. Ursache dafür könnte wiederum das in allen Varianten gleiche C-Substrat (utilisierbare Kohlenwasserstoffe) im jeweiligen Ökosystem sein. Die Beimpfung mit der Starterkultur beeinflusst das BIOLOG-Substratverwertungsspektrum nicht nachweisbar. Dafür können zwei Gründe diskutiert werden: Entweder sind in der autochthonen Biozönose bereits Stämme dieses Taxons vorhanden oder der Anteil des Inoculums an der Biozönose ist zu gering, um einen nachweisbaren Beitrag zum Substratverwertungsspektrum der gesamten Biozönose liefern zu können. Am Ende der Versuchsperiode (Probenahme im April 1997) glichen sich auch diese Differenzen weitgehend aus ($S_j > 0,900$). In Bezug auf die mengenmäßig dominierenden Komponenten sollten deshalb alle untersuchten Biozönosen weitgehend ähnlich sein.

3.3.2 Charakterisierung der Bakteriozönosen durch Isolierung und taxonomische Einordnung ihrer Hauptkomponenten

Die Hinweise zur Struktur und Dynamik der autochthonen Biozönosen, die sich aus der Auswertung der Substratverwertungsspektren ergaben, wurden durch die Ergebnisse der taxonomischen Analysen bestätigt. Auf Grund der relativ hohen Besiedlungsdichte und Artenvielfalt waren erhebliche Verdünnungen der aus den Bodenproben gewonnenen Mikroorganismensuspensionen erforderlich, um Einzelkolonien isolieren zu können. Es konnten daher nur die

quantitativ dominierenden Hauptkomponenten isoliert werden, die in Konzentrationen von mindestens 10^5 - 10^6 cfu/g Boden vorkommen.

Tab. 1: Ähnlichkeit (Jaccard-Index S_J) der Substratverwertungsspektren der Biozönosen der behandelten Sektoren der Versuchsfläche mit dem Substratverwertungsspektrum des Kontrollsektors

S_J , bezogen auf das BIOLOG-Substratverwertungsspektrum der Biozönose der Kontrolle (Sektor IV)				
Datum der Untersuchung	Dauer der Sanierung (Monate)	Sektor I (gedüngt)	Sektor II (beimpft)	Sektor III (gedüngt+beimpft)
Februar 1997	2	0,813	0,817	0,829
März 1997	3	0,845	0,842	0,860
April 1997	4	0,968	0,937	0,936

Die Biozönosen des beimpften/gedüngten Bodens und des unbehandelten Kontrollsektors zeigten zu Beginn des Versuchsabschnitts (Dezember 1997) keine signifikanten Unterschiede: Gram-positive Arten dominierten eindeutig, die Biozönosen bestanden praktisch ausschließlich aus Vertretern der *Actinomycetales* (Gattungen *Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus*). Ungefähr 10% der Gram-positiven Isolate konnten nicht mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden. Als einziger Vertreter der Gram-negativen Bakterien wurde auf beiden Versuchssektoren *Alcaligenes xylosooxidans* nachgewiesen.

Nach zwei Monaten (Probenahme Februar 1997) wurden deutliche Veränderungen festgestellt. Kennzeichnend war das verstärkte Vorkommen Gram-negativer Bakterien in beiden Biozönosen. *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pseudomonas mendocina* wurden im unbehandelten Kontrollboden, *Pseudomonas stutzeri* (in hohen Anteilen an der gesamten Biozönose) und *Pseudomonas fluorescens* im gedüngten und beimpften Boden gefunden. Zusätzlich zu den bereits im Dezember 1997 nachgewiesenen Aktinomycetengattungen *Gordonia*, *Dietzia* und *Rhodococcus* (besonders *R. fascians* und *R. erythropolis*) traten weitere Gattungen wie *Arthrobacter* (in beiden Flächen), *Bacillus* im beimpften und gedüngten Boden und *Microbacterium* in der unbehandelten Kontrolle auf.

3.3.3 Schicksal der Starterkultur *Dietzia maris* CR-053 im Ökosystem

In den Böden Patagoniens ist *Dietzia maris* als autochthone Art verbreitet und wird sowohl in erdölkontaminierten als auch in unbelasteten Böden gefunden. Der Stamm CR-053 wurde aus einer erdölkontaminierten Bodenprobe von einem anderen Ölfeld isoliert, der Art *Dietzia maris* zugeordnet (PERESSUTTI et al. diese Zeitschrift) und als Starterkultur für die dargestellten Sanierungsexperimente eingesetzt.

Während des Sanierungsprozesses wurden Stämme von *Dietzia maris* sowohl im beimpften/gedüngten Sektor als auch im unbehandelten Kontrollsektor der Versuchsfläche gefunden. Von diesen Isolaten wurden die Fettsäureprofile aufgenommen und geprüft, ob mit dieser Methode eine Differenzierung zwischen der eingebrachten Starterkultur und den autochthonen *Dietzia maris*- Stämmen möglich ist. Eine völlige Übereinstimmung mit dem Fettsäureprofil der Reinkultur des Stammes CR-053 wurde nur bei Isolaten aus dem beimpften/gedüngten

Sektor bei Probenahme im Februar 1997 gefunden. Alle anderen Isolate, die im Dezember 1996 und im Februar 1997 aus Bodenproben vom beimpften/gedüngten Sektor und vom Kontrollsektor gewonnen wurden und zur Art *Dietzia maris* (oder zu den nahe verwandten Gattungen *Gordonia* oder *Rhodococcus*) gehören, zeigten mehr oder weniger deutlich abweichende Fettsäureprofile. Der Befund, daß *Dietzia maris* CR-053 mit dieser Methode direkt nach der Beimpfung (Probenahme Dezember 1996) im Ökosystem nicht nachweisbar war, könnte auf den zu geringen Anteil ($< 1\%$) des Inokulums (Animpfdichte ca. 10^5 cfu/g Boden) an der Gesamtbiozönose zurückgeführt werden. In den folgenden zwei Monaten fand höchstwahrscheinlich eine Vermehrung des Inokulums statt, die Konzentration betrug bei der Probenahme im Februar 1997 10^6 cfu/g Boden (ca. 10% der Gesamtbiozönose) und lag damit im Nachweisbereich der Methode der Kolonievereinzellung über Verdünnungsreihen auf Agarplatten. Ob die unter Standardbedingungen aufgenommenen Fettsäureprofile tatsächlich zur Stammdifferenzierung verwendet werden können, muß in weiterführenden Untersuchungen geklärt und abgesichert werden.

Erste Analysen der Bakteriozönosen mittels Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) lieferten ebenfalls Hinweise darauf, daß die Art *Dietzia maris* im beimpften/gedüngten Boden und im Kontrollsektor vorhanden ist (Anwesenheit der entsprechenden Bande im Gel). Eine Differenzierung auf Stammniveau ist mit dieser Methode nicht möglich.

4. Zusammenfassung

Die *in situ*-Sanierung eines hochgradig mit Erdöl kontaminierten semiariden Bodens in Zentralpatagonien wurde unter optimierten Bedingungen erfolgreich durchgeführt. Das Beimpfen mit einer Starterkultur mit hohem Abbaupotential für ein breites Kohlenwasserstoff-Spektrum in Kombination mit der Zugabe anorganischer Nährstoffe beschleunigte signifikant den Sanierungsprozeß.

Unter optimierten Bedingungen wurden 66% der im Boden nachweisbaren Kohlenwasserstoffe abgebaut. Alle untersuchten Fraktionen der Erdölkontamination (Aliphate, Aromaten und Asphaltene) wurden abgebaut, allerdings mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Daraus resultierten erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der im Boden verbliebenen Restkohlenwasserstoffe, verglichen mit dem kontaminierendem Erdöl. Aliphate, Aromaten und Asphaltene bildeten mit etwa gleichen Anteilen diesen Restkohlenwasserstoffgehalt.

Die Zusammensetzung der autochthonen Biozönosen veränderten sich im Verlauf des Sanierungsprozesses in allen Versuchsvarianten (einschließlich Kontrolle) signifikant und kontinuierlich, jedoch in ähnlicher Richtung. Deshalb waren zwischen den Biozönosen aller Versuchsvarianten zum jeweils gleichen Zeitpunkt nur geringfügige Unterschiede festzustellen.

Sowohl nach dem festgestellten Sanierungseffekt als auch nach dem direkten Nachweis über eine Re-Isolation hatte sich die Starterkultur *Dietzia maris* CR-053 im Ökosystem etabliert. Eine Differenzierung zwischen Starterkultur und autochthonen Stämmen von *Dietzia maris* könnte über die Aufnahme von Fettsäureprofilen der Isolate unter standardisierten Bedingungen möglich sein.

Literaturverzeichnis

- ALLISON, L. E., BROWN, J. W., HAYWARD, H. E., RICHARDS, L. A., BERNSTEIN, L., FIREMAN, M., PEARSON, G. A., WILCOX, L. V., BOWER, C. A., HATCHER, J. T., REEVE, R. C. 1993: Diagnostico y rehabilitacion de suelos salinos y sodicos. Ed. L. A. Richards, Editorial Limusa, Mexico.
- DIBBLE, J. T., BARTHA, R. (1979): Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 729-739.
- GARCIA TREJO, A. 1981: Experimentos en microbiología del suelo. Ed. Compania Editorial Continental, S. A. Mexico.
- MACFADDIN, J. F. 1980: Biochemical test for identification of medical bacteria. 2th edition., Willams and Wilfins, Baltimore-London.
- WEBSTER, R., OLIVER, M. A. 1990: Sampling and estimation. In: *Spatial Information Systems*. Oxford University Press, pp. 27-56.
- WÜNSCHE, L., BRÜGGEMANN, L., BABEL, W. (1995): Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 295-306.
- WÜNSCHE, L., HÄRTIG, C., PUCCI, H. O., BABEL, W. 1997: Combined application of BIOLOG and MIS/SHERLOCK for identifying bacterial isolates from hydrocarbon-polluted Argentinian soils. In: Insam, H., Rangger, A. (Eds.) 1997: *Microbial communities*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York-Barcelona-Budapest-Hong Kong-London-Milan-Paris-Santa Clara-Singapore-Tokyo.

Charakterisierung eines als Inokulum für die *in situ*-Sanierung eines hochgradig mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Bodens verwendeten Bakterienstammes

S. R. PERESSUTTI¹, H. M. ALVAREZ¹, I. KLEIN², C. HÄRTIG², L. WÜNSCHE², O. H. PUCCI¹

¹CEIMA – Centro de Estudios e Investigaciones en Micorbiología Aplicada, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Geronimo Maliqueo 120, 9000 Comodoro Rivadavia, Argentinien

²UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Deutschland

1. Einleitung

Die Erdölindustrie, ökonomische Grundlage Zentralpatagoniens (Argentinien), verursacht immer wieder Umweltkontaminationen mit Kohlenwasserstoffen. Die mikrobiologische *in situ*-Sanierung ist eine aussichtsreiche Technologie zur Dekontamination derartiger belasteter Ökosysteme. Eine Variante besteht darin, daß die autochthonen kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien durch Zugabe von Substanzen, die essentiell für ihre Entwicklung sind, gefördert werden (BOGART und HEMMINGSEN 1992, CATALO und PORTIER 1992). Mikrobiologische *in situ* Sanierungsverfahren können aber auch den Einsatz extern vermehrter autochthoner Bakterien mit einem weiten Potential zum Kohlenwasserstoffabbau (Starterkulturen) einschließen, wodurch eine Erhöhung des biokatalytischen Potentials und damit eine Beschleunigung des Abbaus erreicht werden kann. Die Effektivität des Einsatzes von Starterkulturen in natürlichen Ökosystemen hängt von zahlreichen Faktoren ab, z.B. genetische Stabilität, Beibehaltung hoher Vitalität während der Lagerung des Inokulums, hohe enzymatische Aktivität und ausreichende Wachstumsraten im Ökosystem, Konkurrenzfähigkeit mit den autochthonen Mikroorganismen; darüber hinaus dürfen die Starterkulturen keine toxischen Metabolite produzieren und selbst nicht pathogen sein (GOLDSTEIN et al. 1985, LEAHY und COLWELL 1990).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines Bakterienstammes, der als Inokulum für eine *in situ*-Sanierung eines mit Rohöl kontaminierten Areals verwendet wurde. Dieser Mikroorganismus (Stamm 053) wurde aus einer Bodenprobe von einer anderen, ebenfalls mit Rohöl kontaminierten Fläche, 30 km von Comodoro Rivadavia (Patagonien, Argentinien) entfernt, isoliert.

2. Ergebnisse und Diskussion

Taxonomische Einordnung: Zur Identifizierung des Stammes 053 wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Zell- und Koloniemorphologie
- Gramverhalten
- Vorkommen von Diaminopimelinsäuren und taxonomisch relevanter Zucker im Gesamtzellhydrolysat
- G + C- Gehalt der DNA
- Substratverwertungsspektrum (Automated Microbial Ident. System, Fa. BIOLOG, U.S.A.)
- Fettsäureprofil (Microbial Identification System MIS, Fa. MIDI, U.S.A.)

Der Stamm 053 bildet auf festen Nährmedien charakteristisch orange-rötlich gefärbte Kolonien. Unter dem Lichtmikroskop werden kokkoide Zellen und unregelmäßige Stäbchen beobachtet. Stamm 053 ist Gram-positiv, der GC-Gehalt der DNA liegt bei 70,5 mol%.

Tab. 1: Fettsäurezusammensetzung, Stamm CR053 (G.C.)

Fettsäuren	%
14:0	0.53
15:0	6.53
16:1 w7c/15 iso 2OH	1.17
16:0	13.95
17:1 w8c	13.91
17:0	10.78
17:0 10 Methyl	1.19
18:1 w9c	29.24
18:0	14.29
18:0 10 Methyl TBSA	5.16
19:0	2.34
20:1 w9c	0.90
15:0 iso 2OH/16:1w7c	1.17

In der Zellwand (Totalzellhydrolysat) wurden DL-Diaminopimelinsäure, als diagnostisch relevante Zucker Arabinose und Galactose nachgewiesen. Die gaschromatographische Fettsäureanalyse (Tab. 1) ergab, daß die Bakterienzellen hauptsächlich unverzweigte Fettsäuren mit Kettenlängen von 14 bis 20 C- Atomen enthielten. Die identifizierte Hauptkomponente war jedoch Ölsäure (18:1 w9c = 29,2% des Gesamtfettsäuregehaltes), daneben wurde aber auch die für *Rhodococcus* (einschließlich *Dietzia*) typische Tuberculostearinsäure (10Me18:0 = 5,2%) nachgewiesen. Das unter Standardbedingungen aufgenommene Fettsäureprofil entspricht mit einer Ähnlichkeit von 0,481 dem in der MIS-Datenbank gespeicherten Profil der Art *Dietzia maris*. Die gleiche Artzugehörigkeit wurde mit dem BIOLOG-System (35 der 95 auf der GP-Platte angebotenen Substrate konnten genutzt werden) und einer Wahrscheinlichkeit von 0,656 ermittelt.

Die mit unterschiedlichen Methoden erzielten Identifizierungsergebnisse weisen aus, daß der Stamm 053 der Art *Dietzia* (früher *Rhodococcus*) *maris* zuzuordnen ist.

Abbau von Kohlenwasserstoffen: In Screeningtests wurde die Kapazität des Stammes 053 zum Kohlenwasserstoffabbau (Nutzung definierter Aliphaten, Aromaten und Asphalthe sowie verschiedener technischer Gemische als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle) bestimmt. Der Stamm 053 besitzt ein weites Kohlenwasserstoff-Verwertungsspektrum, 90% der angebotenen Substanzen konnten als Wachstumssubstrate genutzt werden. In Weiterführung der Untersuchungen wird auf die Anwesenheit von Plasmiden geprüft, die am Kohlenwasserstoffabbau beteiligt sind.

Wachstum unter suboptimalen Bedingungen: Um die Eignung des Stammes zum Einsatz in semi-ariden Böden abzuschätzen, wurden Untersuchungen unter suboptimalen Bedingungen (geringer Wasser- bzw. Nährstoffgehalt der Böden) durchgeführt. Erste vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, daß der Stamm 053 eine erhöhte Resistenz gegen Austrocknung aufweisen und auch unter unbalanciertem Nährstoffangebot wachsen könnte.

Literaturverzeichnis

- BOGART, A. H., HEMMINGSEN, B. B. (1992): Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2579-2582.
- CATALLO, W. J., PORTIER, R. J. (1992): Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal of organic chemicals from soils and sediments. Water Sci. Tech. 25, 229-237.
- GOLDSTEIN, R. M., MALLORY, L. M., ALEXANDER, M. (1985): Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. 50, 977-983.
- LEAHY, J. G., COLWELL, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54, 305-315.

Vorkommen von Plasmiden in marinen kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien

F. O. GRAÑA, O. H. PUCCI

CEIMA – Centro de Estudios e Investigaciones en Micorbiología Aplicada,
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Geronimo Maliqueo 120, 9000
Comodoro Rivadavia, Argentinien

1. Einleitung

Comodoro Rivadavia ist eine Stadt, die am Strand des Golfes San Jorge (Patagonien, Argentinien) liegt. An zwei Orten an der Stadtperipherie werden seit 70 Jahren Verladearbeiten von Rohöl bzw. Entladearbeiten von destillierten Erdölprodukten durchgeführt. Auf Grund kleinerer Ölundfälle, die recht häufig vorkommen, ergibt sich eine chronische Kontamination dieser Orte.

Der biologische Abbau von Kohlenwasserstoffen kann das Resultat des Katabolismus einzelner, definierter Mikroorganismen oder das Ergebnis des synergistischen Katabolismus verschiedener Komponenten einer Biozönose sein. In der Literatur wird das gehäufte Auftreten von Plasmid-DNA in kohlenwasserstoffkontaminierten Ökosystemen beschrieben (LEAHY et al. 1990, HADA und SIZEMORE 1981). Das Interesse am Nachweis von Plasmiden in kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien ist in den relevanten spezifischen Fähigkeiten begründet, die auf der Plasmid-DNA codiert sind (VAN BELEN et al. 1994, RAMOS GONZALES et al. 1991, FOSTER 1983, LENNON und DE CICCIO 1991, HADA und SIZEMORE 1991).

Nach der langjährigen Einwirkung der Kohlenwasserstoffkontamination an den untersuchten Standorten ist anzunehmen, daß sich dieser Selektionsdruck ausgewirkt hat. Es sollte daher möglich sein, Stämme mit erhöhter Abbaukapazität zu isolieren. Diese Fähigkeit ist möglicherweise mit der Anwesenheit von Plasmiden verknüpft. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Häufigkeit von Plasmiden in kohlenwasserstoffabbauenden marinen Bakterien zu bestimmen und Korrelationen mit dem Prozeß der natürlich ablaufenden Bioremediation in chronisch kontaminierten Gebieten nachzuweisen.

2. Material und Methoden

Probenahmeorte: Die Proben wurden an zwei chronisch kontaminierten Standorten gezogen, an denen Rohöl verladen bzw. Erdöldestillate entladen werden. Diese Orte sind 30 bzw. 3 km vom Zentrum der Stadt Comodoro Rivadavia entfernt.

Probenahme: An jedem Probenahmeort wurden zwei unterschiedliche Proben gezogen: Oberflächenwasser aus dem Meer wurde mit einem sterilen 1,5 l -Plastikprobenehmer, Sediment mit einem sterilen Spatel entnommen und in sterile Kolben überführt. In allen Fällen wurden die Proben sofort in das Labor transportiert.

Kulturmedien (VENKATESWARAN et al. 1993): Zur Bakterienisolierung wurde Medium nach Bushnell-Haas verwendet: $MgCl_2$ 0,3 g, $CaCl_2$ 0,02 g, KH_2PO_4 1 g, NH_4NO_3 1 g, $FeCl_3$ (30%) 2 Tropfen, NaCl 20 g, destilliertes Wasser auf 1 l. Zur Analyse der Plasmide wurden die Mikroorganismen auf LB Medium unter Zusatz von 1% Dieselöl bzw. eines entsprechenden Antibiotikums kultiviert.

Kultivierungs- und Isolierungsmethoden (VENKATESWARAN et al. 1993, VENKATESWARAN und TANAKA 1995): Die Proben wurden in 1 l-Kolben, die 0,5 l Bushnell-Haas-Medium zusätzlich 1% Rohöl-Dieselöl-Gemisch enthielten, bei Zimmertemperatur und unter Begasung mit steriler Luft für 30 Tage kultiviert. Die Konzentrationen an Phosphor und Stickstoff wurden zu Beginn und während des Experimentes mit der Molybdänblau- bzw. Indophenolmethode bestimmt. Machte sich eine Ergänzung erforderlich, wurde Phosphor als 4%ige sterile Lösung eines Gemisches aus Mono- und Dihydrogenphosphat, Stickstoff als 40%ige sterile Ammoniumchloridlösung zugesetzt. Am 3., 14. und 30. Tag der Inkubation wurden aus den Kolben Subproben gezogen und auf Petrischalen mit Bushnell-Haas-Agar, angereichert mit 0,05 g/l Hefeextrakt, 0,25 g/l Pepton und 0,15 g/l Fleischextrakt, ausgestrichen.

Identifizierung der Isolate: Zu einer Grobidentifizierung wurden die Identifizierungssysteme API 20NE und/oder API 20E verwendet.

Wachstum der Isolate auf Kohlenwasserstoffen: Bushnell-Haas-Medium, das 1% Kohlenwasserstoffgemische (im Fall des Benzen-Toluen-Xylen-Gemisches nur 0,1%) enthielt, wurde mit Zellmaterial der Reinkulturen beimpft und bei Zimmertemperatur unter zeitweiligem Rühren inkubiert. Das Wachstum wurde über Trübungsmessungen zwischen dem 2. und 15. Tag nach der Beimpfung beurteilt.

Plasmidisolierung (AUSUBEL et al. 1987): Plasmide wurden mit einer modifizierten Methode nach (BIRNBOIM und DOLY 1979) isoliert.

DNA-Elektrophorese (AUSUBEL et al. 1987): Die DNA wurde unter Verwendung von 6%igen Agarose-Gelen und 0,5x TBE-Puffer aufgetrennt. Nach abgeschlossener Trennung wurden die Gele mit Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) abgefärbt und im Transilluminator im UV-Licht ausgewertet.

Bestimmung der Plasmidgröße: Die Plasmidgrößen wurden einer logarithmischen Kurve (Molekülgröße versus Beweglichkeit) entnommen. Als Referenzmarker wurden das Plasmid pWWO (aus *Pseudomonas* spec.) und das Plasmid pRF30 (aus *E. coli* 10061) verwendet.

3. Ergebnisse und Diskussion

Mit der beschriebenen Isolierungsmethodik wurden insgesamt 23 morphologisch unterscheidbare Kolonien erhalten. Das Kulturmedium, das mit Pepton, Hefe- und Fleischextrakt supplementiert war, ergab nur winzige Kolonien, wodurch eine bessere Differenzierung bei ihrer Isolierung ermöglicht wurde. Bei der ersten Isolierung (Kultivierungszeit 3 Tage) wurden 8 Stämme, am 14. Tag 7 Stämme und am 30. Tag 8 Stämme gewonnen.

Entsprechend den gemessenen aktuellen Nährstoffkonzentrationen bei Kultivierung der Isolate in Flüssigkultur wurden die notwendigen Mengen N und P nachdosiert. Zu Versuchsbeginn enthielt das Medium 175 ppm Stickstoff und 465 ppm Phosphor, nach 10 Kultivierungstagen wurden Konzentrationen von 190 ppm Phosphor und 5 ppm Ammonium gemessen. Eine Nachdosierung von Phosphat war nicht erforderlich, da die aktuelle Konzentration ausreichend war. Im Fall von Ammonium wurde eine sehr ausgeprägte Abnahme beobachtet. Es war deshalb notwendig, Ammonium nachzufüttern.

Die Ergebnisse der Experimente zur Bestimmung des Wachstums der Isolate auf verschiedenen, technologisch bedeutsamen Kohlenwasserstoffgemischen, zu ihrer taxonomischen Zuordnung und zum Nachweis der Plasmide sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Mit den Identifizierungssystemen API 20NE und/oder API 20E konnten 11 der 23 Isolate einem Taxon

zugeordnet werden. Die Wachstumsreaktionen auf Kohlenwasserstoffgemischen zeigten, daß eine große Zahl der isolierten Bakterien (18 von 23) in der Lage ist, auf drei oder mehr der angebotenen Kohlenwasserstoffgemische zu wachsen, 6 der 23 Stämme wuchsen auf 5 oder mehr verschiedenen Gemischen. 5 Stämme wuchsen auf der 0,1%igen BTX-Mischung, zwei davon enthielten einzigartige Plasmide. Die Isolierung der Plasmide wurde in allen Fällen in duplo durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, daß 11 der 23 Isolate Plasmide enthalten, im allgemeinen große Plasmide und, mit Ausnahme des Stammes 402, nur jeweils ein Plasmid. Die Größen der Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: Kohlenwasserstoffverwertung, taxonomische Zuordnung und Plasmidgehalt von 23 Isolaten aus marinen Sedimenten

Stamm	Rohöl	Dieselöl	Kerosin	Benzin	Schmieröl	BTX ⁽¹⁾	Identifizierung	Plasmide (Anzahl)
201	+	+	+	+	+	-		0
202	+	+	-	-	+	-		0
203	+	+	-	+	+	+	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0
204	+	+	+	-	+	+	<i>Alcalcaligenes faecalis</i>	0
205	+	+	-	-	+	-		0
206	+	+	+	-	+	-		0
207	D	+	-	-	-	-		0
208	+	+	+	-	-	-		0
301	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas picketti</i>	0
302	+	+	+	-	+	-	<i>Achromobacter CDC gr VD</i>	0
303	++	++	+	+	++	+		0
304	+	+	+	+	+	D	<i>Achr. CDC gr VD</i>	1
305	++	+	+	-	+	+	<i>Pseudomonas picketti</i>	1
306	++	+	+	-	+	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
307	-	+	-	+	-	-		1
401	+	+	+	-	+	-		1
402	+	+	+	+	+	-		2
403	-	+	+	-	-	D		1
404	+	+	+	+	-	-		1
405	+	+	+	+	+	-	<i>Achromobacter CDC gr VD</i>	1
406	+	+	+	+	+	D	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
407	+	+	+	+	-	-	<i>Moraxella Phenylpyruvica</i>	1
408	+	+	+	-	+	-	<i>Achromobacter CDC gr VD</i>	0

⁽¹⁾BTX = Benzol + Toluol + Xylol

D= kein eindeutiges Wachstum

Um die Größe der Plasmide mit der Funktion korrelieren zu können, müssen neben dem Nachweis der Nutzung einzelner Kohlenwasserstoffe als Wachstumssubstrat auch Antibiotika- und Schwermetallresistenzen herangezogen werden. Die geplanten weiteren Arbeiten umfassen daher die Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide und die Ermittlung von Korrelationen mit Antibiotika- und Schwermetallresistenzen sowie mit der Nutzung einzelner Kohlenwasserstoffe als C-Quelle. Ausgehend vom Potential der untersuchten Stämme wird eine Mikrokosmosstudie durchgeführt werden.

Tab. 2: Größe der Plasmide

Stamm	Größe (Kb)
304	158
305	199
306	223
307	223 und 7
401	223
402	223
403	223
404	223
405	223
406	223
407	223

Literaturverzeichnis

- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SELDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. (Eds.) 1991: Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Vol. 1.
- BIRNBOIM, S. L., DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.
- FOSTER, T. J. (1983): Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev. 47, 361-409.
- HADA, H., SIZEMORE, R. (1981): Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 41, 199-202.
- LEAHY, J. G., SOMERVILLE, C. C., CUNNINGHAM, K. A., ADAMANTIADIS, G. A., BYRD, J. J., COLWELL, R. R. (1990): Hydrocarbon mineralization in sediments and plasmid incidence in sediment bacteria from the Campeche Bank. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1565-1570.
- LENNON, E., DE CICCIO, T. (1991): Plasmids of *Pseudomonas cepacia* of diverse origins. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2345-2350.
- RAMOS GONZALES, M. I., DUQUE, E., RAMOS, J. L. (1991): Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: Host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3020-3027.
- VAN BEILEN, J., WUBBOLD, M. G., WITHOLT, B. (1994): Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. Biodegradation 5, 161-174.
- VENKATESWARAN K., TANAKA, H. (1995): Degradation and mineralization of aromatic hydrocarbon of crude oil in the coral reef environment. Biomedical Letters 52: 63-73.
- VENKATESWARAN, K., IWABUCHI, T., MATSUI, Y., TOKI, H., HAMADA, E., TANAKA, H. (1993): Evaluation of various media with reference to the growth and biodegradation potential of oil degrading microorganisms. Biomedical Letters 48, 43-45.

Biologische Behandlung mineralölkontaminierter Schlämme

A. NOKE, R. A. v. KOLCZYNSKI, R. A. MÜLLER, U. STOTTMEISTER

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung,
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Deutschland

1. Einleitung

Mineralölkontaminationen von Boden, Grund- und Oberflächenwasser sind ein globales Umweltproblem. In allen Bereichen, wo Mineralöle und deren Produkte verarbeitet und verwendet werden, kann es durch Leckagen, Havarien, Reinigungsprozesse o.ä. zu Kontaminationen kommen. Sie treten z.B. auch in großem Umfang im Prozeß der Erdölförderung und -verarbeitung auf.

Das Kooperationsprojekt ENV 21 zwischen der Universidad Nacional de Cuyo in Mendoza und dem UFZ Leipzig hat die Beantwortung wissenschaftlicher und technologischer Fragestellungen zur intensiven Behandlung von mineralöl-kontaminierten Böden und Schlämmen zum Inhalt.

Im Umweltbiotechnologischen Zentrum (UbZ) des UFZ wurden in diesem Zusammenhang Untersuchungen zur Behandlung von bei der Erdölförderung anfallenden Bohrspülschlämmen unternommen. Diese Schlämme bestehen größtenteils aus einer sehr feinkörnigen Ton- bzw. Bentonitmatrix und sind aufgrund der geringen Durchlässigkeit und der daraus folgenden Behinderung des Sauerstoff- und Nährstofftransportes in herkömmlichen Mietenverfahren ohne erhebliche Zugabe strukturbildender Zusätze nicht sanierbar. Als biologische Alternative zur Deponierung oder thermischen Behandlung kommt jedoch das Suspensionsverfahren im Bioreaktor in Betracht.

Der Einsatz eines Reaktorverfahrens bietet folgende Vorteile (KNORR und v. SCHELL 1997): Durch die permanente Durchmischung des Materials wird die Bioverfügbarkeit erhöht und ein hoher Sauerstoffeintrag gewährt. Dies führt zu relativ kurzen Behandlungszeiten. Des Weiteren können wichtige Prozeßparameter durch Kontroll- und Steuerungsmöglichkeiten optimiert werden. Das Material ist nach erfolgter Sanierung biologisch aktiv und kann gegebenenfalls wieder eingebaut werden.

2. Material und Methoden

2.1 Charakterisierung der Bohrspülung

Das für verschiedene Abbautests verwendete Material stammte von einem ehemaligen Erdölfördergelände. Der Mineralölgehalt der untersuchten Probe betrug nach DIN 38409 H18 ca. 19000 mg/kg TS.

Das Material war hinsichtlich seiner Korngrößenverteilung nach DIN 4220 der Bodenart „Lehmiger Schluff“ zuzuordnen. Der Feinkornanteil ($<63 \mu\text{m}$) betrug ca. 80 Masseprozent.

Den Hauptanteil des Feststoffes in Spülmitteln für Tiefenbohrungen stellen Bentonite. Diese gehören zu den Tonmineralen und weisen eine starke Quellfähigkeit, sowie ein starkes Ad-

sorptionsvermögen sowohl für organische Verbindungen als auch für Nährstoffionen, insbesondere für Phosphat, auf (SCHEFFER und SCHACHTSCHNABEL 1992).

Dementsprechend ergab die Analyse der Bohrschlammprobe eine hohe Adsorptionskapazität für die Nährstoffionen PO_4^{2-} und NH_4^+ . Nach Einstellung des Adsorptions- Desorptionsgleichgewichtes wurde für Phosphat eine Adsorption von ca. 3 g/kg TS und für Ammonium von 0,6 g/kg TS beobachtet.

Die Ionenchromatographie (nach DIN 38405, Teil 20) des Wasseraufschlusses (nach DIN 38414 S4) zeigte, daß der Bohrschlamm eine hohe Konzentration an Chloridionen enthielt (ca. 12000 mg/kg TS). Hohe Gehalte an Schwefel (5600 mg/kg TS) und Eisen (40000 mg/kg TS) wurden mittels Atomemissionsspektroskopie (DIN 38406, Teil 22) des Königswasseraufschlusses (DIN 38414, Teil 7) ermittelt.

Des weiteren war der Schlamm anoxisch. Zu Beginn der Belüftung wurde eine sehr starke Sauerstoffzehrung beobachtet, die vermutlich mit einer chemischen Autoxidierung von Eisensulfid zu dreiwertigem Eisen verbunden war.

2.2 Airliftreaktoren

Für die hier beschriebenen Technikumsversuche kamen zwei verschiedene Typen von Airliftreaktoren zum Einsatz:

Rein pneumatisch betriebene Glasreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 4,5 l (Jenaer Glas), zentralem Innenleitrohr und innerem Umwurf. Die Begasung erfolgt bei dieser Bauform durch einen Belüftungsring am Reaktorboden.

65 l Airliftreaktor aus Edelstahl (Biolift® Reactor, Fa. Eimco). Die Begasung erfolgt durch eine Düse am Reaktorboden in das zentrale Innenleitrohr. Dadurch kommt es zu einem äußeren Umwurf des Reaktormediums. Zum intensiven Sauerstoffeintrag stehen zusätzlich vier Diffusoren am Boden des Reaktors zur Verfügung. Der hier zugeführte Luft-Volumenstrom kann unabhängig vom Airlift über Schwebekörperdurchflußmesser geregelt werden. Unter den Diffusoren befindet sich zudem ein Krähwerk, das unabhängig von der Begasung zugeschaltet werden kann und zur Vermeidung des Absetzens von Partikeln aus der Suspension dient. Größere Bodenbestandteile werden so dem zentralen Leitrohr zugeführt und im Aufstrom mitgerissen und resuspendiert. Im oberen Teil des Reaktors befindet sich zudem ein mechanischer Schaumzerstörer.

2.3 Prozeßführung und on-line Messung der Prozeßparameter

Bei beiden Reaktortypen wird über Schwebekörperdurchflußmesser ein definierter Volumenstrom der Begasungsluft eingestellt. Bei den 4,5 l Glasreaktoren betrug dieser 600 l/h. Bei dem 65 l Edelstahlreaktor wurde in den Zuleitungen zu den Diffusoren und zur zentralen Begasungsdüse am Reaktorboden jeweils ein Volumenstrom von 20 l/min eingestellt, so daß die Begasung insgesamt mit 40 l/min erfolgte.

Die Temperierung des Reaktorinhalts auf 30°C wurde bei allen Reaktorversuchen über einen Doppelmantel gewährleistet. Ein Schlangenkühler im Abluftstrom verhinderte einen Flüssigkeitsverlust. Das Kondensat wurde dem Reaktor wieder zugeführt.

Als Prozeßparameter wurden im Reaktor der Gelöst-Sauerstoff, der pH-Wert, die Temperatur und das Redoxpotential on-line überwacht.

Der pH-Wert wurde zur Prozeßkontrolle mittels einer pH-Elektrode (405-DPAS-SC-K8S/200 Kombinations-pH-Elektrode, Fa. Mettler Toledo) gemessen und über den Transmitter (pH-Transmitter 2500, Fa. Mettler Toledo) angezeigt. Der Prozeß wurde ohne pH-Regulierung gefahren, da Werte im physiologischen Bereich von 6,5 - 8,6 pH gemessen wurden.

Das Redoxpotential der Schlämme wurde im Prozeß mit einer Redoxelektrode (Pt 80b-S8/120 Metallelektrode, Fa. Mettler Toledo) gemessen.

Zur Messung des Gelöst-Sauerstoffs kam ein O₂-Sensor (12/120T-Type, Fa. Mettler Toledo) zum Einsatz, der mit einem O₂ Transmitter (O₂ Transmitter 4500, Fa. Mettler Toledo) verbunden war und gleichzeitig das Ablesen der Proben temperatur ermöglichte.

2.4 Durchführung der Reaktorexperimente

Für die Abbaustests wurde ein Mineralsalzmedium ohne Kohlenstoffquelle mit Phosphat in Form von K₂HPO₄ und Ammonium in Form von NH₄Cl eingesetzt. Die Bestimmung der Nährstoffe (Phosphat, Ammonium, Nitrat, Nitrit) erfolgte täglich. Gegebenenfalls wurden Ammonium und Phosphat nachdosiert, so daß in der wäßrigen Phase frei verfügbare Nährstoffe in Form von Ammonium und Phosphat nachweisbar waren. Eine Nährsalzlimitation bezüglich dieser Komponenten wurde durch diese Maßnahme weitgehend ausgeschlossen. Zur Kontrolle des Mineralölabbaus wurden täglich Proben für die H18-Analyse genommen und bis zur Analyse bei -16°C gelagert. Die Bestimmung der KBE erfolgte im Abstand von 1 bis 3 Tagen.

Versuche in 4,5 l Airliftreaktoren

Zur Untersuchung des Abbaus der Mineralölkohlenwasserstoffe in Bohrspülungen wurden zwei 4,5 l Airliftreaktoren mit unterschiedlichen Feststoffgehalten betrieben:

- Reaktor 1, 20% Feststoffgehalt
- Reaktor 2, 30% Feststoffgehalt

Für diese Ansätze wurde der Ausgangsschlamm (Trockensubstanzgehalt 60%) mit Leitungswasser auf den entsprechenden Feststoffgehalt eingestellt, nachdem darin die benötigten Nährsalze gelöst worden waren.

Nach einer Anzuchtperiode von 7 Tagen erfolgte das erste feeding mit unbehandeltem Schlamm im Verhältnis 1:2 und nach 13 Tagen das zweite feeding im Verhältnis 1:4 (d.h. drei von vier Teilen des Reaktorinhaltes wurden gegen unbehandelten Schlamm ausgetauscht).

Versuch im 65 l Airliftreaktor

Der Versuch im halbertechnischen Maßstab wurde mit 65 l Schlamm des Trockensubstanzgehaltes von 30% durchgeführt.

Bei diesem Versuch erfolgte die erste Nährstoffzugabe erst nach der Phase der Aufoxidierung des Schlammes und weitere Zugaben in Abhängigkeit der ermittelten Nährstoffkonzentrationen im Zentrifugat der Proben. Der Versuch mußte nach 6 Tagen aufgrund starker Schaumbildung abgebrochen werden.

2.5 Analytik

Quantitative Bestimmung der MKW in den Schlammproben

Die Bestimmung der MKW erfolgte in Anlehnung an die DIN 38409 H18.

Für die Untersuchung wurde 1 g gefriergetrocknete Probe in einen 250 ml Erlenmeyerkolben eingewogen. Nach Zugabe von 50 ml Freon (1,1,2-Trichlortrifluorethan) wurden die Proben durch Schütteln im Schüttelschrank (Multitron, Fa. Infors) für 30 Minuten bei 25°C und 130 U/min extrahiert. Im Anschluß daran erfolgte eine Filtration des Eluats über Faltenfilter (Whatman 113V, No 1213185) in eine geschlossene mit 8 g Aluminiumoxid gefüllte Chromatographiesäule. Die Proben wurden anschließend in 1 cm Quarzküvetten bei einer Wellenzahl 3080 bis 2700 cm^{-1} im FTIR-Spektrometer (FTIR 8000, Fa. Shimadzu) vermessen.

Untersuchung der organischen Verbindungen in der Reaktorabluft

Die Reaktorabluft wurde auf ihren Gehalt an leicht flüchtigen Kohlenwasserstoffen untersucht. Dazu wurde mittels eines Gasprobennehmers (GS 312, Fa. DESAGA) zu verschiedenen Zeiten des Reaktorversuches ein definierter Abluft-Teilstrom durch je ein Aktivkohleröhrchen (Typ G, Fa. Dräger) gesaugt. Die beladenen Aktivkohleröhrchen mit den dazugehörigen Kontrollschichten wurden mit 5 ml Schwefelkohlenstoff in einem gasdicht verschlossenen Glasöhrchen durch 10 min Ultraschallbehandlung extrahiert und der gewonnene Extrakt durch einen 0,45 μm Nalgene-Spritzenvorsatz filtriert. Die so gewonnenen Extrakte wurden gaschromatographisch analysiert.

Die Analyse mittels GC erfolgte unter folgenden Bedingungen:

- GC Perkin Elmer mit Autosampler
- fused silica Kapillarsäule DMS, 50 m • 0,32 mm, Filmdicke 1 μm
- S/SL Injektor, Splitverhältnis 1:10, 250°C, Injektionsvolumen 2 μl
- FID-Detektor 280°C
- Temperaturprogramm: T1: 40°C, 0 min; Rate 2 K/min, T2: 150°C, 2 min
- Trägergas N₂ (Reinheit 5.0, Fa. Linde), 14,5 kPa
- FID-Brennergase: synthetische Luft (KW-frei, Fa. Linde), H₂ (KW-frei, Fa. Linde)

Die Quantifizierung erfolgte nach der Methode des externen Standards unter Verwendung eines Standardgemisches (Fa. Supelco). Mit dem GC-Programm wurden 49 Komponenten aus dem Siedebereich C1 (Methanol) bis C13 (Tridecan) erfaßt. Die Konzentrationen an Einzelkomponenten in den Extrakten wurden summiert und die Konzentration leichtflüchtiger Kohlenwasserstoffe in der Reaktorabluft zu den verschiedenen Probenahmezeiten berechnet. Durch Integration über die Zeit des Abbautests konnte die Gesamtmenge der mit der Abluft den Reaktor verlassenden Kohlenwasserstoffe abgeschätzt werden.

GC-MS Analyse des Hexanextraktes

Um detaillierte Informationen über die Zusammensetzung der im Bohrschlamm enthaltenen MKW zu gewinnen, wurden zu verschiedenen Verweilzeiten dem Airliftreaktor Proben entnommen. 0,5 g der gefriergetrockneten Proben wurden mit 2,5 ml n-Hexan in gasdichten Ampullen 15 min im Ultraschall extrahiert und dann 10 min bei 10000 U/min zentrifugiert.

Die rein qualitative Analyse der Extrakte erfolgte unter folgenden Bedingungen:

- GC HP 5890 series II, MS HP 5971 series (Quadrupol)
- Säule HP-5MS, 30 m • 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm
- Full scan m/z 40...600
- Temperaturprogramm: T1: 60°C, 1 min; Rate 5 K/min, T2: 300°C, 20 min
- Trägergas He, 10 psi
- Injektor 280°C, Injektionsvolumen 1 µl, Transferline 280°C

Mit diesem Analysenprogramm wurden in der unbehandelten Bohrschlammprobe Alkane im Bereich der Molekülgröße von C₁₄ bis C₄₀ nachgewiesen.

Trockensubstanzbestimmung der Schlammsuspensionen

Die Trockensubstanz der Schlämme wurde mit der Trockenwaage (Sartorius MA40) mittels Infrarottrocknung bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz bestimmt.

Nährstoffbestimmung in den Zentrifugaten der Schlämme

Phosphat, Ammonium, Nitrat und Nitrit wurden mit Analysestäbchen (Fa. Merck) im Zentrifugat der Schlämme halbquantitativ nachgewiesen.

Koloniezahlbestimmung in den Schlammproben

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten in den Schlammproben erfolgte durch die Ausplattierung auf R2A-Agar. 10 ml Schlammprobe wurden mit 90 ml sterilfiltrierter, 0,2%iger Natriumpyrophosphatlösung versetzt. Der Ansatz wurde dann 30 Minuten bei 25°C und 150 U/min auf dem Schüttler dispergiert. Nach dem 2-5 minütigen Sedimentieren der Probe wurde 1 ml des Überstands steril entnommen. Nach Ansetzen einer Verdünnungsreihe mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung wurde 0,1 ml auf R2A-Agar ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation der Platten für 10 Tage bei 20°C. Die Auszählung erfolgte nach 5, 7 und 10 Tagen Inkubationszeit, wobei der 10 Tagewert als experimentelles Ergebnis gewertet wurde.

3. Ergebnisse durchgeführter Abbautests in Airliftreaktoren

Experimentelles Ziel war die Untersuchung der biologischen Sanierbarkeit der mineralölkontaminierten Bohrspülungen. Hierzu wurden die wesentlichen Kenngrößen für eine spätere Verfahrensentwicklung wie Abbaukinetiken und erreichbare Endkonzentrationen der MKW bestimmt.

Im 4,5 l Maßstab wurde ermittelt, in welchem Maße sich der Mineralölabbau durch sequencing batch Fahrweise beschleunigen läßt. Ebenso wurde der Einfluß unterschiedlicher Feststoffkonzentrationen und die Handhabbarkeit der Prozeßanalytik untersucht. Das scaling up in den halbtechnischen Maßstab erfolgte im 65 l Airliftreaktor.

3.1 Versuche in 4,5 l Airliftreaktoren

Die Kinetik des mikrobiellen Abbaus der Mineralölkontamination in der Bohrschlammprobe ist in Abbildung 1 dargestellt.

Nach einer kurzen Adaptationsphase, in der es auch zu einer Aufoxidierung des anoxischen Bohrschlammes kam, erfolgte eine starke Abnahme der MKW-Konzentration. Nach ca. 140 Stunden Behandlungsdauer kam der Abbauprozess zum Erliegen. In Ansatz 1 betrug die erreichte Abbaueffizienz 82% und in Ansatz 2 77% bei Endkonzentrationen von ca. 3500 bzw. 4500 mg/kg TS.

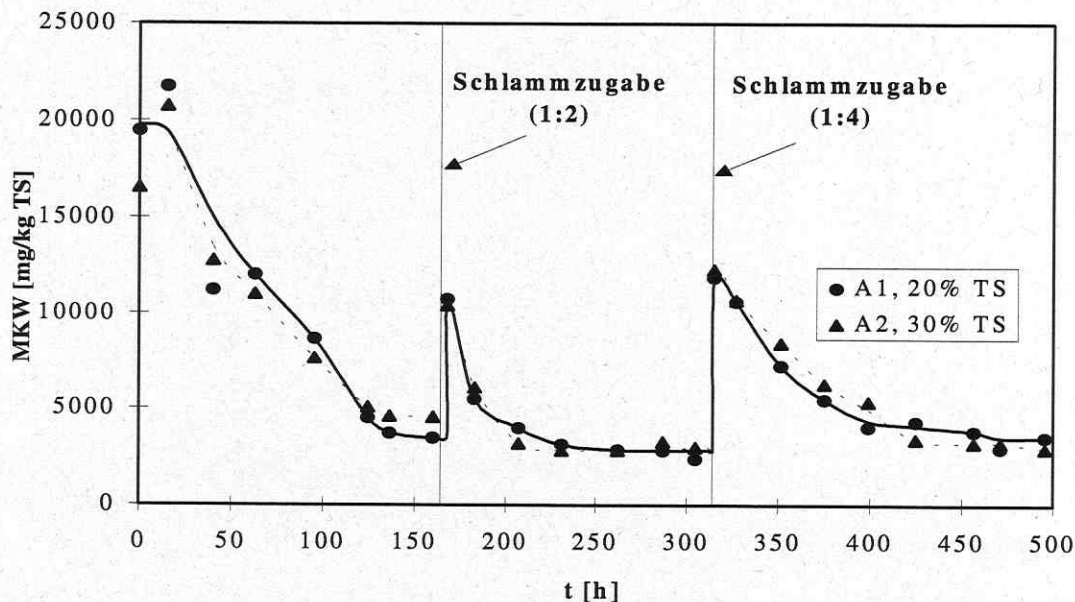


Abb. 1: Kinetik des MKW-Abbaus. Behandlung von MKW-kontaminierten Bohrspülschlämmen im 4,5 l Airliftbioreaktor. Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Austausches eines Teils des Reaktorinhaltes gegen unbehandelten Bohrschlamm an

Nach dem ersten feeding im Verhältnis 1:2 (d.h. Austausch der Hälfte des Reaktorinhaltes gegen unbehandelten Bohrschlamm des jeweiligen TS-Gehaltes), erfolgte der MKW-Abbau wesentlich schneller als in der ersten Prozeßphase, so daß die bioverfügbare C-Quelle bereits nach weiteren 60 h verbraucht war. Die Endkonzentrationen betrugen bei beiden Ansätzen ca. 2800 mg MKW/kg TS. Die in diesem Zeitraum in A1 und A2 erreichten Abbaueffizienzen lagen bei 85%, bezogen auf die Ausgangskonzentration des unbehandelten Schlammes von 19500 mg/kg TS.

Am 13. Tag des Versuches erfolgte ein erneutes feeding im Verhältnis (1:4). Innerhalb von 110 h nach dem zweiten feeding wurden in Ansatz A1 80,5% und in A2 82,5% der MKW-Ausgangskonzentration metabolisiert, bei jeweiligen Endkonzentrationen von 3800 und 3400 mg/kg TS.

In Abbildung 2 ist die Entwicklung der autochthonen Mikroorganismen in den drei batch-Zyklen für die zwei mit unterschiedlichen Feststoffkonzentrationen betriebenen Reaktoren dargestellt.

Von Ausgangskonzentrationen im unbehandelten Schlamm um 10^6 Zellen/g TS steigt die Zellzahl innerhalb von drei Tagen um mehr als drei Zehnerpotenzen. Bei allen drei batch-Zyklen stellten sich Zellzahlen zwischen 10^9 und 10^{10} KBE/g TS ein.

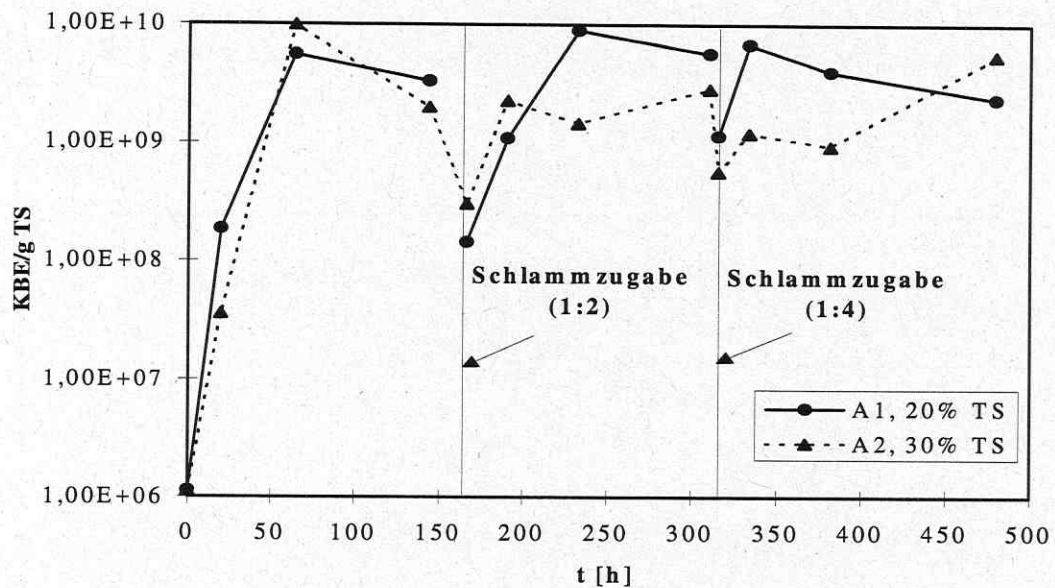


Abb. 2: Entwicklung der KBE (Koloniebildende Einheiten). Behandlung von MKW-kontaminierten Bohrspülschlämmen im 4,5 l Airliftbioreaktor bei zwei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten

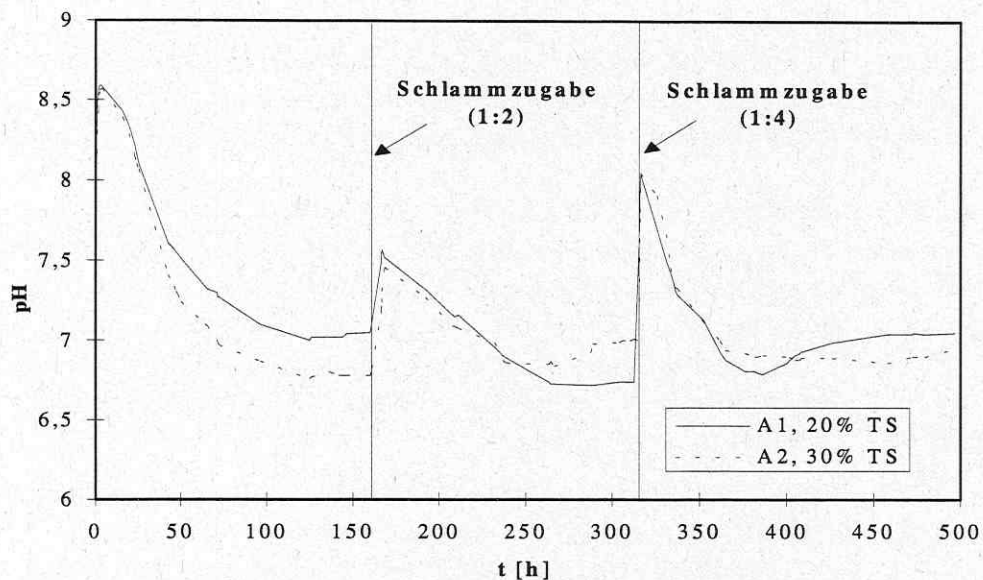


Abb. 3: Kinetik des pH-Wertes. Behandlung von MKW-kontaminierten Bohrspülschlämmen im 4,5 l Airliftbioreaktor bei zwei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten

Der pH-Wert wurde während der gesamten Versuchsdauer direkt im Prozeß gemessen und es erfolgte keine pH-Wertregulierung, da der physiologische pH-Bereich während der gesamten Versuchszeit nicht überschritten wurde. Es ist eine gute Übereinstimmung in den Kurvenverläufen (siehe Abb. 3) der unterschiedlichen Versuchsansätze beim MKW-Gehalt und pH-Wert zu erkennen. Nach einem kurzen Anstieg des pH zu Versuchsbeginn, der vermutlich mit der

Einstellung eines Gleichgewichtszustandes verbunden ist, nimmt der pH-Wert im Verlauf der Versuchszeit ab und stellt sich dann, nahezu zeitgleich mit dem Ende des mikrobiellen MKW-Abbaus, auf einen konstanten Wert ein. Die Verringerung des pH ist durch die Bildung organischer Säuren beim Abbau der Kohlenwasserstoffe und die Aufoxidierung von Ammonium und Einbau in die Biomasse zu erklären.

Der pH-Wert hat sich als eine praktikable Kenngröße zur einfachen Kontrolle der MKW-Metabolisierung erwiesen. Es ist davon auszugehen, daß bei der untersuchten Matrix pH-Werte von 6,6 bis 6,7 das Erliegen der MKW-Umsetzung kennzeichnen.

Das Redoxpotential (Abb. 4) stieg jeweils zu Beginn der batch-Zyklen sehr stark an und bewegte sich innerhalb der ersten 10 h aus dem negativen in den positiven Bereich. Während dieser Zeit erfolgte die chemische Oxidation des anoxischen Schlammes. Das weitere Ansteigen des Redoxpotentials wird in wachsendem Maße durch biologische Oxidationsprozesse hervorgerufen, die einhergehen mit der Entwicklung hoher Zellzahlen und dem mikrobiellen Abbau der Mineralölkohlenwasserstoffe. Es ist zu erkennen, daß bei den zwei feedings durch die Zugabe von unbehandeltem anoxischen Schlamm das Redoxpotential sinkt und anschließend durch die Sauerstoffzufuhr und damit verbundene Aufoxidation des Materials wieder ansteigt.

Die Messung des Gelöstsauerstoffs in den verschiedenen Versuchsansätzen erwies sich als recht problematisch. Die genutzten pO_2 -Elektroden wurden schnell vom Schlamm verschmutzt und zeigten eine geringe Langzeitstabilität (große Drift) der kalibrierten Werte. Die Meßergebnisse sind nicht graphisch dargestellt.

Durch die intensive Belüftung im Airlift ist jedoch davon auszugehen, daß abgesehen von der Phase der chemischen Aufoxidierung zu Beginn der batch-Zyklen, stets eine ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit Gelöstsauerstoff gewährleistet war.

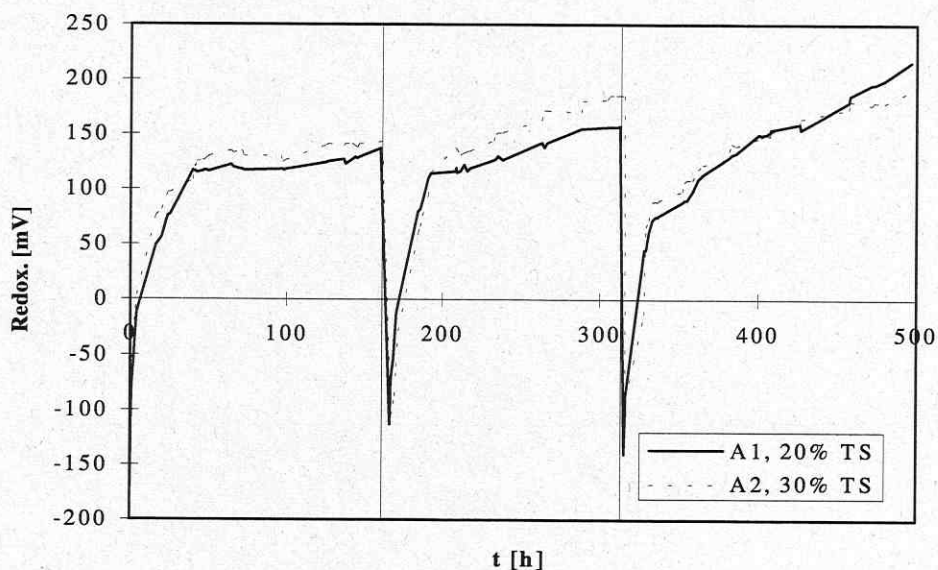


Abb. 4: Kinetik des Redoxpotentials. Behandlung von MKW-kontaminierten Bohrspülschlämmen im 4,5 l Airliftbioreaktor bei zwei unterschiedlichen Trockensubstanzgehalten

Die MKW-Eliminationskinetiken sowie der zeitliche Verlauf des pH und des Redoxpotentials korrelieren für beide eingestellte Feststoffgehalte. Da der Reaktorbetrieb bei einem höheren Feststoffgehalt ökonomisch günstiger ist, wurde der folgende Versuch mit 30% TS durchgeführt.

3.2 Versuchsansatz im 65 l Airliftreaktor

Die zuvor erarbeiteten Erkenntnisse sollten auf den halbertechnischen Maßstab übertragen und die Prozeßstabilität untersucht werden. Dazu wurde Bohrspülung mit 30% Trockensubstanzgehalt im 65 l Edelstahl-Airliftreaktor behandelt.

Nach 142 Stunden mußte der Versuch auf Grund starker Schaumbildung abgebrochen werden. Zu diesem Zeitpunkt war in der MKW-Abbaukinetik (Abb. 5) noch kein Plateau erreicht. Die nach H18 nachweisbare MKW-Konzentration betrug gegen Versuchsende 6500 mg/kg TS. Dies entspricht einem Abbaugrad von 64% bezogen auf die Ausgangskonzentration von 18000 mg/kg TS.

Die Zellzahlen stiegen analog zu den Versuchen in den 4,5 l Airliftreaktoren schnell an, erreichten nach 48 h Konzentrationen von 10^9 bis 10^{10} KBE/g TS und hielten sich dann bei diesem Niveau (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt).

Auch der pH-Wert verhielt sich wie bei den Versuchen im 4,5 l Maßstab beobachtet. Er sank von anfänglichen Werten um 8,2 auf 6,6 bei Abbruch des Versuches. Es konnte somit auch hier festgestellt werden, daß der pH-Wert in Abhängigkeit der Verstoffwechselung der Mineralölkohlenwasserstoffe sinkt und als einfacher Prozeßkontrollparameter geeignet ist.

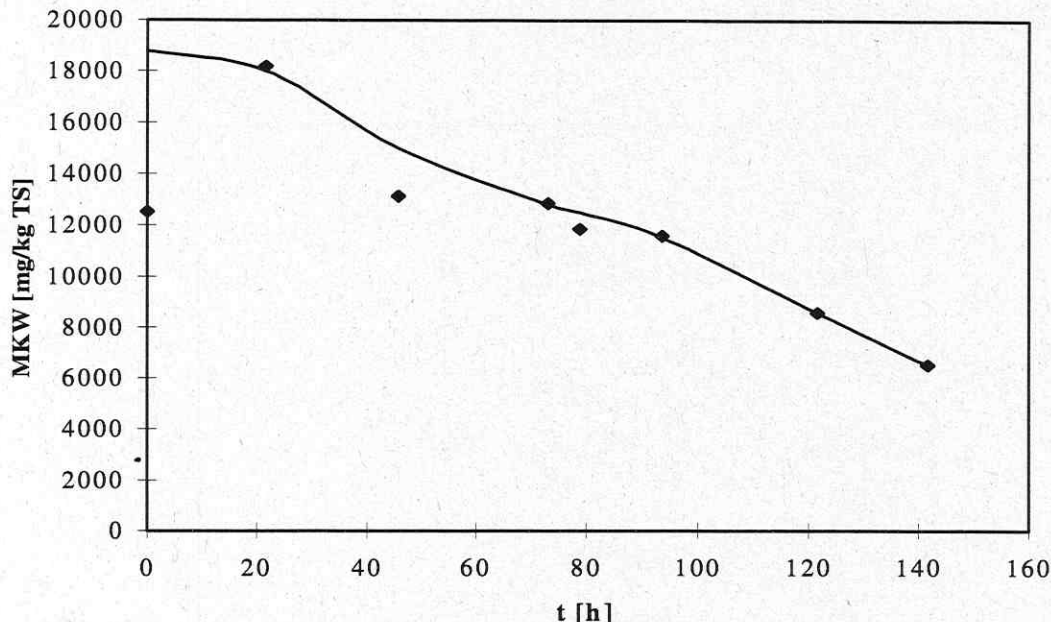


Abb. 5: Kinetik des Mineralölabbau in Bohrspülschlamm bei intensiver Behandlung im 65 l Airliftreaktor

Die Experimente im halbertechnischen Maßstab sollten einer ersten Schadstoffbilanzierung dienen. Dazu wurden der Anteil leicht flüchtiger Kohlenwasserstoffe in der Abluft und die Konzentrationen an MKW im Prozeßwasser bestimmt.

Der Hauptanteil der leichtflüchtigen Komponenten entwich innerhalb der ersten 5 Stunden nach Beginn des Versuchs, wobei die Ausgasung mit der Zeit exponentiell abnahm. Die Abso-
lutmenge der über den Versuchszeitraum von 5 Tagen aus dem Reaktor entwichenen organi-
schen Verbindungen wurde abgeschätzt. Sie betrug ca. 3500 mg und stellt somit, bezogen auf
eine MKW-Ausgangskonzentration von ca. 18000 mg/kg TS, bei einem TS-Gehalt von 30%
und 65 l Reaktorinhalt, 0,87% der zu Versuchsbeginn enthaltenen Schadstoffmenge dar. Der
Anteil an mit der Reaktorabluft entweichenden Schadstoffkomponenten ist somit für die
Schadstoffbilanz vernachlässigbar. Die Verringerung der Schadstoffkonzentration im Ver-
suchsverlauf ist also eindeutig auf eine Verstoffwechselung durch die autochthonen Mikroor-
ganismen zurückzuführen.

In der wäßrigen Phase konnten nach der H18 Methode zu keinem Zeitpunkt des Versuchs
relevante Mengen an MKW nachgewiesen werden.

Als positiver Nebeneffekt der biologischen Behandlung wurde festgestellt, daß sich das Ab-
setzverhalten der Feinkornpartikel wesentlich verbessert. Nach 6 Stunden Sedimentationszeit
nahm das Schlammvolumen auf 62% ab, so daß durch Abziehen des klaren Überstandes das
Volumen der weiterzuverwertenden Schlammmenge um ca. 40% reduziert werden könnte. Im
Vergleich dazu blieb der unbehandelte Schlamm weiterhin stabil und es konnte auch nach 48
Stunden keine Sedimentation festgestellt werden. Die deutliche Verbesserung der Sedimen-
tierbarkeit des Materials ist einerseits in der Veränderung der Oberflächenstruktur der Fein-
kornpartikel durch Ablösen der organischen Kontaminanten begründet. Andererseits führt das
Aufwachsen der Biomasse auf die Tonpartikel zu einer Flockulation und durch die dadurch
hervorgerufene Vergrößerung der Partikel zu einer erhöhten Sinkgeschwindigkeit.

4. Diskussion und Ausblick

Bei den Abbauprobungen in den 4,5 l Airliftreaktoren wurden reproduzierbar Abbaugrade um
80% bei einer Behandlungsdauer von drei bis vier Tagen erreicht. Die Endkonzentrationen der
MKW lagen bei 2800 bis 4500 mg/kg TS. Bei der Behandlung von dieselölkontaminierten
Böden erreichten von CROFT et al. (1997) innerhalb von 5 Tagen eine 90%ige Dekontaminati-
on im Slurryreaktor. Bei bereits gealterten Schadensfällen oder aus Bodenwaschanlagen
stammendem Feinkornmaterial werden meist geringere Abbaugrade bei wesentlich längeren
Behandlungszeiten erreicht (ELIAS und WIESMANN 1995). Der hohe Abbaugrad von 80% ist
darin begründet, daß die Kontamination trotz mehrjähriger Lagerung der Bohrschlämme als
nicht gealtert anzusehen ist. Die Bohrschlämme wurden direkt nach der Förderung in Erdmul-
den verbracht und auf Grund der geringen Durchlässigkeit der Matrix konnte keine Versor-
gung mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgen.

Zwischen den Abbaugraden und -kinetiken bei den zwei getesteten Feststoffkonzentrationen
von 20% und 30% wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt. Aus wirtschaftlichen
Gründen ist daher der höhere Feststoffgehalt für den Reaktorbetrieb zu bevorzugen, da so in
gleicher Zeit mehr Material dekontaminiert werden kann.

Die spezifischen Abbauraten in den aktiven Abbauphasen lagen für die drei batch-Zyklen bei
2700, 2800 und 1800 mg Kohlenwasserstoffabbau pro kg TS und Tag. Daraus ist zu erkennen,
daß es nur bei der ersten Nachdosierung zu einer Beschleunigung des MKW-Abbaus kam.
Der Reaktionsverlauf nach dem zweiten feeding zeigt keine Erhöhung der Abbaugeschwin-
digkeit. Durch die offensichtlich zu spät erfolgte Nachdosierung war die Biomasse nicht mehr
voll aktiv. Eine schnelle und verlässliche Prozeßanalytik muß hier Abhilfe schaffen, so daß

sofort bei Ende des Abbauprozesses ein Großteil des Reaktorvolumens gegen unbehandelten Schlamm ausgetauscht werden kann.

Im 65 l Airliftreaktor wurde die MKW-Konzentration des Spülschlammes von einer Ausgangskonzentration von ca. 18000 mg/kg TS bis auf 6500 mg/kg TS abgereichert. Die spezifische Abbaurate betrug dabei ca. 2200 mg/kg TS • d und ist somit vergleichbar mit den für die 4,5 l Airliftversuche erhaltenen Werten. Damit liegt die erreichte Abbauleistung bei beiden Airliftreaktortypen im selben Bereich und das scaling up kann als erfolgreich angesehen werden.

GC-MS Analysen von Hexanextrakten wiesen darauf hin, daß es sich bei den Restkonzentrationen an MKW nach H18 um höhermolekulare Verbindungen handeln muß ($> C_{40}$), die aufgrund der Molekülgröße oder der festen Bindung an die anorganische Matrix dem mikrobiellen Abbau nicht mehr zugänglich sind. Bei der Analyse konnten, im Gegensatz zur Anfangsprobe, nach 6 Tagen Bioreaktorbehandlung keine Alkane im Bereich C_{14} bis C_{40} mehr nachgewiesen werden. Die erreichten Endkonzentrationen der MKW nach H18 von minimal 2800 mg/kg TS liegen immer noch deutlich über den Werten für den Wiedereinbau nach LAGA (1995). Die Obergrenze für den Wiedereinbau von Boden wird durch den Z2-Wert bei 1000 mg/kg TS festgelegt. Von ANGEHRN et al. (1997) wird jedoch diskutiert, ob ein starres Festhalten an derartigen Grenzwerten sinnvoll ist, da von erfolgreich saniertem Bodenmaterial in der Regel kein Gefahrenpotential ausgeht. Der Restschadstoffgehalt besteht größtenteils aus apolaren, hydrophoben, schwer siedenden Komponenten. Diese gelangen nur in unbedeutendem Umfang als Eluat ins Grundwasser und haben keine toxische Wirkung auf Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere. In der wässrigen Phase der behandelten Bohrspülschlämme wurden nur sehr geringe Gehalte an MKW festgestellt, die im Bereich der Nachweisgrenze der H18-Methode liegen.

Während aller Versuche wurde beobachtet, daß MKW-Abbau und die Verringerung des pH-Wertes miteinander korrelierten. Daher scheint der pH als einfacher Prozeßkontrollparameter zur Beschreibung des MKW-Abbaus nutzbar zu sein. Es ist allerdings zu beachten, daß hohe punktuelle Nährstoffzugaben sich direkt auf den pH-Wert auswirken können und ebenfalls die Aufoxidierung von im Bohrschlamm enthaltenem Sulfid zu Sulfat zu einer Absenkung des pH führt.

Die bei den Reaktorversuchen häufiger beobachtete Schaumbildung, die bei dem 65 l Airliftreaktorversuch zum Abbruch führte, ist entweder auf die Bildung von Biotensiden oder auf Zelllysis eines Teils der am Abbau beteiligten Mikroorganismen zurückzuführen. Ursache für die Zelllysis ist die Limitation einer oder mehrerer Nährstoffkomponenten.

Die ausreichende Versorgung der Mikroorganismen mit den Nährstoffionen Ammonium und Phosphat erwies sich als problematisch, da die Tonmatrix der Bohrspülung ein sehr starkes Adsorptionsvermögen insbesondere für Phosphat besitzt. Tonminerale sind Schichtsilikate in deren Zwischenschichtraum starke elektrostatische Wechselwirkungen herrschen. Die geringe Teilchengröße und die Schichtladung sind Ursache für die hohe Reaktionsfähigkeit der Tonminerale (SCHEFFER und SCHACHTSCHNABEL 1992). Phosphat kann mit den Schichtsilikaten reagieren. Dies führt zur Ausfällung von Aluminiumphosphat (ZIECHMANN und MÜLLER-WEGNER 1990).

Ausblick

- Eine Verfahrensverbesserung könnte darin bestehen, den anoxischen Schlamm in einem Aufschlußbehälter durch intensive Belüftung bereits vor Befüllen des Bioreaktors auf-

zu oxidieren. Somit wäre die Milieuveränderung beim fed-batch minimiert, was sicherlich zu einer Beschleunigung des Abbauprozesses führt.

- Die Ursache des Schäumens muß ergründet werden, um Prozeßunterbrechungen zu vermeiden.
- Die Nährstoffzudosierung bedarf einer Optimierung, da sowohl eine Überdosierung, als auch eine nicht ausreichende Nährstoffversorgung schnell zur Hemmung des mikrobiellen MKW-Abbaus führt.

5. Zusammenfassung

In Airlift-Reaktor-Versuchen im labor- und halbtechnischen Maßstab wurde gezeigt, daß die MKW-Kontamination in Feinkornmaterialien entscheidend abgereichert werden konnte. Bei dem untersuchten Material handelt es sich um Bohrspülschlämme, die im Prozeß der Erdölförderung anfallen. Die Schlämme enthielten eine Mineralölkontamination von ca. 19000 mg/kg TS.

Dieses feinkörnige Material kann ohne vorhergehende aufwendige Klassierschritte in den Bioreaktor überführt werden. Im Suspensionsverfahren erfolgte innerhalb von 3 bis 4 Tagen Behandlungsdauer eine Abreicherung der Mineralölkontamination um ca. 80%. Die autochthonen Mikroorganismen konnten durch intensive Belüftung, Durchmischung und ausreichende Nährstoffversorgung des Reaktormediums derart aktiviert werden, daß Zellzahlen von 10^9 bis 10^{10} KBE/g TS und spezifische Abbauraten von 1800 bis 2800 mg MKW/kg TS • d erreicht wurden.

Weniger als 1% der Ausgangsmenge an Kohlenwasserstoffen wurde während des Abbauprozesses mit der Reaktorabluft ausgestriipt. Ein vollständiger Abbau der Alkane C₁₄ bis C₄₀ wurde mittels GC-MS nachgewiesen.

Es wurde festgestellt, daß die Matrix „Bohrspülung“ besondere Ansprüche an die Nährstoffzugaben stellt. Phosphatverbindungen wurden wesentlich stärker adsorbiert als Ammoniumverbindungen.

Im Verlauf der Abbauversuche wurde festgestellt, daß der pH-Wert recht gut mit dem Abbau der MKW-Kontamination korreliert und sich daher als einfacher Parameter zur Beschreibung des Abbauprozesses eignet. Dies ist insbesondere wichtig, da bei einem fed-batch Betrieb zum Zeitpunkt des Endes des mikrobiellen Abbaus die Nachdosierung der neuen C-Quelle (unbehandelter Schlamm) erfolgen muß und ein zu langes Warten die biologische Aktivität der Mikroorganismen herabsetzt.

Es wurde festgestellt, daß die Sedimentierfähigkeit des Bohrspülschlammes durch die Behandlung im Bioreaktor entscheidend verbessert wird. Dies wirkt sich vorteilhaft auf den folgenden Prozeßschritt der Entwässerung aus.

Literaturverzeichnis

- ANGHERN, D., GÄLLI, R., SCHLUEP, M., ZEYER, J. (1997): Biologisch saniertes Bodenmaterial aus Mineralölschadensfällen: Abfall oder Produkt? Terra Tech. 3, 51-56.
- CRAFT, B., PITTMAN, S., DAVIES, S. 1997: Combined *ex situ* physical and bioreactor treatment of diesel in soil. In *situ* and *on-site* bioremediation: Vol.5. Batelle Press. S. 83-84.

- ELIAS, F., WIESMANN, U. (1995): Biologische Behandlung von Reststoffen der Bodenwäsche in einer 4-stufigen Rührreaktorkaskade im Labormaßstab. Altlasten-Spektrum. 3, 148-157.
- KNORR, C., v.SCHELL, T. (Hrsg.) 1997: Mikrobieller Schadstoffabbau. Vieweg. Braunschweig/Wiesbaden.
- LAGA-Länderarbeitsgemeinschaft Abfall 1995: Technische Regeln Teil 6/4.3.17.1.
- SCHEFFER, F., SCHACHTSCHNABEL, P. 1992: Lehrbuch der Bodenkunde. Enke Verlag. Stuttgart.
- ZIECHMANN, W., MÜLLER-WEGNER, U. 1990: Bodenchemie. BI-Wissenschaftsverlag.

Abkürzungsverzeichnis

DIN	Deutsche Industrie Norm
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Detektion
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KW	Kohlenwasserstoff
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe

Intensive Behandlung von im Airliftreaktor biologisch sanierten Böden

E. ERCOLI¹, J. GÁLVEZ¹, R. MÜLLER², U. STOTTMEISTER²

¹Laboratorio de Bioprocesos, Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ingenieria, 5500 Mendoza, Argentinien

²UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Deutschland

1. Einleitung

Die mikrobiologische Behandlung von MKW-kontaminierten Böden, Sedimenten und anderen Feststoffen in der üblichen Form dauert mehrere Monate, und die Resultate zeigen eine asymptotische Abnahme des abbaubaren Kontaminanten. In quasi allen in der Literatur beschriebenen Fällen kann eine Restkontamination nach der Behandlung nachgewiesen werden (ARENDE et al. 1993).

Der Grund dieses Phänomens ist bis jetzt noch nicht voll geklärt. Vermutlich beruht die Ursache dieses Verhaltens auf Sorptions-Desorptionsgleichgewichten oder auf einer nicht homogenen Verteilung im Feststoff. Neuere Arbeiten analysieren im einzelnen die drei Arten der Limitation, die oben genannt wurden: Abbaubarkeit, Diffusion und Fähigkeit zur Desorption (ARENDE et al. 1993). In einigen Arbeiten wird angenommen, daß die Diffusion aus den Matrices der limitierende Mechanismus des Kohlenwasserstoffabbaus ist. Experimente, die in Slurryreaktoren zum Studium des Abbaus von Hexadekan und Dieselöl durchgeführt wurden, zeigen, daß die Restkonzentration an Kohlenwasserstoff nach dem Abbau nicht durch die Unfähigkeit der Organismen zum Abbau dieser Substanzen oder durch die Bildung toxischer Substanzen bedingt ist, da unter anderen Bedingungen der Kontaminant vollständig mineralisiert wird (GEERDINK 1995).

Die Kontamination ist im Boden nicht gleichmäßig verteilt, sondern von der Korngrößenverteilung und dem Anteil an organischer Substanz abhängig. Für biologisch sanierte Böden trifft dasselbe zu (NEEBE und FEIL 1993).

Die Alternative, Bioreaktoren zur intensiven Behandlung von Böden zu nutzen, ist vor allem durch die Kosten beschränkt, die mit der Bewegung großer Erdvolumina verbunden sind (ARENDE et al. 1993).

Die grundlegende Idee dieser Arbeit besteht darin, nur den hochkontaminierten Anteil, d.h. die Fraktion mit der kleinsten Korngröße, in einem pneumatisch belüfteten Bioreaktor zu behandeln. Das Prinzip dieser Arbeit basiert darauf, daß es in einem intensiven Reinigungssystem möglich ist, hohen Massentransfer, homogene Phasen und kontrollierte mikrobiologische Wachstumsbedingungen zu erreichen, was eine weitgehende Dekontaminierung ermöglicht.

2. Material und Methoden

Behandlungseinheit (Abb. 1): Diese Einheit besteht aus einem Schlammbehälter, einem Hydrozyklon, um die Feinkornfraktion des Bodens abzutrennen, und dem Bioreaktor. Alles besteht aus Edelstahl AISI 316. Der Hydrozyklon besitzt eine Höhe von 400 mm bei einem Durchmesser von 100 mm und hat einen 45 mm Oberlauf und einen 5 mm Unterlauf. Der Airliftreaktor hat einen Durchmesser von 218 mm und eine Höhe von 1025 mm. Das Innenleitrohr

ist

900 mm hoch und hat einen Durchmesser von 140 mm. Der Reaktorboden ist nach innen gewölbt, und die maximale Höhe der Wölbung beträgt 35 mm. Der Reaktor hat einen Doppelmantel zum Temperieren. Temperatur, pH-Wert, Durchfluß und Druck der eintretenden Luft können geregelt werden.

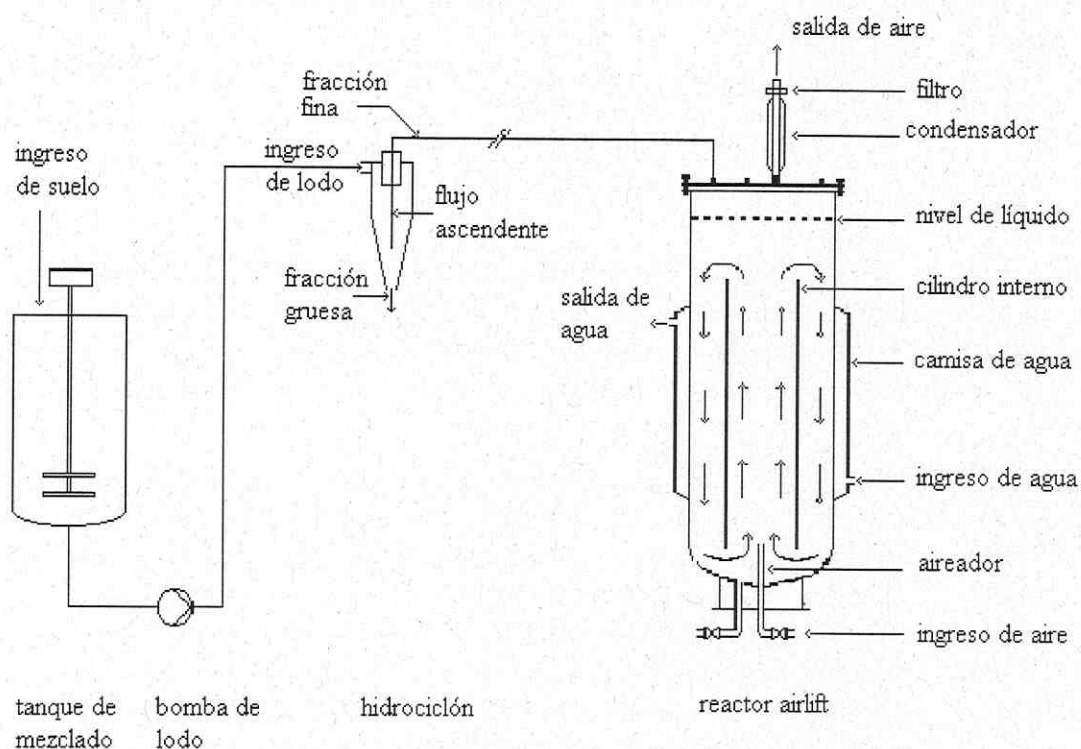


Abb. 1: Behandlungseinheit

Mikroorganismen: Es wurde ein mikrobielles Konsortium verwendet, das vom Gelände einer Erdölförderstelle in der Provinz Mendoza, Argentinien, auf folgende Art isoliert wurde: Eine definierte Menge Boden wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt, der das folgende Medium enthielt: 5,0 g/l NaCl, 0,2 g/l $MgSO_4$, 1,0 g/l $NH_4H_2PO_4$, 1,0 g/l K_2HPO_4 , 0,5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,02 g/l Hefeextrakt. Der Kolben wurde bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert und während 45 Tagen an steigende Konzentrationen der Kontaminanten adaptiert. Anschließend wurde die Kultur unter sterilen Bedingungen zur Konservierung auf Dauernährmedium überführt: 5,44 g/l KH_2PO_4 , 5,68 g/l Na_2HPO_4 , 1,00 g/l NH_4Cl , 1,50 mg/l $FeCl_3$, 0,15 mg/l $CaCl_2$, 1,0 g/l Hefeextrakt, 16,00 g/l Parafin-Diesel, 25,0 g/l Agar. Die Kultur wurde bei 4°C gelagert. Die erhaltene Kultur bestand aus einem sporenbildenden Gram-positiven, fakultativ anaeroben Bazillus und einer aeroben Hefe.

Mikroskop: Verwendet wurden ein Mikroskop von Fisher Scientific mit Immersionsobjektiv (100 x Vergrößerung) und normalen Objektiven mit 40 x und 60 x Vergrößerung.

Kulturmedien: Für die Abbauersuche wurde das Kulturmedium A (Tab. 1 und 2) gelöst im Produkt des Hydrozyklon-Oberlaufes verwendet. Zur Gewinnung des Inoculums wurde dasselbe Medium verwendet, jedoch anstelle des Hydrozyklon-Oberlauf-Produktes wurde zur Lösung dest. Wasser eingesetzt. Zusätzlich wurden noch 16 g/l hydriertes Dieselöl als C-Quelle zugeführt. Für die Optimierungsversuche wurden Medium A und B verwendet (Tab. 1 und 2), deren Komponenten wie in Tabelle 4 beschrieben kombiniert wurden. Für die semikontinuierlichen Prozesse wurde das optimierte Medium verwendet.

Kontaminierter Boden: Es wurde ein Modellboden aus gesiebttem Sand verwendet (Durchmesser ≤ 2 mm): 95%, Wurmhumus (ungesiebt): 4,5%, hydriertes Dieselöl: 0,5%. Es wurden zwei Sorten von Modellböden hergestellt (Tab. 3).

Die Modellböden wurden 90 Tage lang gelagert. Während dieser Zeit wurden die Gefäße täglich umgewälzt, um den Inhalt zu homogenisieren. Anschließend wurde der Boden im Hydrozyklon behandelt, und der Oberlauf wurde für die Abbauprobversuche eingesetzt. Die Korngrößenverteilungen sind in Abbildung 2 und 3 für die Oberlauf-Produkte der groben bzw. feinen Modellböden zu sehen.

Tab. 1: Zusammensetzung der Kulturmedien

Medium A		Medium B	
KH ₂ PO ₄	5,4 g/l	NaCl	5,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	5,6 g/l	MgSO ₄	0,2 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l	NH ₄ HPO ₄	1,0 g/l
Hefeextrakt	1,0 g/l	K ₂ HPO ₄	1,0 g/l
Mikronährstoffe A	0,15 ml/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g/l
		Hefeextrakt	1,0 g/l
		Mikronährstoffe B	10,0 ml/l

Tab. 2: Zusammensetzung der Mikronährstofflösungen

Mikronährstoffe A		Mikronährstoffe B	
FeCl ₃	10 g/l	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	275 ml
CaCl ₂	1 g/l	ZnSO ₄	550 mg/l
		CaCl ₂ • 2 H ₂ O	110 mg/l
		MnCl ₂ • 4H ₂ O	275 mg/l
		CuSO ₄ • 5 H ₂ O	110 mg/l
		CoSO ₄ • 7 H ₂ O	110 mg/l
		KCl	2750 mg/l
		NaCl	2750 mg/l

Tab. 3: Zusammensetzung der Modellböden

Durchmesser\Sand	Grob	Fein
Sand 0,501-2,000 mm	57,0%	9,5%
Sand 0,101-0,500 mm	28,5%	28,5%
Sand 0-0,100 mm	9,5%	57,0%
Humus	4,5%	4,5%
Hydriertes Dieselöl	0,5%	0,5%

Experimentelles Vorgehen: Für jeden kontaminierten Boden wurde ein Vorversuch durchgeführt. Für die weiteren Versuche wurde nur der feine Modellboden eingesetzt. Für die semi-kontinuierlichen Prozesse wurde der feine Modellboden eingesetzt. Das Arbeitsvolumen des Reaktors betrug 40 l. Es wurden zwei unterschiedliche Typen von Belüftern eingesetzt, der erste für die Vorversuche war eine elliptische Düse und der für die späteren Versuche war eine durchlochte Siebplatte. Belüftet wurde mit 13 bis 34 Liter pro Minute. Der pH-Wert betrug 6,8 und die Temperatur 30°C. Um den Temperatureinfluß zu testen, wurde die Temperatur auf 40°C erhöht. Zusätzlich wurde die Zugabe von Tween 80 getestet.

Anschließend ruhte die Probe 10 min zum Sedimentieren, und es wurden 10 ml der Tetrachlorkohlenstoffphase abgezogen. Nach Zugabe von 1 g Florisil wurde 2 Minuten geschüttelt. Anschließend ruhte die Probe 10 min lang zum Sedimentieren. Der Überstand wurde im Spektralbereich von 3,2 bis 3,6 μm gegen Tetrachlorkohlenstoff gemessen. Das Gewicht der Festphase in der Probe wurde als Filtrat oder als Trockengewicht bestimmt.

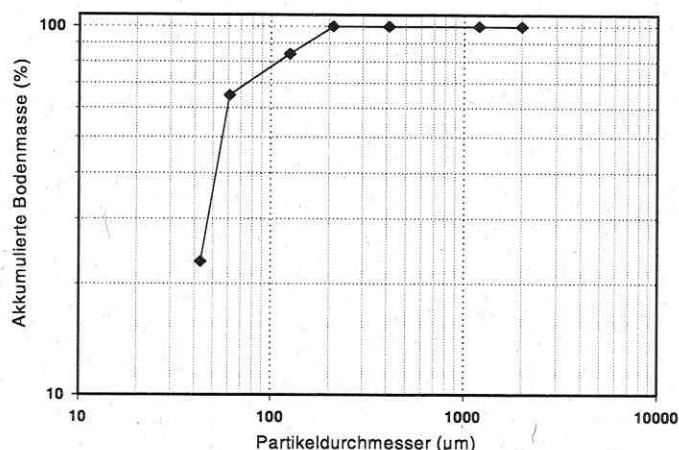


Abb. 2: Verteilung der Partikel im Oberlauf des Hydrozyklons bei Einsatz des groben Modellbodens

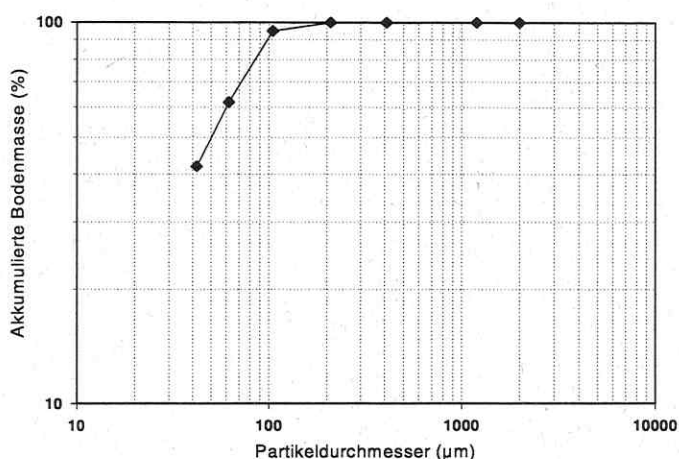


Abb. 3: Verteilung der Partikel im Oberlauf des Hydrozyklons bei Einsatz des feinen Modellbodens

3. Resultate und Diskussion

Vorversuche: Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4 und 5 für die groben und für die feinen Modellböden gezeigt. Es konnte gezeigt werden, daß eine Suspension mit feiner Korngröße, die stark mit Kohlenwasserstoff kontaminiert ist, effizient in einem Airliftreaktor behandelt werden kann. Im Fall des groben Bodens wurden innerhalb von 62 Stunden und im Fall des feinen Bodens innerhalb von 14 Stunden 77% des angebotenen Kohlenwasserstoffs abgebaut.

Es konnten zwei Phasen unterschieden werden: Eine anfängliche Phase mit schnellem Abbau gefolgt von einer langsamen Phase. Die Anfangsphase kann ihre Ursache in einer Kombination von Abbau und Verdampfung haben. Dieses Verhalten stimmt mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen überein: eine erste Phase, innerhalb derer sich der an der Oberfläche befindende Kontaminant schnell von der Partikeloberfläche löst und von den Mikroorganismen konsumiert wird, und eine zweite Phase, in der die Desorption der innerhalb des Partikels vorliegenden Kontaminanten stattfindet (GEERDINK 1995).

In den beiden untersuchten Bodentypen wird eine Endkonzentration an Kohlenwasserstoff erreicht, die auch bei steigender Behandlungsdauer nicht unterschritten wird. Dieser Grenzwert liegt bei ungefähr 25% der Anfangskonzentration für den groben Modellboden, während für den feinen Modellboden die Restkonzentration bei 50% liegt.

Die Abbaurate ist niedriger im grobkörnigen Boden als im feinkörnigen (Abb. 4 und 5). Dieses Verhalten kann dadurch erklärt werden, daß im groben Modellboden der Kontaminant sich zum größten Teil in den Poren und im Inneren der Partikel und in geringerem Maß auf der Oberfläche der Partikel befindet. Der Kontaminant im Inneren des Partikels desorbiert nur langsam. In dem feinen Modellboden liegt ein entgegengesetztes Phänomen vor. Es gibt eine größere spezifische Oberfläche, und die Porenlänge ist kürzer, weswegen die Desorption schneller verläuft (BOSMA et al. 1997).

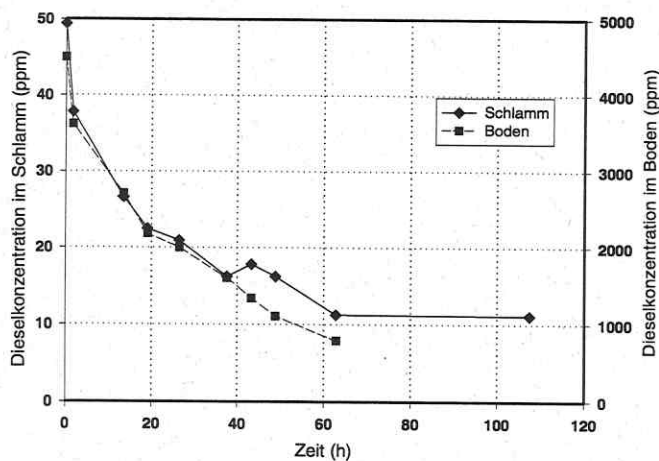


Abb. 4: Abbau von adsorbiertem Diesel im groben Modellboden

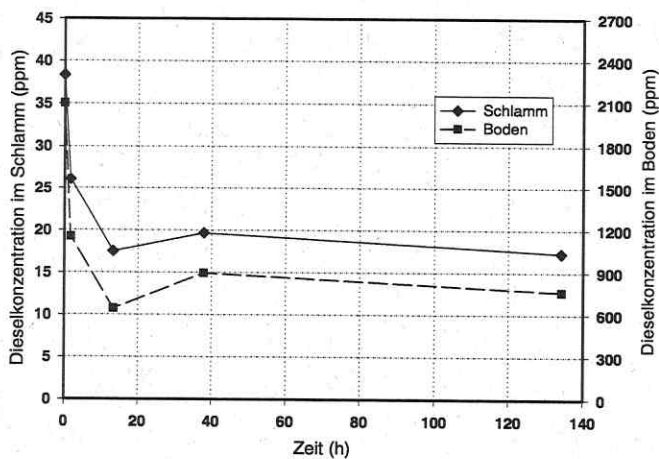


Abb. 5: Abbau von adsorbiertem Diesel in feinem Modellboden

Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration: Der Effekt der Sauerstoffkonzentration, verursacht durch den Wechsel des Belüfters, ist in Abbildung 6 und 7 dargestellt. Um die

Sauerstoffübertragung im Fermenter zu verbessern, wurde der Belüfter modifiziert. Der Wechsel des Belüfters führte zu einer Verbesserung des Abbaus um 50%. Diese Differenz spiegelt sich nicht in der Veränderung der Endkonzentration der Kohlenwasserstoffe in der festen Phase wider, in der nur eine Verbesserung um 6% erreicht wurde. Ein Fakt, der noch untersucht werden muß. Eine mögliche Erklärung ist, daß in Prozessen, in denen ein Kohlenstoffs substrat mit sehr kleiner Rate metabolisiert wird, der Gelöstsauerstoff kein limitierendes Substrat darstellt. Die leichte Verbesserung des Abbaus könnte auch durch die erhöhte Turbulenz, die den Massentransfer von der Oberfläche zum Mikroorganismus verbessert, bedingt sein (BAILEYS und OLLIS 1986).

Einfluß der Temperaturerhöhung und Effekte von Tensiden: Der Effekt der Temperaturerhöhung und der Zugabe von Tensiden ist in Abbildung 8 zu sehen. Sobald die asymptotische Abbauphase erreicht wurde, wurde die Temperatur erhöht, um eine verbesserte Desorption zu erzielen. Mit dieser Behandlung wurde innerhalb von 90 Stunden insgesamt eine Verringerung der Konzentration um 86% erreicht, was einer Erhöhung des Abbaus um 15% entspricht. Die Mikroorganismen benötigten 30 Stunden, um sich an die neuen Temperaturbedingungen zu gewöhnen und eine genügende Vielfalt und entsprechend hohe Konzentration für den Abbauprozess zu erreichen.

Die Zugabe der oberflächenaktiven Substanz (Tween 80®) führt nicht zu einer Erhöhung des Abbaus, zumindest dann nicht, wenn sie

nach der Temperaturerhöhung zugegeben wird.

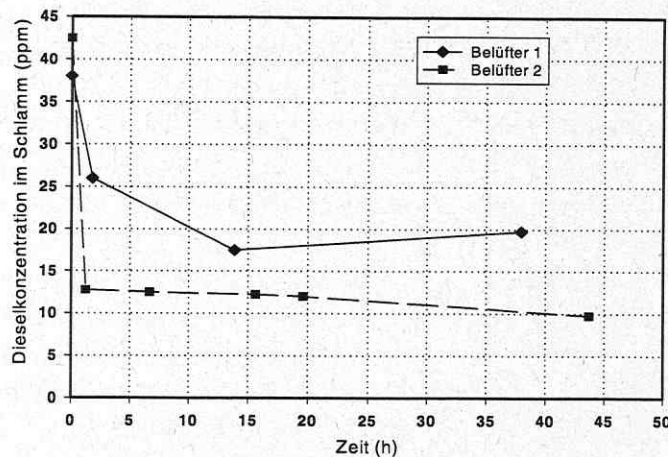


Abb. 6: Effekt der Gelöstkonzentration im Schlamm

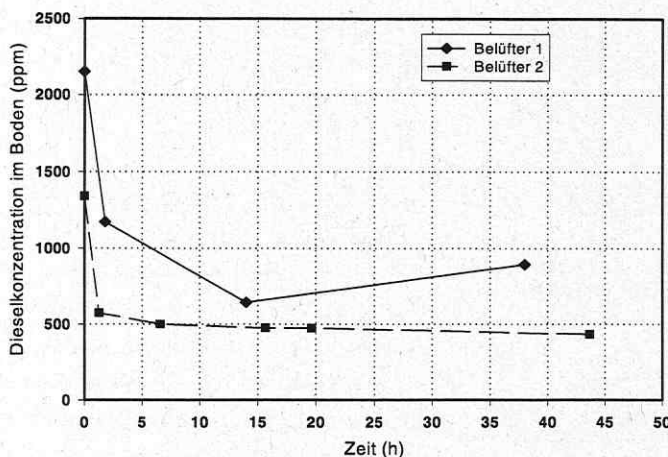


Abb. 7: Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration im Boden

Einfluß der Belüftungsrate: Der Einfluß der Belüftungsrate ist in Abbildung 9 gezeigt. Das Luftvolumen beeinflusst signifikant den Abbauprozess. Bei einem Volumenstrom von 30 Litern pro Minute nimmt die Konzentration des Kontaminanten schnell ab und erreicht einen Abbau in der Größe von 55% innerhalb von 2,5 Stunden und einen Abbaugrad von 70% innerhalb von 16 Stunden. Wenn die Luftversorgung 13 Liter pro Minute beträgt, werden 20% Abbau innerhalb von 1,6 Stunden und 55% innerhalb von 20 Stunden erreicht.

Analyse des Einflusses der Makro- und Mikronährstoffe: Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Der Einfluß jedes Nährstoffs und von Gruppen von Mikronährstoffen wurde einzeln getestet.

Stickstoff: Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Konzentration zwischen 0,97 g/l und 1,33 g/l NH_4^+ betrug. Sowohl Überschuß als auch Mangel senken den erreichten Abbau um 10 bis 15%.

Phosphor: Mit einer Konzentration von 1,36 g/l PO_4^{3-} wurden die besten Ergebnisse erzielt. Höhere Konzentrationen bewirkten eine Verringerung des Abbaus um 15%.

Anorganische Mikronährstoffe: Bei Einsatz zweier verschiedener Mikronährstofflösungen, einer reichen und einer armen und zusätzlich verschiedener Zusammensetzung von Makronährstoffen, wurden keine wesentlichen Unterschiede im Abbau festgestellt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sowohl im Boden (Sand und Humus) als auch im Wasser des Kulturmediums die Mikronährstoffe in ausreichendem Maß vorhanden sind.

Organische Mikronährstoffe: Bei Einsatz von drei verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen als organische Mikronährstoffe wurden mit Medium B keine signifikanten Unterschiede erzielt, während in Medium A beobachtet wurde, daß der Abbau negativ beeinflusst wurde. Für den ersten Fall kann das erklärt werden, da durch den Humus die Komponenten in ausreichendem Maß eingebracht werden, und es nicht nötig ist Hefeextrakt zuzufügen.

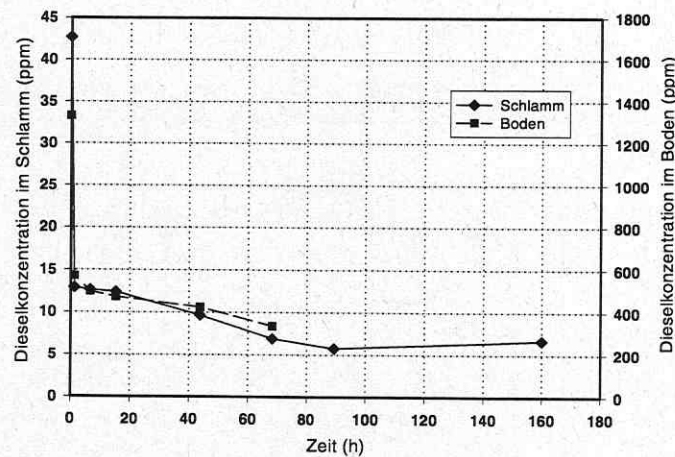


Abb. 8: Effekte der Temperaturerhöhung und der Zugabe von Tensiden

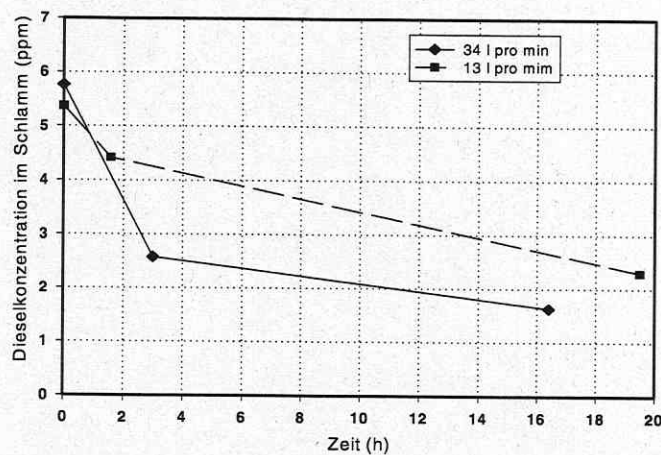


Abb. 9: Einfluß der Belüftungsrate

Wenn der pH-Wert in Medium B sich frei entwickeln konnte, stieg er im Verlauf des Prozesses auf pH 8,6, ohne daß ein negativer Effekt auf den biologischen Abbau festzustellen war. Im Fall von Medium A sank der pH-Wert und der Abbau wurde um 15% gesteigert (vermutlich begünstigt die Absenkung des pH-Wertes die Entwicklung von Hefen).

Die Zusammensetzung des optimierten Mediums ist: 5,00 g/l NaCl, 0,20 g/l MgSO_4 , 1,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1,0 g/l K_2HPO_4 , 3,00 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,00 g/l Hefeextrakt, 2,75 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,50 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,10 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,75 mg/l NaCl und 27,50 mg/l KCl.

Tab. 4: Kombination der Nährstoffe zur Optimierung des Nährmediums und erreichte Endkonzentrationen bei Versuchen in geschüttelten Erlenmeyerkolben

Komponente	Basismedium	Konzentration von Makro- und Mikronährstoffen	Kohlenwasserstoffkonzentration (ppm)	Abbau (%)
Kontrolle	A	Referenzmedium (ohne Abbau)	956	0
	B	Referenzmedium (ohne Abbau)	991	0
Phosphor	A	1,0 g/l KH_2PO_4 1,0 g/l NaH_2PO_4	n.d.	n.d.
	A	5,4 g/l KH_2PO_4 5,6 g/l NaH_2PO_4	198,81	79,2
	B	1,0 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,0 g/l K_2HPO_4	101,23	89,8
	B	5,0 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5,0 g/l K_2HPO_4	234	76
Stickstoff	A	1,0 g/l NH_4Cl	198,81	79,2
	A	5,0 g/l NH_4Cl	137,07	85,6
	B	3,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	101,23	89,8
	B	15,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	274,48	72
Mikronährstoffe anorganisch	A	Mikronährstoffe A	198,81	79,2
	A	Mikronährstoffe B	198,81	79,2
	B	Mikronährstoffe A	139,06	86
	B	Mikronährstoffe B	101,23	89,8
Mikronährstoffe organisch	A	0 g/l Hefeextrakt	95,25	90
	A	0,2 g/l Hefeextrakt	n.d.	n.d.
	A	1,0 g/l Hefeextrakt	198,81	79,2
	B	0 g/l Hefeextrakt	81,31	91,8
	B	0,2 g/l Hefeextrakt	89,28	91
	B	1,0 g/l Hefeextrakt	101,23	89,9
Umweltbedingungen	A	pH konstant (nicht modifiziertes Medium)	198,81	79,2
	A	11,0 g/l KH_2PO_4 , unregelter pH, Endwert 5,75	53,43	94
	B	pH konstant (nicht modifiziertes Medium)	101,23	89,8
	B	2,0 g/l KH_2PO_4 , unregelter pH, Endwert. 8,60	109,19	89

n. d.: nicht bestimmt

4. Schlußfolgerungen

- Es wurde gezeigt, daß die Kombination eines Hydrozyklons mit einem Airliftreaktor zum Abbau von Kohlenwasserstoffen eingesetzt werden kann und innerhalb einer akzeptabel kurzen Zeit zu einem biologisch sanierten Boden führt.
- Der maximal erreichte Abbau des diskontinuierlichen Prozesses betrug 75% bei 30°C, wobei bei Raumtemperatur 15 - 20 ppm erreicht wurden. Bei 40°C wurden 6 ppm erreicht, was einem Abbau von 86% entspricht.
- Es können zwei Phasen in der Desorption des Kontaminanten unterschieden werden: die erste, in der das Dieselöl, das sich auf der Oberfläche der Partikel befindet, schnell desorbiert und durch die Mikroorganismen konsumiert wird. In dieser Phase ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt der biologische Abbau der Kontamination. In der zweiten Phase findet die Desorption des in den Partikeln befindlichen Kohlenwasserstoffes statt. Hier ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Massentransfer innerhalb der Partikel. Beide Phasen sind durch die chemische Zusammensetzung der Rückstände limitiert.
- Eine Verlängerung der Behandlungszeit führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Abbaus innerhalb des diskontinuierlichen Prozesses.
- Die Erhöhung der Temperatur in der Endphase des Prozesses begünstigte den Prozeß.
- Die Zugabe von Tensiden (Tween 80®) führte nicht zu einer Verbesserung, zumindest dann nicht, wenn dies nach der Temperaturerhöhung geschieht.

Literatur

- ANONYMOUS 1972: Methods for the analysis of oil in water and soil. Report No. 9/72. Stichting Concawe, The Hague, Belgium.
- ARENDT, F., ANNOKKEE, G. J., BOSMAN, R., VANDEN BRINK, W. J. (Eds) 1993: Contaminated Soil '93, Fourth International KFK/TNO Conference on Contaminated Soil. Volume I and II. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. 1986: Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Ed. McGraw-Hill.
- BOSMA, T. N. P., MIDDELDORP, P. J. M., SCHRAA, G., ZEHNDER, A. (1997): Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. Environ. Sci. Technol. 31, 248-252.
- CHISTI, M. Y. 1989: Airlift bioreactors, 1st Ed. Elsevier Applied Science, London.
- DEITSCH, J. J., SMITCHE, J. A. (1995): Effect of triton X-100 on the rate of trichloroethene desorption from soil to water. Environ. Sci. Technol. 29, 4, 1069-1080.
- GEERDINK, M. J. 1995: Kinetics of the microbial degradation of oil in soil slurry reactors. Technische Universiteit Delft. The Netherlands.
- NEEBE, T. H., FEIL, A. (1993): The decontamination characteristic of polluted soils for assessment of suitability for treatment of former industrial sites. Rev. Aufbereitungstechnik 34, 27-35.

Das Potential der Pilze für die Bioremediation von Kohlenwasserstoff-Verunreinigungen

W. FRITSCHÉ¹, M. HOFRICHTER¹, U. SACK¹, K. SCHEIBNER¹, D. SCHLOSSER¹,
A. ARAMBARRI², M. CABELLO²

¹Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 12,
07743 Jena, Deutschland

²Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de
La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentinien

Bodenkontaminationen, die bei der Förderung und Verarbeitung von Erdöl entstehen, enthalten ein breites Spektrum von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen. Während aliphatische und monoaromatische Kohlenwasserstoffe unter geeigneten Bedingungen relativ gut mikrobiell abbaubar sind, zeigen die Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) mit ansteigender Zahl von aromatischen Kernen eine zunehmende Persistenz. Diese Persistenz gegen den mikrobiellen Angriff ist einmal auf die stabile chemische Struktur, zum anderen auf die geringe Bioverfügbarkeit zurückzuführen. Die geringe Bioverfügbarkeit ist wiederum durch verschiedene Faktoren bedingt, vor allem die geringe Wasserlöslichkeit und die Sorption an die Bodenmatrix. PAK treten im Erdöl als „minor components“ auf, bei der Verarbeitung durch Pyrolyse-Prozesse nimmt der Anteil zu. Da die mehrkernigen PAK human- und ökotoxikologisch besonders bedenklich sind, wurden die Untersuchungen des Projektes in zunehmendem Maße auf diese Stoffgruppe konzentriert.

Bakterien können PAK bis zu maximal vier aromatischen Kernen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Die Zahl der dazu befähigten Spezies nimmt mit zunehmender Molekülgröße ab. Für den Abbau der vierkernigen Verbindung Pyren wurden bisher nur einige *Mycobacterium*-Stämme beschrieben. Über die Rolle der Pilze für den Abbau mehrkerniger PAK liegen nur wenige Arbeiten vor. Insgesamt sind die Abbauleistungen der Pilze im Vergleich zu den Bakterien weniger untersucht worden. Bei der gemeinsamen Konzipierung des Projektes wurde daher vereinbart, das Potential der Pilze aus den verschiedenen klimatischen Regionen der Partnerländer intensiver auf ihre Fähigkeiten zum Abbau persistenter Kohlenwasserstoffe zu untersuchen. Das Ziel war es, die Möglichkeiten und Grenzen dieser Organismengruppe für die Bioremediation von Mineralölkontaminationen aufzuklären. In einem breit angelegten Screening wurden Vertreter der verschiedenen ökologischen und damit auch taxonomischen Gruppen der Deuteromyceten, Zygomyceten, Ascomyceten und Basidiomyceten bearbeitet. Ausgewählte Ergebnisse wurden bereits publiziert (COLOMBO et al. 1996, SACK et al. 1997a). In den folgenden Ausführungen werden vor allem Ergebnisse mit ligninolytischen Basidiomyceten vorgestellt, die in den Regionen der Kooperationspartner neu isoliert wurden.

Screening auf Basidiomyceten mit hohen ligninolytischen Aktivitäten

Ligninolytische Basidiomyceten zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, extrazelluläre radikalbildende Enzyme zu bilden, die ein hohes Oxidationspotential zum Abbau persistenter biogener und anthropogener Substanzen besitzen. Der Abbau von Fremdstoffen erfolgt unter cometabolischen Bedingungen, d. h. es muß neben dem nicht zum Wachstum nutzbaren Fremdstoff noch ein Wachstumssubstrat, z. B. eine biogene Substanz wie Zucker, zugesetzt werden. Ein direktes Screening auf PAK-Abbau ist daher schwierig. Es wurden aus diesem

Grunde zwei Screening-Methoden auf hohe Abbaupotentialen durch ligninolytische Pilze entwickelt, die Depolymerisation von Kohle-Huminsäuren (HOFRICHTER und FRITSCH 1996, 1997) und die Mineralisierung (CO₂-Freisetzung) von radioaktiv markiertem 2,4,6-Trinitrotoluol (SCHEIBNER et al. 1997). Die in den Publikationen ausgewiesenen Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, daß von etwa 200 getesteten Pilzen nur wenige Vertreter ein hohes Abbaupotential für persistente Strukturen besitzen. Es sind Basidiomyceten, die von abgestorbenem Holz (White Rot Fungi) oder aus der Streuschicht (Litter decaying Fungi) isoliert wurden. Unter den Micromyceten der verschiedenen taxonomischen Gruppen wurden keine Stämme gefunden, die auch nur annähernd vergleichbare Leistungen zeigten. Auf die Untersuchung von Pilzen aus der Streuschicht wurde besonderer Wert gelegt, da sie gut an den Boden als Substrat angepaßt sind. Folgende Arten wiesen in beiden Screening-Verfahren besonders hohe Aktivitäten aus und wurden für weitere Untersuchungen eingesetzt:

Streu abbauende Pilze:

- *Stropharia rugoso-annulata*
- *Agrocybe praecox*

Weißfäulepilze:

- *Kuehneromyces mutabilis*
- *Trametes versicolor*
- *Nematoloma frowardii*
- *Clitocybula dusenii*

Der *Nematoloma*- und der *Clitocybula*-Stamm wurden im Rahmen des gemeinsamen Projektes in Argentinien isoliert. Den argentinischen Mitautorinnen und Herrn M. Rajchenberg (Universität Bariloche) danken wir vielmals für die Identifikation der Pilzisolates. In den folgenden Ausführungen werden diese Stämme besonders berücksichtigt.

Cometabolismus und Mineralisierung von PAK

Vergleichende Untersuchungen mit einer größeren Zahl von Pilzen aus verschiedenen Gruppen ergaben, daß PAK mit drei und mehr kondensierten Ringen sowohl von Micromyceten als auch von Basidiomyceten cometabolisiert werden. Zur Mineralisation sind nur bestimmte Basidiomyceten befähigt. Micromyceten und Basidiomyceten verfügen offensichtlich über intrazelluläre Monooxygenasen, die über instabile Arenoxide die Bildung von zwei Hauptgruppen von Metaboliten bewirken, Trans-dihydrodiolen und Phenole. An der Trans-dihydrodiol-Bildung aus Arenoxiden sind Hydrolasen beteiligt, die Phenolbildung erfolgt spontan. Phenolische Strukturen können durch wenige Pilze methyliert werden. In Abbildung 1 sind die Befunde für den Pyrenmetabolismus zusammengefaßt.

Mit ausgewählten Weißfäulepilzen wurde mittels radioaktiv markierter PAK nachgewiesen, daß sie PAK mineralisieren können. Das Ausmaß und die Rate der Mineralisation hängen in starkem Maße von den Kulturbedingungen ab. Abbildung 2 zeigt, daß unter vergleichbaren Bedingungen die Mineralisierung in Flüssigkultur relativ gering ist, in Strohkultur dagegen sehr hoch. Bei der Strohkultur handelt es sich um Pilzkulturen auf dem Festsubstrat Stroh. Die hohen Abbaupotentialen auf Stroh sind wahrscheinlich auf den engen Kontakt von Pilzmycel, Stroh und PAK sowie auf die hohe Produktion von extrazellulären ligninolytischen Enzymen zurückzuführen.

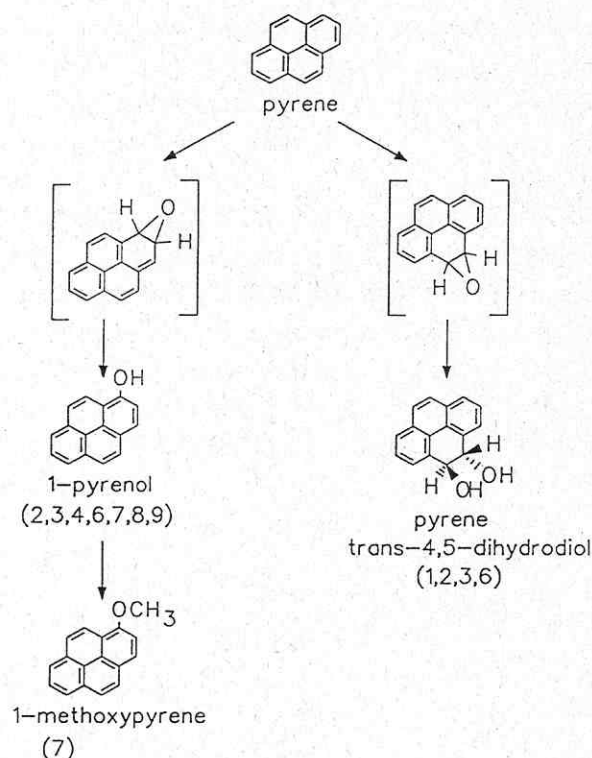


Abb. 1: Cometabolismus von Pyren durch Pilze verschiedener taxonomischer Gruppen. Die Ziffern geben die Pilzspezies an, mit denen die entsprechenden Metabolite nachgewiesen wurden: 1: *Trametes versicolor*, 2: *Kuehneromyces mutabilis*, 3: *Nematoloma frowardii*, 4: *Laetiporus sulphureus*, 5: *Flammulina velutipes*, 6: *Agrocybe aegerita*, 7: *Aspergillus niger*, 8: *Penicillium* sp., 9: *Fusarium* sp.

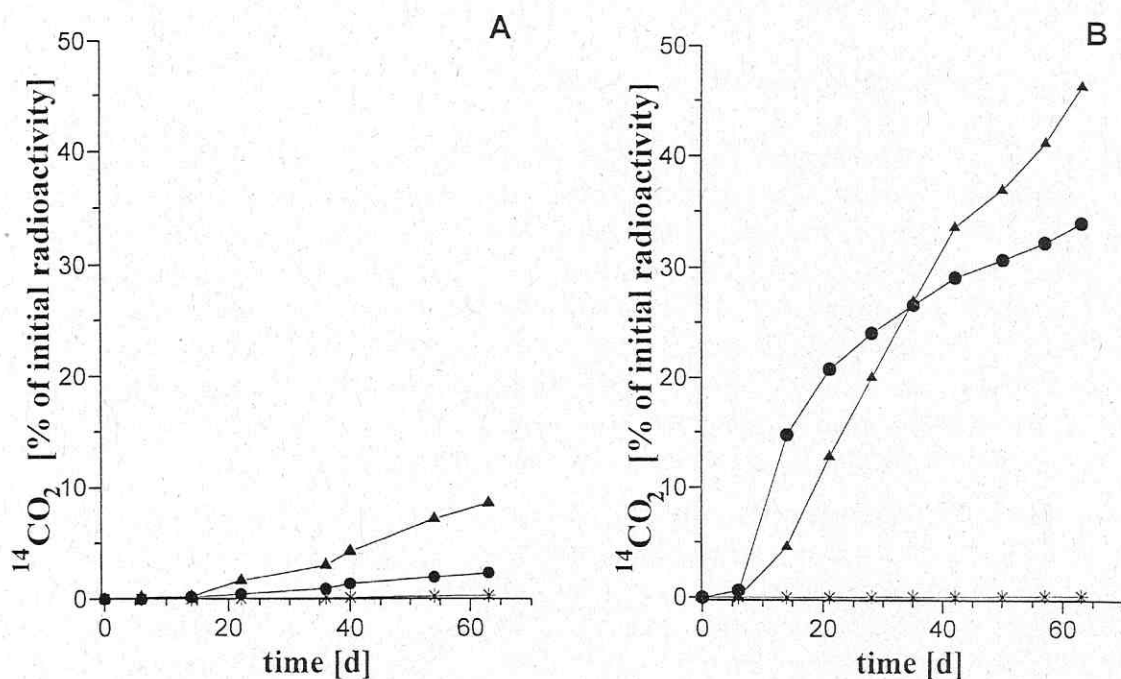


Abb. 2: Mineralisierung von Pyren in Flüssigkultur (A) und auf dem Festsubstrat Stroh (B).
 ● *Trametes versicolor*, ◆ *Nematoloma frowardii*, * Kontrolle
 4,5,9,10 ¹⁴C-Pyren wurde eingesetzt

Rolle der Mangan-Peroxidase für die PAK-Mineralisierung

In Flüssigkulturen von *Trametes versicolor*, *Kuehneromyces mutabilis* und *Nematoloma frowardii* wurden die Aktivitäten der extrazellulären ligninolytischen Enzyme Mangan-Peroxidase, Lignin-Peroxidase und Laccase im Verlaufe der Kultur bestimmt. Bei diesen ligninolytischen Pilzen war die Mangan-Peroxidase das dominierende Enzym. Die Aktivität dieses Enzymes wird bei *Nematoloma frowardii* durch Mangan-II-Ionen stark induziert (Abb. 3), gleichzeitig werden die Aktivitäten der Lignin-Peroxidase und der Laccase reprimiert. Durch dieses Phänomen wurde es möglich, Rohpräparate der Mangan-Peroxidase zu gewinnen und für enzymatische Versuche einzusetzen.

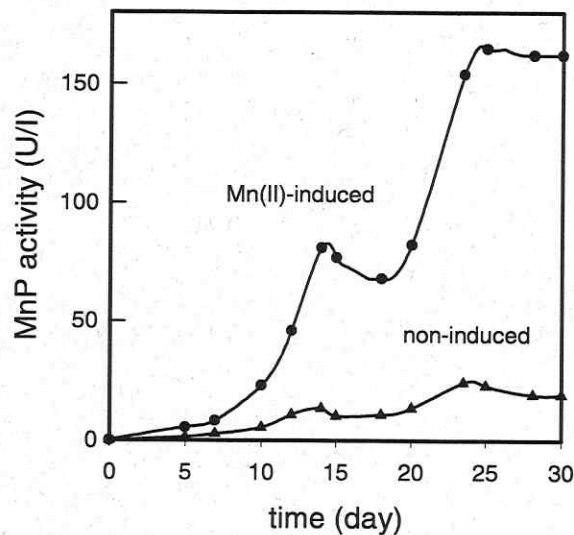


Abb. 3: Aktivität der Mangan-Peroxidase in Mangan-II-induzierten und nicht induzierten Kulturen von *Nematoloma frowardii* (Methodik siehe HOFRICHTER und FRITSCH 1997)

Das Ergebnis des Umsatzes verschiedener PAK durch Mangan-Peroxidase ist in Abbildung 4 dargestellt. Dieses extrazelluläre ligninolytische Enzym katalysiert die Mineralisierung von mehrkernigen PAK. Die Aktivität ist stark vom Zusatz verschiedener Mediatoren abhängig, unter denen dem reduzierten Glutathion als Thiol-Radikale lieferndes Agens besondere Bedeutung zukommt. Erst kürzlich wurde die Funktion der Mangan-Peroxidase als entscheidender Katalysator für die Mineralisierung eines breiten Spektrums von aromatischen und aliphatischen Natur- und Fremdstoffen erkannt (HOFRICHTER et al. 1998). Das Prinzip ist die zuerst von KIRCK und FARRELL (1987) beschriebene Enzymatische „Verbrennung“ (enzymatic combustion). Durch dieses universale Prinzip wird neben dem Abbau persistenter Naturstoffe wie Lignin auch ein breites Spektrum von Fremdstoffen, z. B. Pentachlorphenol und TNT, abgebaut. Im Vergleich zu diesen Verbindungen ist die Mineralisierung der PAK geringer, da ihre Struktur den elektrophilen Angriff durch die Peroxidase-Reaktion erschwert. Abbauraten und Abbaugrad hängen maßgeblich von den Milieubedingungen ab, wie auch der in Abbildung 2 dargestellte Versuch zeigt.

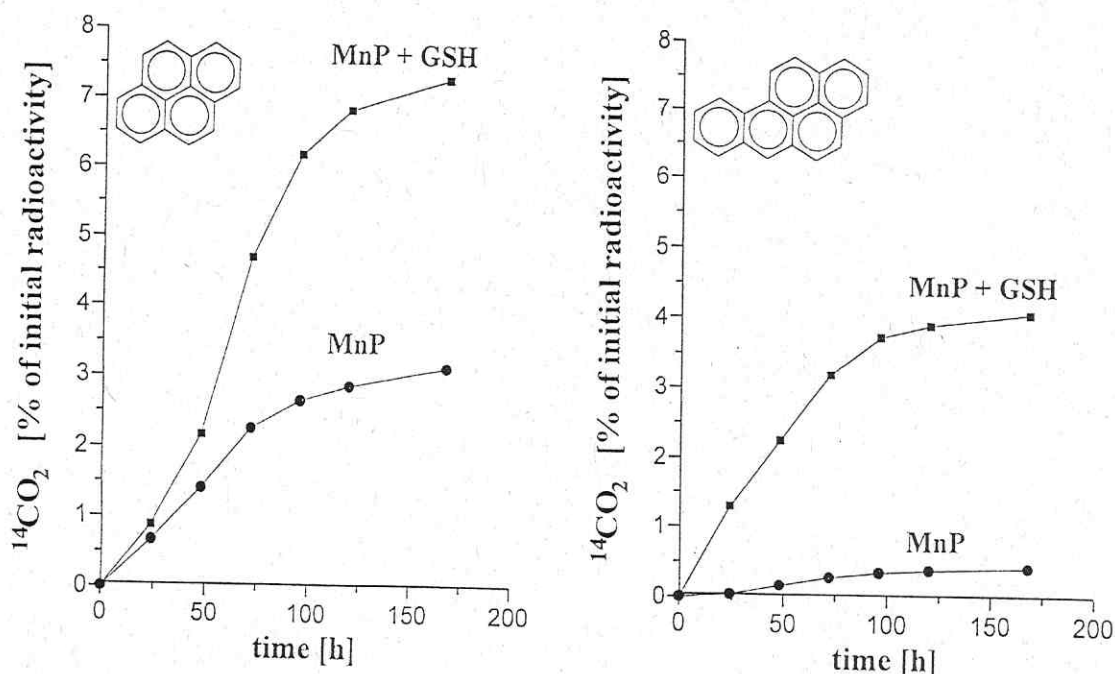


Abb. 4: Mineralisierung von ringmarkiertem ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo(a)pyren durch Mangan-Peroxidase (MnP) in Abhängigkeit vom Glutathion-Zusatz (GSH) (Methodik siehe SACK et al. 1997b)

PAK-Abbau im Boden

Durch die extrazellulären ligninolytischen Enzyme der Basidiomyceten kommt es zu einer Erweiterung des biologischen Abbaupotentials für PAK. In Abbildung 5 sind die z. T. noch hypothetischen Reaktionen und Produkte zusammengefaßt. Zu der intrazellulären Oxidation kommt die extrazelluläre Oxidation durch die Radikale generierenden Peroxidasen. Beide Prozesse interagieren, wie in Abbildung 5 dargestellt ist.

Es ergibt sich die Frage, ob bzw. in welchem Umfang das zusätzliche Abbaupotential der ligninolytischen Basidiomyceten für die Bioremediation von PAK in Böden von Bedeutung ist. Als Beitrag zu diesem Problem wurden orientierende Versuche durchgeführt, bei denen ein mit ^{14}C -Pyren kontaminierter Boden mit dem Pilz *Kuehneromyces mutabilis* beimpft wurde. Der Pilz kann mit bewachsenem Stroh oder Sägespänen (saw dust) in den Boden eingebracht werden. Von besonderem Interesse ist die Wirkung des Pilzes in einem unsterilen Boden, der bereits eine PAK-Abbau-Kapazität durch die autochthone Mikrobenflora besitzt. Abbildung 6 zeigt diese Situation in Säule 4. Die Mineralisierung, gemessen durch die CO_2 -Freisetzung, wird durch die Beimpfung mit dem Pilz (Bioaugmentation) gefördert. Damit steigt gleichzeitig die Gesamtrate der Bioremediation, die sich aus der Summe von Mineralisierung und Bildung gebundener Rückstände ergibt. Die Fraktion der gebundenen Rückstände enthält Metaboliten, die durch kovalente Bindungen fest in die Huminstoffe eingebunden wurden. In diesen Versuchen wurde der Boden künstlich mit Pyren kontaminiert. Die Bedingungen entsprechen daher nicht real kontaminierten Böden in der Umwelt. Diese und weitere Versuche zeigen jedoch, daß bestimmte ligninolytische Pilze das dem Boden eigene Abbaupotential fördern können, wenn sie zusammen mit einem Wachstumssubstrat (Stroh oder Holzpartikel) in den Boden eingebracht werden. Dadurch werden Beimpfung (Bioaugmentation) mit Biostimulation durch das Wachstumssubstrat gekoppelt.

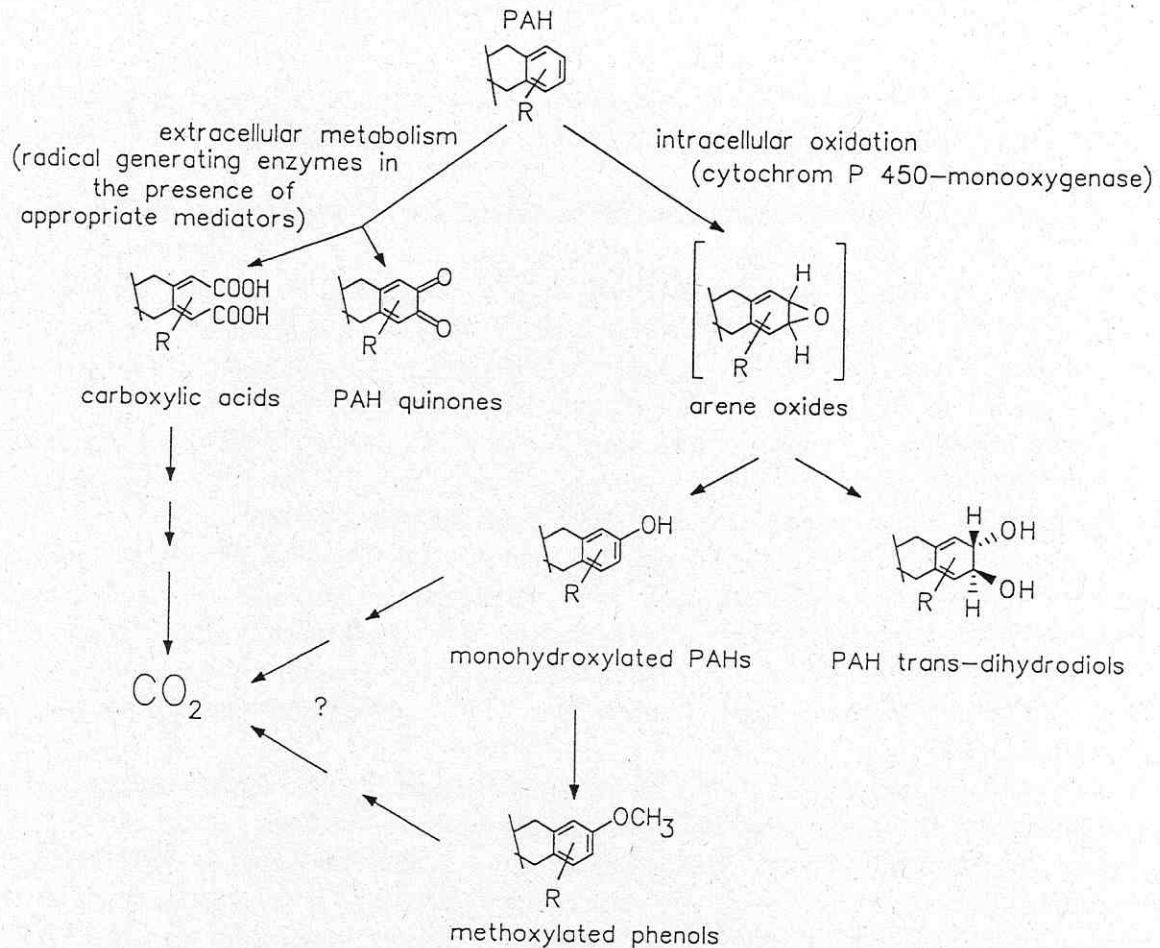


Abb. 5: Abbauwege von PAK durch ligninolytische Basidiomyceten

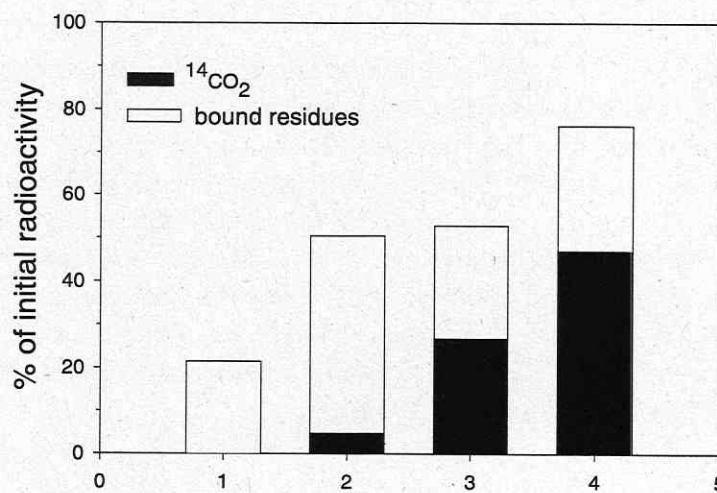


Abb. 6: Förderung der Eliminierung von ^{14}C -Pyren aus Boden durch Zugabe von *Kuehneromyces mutabilis* nach einer Versuchsdauer von 63 Tagen. 1. Steriler Boden (Kontrolle), 2. Zusatz des Pilzes zu sterilem Boden, 3. Unbeimpfter Boden mit autochthoner Mikroflora, 4. Förderung der Aktivitäten der autochthonen Mikroflora durch Zugabe des Pilzes (Methodik siehe SACK und FRITSCH 1997)

Schlußfolgerungen

- Die Untersuchungen zum PAK-Abbau durch Pilze zeigen, daß diese Organismengruppe über spezifische metabolische Potenzen verfügt, die zur Erweiterung des Biodegradationspotentials führen.
- Einige ligninolytische Basidiomyceten (Weißfäulepilze und Streu-abbauende Pilze) verfügen mit den Radikale generierenden extrazellulären Enzymen über Abbauleistungen für Natur- und Fremdstoffe, die bei keiner anderen Organismengruppe vorkommen. Diese Enzyme bewirken eine enzymatische „Verbrennung“ von persistenten Natur- und Fremdstoffen, u. a. auch von PAK. Der Mangan-Peroxidase kommt auf Grund der hohen Aktivität, mit der sie in den Medien nachweisbar ist, eine besondere Rolle zu.
- Das breit angelegte Screening mit Pilzen aus den verschiedenen Regionen Mitteleuropas und Argentiniens hat zum Auffinden von neuen Stämmen geführt, die höhere Abbauleistungen als die bisher in der Literatur beschriebenen Stämme besitzen.
- Die Anwendbarkeit der neu isolierten Stämme für neue Bioremediationsverfahren von Kohlenwasserstoffen aus Böden bedarf weiterer Untersuchungen unter praxisnahen Bedingungen. Da die ligninolytischen Basidiomyceten ihr spezifisches Degradationspotential unter cometabolischen Bedingungen entfalten, ist der Kombination von Bioaugmentation (Beimpfung) und Biostimulation (Wachstumssubstrat-Zugabe) besondere Aufmerksamkeit zu widmen.
- Für die Bioremediation sind zwei Prozesse von Bedeutung, die Mineralisierung und die Humifizierung. Bei der Humifizierung werden die beim PAK-Abbau gebildeten Metabolite (Abb. 4) fest in die Huminstoff-Fraktion eingebaut, so daß sie ihre chemische Individualität verlieren. Daher ist bei dem langfristig eintretenden Humusabbau keine Freisetzung toxikologisch bedenklicher Verbindungen zu erwarten. Der Humifizierungsprozeß der PAK ist den natürlichen Prozessen der Humusbildung aus biogenen aromatischen Verbindungen vergleichbar.

Danksagung

Wir danken Frau Prof. Dr. A. Arambarri und den Mitarbeiterinnen des Botanischen Instituts „C. Spegazzini“ der Universität sehr herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die vielfältigen Unterstützungen bei den Arbeitsaufenthalten in Argentinien. Herrn Prof. Dr. H. Metzner, Präsident der Europäischen Akademie für Umweltfragen, gilt unser besonderer Dank für die Schaffung der Kooperationsbeziehungen. Für die Initiative zur Publikation der gemeinsamen Arbeiten des Deutsch-Argentinischen Forschungsverbundes fühlen wir uns mit Frau Dr. Berthe-Corti, Fachbereich Biologie der Universität Oldenburg, in dankbarer Weise verbunden. Die Arbeiten wurden durch das BMBF im Rahmen der Wissenschaftlich-Technischen Zusammenarbeit (WTZ) Deutschland-Argentinien, Projekt ARG ENV23, sowie durch den Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Literatur

- COLOMBO, J. C., CABELLO, M., ARAMBARRI, A. (1996): Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental Pollution* 94, 355-362.
- HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1996): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank coal depolymerizing activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 220-225.
- HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1997): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal humic acid depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 419-424.
- HOFRICHTER, M., SCHEIBNER, K., SCHNEEGAß, I., FRITSCH, W. (1998): Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 399-404.
- KIRK, T. K., FARRELL (1987): Enzymatic „combustion“: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- SACK, U., FRITSCH, W. (1997): Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 77-83.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., CAZAU, M.C., FRITSCH, W. (1997a): Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2906-2909.
- SACK, U., HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1997b): Degradation of PAHs by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 227-234.
- SCHEIBNER, K., HOFRICHTER, M., HERRE, A., MICHELS, J., FRITSCH, W. (1997): Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 452-457.

Phytoremediation und Landfarming von kohlenwasserstoffkontaminierten Böden

T. GÜNTHER, B. KIRSCH, M. LÄTZ, W. FRITSCH

Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 12,
07743 Jena, Deutschland

1. Einleitung

Phytoremediationsverfahren nutzen pflanzliche Aktivitäten zur Behandlung von kontaminierten Böden, Schlämmen und Abwässern (APRILL und SIMS 1990, ANDERSON et al. 1993, SCHNOOR et al. 1995, HÖPPNER et al. 1997). Durch das Aufbringen geeigneter Vegetation auf kontaminierte Böden kann die biologische Aktivität der autochthonen Organismengemeinschaften und damit der Schadstoffabbau gefördert werden. In der Gesamtheit führen diese Pflanzen-Mikroben-Interaktionen zu einer dauerhaften Stimulierung des biologischen Selbstreinigungspotentials belasteter Habitate. Ähnliche Effekte werden beim „Landfarming“ durch intensive landwirtschaftliche Bearbeitung und Düngung erreicht. Für den Bereich der biologischen Bodensanierung ist die Phytoremediation potentiell für großflächige, oberflächennahe Kontaminationen anwendbar. Bodenreinigungsverfahren unter Einbeziehung von Vegetation werden u.a. vorgeschlagen zur *in situ* Behandlung bzw. zum „Landfarming“ von organischen Kontaminationen. Darüber hinaus wird die Eignung von speziellen, toleranten Pflanzen getestet, die zum Entzug von Schwermetallen aus Böden und Klärschlämmen genutzt werden können (SALT et al. 1995, CUNNINGHAM et al. 1996).

Im vorliegenden Beitrag werden Prinzipien und experimentelle Befunde dargestellt, wie Pflanzen und die assoziierten Mikrobenpopulationen des Wurzelraumes die Eliminierung von Kohlenwasserstoffen, insbesondere polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) aus Böden beeinflussen.

2. Förderung des Schadstoffmetabolismus in der Rhizosphäre

Pflanzen wirken in komplexer Weise auf den Verbleib von organischen Umweltchemikalien im Boden ein. Von primärer Bedeutung sind dabei die synergistischen Interaktionen von Makro- und Mikroorganismus in der Rhizosphäre (Wurzelraum) (Abb. 1). Dieses Habitat zeichnet sich gegenüber dem nicht durchwurzelten Boden durch erhöhte biologische Aktivität und mikrobiologische Diversität aus. Pflanzen beeinflussen den Abbau von organischen Schadstoffen auf direktem und indirektem Wege (Abb. 2). Die pflanzliche Vegetationsdecke trägt primär zur Stabilisierung der mikroklimatischen und bodenbiologischen Faktoren bei. Dadurch und durch Freisetzung von leichtverwertbaren Substraten (Wurzelexsudate), wird das Wachstum und die Aktivität von Mikroorganismen verbessert und damit der mikrobielle Metabolismus von organischen Schadstoffen gefördert. Neben diesem indirekten, Mikrobenvermittelten Einfluß wirken Pflanzen auch direkt auf den Verbleib von Bodenkontaminationen in Form von Aufnahme, Transport, Metabolisierung und irreversibler Festlegung. Die Pflanzenwurzel scheidet außerdem eine Reihe von Enzymen (Peroxidasen, Polyphenoloxidasen) in den Boden aus, die extrazellulär zur oxidativen Umsetzung von aromatischen Kohlenwasserstoffen befähigt sind (GÜNTHER et al. 1998). Die Bedeutung dieses direkten pflanzlichen Einflusses auf Bodenkontaminationen ist weitgehend ungeklärt.

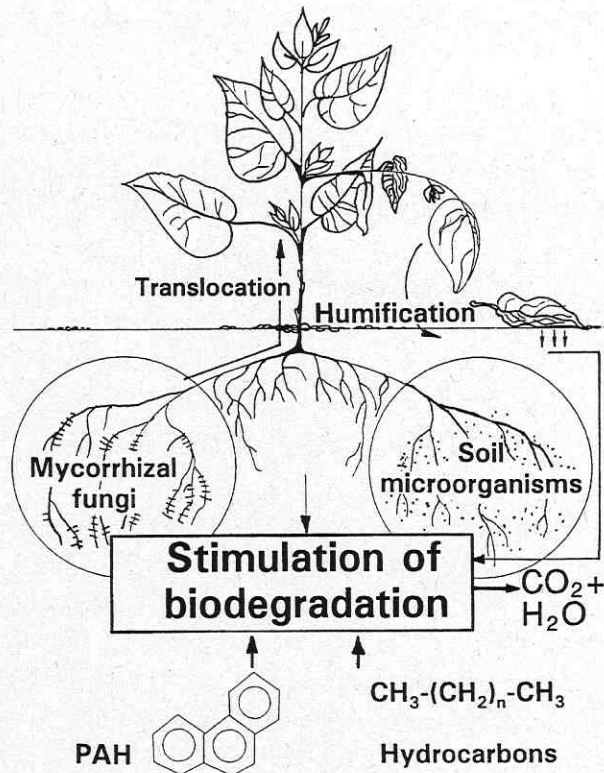


Abb. 1: Spezifische Organismengemeinschaften des pflanzlichen Wurzelraumes, die durch kooperative Leistungen zur Eliminierung von Kohlenwasserstoffen im Boden beitragen

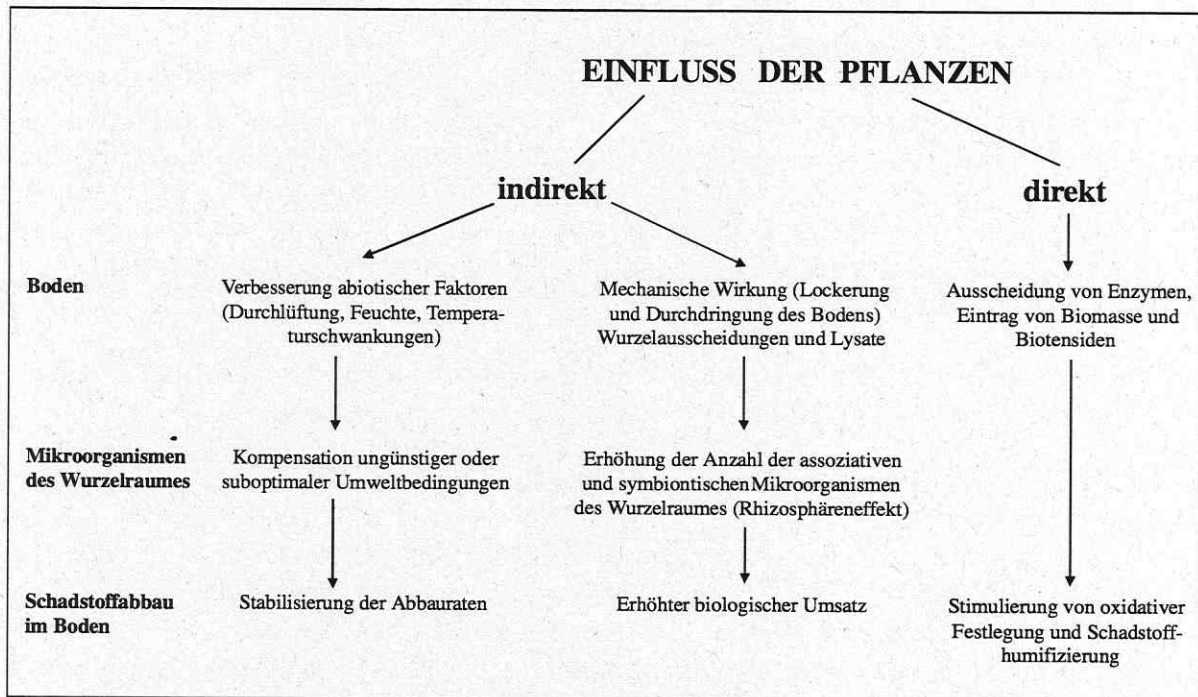


Abb. 2: Der direkte und indirekte Einfluß von Pflanzen auf den Verbleib von organischen Umweltchemikalien im Boden

3. Altlast-Standort Teerwerk Rositz: Möglichkeiten und Grenzen der biologischen Bodensanierung

Das Gelände des ehemaligen Teerverarbeitungswerkes Rositz/Ostthüringen stellt die gravierendste Altlast des Landes Thüringen auf dem Gebiet der Carbochemie dar. Während der mehr als 70-jährigen Produktion an diesem Standort wurden ca. 19 Mio. Tonnen Braunkohlenschwelteer und 10 Mio. Tonnen Erdöl verarbeitet. Ursprünglich von der Kaiserlichen Kriegsmarine im Jahre 1917 zur Sicherung ihres Schmieröl- und Treibstoffbedarfes errichtet, wurde die Produktpalette in späterer Zeit erheblich erweitert. 1990 wurde das Teerwerk aus ökologischen und ökonomischen Gründen stillgelegt. Durch die unsachgemäße Deponie von Produktionsrückständen sowie durch die massiven Bombardierungen im Zweiten Weltkrieg sind große Flächen des Betriebsgeländes hochgradig mit Mineralölkohlenwasserstoffen, PAK und Phenolen kontaminiert.

Ein Charakteristikum der oberflächennahen Bereiche des belasteten Bodens stellen die hohen C_{org} -Werte dar, die zum großen Teil durch Kohlenwasserstoff-Kontaminationen und Teerpartikel verursacht werden (Tab. 1). Die PAK, die im Mittel Konzentrationen von 100 mg/kg erreichen, stellen nur einen kleinen Teil der komplexen Gesamtbelastung dar. Im HPLC-Chromatogramm eines typischen Bodenextraktes ist neben den trennbaren PAK ein stark ausgeprägter nicht auflösbarer „Background“ vorhanden, der wahrscheinlich hauptsächlich durch PAK-Abkömmlinge (alkylierte PAK) repräsentiert wird (Abb. 3). Diese Verbindungen werden häufig in Böden mit Langzeitkontaminationen gefunden (KÄSTNER et al. 1993).

Durch Bestimmung der Korngrößenverteilung und durch Naßoxidation der organischen Matrix mit nachfolgender mikroskopischer Separierung der verbliebenen Bestandteile konnte festgestellt werden, daß in den untersuchten Proben mengenmäßig Teer- und Kohlepartikel stark vertreten sind und ca. 1/5 der Grobkornfraktion bilden (Abb. 4). Der relative PAK-Gehalt der Teer- und Kohlefraktion liegt beträchtlich über dem Niveau der anderen Korngrößenfraktionen. PAK, die an solchen Matrices sorbiert vorliegen, sind in der Regel im Boden nur gering bioverfügbar (WEIBENFELS et al. 1992). Ihre schnelle biologische Eliminierung wird dadurch limitiert. Laboruntersuchungen zum Abbau von höherkondensierten PAK durch Zusatz von Weißfäulepilzen zum kontaminierten Material bestätigten dies (WOLTER 1993). Um eine effektive Eliminierung der Schadstoffe zu erreichen, muß ihre Verfügbarkeit erhöht werden. Dazu können die Aktivitäten des pflanzlichen Wurzelsystems genutzt werden.

4. Langzeituntersuchungen zur Stimulierung des Kohlenwasserstoff-Abbaus im Wurzelraum autochthoner Pflanzen des Teerwerkes Rositz

Große Bereiche des Werksgeländes, u. a. extrem hoch belastete Sedimente und Spülsäume von Rückstandsdeponien, weisen einen Vegetationsbestand auf, der keine augenfälligen Schädigungen oder Wachstumsdepressionen infolge des Schadstoffgehaltes des Bodens aufweist. Zu den bestandsbildenden Vertretern dieser toleranten und angepassten Pflanzen zählen Goldrute (*Solidago canadensis* L.), Rainfarn (*Tanacetum vulgare* L.), Glatthafer (*Arrhenatherum elatius* (L.) Presl), Beifuß (*Artemisia vulgaris* L.) und Nachtkerze (*Oenothera biennis* L.) Solche Spezies sind häufig auf Industriebrachen zu finden (REBELE und DETTMAR 1996).

Um die potentielle Förderung des Kohlenwasserstoff-Abbaus durch die Ruderalvegetation zu untersuchen, wurden Langzeit-Gefäßversuche unter Freiland/Gewächshausbedingungen durchgeführt. Es wurde die Abnahme von PAK und aliphatischen Kohlenwasserstoffen im

Wurzelraum ausgewählter Pflanzen innerhalb zweier Vegetationsperioden untersucht. Be-
pflanzte und unbepflanzte Mitscherlich-Gefäße wurden zweimal gedüngt (NPK) und regel-
mäßig bewässert. Viermal innerhalb von 16 Monaten wurden Bodenproben aus dem Wurzel-
raum der Pflanzen und aus unbepflanzten Kontrollansätzen entnommen und chemisch analy-
siert. Nach Abschluß der Versuche wurde die Pflanzenbiomasse, das Wurzelwachstum und
weiter physikalisch-chemische Daten bestimmt.

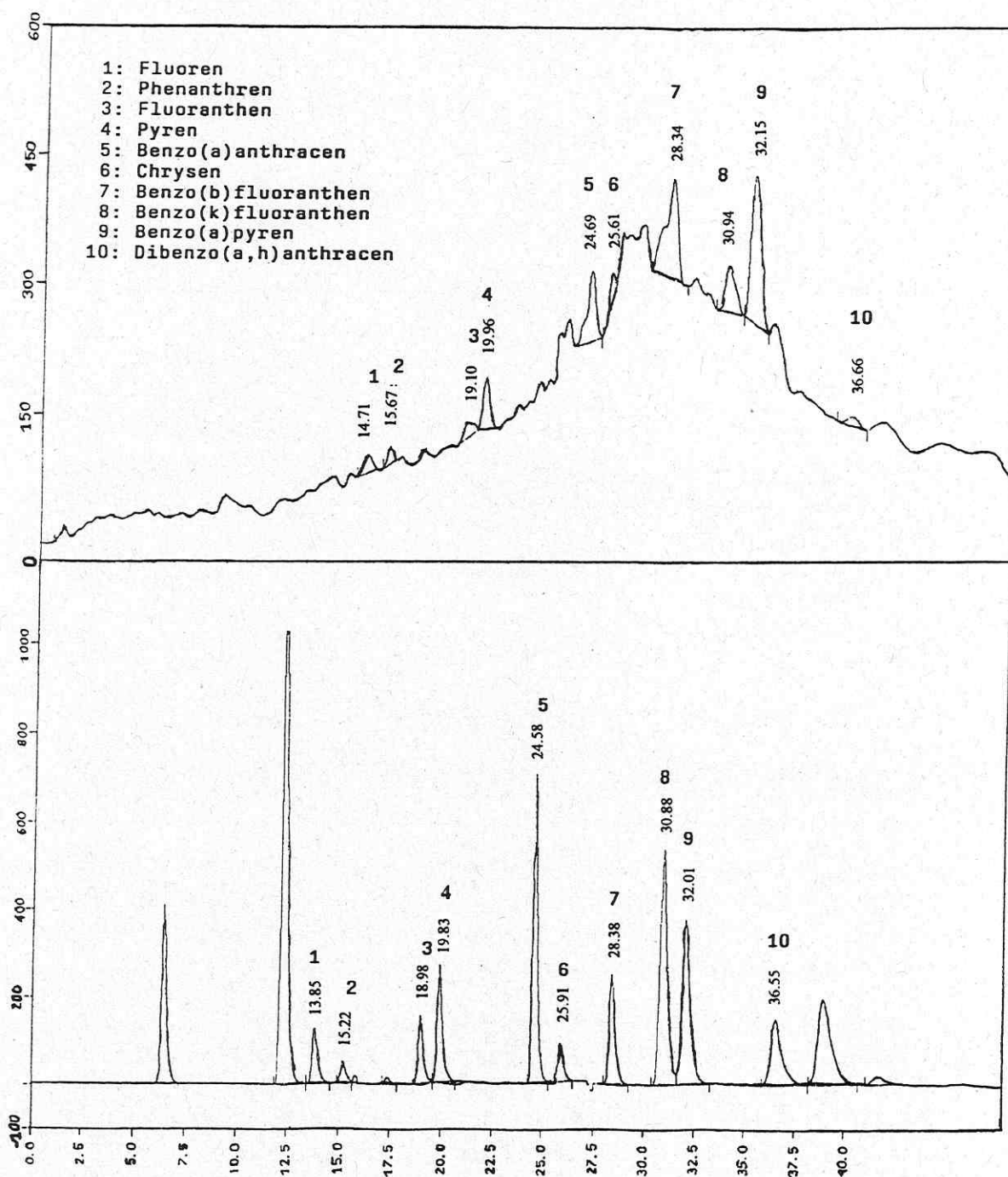


Abb. 3: HPLC-Chromatogramm eines Extraktes des Rositz-Bodens (oben) und des PAK-Standards (unten). Bodenextraktion mit Ethylactat/Ultraschallbehandlung, HPLC-Trennbedingungen: Säule: 150/4 Nucleosil 100-5C 18 PAH, Laufmittel: Methanol/Wasser [70:30, v/v], Fluoreszenzdetektion: Excitation/ Emission- 265/430 nm

Parameter	Wert
TexturSandiger	Lehm
pH (0,01 M CaCl ₂)	7,58
C _{org} (%)	14,10
N _{tot} (%)	0,16
PAK _{Gesamt} (mg/kg)*	103,00
Phenanthren	n.b.
Anthracen	n.b.
Fluoranthren	10,90
Pyren	13,80
Benzo(a)anthracen	8,00
Chrysen	32,00
Benzo(b)fluoranthren	10,60
Benzo(k)fluoranthren	1,90
Benzo(a)pyren	9,90
Dibenzo(a,h)anthracen	15,80

Tab. 1: Ausgewählte Eigenschaften und Konzentration von PAK im verwendeten Boden

* Die PAK-Konzentration der Bodenextrakte wurde nach dem EPA-Standard bestimmt.
n.b.: nicht bestimmt

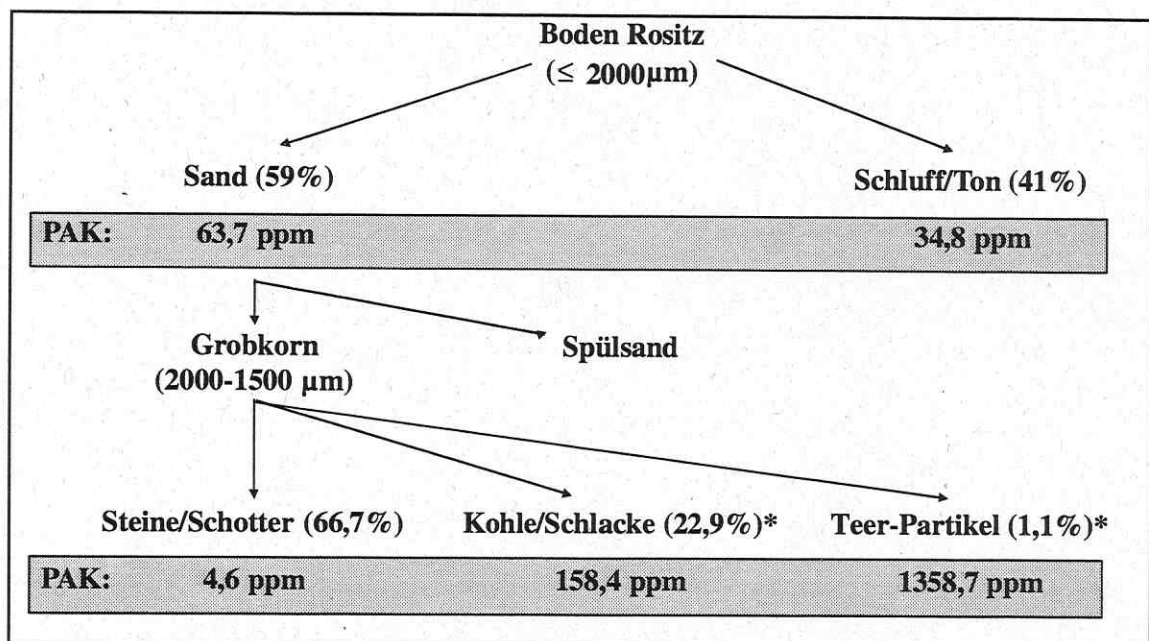


Abb. 4: Korngrößenverteilung des Testbodens und der Siebfraction (1500 - 2000 μm). Die Partikel dieser Siebfraction wurden nach Na₂Oxidation der organischen Matrix des Bodens (Schwefelsäure/H₂O₂) unter dem Stereomikroskop separiert. Die Konzentration der PAK ($\mu\text{g/g}$) ist für die einzelnen Fraktionen dargestellt (schraffiert)

Der Einfluß der Pflanzen auf die Schadstoffeliminierung im Boden war unterschiedlich ausgeprägt. *Solidago canadensis* förderte die Abbauprozesse am intensivsten (Abb. 5 und 6). Während der ersten Vegetationsperiode nahm die PAK-Ausgangskonzentration von 103 mg/kg in allen Ansätzen deutlich ab. Dieser Rückgang ist als „Landfarming“-Effekt zu werten und wird wahrscheinlich durch erhöhte mikrobielle Aktivitäten infolge von Bodenlockerung, Düngung und verbesserten Umweltbedingungen verursacht. Abhängig von der Pflanzenart wurden im Wurzelraum Werte von 46 - 60 mg/kg ermittelt, die in der Mehrzahl unter den PAK-Gehalten der unbepflanzten Kontrolle (64 mg/kg) lagen. In der zweiten Vegetationsperiode war die Schadstoffeliminierung mit Ausnahme der *Solidago*-Versuchsansätze we-

sentlich geringer. Die PAK-Endkonzentration von 24 mg/kg im Wurzelraum von *Solidago canadensis* lag deutlich unter den Werten aller anderen Ansätze (Abb. 5).

Für die untersuchten Pflanzen konnte ausgeschlossen werden, daß eine signifikante Aufnahme von PAK in den Sproß oder die Wurzeln erfolgte. Ebenfalls auszuschließen ist die Evaporation von PAK, da die hauptsächlich vorliegenden Drei- bis Fünfring-Verbindungen nur über einen sehr geringen Dampfdruck verfügen. Nach alkalischem Aufschluß der Humusmatrix (ESCHENBACH et al. 1994) wurden nur geringfügig höhere PAK-Konzentrationen in den Bodenextrakten gefunden. Dieser Befund deutet darauf hin, daß PAK-Festlegungsprozesse in den untersuchten Böden von geringer Bedeutung sind. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß hauptsächlich mikrobielle Metabolisierungs- und Abbauprozesse für den Rückgang der PAK-Belastung verantwortlich sind.

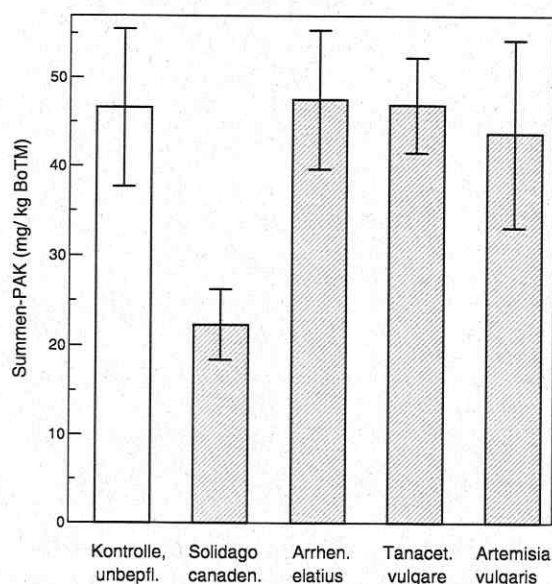


Abb. 5:
Restkonzentration von polycyclischen aro-matischen Kohlenwasserstoffen (Mittel-werte $\pm$ Standardabweichung; n = 3) im Wurzelraum von Pflanzen und in unbe-pflanzten Kontrollansätzen nach 16-mo-natiger Kultivierung im Gefäßversuch mit kontaminiertem Boden des Teerwerkes Rositz

Die Konzentration der aliphatischen Kohlenwasserstoffe (Mineralölrückstände) wurde nach Extraktion und Aufreinigung der Extrakte IR-spektrophotometrisch bestimmt (Abb. 6). Im Vergleich zur unbepflanzten Kontrolle nahm die Konzentration der aliphatischen Kohlenwasserstoffe im Wurzelraum von Pflanzen stärker ab. *Solidago canadensis* bewirkte eine Reduktion auf 41% im Vergleich zur Kontrolle.

Nach 16-monatiger Kultivierung konnte für die Mehrzahl der Pflanzen eine starke Entwicklung von Sproß und Wurzel, die intensive Penetration des Bodens sowie die Veränderung weiterer Bodenkenndaten festgestellt werden (Tab. 2).

5. Schlußfolgerungen

Im Wurzelraum von Pflanzen wie Goldrute (*Solidago canadensis*) ist der Abbau von PAK und aliphatischen Kohlenwasserstoffen in Langzeit-kontaminierten Böden gefördert. Für andere autochthone Pflanzenarten der Altlastflächen trifft dieser Befund nicht zu. Obwohl diese ebenfalls den kontaminierten Boden besiedelten, war die PAK-Abnahme in der Rhizosphäre nicht gesteigert. Es ist deshalb zu vermuten, daß nicht allgemeine, spezie-unabhängige Aktivitäten der Pflanze (z.B. die Stabilisierung der mikroklimatischen Bedingungen) für die Förderung der Kohlenwasserstoff-Eliminierung unter den gegebenen Bedingungen verantwortlich sind, sondern daß spezifischere Effekte der Pflanzen-Mikroben-Interaktion vorliegen sollten.

Die Resultate zeigen, daß bestimmte Pflanzen in der Lage sind stark Kohlenwasserstoff-kontaminierte Böden zu besiedeln und die natürlichen Selbstreinigungsprozesse zu stimulieren. Solche Spezies können als geeignete Vegetationsdecke für die Phytoremediation genutzt werden. Es ist zu erwarten, daß diese Technologie die etablierten „Landfarming-Verfahren“ zur Bodenreinigung sinnvoll ergänzen und erweitern kann.

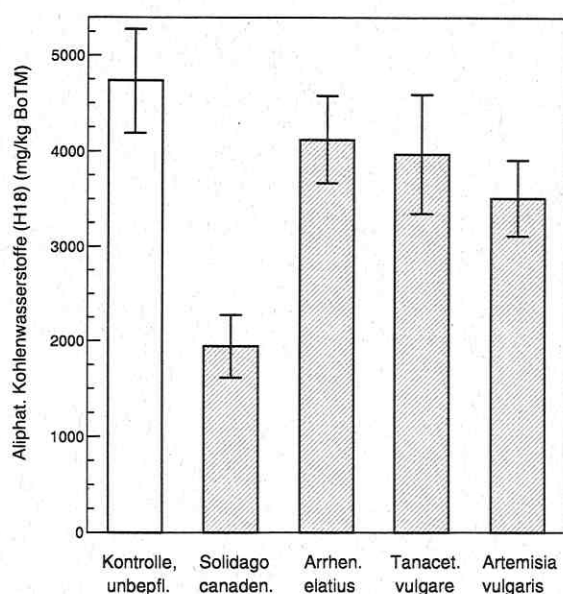


Abb. 6: Restkonzentration aliphatischer Kohlenwasserstoffe (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung; $n = 3$) im Wurzelraum von Pflanzen und in unbepflanzten Kontrollansätzen nach 16-monatiger Kultivierung im Gefäßversuch mit kontaminiertem Boden des Teerwerkes Rositz. (Die Kohlenwasserstoffe wurde nach DEV H18, DIN 38409 bestimmt)

Tab. 2: Boniturindex des Durchwurzelungsgrades und der Bodenveränderung sowie organischer Kohlenstoff (C_{org}) des Testbodens nach 16-monatiger Kultivierung von Pflanzen im Gefäßversuch

Spezies	Wurzelindex ¹⁾	Bodenveränderung ²⁾	$C_{org} (%)$ ³⁾
<i>Solidago canadensis</i>	++++	stark	2,2
<i>Arrhenatherum elatius</i>	++++	stark	2,4
<i>Tanacetum vulgare</i>	++	gering	n.b.
<i>Artemisia vulgaris</i>	+++	stark	1,5

¹⁾ Visuelle Bonitur des Durchwurzelungsgrades des kontaminierten Bodens (B):

„+“ sehr geringes Wurzelwachstum, „++“ Wurzelsystem (WS) entwickelt, B nicht vollständig durchwurzelt, „+++“ kräftiges WS, B überwiegend durchwurzelt, „++++“ kräftiges WS, hoher Feinwurzelanteil, B vollständig durchwurzelt.

²⁾ Bonitur der Bodenveränderungen des Wurzelraumes im Vergleich zur unbepflanzten Kontrolle:

„gering“ keine oder geringfügige Änderung, „mittel“ lockere Bodenstruktur, Farbunterschiede, „stark“ deutlich veränderte Struktur des B, aufgelockert, Farbunterschiede.

³⁾ Abnahme des organischen Kohlenstoffs im durchwurzelten Boden nach 16-monatiger Kultur. In der unbepflanzten Kontrolle nahm der Wert um 1,7% ab (Anfangswert C_{org} : 14,1%)

n.b.: nicht bestimmt

Danksagung

Wir danken Frau Prof. Angelica M. Arambarri, Dr. Marta Cabello und den Mitarbeitern des Institutes für Botanik „C. Spegazzini“, Universität La Plata, Argentinien für die fruchtbare Zusammenarbeit, für viele wertvolle Hinweise und für die anregenden Diskussionen.

Die Arbeiten wurden durch das BMBF im Rahmen der Wissenschaftlich-Technologischen Zusammenarbeit Deutschland-Argentinien (ARG ENV 23) gefördert. Teile der Untersuchungen wurden durch das Thüringer Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kultur finanziert. Wir danken außerdem den Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt/M. für die finanzielle Unterstützung.

Literaturverzeichnis

- ANDERSON, T. A., GUTHRIE, E. A., WALTON, B. T. (1993): Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2630-2636.
- APRILL, W., SIMS, R. C. (1990): Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20, 253-265.
- CUNNINGHAM, S. D., ANDERSON, T. A., SCHWAB, A. P., HSU, F. C. 1996: Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. In: D. L. Sparks (Ed.) *Advances in Agronomy* (Vol. 56), Academic Press, San Diego 55-114.
- ESCHENBACH, A., KÄSTNER, M., BIERL, R., SCHÄFER, G., MAHRO, B. (1994): Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Chemosphere* 28, 683-692.
- GÜNTHER, T., SACK, U., HOFRICHTER, M., LÄTZ, M. (1998): Oxidation of PAH and PAH-derivatives by fungal and plant oxidoreductases. *J. Basic Microbiol.* (im Druck).
- HÖPPNER, H., GÜNTHER, T., FRITSCH, W. (1997): Biologische Prinzipien der Eliminierung von organischen Umweltchemikalien in Pflanzenkläranlagen. *Wasser & Boden* 49 (12), 18-21.
- KÄSTNER, M., MAHRO, B., WIENBERG, R. 1993: Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. In: R. Stegmann (Hrsg.): *Hamburger Berichte*, Band 5, *Economia Verlag*, Bonn.
- REBELE, F., DETTMAR, J. 1996: *Industriebrachen-Ökologie und Management*. Ulmer, Stuttgart.
- SALT, D. E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N., DUSHENKOV, V., ENSLEY, B. D., CHET, I., RASKIN, I. (1995): Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnol.* 13, 468-474.
- SCHNOOR, J. L., LICHT, L. A., MC CUTCHEON, S. C., WOLFE, N. L., CARREIRA, L. H. (1995): Phytoremediation of organic and nutrient contamination. *Environ. Sci. Technol.* 29, A, 318-323.
- WEIBENFELS, W. D., KLEWER, H.-J., LANGHOFF, J. (1992): Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: Influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 689-696.
- WOLTER, M. 1993: Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Weißfäulepilze. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig.

Wachstum auf Pyren durch *Rhodotorula glutinis*, isoliert aus kontaminierten Arealen

M. C. ROMERO, M. C. CAZAU, S. GIORGIERI, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentinien

1. Einleitung

In mit Kohlenwasserstoff kontaminierten Gebieten ist Pyren aufgrund seiner Struktur mit vier Benzolringen und seiner hohen Hydrophobizität einer der persistenten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Pyren, das im Ames-Test mutagen ist, scheint jedoch nicht kanzerogen zu sein (HOLDER et al. 1985, CERNIGLIA 1992). Der mikrobielle Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen trägt in entscheidendem Maße zur Dekontamination von belasteten Sedimenten und oberen Bodenschichten bei (SCHNEIDER et al. 1996, THIBAUT et al. 1996).

Die Mehrzahl der Untersuchungen hat sich an der Isolierung von Organismen und der Bestimmung der Kapazität zur Pyrenmineralisation orientiert. Dabei wurde eine beträchtliche Zahl von Bakterienspezies und Spezies filamentöser Pilze identifiziert (KELLEY et al. 1993, STRINGFELLOW und AITKEN 1995, SWANNELL et al. 1996, SACK et al. 1997, LAMBERT et al. 1994).

Ziel der Arbeit war es, Hefen zu isolieren und das Vermögen der Isolate zur Nutzung von Pyren als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu testen. Damit soll die Kenntnis über PAK-abbauaktive Pilzspezies erweitert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung und Identifizierung

Die Mikroorganismen wurden aus mit Kohlenwasserstoff kontaminierten Sedimentproben des Canal Este, Ensenada-Argentinien, isoliert. In Zehnerschritten angelegte Verdünnungen wurden auf Agarplatten mit Basalmineralmedium ausgebracht (K_2HPO_4 200 mg, KH_2PO_4 50 mg, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,75 mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 25 mg pro Liter A. dest.) und mit einer ethanolischen Pyrenlösung versetzt (0,041 mg Pyren pro Platte). Durch wiederholtes Überimpfen auf Pyren-Agar wurde der dominierende Stamm gereinigt und isoliert. Dieser Hefestamm wurde anhand seiner morphologischen Charakteristik und mittels biochemischer Tests, wie z.B. Wachstum auf Nitrat als alleiniger N-Quelle, als *Rhodotorula glutinis* identifiziert (LODDER 1970, PHAFF et al. 1978). Die Identität wurde mit der API-Yeast-Ident und API 20C (Analytab Products 1992) überprüft.

2.2 Biotransformation

Eine Suspension des isolierten Stammes wurde in 100 ml sterilem MBS mit Zusatz von 40 mg/l Pyren kultiviert. Die Suspension wurde für drei Tage bei $27 \pm 1^\circ C$ gehalten. Von die-

ser Vorkultur wurde ein Aliquot von 2 ml entsprechend $1,5 \cdot 10^3$ Zellen/ml als Inokulum verwendet.

Die Versuche zur Biotransformation von Pyren wurden in 2 l-Erlenmeyerkolben durchgeführt. Diese enthielten 0,5 l steriles MBS-Medium, das mit 40 mg/l Pyren supplementiert war. Die Kulturen wurden bei $27 \pm 1^\circ\text{C}$ bei 140 rpm im Dunkeln inkubiert. Der pH-Wert wurde während des gesamten Versuches konstant auf 6,8 – 7,0 gehalten, wie er in den natürlichen Proben vorlag. Die Experimente wurden im Duplikat durchgeführt. Als Kontrolle wurden ein dritter Erlenmeyer-Kolben mit der genannten Konzentration an Ethanol sowie nicht angeimpfte, abiotische Kolben kultiviert.

In regelmäßigen Abständen wurden Aliquote der Kulturen mit Pyren und der Kontrollen gezogen und die Gesamtzellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die spezifische Wachstumsrate ($\mu = d [\ln x/x_0] / dt$) und die Verdopplungszeit ($t_d = [\ln 2] / \mu$) wurden anhand der linearen Phase der Wachstumskurven der Hefen berechnet. Das Trockengewicht der Mikroorganismen wurde gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden 10 ml pro Aliquot Zellsuspension 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag bei 90°C 24 h lang bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (GÜNTHER et al. 1995).

2.3 Chemische Analysen

Die Proben wurden durch Festphasenmikroextraktion extrahiert (SPME fiber assembly, 100 μm polydimethylsiloxane coating, SUPELCO). Die Probe wurde mit wässriger Lösung behandelt, 20 min bei Zimmertemperatur auf dem Magnetrührer gerührt, Phenanthren wurde als interner Standard verwendet und mit einem response-Faktor von 0,60 gemessen.

Für diese Bestimmungen wurde ein Perkin-Elmer Autosystem Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Als Trägergas wurde Stickstoff eingesetzt (10 psi). Der Detektor hatte eine Temperatur von 300°C . Die Ofentemperatur wurde zwischen 50°C (Anfangszeit 3 min) und 250°C (Endzeit 7 min.) mit einer Rate von $15^\circ\text{C}/\text{min}$ erhöht. Für alle Bestimmungen wurde eine Kapillarsäule verwendet (PVMS/54; 25 m $\cdot$ 0,32 mm ID, (Methyl 5% Phenylsilikon, 1,0 μm Filmdicke).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die mittlere Pyrenkonzentration der belasteten Böden und Sedimente betrug 159,4 ppm (Abb. 1). Die in den Proben dominierende Hefespezies war mit 80% *Rhodotorula glutinis* (HARRISON 1958) (Subdivision Ascomycotina, Klasse Hemiascomycetes, Ordnung Cryptococcales) (Tab. 1).

Das Wachstum von *R. glutinis* auf Pyren und in der Kontrolle verlief bis zum 16. Kulturtag ähnlich. Diese Phase entsprach der metabolischen Adaptation der Hefen an den Kohlenwasserstoff (Abb. 2). Dabei wurden Konzentrationen von $41,5 \cdot 10^5$ N/ml und $39,8 \cdot 10^5$ N/ml erreicht. Nach 20 Tagen betrug die Zellzahl in den Kulturen mit Pyren $458,0 \cdot 10^5$ N/ml. Die maximale Zellzahl wurde am 23. Tag mit $1342,5 \cdot 10^5$ N/ml erreicht und nahm danach wieder ab, am 26. Tag im Ansatz mit Pyren auf $815,0 \cdot 10^5$ N/ml und in der Kontrolle mit Ethanol auf $14,0 \cdot 10^5$ N/ml. Diese Abnahme war durch den vollständigen Verbrauch beider Substrate bedingt.

Die exponentielle Entwicklung, die ab dem 16. Kultivierungstag in der Pyrenkultur beobachtet wurde, korrespondierte nicht mit der zugehörigen Kontrolle, die bis zum Ende der Inkubation einen mittleren Wert von $31,2 \pm 5,9 \cdot 10^5$ N/ml aufwies.

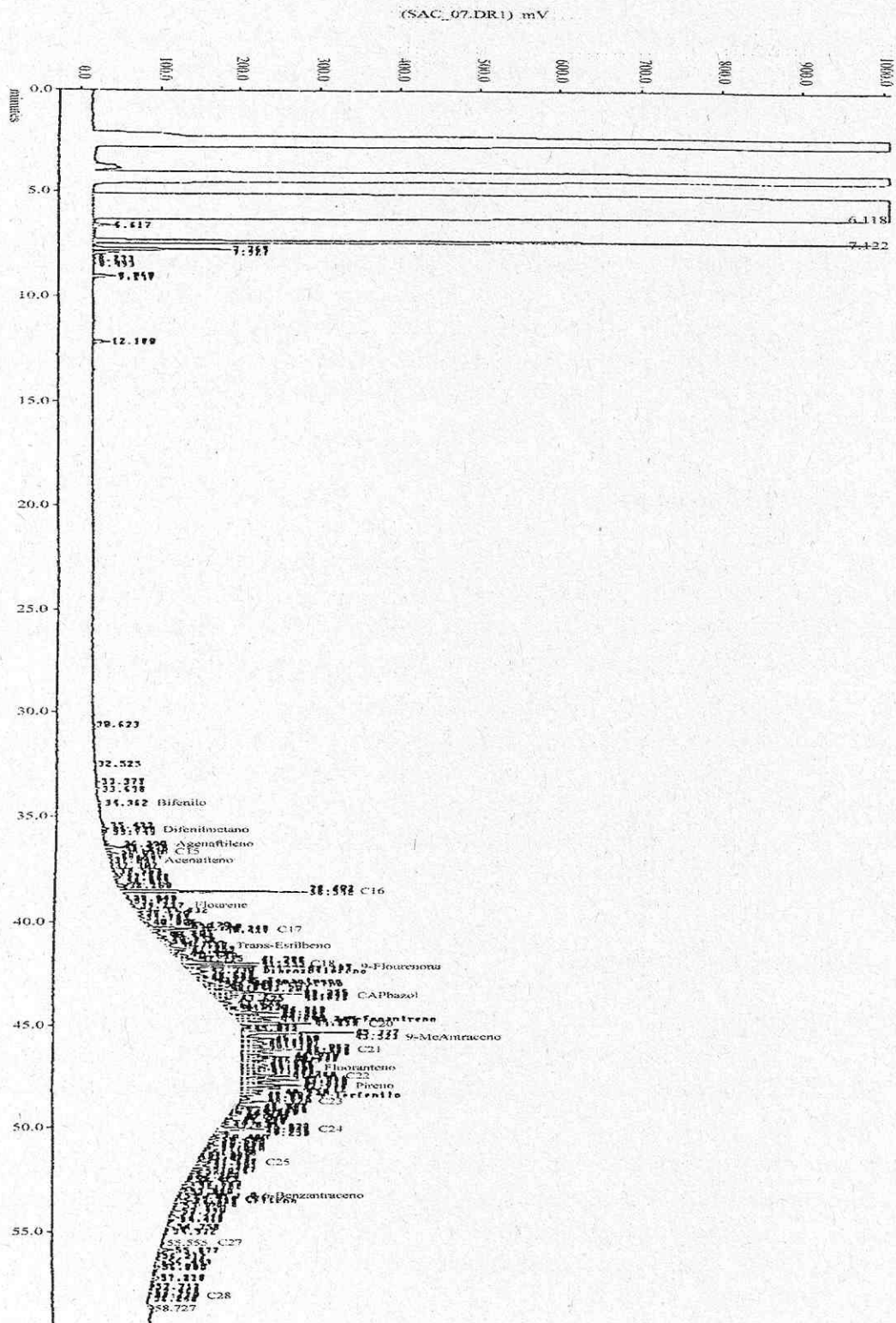


Abb. 1: Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffe der Sedimentproben

In der logarithmischen Phase, die zwischen dem 16. und dem 23. Kulturtag stattfand, war die spezifische Wachstumsrate $\mu = 0,026 \text{ h}^{-1}$ ($\mu = d [\ln \cdot n/n_0] / dt$) und die Verdopplungszeit $t_d = 26,7 \text{ h}$ ($t_d = [\ln 2] / \mu$).

Die niedrigen Werte von μ und die relativ langen Verdopplungszeiten, die erhalten wurden, sind Eigenschaften der Kohlenstoffquelle, die getestet wurde. Andere Autoren haben in mikrobiellen Kulturen mit Pyren als alleiniger C-Quelle Wachstumsraten zwischen $0,056 \text{ h}^{-1}$ (*Mycobacterium* sp.; BOLDRIN et al. 1993) und $0,023 \text{ h}^{-1}$ (*Rhodococcus* sp., WALTER et al. 1991) erhalten. Es muß festgestellt werden, daß diese Wachstumsraten in *in vitro* Kulturen erhalten wurden, in denen die Abbauprozesse nicht durch die Substratverfügbarkeit limitiert waren.

Tab. 1: Morphologische und biochemische Charakteristik von *Rhodotorula glutinis*

<u>Wachstum:</u>	bei 37°C (+); pellicle in broth (-); pseudo-true-hyphae (-); Askosporen (-); Chlamydosp. (-); Keimschlauch (-); Kapseln, ind. Tinte (-); Urease (+); KNO ₃ -Verbrauch (+); Phenoloxidase (-).
<u>Assimilation:</u>	Glucose (+); Glycerin(-); Gly-2-Keto-D-Gluconat (+); L-Arabinose (-); D-Xylose (-); Adonitol (+); Xylitol (±); Stärke (+); Galaktose (-); Inositol (-); Sorbitol (+); Methyl-Glucosid (+); N-Acetyl-D-Glucosamin (-); Cellobiose (+); Lactose (-); L-Rhamnose (-); Maltose (+); Sucrose (+); Trehalose (+); Melezitose (+); Citronensäure (+); Raffinose (±).
<u>Gärung:</u>	Glucose (-); Maltose (-); Sucrose (-); Lactose (-); Galactose (-); Trehalose (-).

Das Wachstum von Mikroorganismen unter natürlichen Bedingungen, unter denen der Abbau von PAK von der Löslichkeit derselben und von den physiko-chemischen Bedingungen abhängt, ist wahrscheinlich geringer als das im Labor erzielte. Die Mehrzahl der Versuche wurde mit bakteriellen Spezies oder mit filamentösen Pilzen durchgeführt.

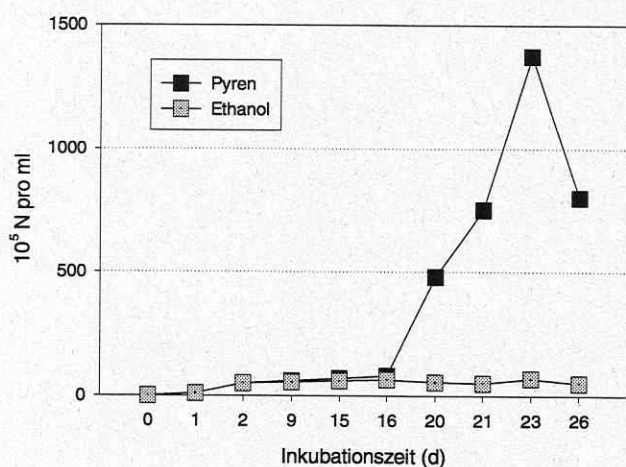


Abb. 2: Wachstumskurve von *Rhodotorula glutinis* mit Pyren (Kontrolle: Ethanol)

Die Anfangskonzentration an Pyren nahm signifikant ab. Am Versuchsende wurden Pyrenrestkonzentrationen von 3,6 – 5,8 mg/l erhalten (Abb. 3). Dies entspricht einer 90%igen Abnahme im Vergleich zur Anfangskonzentration an Kohlenwasserstoff.

Die Anfangsbiomasse von $5,30 \text{ mg} \pm 0,75 \text{ mg/l}$ stieg auf $14,5 \text{ mg} \pm 0,85 \text{ mg/l}$. Daraus ergab sich ein Ertragskoeffizient für Pyren in zellulärer Biomasse von 0,23. Dieser Wert überschätzt den Ertrag leicht, da nicht um den Kohlenstoffanteil, der aus dem Ethanol stammt, korrigiert wurde. Koeffizienten zwischen 0,10 – 0,31 wurden in bakteriellen Spezies mit Kresol als Substrat beobachtet (GÜNTHER et al. 1995).

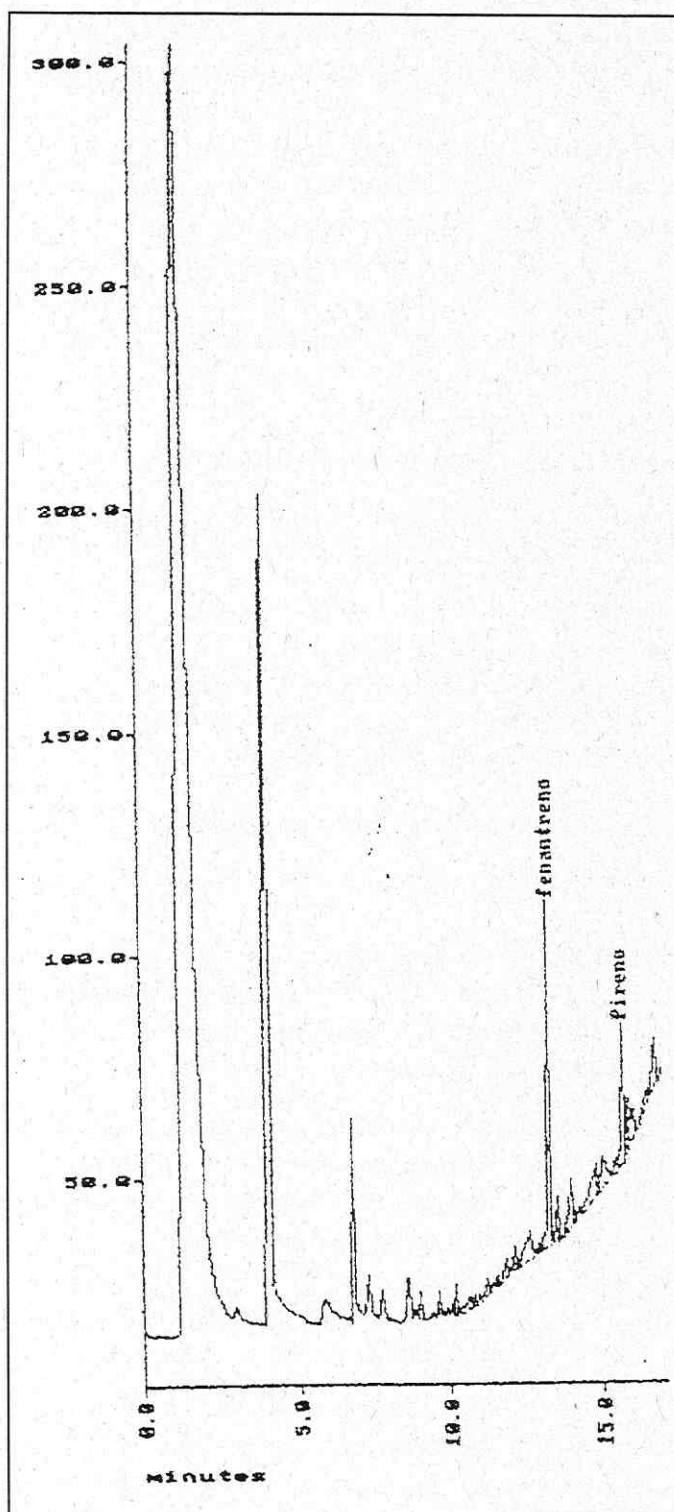


Abb. 3:
Pyren-Restkonzentration in Kulturen
von *Rhodotorula glutinis* mit Pyren als
alleiniger C-Quelle nach 30 Tagen

4. Schlußfolgerungen

Rhodotorula glutinis war in der Lage, nach einer anfänglichen Lag-Phase mit Pyren als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle exponentiell zu wachsen. Die Wachstumsrate ebenso wie der Zellertrag, welche mit dieser Hefe auf Pyren erzielt wurden, sind vergleichbar denen von Bakterienspezies. Der Einsatz dieser Hefe in der Bioremediation von kontaminierten Böden und Sedimenten wird vorgeschlagen.

Danksagung

Unser Dank gilt Bact. M.E. Gatti (Cát. Microbiología, Fac. Cs. Veterinarias, UNLP) für die Identifizierung und die Kulturführung von *R. glutinis*; und Dr. J.A. Arcas (CINDEFI, Fac. Cs. Exactas, UNLP) für technische Hilfe und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten.

Literatur

- Analytab Products 1992: API 20EN analytical profile index, 5th ed. Analytab Products, Marcy-I'Etoile, France. „Anal. Proc. 1992“.
- BOLDRIN, B., TIEHM, A., FRITZSCHE, C. (1993): Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1927-30.
- CERNIGLIA, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351-68.
- GÜNTHER, K., SCHLOSSER, D., FRITSCHE, W. (1995): Phenol and cresol metabolism of *Bacillus pumilus* isolated from contaminated groundwater. J. Basic. Microbiol. 35, 83-92.
- HOLDER, C. L., KORFMACHER, W. A., SLIKKER, D. W., THOMPSON, H. C., CERNIGLIA, C. E. (1985): Mass spectral characterization of doxylamine and its rhesus monkey urinary metabolites. Biomed. Mass Spectrom. 12, 151-58.
- KELLEY, Y., FREEMAN, J. P., EVANS, F. E., CERNIGLIA, C. E. (1993): Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 59, 800-06.
- LAMBERT, M., KREMER, S., STERNER, O., ANKE, H. (1994): Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK 375. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3597-01.
- LODDER, J. 1970: The yeast: a taxonomy study, 2nd ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- PHAFF, H. J., MILLER, M. W., MRAK, E. M. 1978: The life of yeast, 2nd. ed. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., MARTENS, R., ZADRAZIL, F., FRITSCHE, W. (1997): Comparison of phenantrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3919-25.
- SCHNEIDER, J., GROSSER, R., JAYASIMHULU, K., XUE, W., WARSHAWSKY, D. (1996): Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]apyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. Appl. Environ. Microbiol. 62, 13-19.
- STRINGFELLOW, W. T., AITKEN, M. D. (1995): Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61, 357-62.
- SWANNELL, R. P. J., LEE, K., McDONAGH, M. (1996): Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiol. Rev. 60, 342-65.
- THIBAUT, S. L., ANDERSON, M., FRANKENBERGER, Jr., W. T. (1996): Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. Appl. Environ. Microbiol. 62, 283-287.
- WALTER, U., BEYER, M., KLEIN, J., REHM, H. J. (1991): Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 671-76.

Isolation and characterization of yeast hydrocarbon degraders

M. C. ROMERO, E. M. GATTI, M. C. CAZAU, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentina

1. Introduction

In environmental research the transformation of hydrocarbons is better documented for filamentous fungi than for yeasts (SUTHERLAND et al. 1991; CERNIGLIA et al. 1994; SACK et al. 1997). In spite of the frequent occurrence of yeasts and their higher activity in polluted environments, the study of their potential deserves further attention. Moreover, yeasts have become the predominating microorganisms in certain environments, especially those heavily contaminated (BERDICEVSKY et al. 1993, AVERY and TOBIN 1993).

Few studies have evaluated the ability of yeast species to biotransform a variety of aliphatic and aromatic hydrocarbons by cooxidation and in the presence of alternative carbon sources (LINDLEY et al. 1986, OKPOKWASILI and AMANCHUKWU 1988). Therefore, the objective of this assay was to determine the ability of representative isolated yeasts to grow on different aliphatic and aromatic hydrocarbons.

2. Materials and methods

2.1 Sampling sites and chemical analyses

Sediment samples were taken from a stream contaminated with hydrocarbons, near YPF-Petroleum Refinery (La Plata; Argentina). The organic carbon concentration of the sediment was determined using a CHN analyzer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) The hydrocarbon concentrations were analyzed by gas chromatography in triplicate; solid phase microextraction technique was used (SPME fiber assembly, 100 µm polydimethylsiloxanecoating, SUPELCO). The sampling was performed with 4 ml aqueous solution stirring magnetically for 20 min at room temperature, using naphthalene as internal standard, with a response factor of 0.60.

A Perkin-Elmer Autosystem Gas Chromatograph equipped with a flame ionisation detector was used. Nitrogen was used as carrier gas (10 psi). The injection port was glass lined and allows split/splitless injection. The split relation was 1/20 and the temperature 280°C. The detector was maintained at 300°C. The oven temperature was programmed from 50°C (initial time 3 min) to 250°C (final time 7 min) at a rate of 15°C/min. For the injection with the microfiber the splitter was closed for 3 min.

A fused-silica capillary column, liquid phase (methyl 5% phenyl silicone) permaphase PVMS/54 (25 m • 0.32 mm ID, 1.0 µm film thickness) was used for all determinations.

2.2 Yeast isolation

Sediment samples were serially diluted and assayed for the presence of hydrocarbon degrading yeast species by the modified method of KIKOHARA et al. 1982, by triplicate. The strains were

purified by streaking the colonies on agar-plates with mineral basal salts (MBS) amended with the respective hydrocarbon as sole carbon source; then they were incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 30 days, although most of the colonies appear on the 5th day. Moreover, sterile controls of each aliphatic and aromatic hydrocarbon were simultaneously incubated.

To the autoclaved MBS containing (per liter distilled water): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1000 mg, K_2HPO_4 800 mg, KH_2PO_4 200 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, 2% agar; one ml of vitamin solution, sterilized by filtration, was added to the medium. The pH was adjusted to 4.5 and to 7.0. The surfaces of the sterile MBS plates were coated with 125 μl of filtered (0.2 μm pore size) aliphatic and aromatic hydrocarbon ethanolic solutions; then the plates were dried for 40 min at 35°C with UV exposure to volatilize the ethanol. The concentration of *n*-hexadecane ($\text{C}_{16}\text{H}_{34}$), *n*-heptadecane ($\text{C}_{17}\text{H}_{36}$), *n*-octadecane ($\text{C}_{18}\text{H}_{38}$) and *n*-tetracosan ($\text{C}_{24}\text{H}_{50}$) added to each plate was 2.8 mg; and 0.15 mg of phenanthrene ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$), anthracene ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) and pyrene ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}$) was added to the other plates.

2.3 Yeast enumeration

Yeast extract-malt extract (YM) agar (Difco) and MBS amended with the respective aliphatic and aromatic hydrocarbons were the media employed for enumerating the total yeast population and the number of hydrocarbon-consuming yeasts. All the media were adjusted to pH 4.5 and to pH 7.0 with HCl, and amended with streptomycin to a final concentration of 0.03 $\mu\text{g/ml}$. Yeasts were enumerated by standard spread plate methods (APHA, 1992); and plates with more than 25% of their surface area covered with filamentous fungi were not used.

Suspensions of the selected yeasts were prepared in 100 ml of sterile physiological solution and 0.1 ml was utilized as inoculum. The plates were incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and controlled during 30 days. Sterile controls of each hydrocarbon were simultaneously incubated. Data from yeasts biotransforming assays were compared with a sterile control and evaluated by analysis of variance; significant levels were set at $P < 0.05$.

2.4 Identification

Ten yeast species were isolated from the studied sediment on the hydrocarbon-agar, but only five of them were identified. All media and dilutions were performed in triplicate plates by the spray-plate technique. The isolates with slow growth compared with counts performed on YM agar were not selected.

The species were identified by colony appearance, cell morphology and physiological differences, such as carbohydrate assimilation-fermentation tests, and growth on nitrate as sole nitrogen source (LODDER 1970, PHAFF et al. 1978). Identification was confirmed by the use of rapid identification methods API Yeast-Ident and API 20C (Analytab Products, 1992).

3. Results

The sediment properties were pH 6.8; texture: sand 79.9%, lime 9.2%, clay 10.9%; composition: C-organic 4.80%. The hydrocarbon concentrations of the studied sediment were 246.0 ppm hexadecane; 67.8 ppm heptadecane; 150.1 ppm octadecane; 134.8 ppm octadecane; 11.1 ppm phenanthrene; 33.0 ppm anthracene and 159.4 ppm pyrene (Fig. 1).

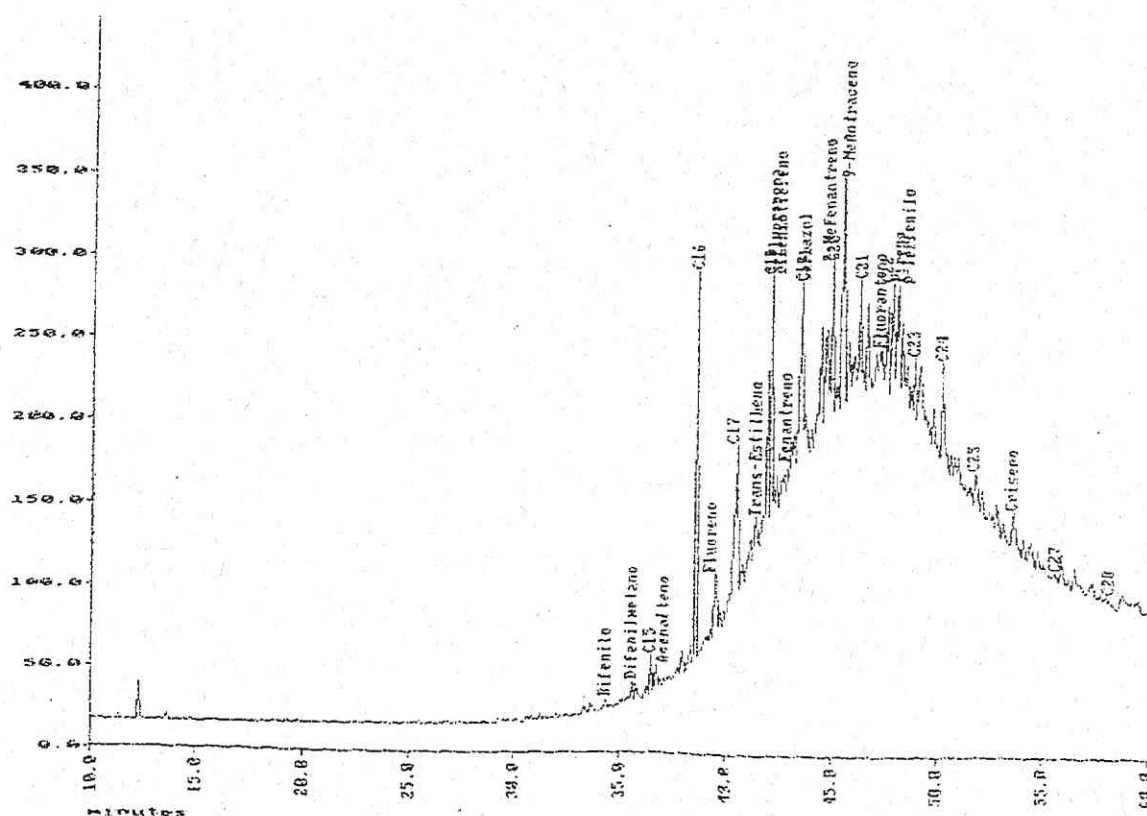


Fig. 1: Chromatogram of the studied sediment

Of ten isolates, five yeasts were identified to the level of species as they represented 72% and 86% of the strains that grow on aliphatic and aromatic hydrocarbon agar, respectively. These percentages were obtained by comparing yeast colony numbers on MY, considered total yeast population, with the ones on hydrocarbon-agar. Isolates with less pronounced growth were not scored as hydrocarbon biotransforming yeasts. The selected strains were identified as *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula minuta*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Cryptococcus albidus* (Tab. 1).

The enumeration of aliphatic and aromatic hydrocarbon degraders is shown as CFU/ml (mean values obtained from three plates and three dilutions), at the final period incubation (Tab. 2). The colonies obtained on the different hydrocarbon agar were statistically significantly different ($P < 0.05$) from the sterile control.

C. albidus and *C. tropicalis* grew on *n*-hexadecane, *n*-heptadecane and *n*-octadecane, but only $1.0 \cdot 10^2$ and $1.5 \cdot 10^3$ CFU/ml were observed on *n*-tetracosan. The other three yeasts *R. rubra*, *R. minuta* and *C. krusei* had almost the same ability to transform *n*-alkanes except *n*-tetracosan, and the colony numbers obtained in ($C_{16}H_{34}$), ($C_{17}H_{36}$), and ($C_{18}H_{38}$) were significantly higher than those obtained with the other yeasts at pH 7.0.

R. minuta and *R. rubra* grew on the aromatic hydrocarbons and similar densities were observed on phenanthrene and anthracene ($0.9 \cdot 10^5 - 1.8 \cdot 10^6$ CFU/ml; $2.0 \cdot 10^6 - 12 \cdot 10^6$ CFU/ml, respectively); significantly lower values were obtained on pyrene as sole carbon source, and a 100-fold decrease was observed for each species.

Tab. 1: Cultural and biochemical characteristics of the isolated yeasts

	<i>R. minuta</i>	<i>R. rubra</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albidus</i>
Growth at 37°C	+	+	+	+	– (rare)
Pellicle in broth	–	–	+	+	–
Pseudo/true hyphae	–	–	+	+	–
Chlamydospores	–	–	–	–	–
Germ tubes	–	–	–	–	–
Capsule	– (variab)	– (variab)	–	–	+
Urease	+	+	–	+	+
KNO ₃ utilization	+	–	–	–	+
Phenol oxidase	–	–	–	– (variab)	–
Ascospores	–	–	–	– (variab)	–
Assimilation of:					
Dextrose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	–	+
Sucrose	+	+	+	–	+
Lactose	–	–	–	–	+
Galactose	+	+	+	–	+
Melibiose	–	–	–	–	+
Cellobiose	+	+	+	–	+
Inositol	–	–	–	–	+
Xylose	+	+	+	–	+
Raffinose	+	+	–	–	+
Trehalose	+	+	+	–	+
Dulcitol	–	–	–	–	+
Fermentation of:					
Dextrose	–	–	+	+	–
Maltose	–	–	+	–	–
Sucrose	–	–	+	+	–
Lactose	–	–	–	–	–
Galactose	–	–	+	–	–
Trehalose	–	–	+	–	–

The numbers of *C. krusei*- and *C. tropicalis*-colonies obtained on aromatic hydrocarbons were lower than the *Rhodotorula* spp ones, being the yeast counts $2.2 \cdot 10^4$ – $1.5 \cdot 10^5$ CFU/ml and $0.7 \cdot 10^4$ – $0.5 \cdot 10^3$ CFU/ml, respectively. *Cryptococcus albidus* had a significantly less growth on phenanthrene and anthracene.

Tab. 2: Growth of the yeast strains on aliphatic and aromatic hydrocarbons (results expressed as CFU/ml, after 30 days of incubation and pH 7.0)

	hexane	heptane	octade	tetraco	phenan	anthra	pyrene
<i>R. rubra</i>	$5.1 \cdot 10^6$	$4.9 \cdot 10^6$	$5.4 \cdot 10^6$	$1.2 \cdot 10^3$	$2.0 \cdot 10^6$	$1.2 \cdot 10^6$	$2.0 \cdot 10^4$
<i>R. minuta</i>	$4.2 \cdot 10^6$	$3.5 \cdot 10^6$	$4.2 \cdot 10^6$	$0.8 \cdot 10^3$	$0.9 \cdot 10^5$	$1.8 \cdot 10^6$	$1.8 \cdot 10^4$
<i>C. tropicalis</i>	$2.5 \cdot 10^5$	$2.8 \cdot 10^4$	$2.2 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^4$	$0.7 \cdot 10^4$	$0.5 \cdot 10^3$	$3.5 \cdot 10^3$
<i>C. krusei</i>	$5.7 \cdot 10^6$	$2.7 \cdot 10^6$	$2.5 \cdot 10^5$	$0.6 \cdot 10^4$	$2.2 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^5$	$1.6 \cdot 10^4$
<i>C. albidus</i>	$5.5 \cdot 10^5$	$3.4 \cdot 10^5$	$3.8 \cdot 10^4$	$1.0 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^2$	$3.1 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^2$

It is noteworthy that the yeast counts on *n*-tetracosan for the five isolated yeasts were similar to the ones obtained for pyrene, although it is an aliphatic hydrocarbon.

The data also indicate that pyrene transformation by the isolated yeasts was slow when compared with phenanthrene and anthracene; yeast densities fall between $2.0 \cdot 10^4$ and $2.5 \cdot 10^2$ CFU/ml for the five species. The enumeration of yeast hydrocarbon degraders on pH 4.5 (data not shown) was similar to the ones observed at pH 7.0, so we can infer that this factor did not affect hydrocarbon biotransformation.

4. Discussion

Candida spp. is the most frequently isolated genera from contaminated sites (HAGLER et al. 1979, FEDORAK et al. 1984, MACGILLIVRAY and SHIARIS 1993). The adaptive oxidizing system for *n*-alkane by different species of *Candida* has been reported by numerous authors, and the system could be induced also by compounds other than hydrocarbons (OKPOKWASILI and AMANCHUKWU 1988, ASCON-CABRERA and LEBEAULT 1993).

In the presence of glucose, different *Candida* spp. oxidized anthracene and pyrene (WISEMAN and WOODS 1979, HOFMANN 1986); the biotransformation of phenanthrene has also been reported (MACGILLIVRAY and SHIARIS 1994). Moreover, *C. tropicalis* was not enumerated as a presumptive pyrene degrader as sole carbon source in this last report, so it is a new species able to take up pyrene.

Environmental surveys have also shown the widespread distribution of the *Rhodotorula* spp. in polluted ecosystems (BERDICEVSKY et al. 1993, HOFRICHTER et al. 1993). The ability of *R. minuta* and *R. rubra* to grow on phenanthrene, anthracene and pyrene, is in coincidence with others reports (CERNIGLIA and CROW 1981, WRIGHT and RATLEDGE 1991), but in our assay this ability was proved without other carbon sources.

Although *Cryptococcus albidus* has generally been mentioned as environmental isolate but with minor importance in contaminated environments (HAGLER and MENDONCA-HAGLER 1981), the isolate's strain was able to grow on hydrocarbons.

Hydrocarbons differ in their susceptibility to microbial attack and have been ranked in order of decreasing susceptibility: *n*-alkanes > low-molecular-weight aromatics > high-molecular-weight aromatics (LEAHY and COLWELL 1990). This pattern was not observed in our experiments, as greater degradation of aromatics than *n*-tetracosan was obtained. As the

hydrocarbon concentrations used were high, we could infer negative plates as inability to degrade the compound or as inhibition response to the concentration assayed.

In conclusion, the assayed yeast strains were able to utilize aromatic hydrocarbons containing three or four rings as sole carbon source. Besides all the strains were able to grow on any hydrocarbons, there were clear differences between the yeast species with respect to the kind of compound utilized and the growth densities.

Although all the species were environmental isolates from polluted sites, *R. minuta* and *R. rubra* had a high response to biotransform either aliphatic or high-aromatic-hydrocarbon. *C. krusei* and *C. tropicalis* were moderate hydrocarbon degraders according to our assay; moreover, *C. albidus* was able to grow on significant amounts of aliphatic hydrocarbons.

References

- Analytab Products. (1992): API 20EN analytical profile index, 5th ed. Analytab Products, Marcy-I'Etoile, France. "Anal. Proc.1992".
- APHA (1992): Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 th. ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- AVERY, S. V., TOBIN, J. M. (1993): Mechanisms of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3960-3966.
- BERDICEVSKY, I., DUEK, L., MERZBACH, D., YANNAI, S. (1993): Susceptibility of different yeast species to environmental toxic metals. Environ. Pollut. 80, 41-44.
- CERNIGLIA, C. E., CROW, S. A. (1981): Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeast. Arch. Microbiol. 129, 9-13.
- CERNIGLIA, C. E., GIBSON, D. T., DODGE, R. H. (1994): Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3931-3938.
- FEDORAK, P. M., SEMPLE, K. M., WESTLAKE, D. W. S. (1984): Oil-degrading capabilities of yeast and fungi isolated from coastal marine environments. Can. J. Microbiol. 30, 565-571.
- HAGLER, A. N., SANTOS, S. S., MENDONÇA-HAGLER, L. C. (1979): Yeast of a polluted Brazilian estuary. Rev. Microbiol. 10, 36-41.
- HAGLER, A. N., MENDONÇA-HAGLER, L. C. (1981): Yeast from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Appl. Environ. Microbiol. 41, 173-178.
- HOFMANN, K. H. (1986): Oxidation of naphthalene by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. J. Basic Microbiol. 26, 109-111.
- HOFRICHTER, M., GÜNTHER, T., FRITSCH, W. (1993): Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. Biodegradation 3, 415-421.
- KIYOHARA, H., NAGAO, K., YANA, K. (1982): Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43, 454-457.

- LEAHY, J. G., COLWELL, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.
- LINDLEY, N. D., PEDLEY, J. F., KAY, S. P., HEYDEMAN, M. T. (1986): The metabolism of yeasts and filamentous fungi which degrade hydrocarbons fuels. *Int. Biodeterior.* 22, 281-287.
- LODDER, J. 1970: *The yeast: a taxonomy study*, 2nd ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- MACGILLIVRAY, A. R., SHIARIS, M. P. (1993): Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeast isolated from coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1613-1618.
- MACGILLIVRAY, A. R., SHIARIS, M. P. (1994): Relative role of eukaryotic and prokaryotic microorganisms in phenanthrene transformation in coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1154-1159.
- OKPOKWASIL, G. C., AMANCHUKWU, S. C. (1988): Petroleum hydrocarbon degrading by *Candida* species. *Environ. Int.* 14, 243-247.
- PHAFF, H. J., MILLER, M. W., MRAK, E. M. 1978: *The life of yeast*, 2nd. ed. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., MARTENS, R., ZADRAZIL, F., Fritsche, W. (1997). Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3919-3925.
- SUTHERLAND, J. B., SELBY, A., FREEMAN, J., EVANS, F., CERNIGLIA, C. (1991): Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1154-1159.
- WISEMAN, A., WOODS, L. (1979): Beanzo[a]pyrene metabolites formed by the action of yeast cytochrome P4550/P448. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 29, 320-324.
- WRIGHT, J. D., RADTLEDGE, C. (1991): Isolation of *Rhodotorula rubra* strains showing differences in degradation of aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 94-99.

Die Aktivität extrazellulärer ligninolytischer Oxidasen und Peroxidasen Aktivität von Micromyceten, isoliert aus unterschiedlichen Regionen der Republik Argentinien

M. C. N. SAPARRAT, A. M. M. BUCSINSKY, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de
La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentinien

1. Einleitung

Mehrere Oxidasen und Phenoloxidasen sind am Prozeß der Modifikation und des Abbaus von Lignin beteiligt: Ligninperoxidase (LiP), Manganperoxidase (MnP), Mn unabhängige Peroxidasen (MiP), Laccase und Aryl-Alkoholoxidase (AAO) (ODIER und ROUAU 1985, HEINZKILL und MESSNER 1997). Diese ligninolytischen Enzyme besitzen eine geringe Substratspezifität (GUILLEN 1991, HOFRICHTER und FRITSCHKE 1996), eine Eigenschaft aufgrund derer sie nicht nur Lignin, sondern auch andere Verbindungen mit ähnlicher Struktur, wie z.B. Huminsäuren, DDT und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) abbauen (KIRK 1983, BUMPUS und AUST 1987). Die Mechanismen und Funktionen des ligninolytischen Enzymsystems sind bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Über ligninolytische Enzyme von Pilzen, die aus zersetztem organischem Material von Boden und Uferzonen isoliert werden, gibt es nur wenig Information. Dies führte uns dazu diese Enzymsysteme zu untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Kenntnisse zur Bildung von Oxidasen und/oder Peroxidasen durch Mikromyceten, die aus zersetztem organischem Material isoliert wurden, zu erlangen. Für die Untersuchung wurden 12 Pilzstämme aus verschiedenen taxonomischen Gruppen – Ascomyceten und Deuteromyceten – mit der Fähigkeit zur Bildung von extrazellulären ligninolytischen Enzymen ausgewählt. Ihre Fähigkeit zur Produktion von Oxidasen und/oder Peroxidasen wurde qualitativ bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Pilzstämme

Es wurden verschiedene Mikromyceten verwendet, die zur Untergruppe *Ascomycotina* oder zur Formgruppe *Deuteromycotina* gehören. Die Pilze stammen aus der Stammsammlung des Instituto Spegazzini (CLPS). Diese Stämme wurden aus zerfallendem organischen Material isoliert, das aus Böden und Uferzonen verschiedener Gewässer Argentiniens stammt.

Untergruppe *Ascomyceten*: *Emericella nidulans* (Eidam) Vuillemin (CLPS Kult Nr. 29); *Sordaria fimicola* (Roberge) Cesati et de Notaris (CLPS Kult Nr. 30); und *Talaromyces helicus* (Raper und Fenell) C.R. Benjamin (CLPS Kult Nr. 553).

Formgruppe *Deuteromycotina*: *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler (CLPS Kult Nr. 267); *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud (CLPS Kult Nr. 2); *Epicoccum purpurans* Ehrenb. ex Schlecht. (CLPS Kult Nr. 23); *Fusarium solani* (MARTIUS) Saccardo (CLPS Kult Nr. 555); *Graphium putredinis* (Corda) Hughes (CLPS Kult Nr. 423);

Phaeoisaria clematidis (Fuckel) Hughes (CLPS Kult Nr. 154); *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. und Hochapfel (CLPS Kult Nr. 469); *Scopulariopsis brumptii* Salvanet-Duval (CLPS Kult Nr. 135); *Trichoderma saturnisporum* Hammil (CLPS Kult Nr. 264).

Die Stämme wurden als Strichkulturen bei 4°C auf Malzagar und auf Mineralöl gehalten.

2.2 Substrat

Die Identifizierung der pilzlichen extrazellulären Oxidasen und Peroxidasen wurde auf Czapek-Dox-Medium, modifiziert mit ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diaminsalz (Sigma) durchgeführt. ABTS ist ein sehr empfindliches Substrat, das anhand einer Farbreaktion die schnelle Selektion von Pilzen erlaubt, die ligninolytische Enzyme produzieren (HIGHLEY 1987, BOURBONNAIS und PAICE 1990). Die Anwendung dieses Tests erlaubt nicht nur den Nachweis von Phenoloxidasen – wie der Laccase –, sondern auch von Peroxidasen des Typs Mn-P (HOFRICHTER und FRITSCH 1996). Die Aktivität der Oxidasen wurde mit der Aktivität der Peroxidase korreliert.

2.3 Animpfen und Kulturbedingungen

Getestet wurde in Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm, die 20 ml modifizierten Czapek-Dox-Agar folgender Zusammensetzung enthielten: 10 g Glucose, 1 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄ • H₂O, 0,5 g KCl, 0,2 g Hefeextrakt, 0,2 g ABTS, 20 g Agar-Agar pro Liter (der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren auf pH 6,0 – 7,0 eingestellt, danach wurde bei 1 atm für 20 min autoklaviert). Es wurden Stanzstücke von aktivem Mycel (5 mm Durchmesser) angeimpft, das zuvor in Platten mit 2% Malzagar kultiviert wurde. Von jedem Stamm wurden drei Parallelen unter kontrollierten Bedingungen (Inkubator 25°C) gezogen.

2.4 Interpretation

Die Bonitierung der Ergebnisse erfolgte über 6 Wochen. In diesem Zeitraum wurden alle 7 Tage das Pilzwachstum und die Farbe der Höfe um die Kolonien kontrolliert.

Bonitur-Index zur Bildung von extrazellulären Phenoloxidasen und Peroxidasen:

1. Positive Reaktion (++): Intensiv grüner Hof in definierten Zonen.
2. Schwach positive Reaktion (+): Schwach grüner Hof.
3. Negative Reaktion – ohne Oxidasen-Peroxidasenaktivität – (-): Grüner Hof fehlt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Färbung des modifizierten Czapek-Dox-Mediums (Oxidation von ABTS) und Pilzwachstum:

Es wurde von jedem Stamm das ligninolytische Potential ermittelt. Tabelle 1 zeigt den Grad der Reaktion bezüglich der Enzymproduktion der einzelnen Stämme. Zusätzlich sind die entsprechenden Autoren aufgeführt. Der Test zeigte für folgende Stämme eine potentielle ligninolytische Aktivität (positive Reaktion für Oxidasen und/oder Peroxidasen): *Graphium putredinis*, *Phaeoisaria clematidis*, *Phoma glomerata*, *Sordaria fimicola* (diese drei Spezies werden hier zum ersten Mal als Produzenten ligninolytischer Enzyme genannt) und *Tala-*

romyces helicum. Die Produktion von extrazellulären Oxidasen und/oder Peroxidasen war nur bei 40% der eingesetzten Micromyceten nachweisbar. Hier wurde die Reaktion wie folgt beobachtet:

1. Positive Reaktion (++):

Graphium putredinis
Phaeoisaria clematidis
Talaromyces helicus

Graphium putredinis und *Talaromyces helicus* produzierten nachweisbare Mengen an extrazellulären ligninolytischen Enzymen (SAPARRAT et al. 1996). Für diese Species ist der Abbau von gesättigten Kohlenwasserstoffen, Aromaten, Harzen und Asphaltenen beschrieben (OUDOT 1993).

2. Schwach positive Reaktion (+):

Phoma glomerata
Sordaria fimicola

3. Keine Oxidase/Peroxidasen-Aktivität (-):

Alternaria alternata
Aureobasidium pullulans
Emericella nidulans
Epicoccum purpurascens
Fusarium solani
Scopulariopsis brumptii
Trichoderma saturnisporum

Reinkulturen von *Alternaria alternata* sind in der Lage, Aliphaten wie Kerosin abzubauen (RUBDIGE 1974). In Mischkulturen metabolisiert *A. alternata* die aromatische Fraktion von petrochemischen Rückständen. Für *Alternaria* ist die Nutzung von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle beschrieben (CAZAU et al. 1992). Unter den verwendeten Kulturbedingungen konnte für *Alternaria* keine Peroxidase (MnP) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu haben HOFRICHTER und FRITSCHKE (1996) die Bildung von MnP durch Stämme dieser Gattung bei Wachstum auf Huminsäuren berichtet.

Obwohl unter den genannten Bedingungen in *Aureobasidium pullulans* keine Oxidase/Peroxidase-Aktivität nachweisbar war, wurde in früheren Experimenten die Produktion von extrazellulärer Laccase nachgewiesen. Deren Bildung wird in hohem Maß durch die Art der dem Medium zugefügten Kohlenstoffquelle beeinflusst. Das Wachstum dieses hefeartigen Pilzes in einem Medium mit Lactose führt zu einer höheren Produktion an Phenoloxidasen im Vergleich zum Wachstum auf Monosacchariden (z.B. Glucose, Maltose) (DESPHANDE et al. 1992). Der reprimierende Effekt der Glucose – dem hier verwendeten Wachstumssubstrat – auf die Expression und Produktion des Enzyms Laccase (EGGERT et al. 1995) könnte die fehlende Produktion der ligninolytischen Enzyme in diesem Pilzstamm bestimmt haben.

Während bei *Talaromyces helicum* sich die Färbung des Czapek-Dox-Mediums bis zur zweiten Woche intensivierte (++) , war bei allen anderen Pilzen nur in der ersten Woche enzymatische Aktivität nachweisbar. Weiterhin zeigten sich im Verlauf der sechs Wochen violette Farbtöne im Medium verschiedener Pilze (außer in *Epicoccum purpurascens*, *Graphium putredinis* und *Trichoderma saturnisporum*). Diese Resultate deuten auf die Anwesenheit von unspezifischen Enzymen, die ABTS und/oder seine Oxidationsprodukte zu unterschiedlichen nicht identifizierten gefärbten Substanzen umsetzen.

Das Mycelwachstum aller getesteten Stämme auf modifiziertem Czapek-Dox-Medium zeigte keine Unterschiede zum Wachstum auf Malzextrakt-Agar (M.E.).

Tab. 1: Ergebnisse des ABTS-Testes mit verschiedenen Micromyceten-Spezies und Referenzen zur Produktion extrazellulärer ligninolytischer Enzyme

Spezies	Reaktion des ABTS-Tests	Andere Autoren
<i>Alternaria alternata</i>	–	HOFRICHTER u. FRITSCH 1996
<i>Aureobasidium pullulans</i>	–	DESPHANDE et al. 1992
<i>Emericella nidulans</i>	–	–
<i>Epicoccum nigrum</i>	–	–
<i>Fusarium solanum</i>	–	IWAHARA et al. 1980 GUILLÉN et al. 1990
<i>Graphium putredinis</i>	++	SAPARRAT et al. 1996
<i>Phaeoisaria clematidis</i>	++	–
<i>Phoma glomerata</i>	+	–
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	–	–
<i>Sordaria fimicola</i>	+	–
<i>Talaromyces helicum</i>	++	SAPARRAT et al. 1996
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	–	–

Literatur

- BOURBONNAIS, R., PAICE, M. G. (1990): Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267, 99-102.
- BUMPUS, J. A., AUST, S. D. (1987): Biodegradation of environmental pollutants by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. BioEssays 6, 166-170.
- CAZAU, M. C., MASELLI, G., ARAMBARRI, A. M. (1992): Utilización de diferentes especies de hongos como biodegradadores de hidrocarburos I. Ensayo preliminar. Bol. Micol. 7, 79-83.
- DESPANDE, M. S., VINAY, B. R., LYNCH, J. M. (1992): *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. Enzyme Microbiol. Technol. 14, 514-527.
- EGGERT, C., TEMP, U., ERIKSSON, E. L. (1995): The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1151-1158.
- GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, A. T., MARTÍNEZ, M. J. (1990): Production of hydrogen peroxide by aryl alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 465-469.
- GUILLÉN, F. 1991: Aril alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii* - Estudio en relación con la degradación de lignina -. Unpublished thesis. 120 pp. Universidad de Alcalá de Henares, Facultad de Ciencias, Madrid.
- HEINZKILL, M., MESSNER, K. 1997: The ligninolytic system of fungi. In: Fungal Biotechnology, (Chapman & Hall) Anke, T. (Eds.), London, chapter 8, 213-227.

- HIGHLEY, T. (1987): Effect of carbohydrate and nitrogen on hydrogen peroxide formation by wood decay fungi in solid medium. *FEMS Microbiol. Lett.* 48, 373-377.
- HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1996): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. Y. Screening for low-rank-coal-depolymerizing activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 220-225.
- IWAHARA, S., NISHIHARA, T., JOMORI, T., KUWAHARA, M., HIGUCHI, T. (1980): Enzymic oxidation of α,β -unsaturated alcohols in the side chains of lignin-related aromatic compounds. *J. Ferm. Technol.* 58, 183-188.
- KIRK, T. K. 1983: Degradation and conversion of lignocellulosics. In: SMITH, J. E., BERRY, B. R., KRISTIANSEN, B. (Eds.), *Arnold, London, The Filamentous Fungi, Vol. 4. Fungal technology.* 266-294.
- ODIER, E., ROUAU, X. 1985: Les cellulases et les enzymes de dépolimérisation de la lignine. In: MOURANCHE, A., COSTES, C. (Eds.), *Gauthier-Villares, París, Hydrolases et Dépolimérase. Enzymes d'intérêt industriel.* 199-237.
- LOUDOT, J., DUPONT, J., HALOUI, S., ROQUEBERT, R. (1993): Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1167-1173.
- RUBDIGE, T. (1974): A new selective medium for the screening of aircraft fuels for biodegradable fungi. *Int. Biodeterior. Bull.* 10, 53-55.
- SAPARRAT, M. C. N., BUCSINSZKY, A. M. M., TOURNIER, H. A., ARAMBARRI, A. M. 1996: Análisis de la producción de enzimas ligninolíticas por diferentes especies de *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*. In: *Libro de resúmenes de las XXV Jornadas Argentinas de Botánica, Mendoza, 17-22 Noviembre, p. 10.*

Biotransformation von Pyren durch Pilze

M. C. ROMERO, M. L. SALVIOLI, M. C. CAZAU, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentinien

1. Einleitung

Pyren und weitere polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) bilden eine Substanzgruppe mit hoher Umweltrelevanz, die von der U.S. Environmental Protection Agency in die Liste der „priority pollutants“ aufgenommen wurde (INT. AGENCY RES. 1983, KAGAN et al. 1985). Der mikrobielle Abbau und die Transformation dieser Kohlenwasserstoffe ist ein wichtiger Prozeß in der biologischen Sanierung kontaminierter Gebiete (LAMBERT et al. 1994, CHAINEAU et al. 1995).

Die Untersuchungen zum Abbau von PAK konzentrierten sich bisher auf die Pilzgruppen der Zygomyceten und der Basidiomyceten. Beispiele dafür sind Arbeiten zum Abbau von PAK und zur Bildung von Metaboliten durch *Crinipellis stipitaria* und *Phanerochaete chrysosporium* (POTHULURI et al. 1993, LANGE et al. 1994, VAZQUES-DUHALT et al. 1994, SACK et al. 1997). Spezies der Deuteromyceten, wie *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., Bewohner von kontaminierten Böden, wurde ein geringeres Abbaupotential zugeschrieben (OUDOT et al. 1993, SACK und GÜNTHER 1993).

Die Isolierung und Identifizierung von kohlenwasserstoffabbauenden Stämmen wird in Argentinien von mehreren Gruppen betrieben. CAZAU et al. (1994), COLOMBO et al. (1996) und ROMERO et al. (1997) isolierten und identifizierten kohlenwasserstoffabbauende Pilzspezies u.a. aus kontaminierten Böden. Die Untersuchungen wurden mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen und mit Zwei- und Dreiring-PAK als Modellsubstanzen durchgeführt.

Aus belasteten Bodenproben des Werksgeländes der Raffinerie YPF-La Plata, Argentinien wurden Stämme von *Fusarium solani* und *Rhodotorula glutinis* isoliert und identifiziert. Diese Pilze wurden für die weiteren Versuche ausgewählt, da sie gutes Wachstum auf Agarplatten zeigten, deren Nährmedium Pyren als alleinige Kohlenstoffquelle enthielt. Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen bildete der *in vitro* Abbau von Pyren mit und ohne Co-substrat.

2. Material und Methoden

2.1 Kultivierung der Pilzspezies

Fusarium solani und *Rhodotorula glutinis* wurden in 20 ml Mineral-Basal-Medium kultiviert (MBM), das 40 mg/l Pyren enthielt (Stammlösung: 0,8 mg Pyren / 2,5 ml Dimethylformamid), (a) mit 0,5% Glucose, (b) ohne weitere Kohlenstoffquelle, pH 6,5. Die Zusammensetzung des MBM war (mg/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 400; K_2HPO_4 320; KH_2PO_4 80; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 80; CaCl_2 40; FeCl_2 2.

Zu Beginn wurde die Biomasse von *F. solani* bestimmt. Hierzu wurden von einer Petrischale mit Pyrenagar drei Stanzstücke von 7 mm Durchmesser entnommen und auf einem vorher ausgewogenen Filterpapier für 48 h bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dem Kol-

ben mit Pyren und den Kontrollen wurde eine identische Kulturmenge als Inokulum zugegeben.

Kulturen der Hefe *R. glutinis* wurden mit 0,2 ml Zellsuspension inokuliert. Dazu wurde Zellmaterial einer Stammkultur mittels Impföse in sterile physiologische Kochsalzlösung überführt und durch Schütteln suspendiert. Die Zellzahl (N/ml), die jedem Kolben zugegeben wurde, wurde durch Auszählen bestimmt (Thoma-Zählkammer, Fein-Optik Bad Blankenburg).

Jeweils zwei 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 20 ml des Medium (mit und ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle) wurden unter sterilen Bedingungen mit den zu untersuchenden Pilzen angeimpft und zusammen mit den abiotischen Kontrollen (ohne Inokulum) inkubiert. Die Kultivierung erfolgte als Schüttelkultur (140 rpm) bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ über 20 Tage. Zweimal wöchentlich wurden Proben entnommen und für jedes Medium und jede Pilzart bzw. die Kontrolle in duplo aufgearbeitet.

2.2 Probenaufarbeitung

Extraktion und Pyrenbestimmung

In regelmäßigen Abständen wurde mittels HPLC die Pyren-Restkonzentration in beiden Kulturmedien sowohl in der *F. solani*- als auch der *R. glutinis*-Kultur analysiert. Die Extraktion bestand aus fünf aufeinanderfolgenden Behandlungen der Kulturmedien mit je 30 ml Ethylacetat (Endvolumen 150 ml) im Scheidetrichter. Der Extrakt wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, mit Ultraschall behandelt, filtriert und im Rotationsverdampfer zum Trocknen eingengt (Säulentemperatur -6°C , Bad 40°C , 50 mPa). Der Rückstand wurde in 1500 μl Ethylacetat gelöst, verdampft und erneut in 1500 μl Methanol gelöst.

Die entsprechenden Proben wurden mit Ultraschall behandelt und mittels HPLC (Merck Hitachi) bestimmt. Ausstattung: L-4200 UV-Detektor, Chromato-Integrator D-2500; Säule RP 18 (125 • 4 mm, innerer Durchmesser); Lösungsmittel Acetonitril : Wasser – 80 : 20; Flußrate 1,0 ml/min; Wellenlänge 254 nm.

Jede Probe wurde zweifach bestimmt und auf einen Standard bezogen. Die aufgelisteten Daten wurden mit einer mittleren Standardabweichung von 15% erhalten. Die Kalibrierungskurve wurde in dreifacher Ausführung mit verschiedenen Verdünnungen (5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/l) einer Pyrenstammlösung in Dimethylformamid erstellt, die identisch war mit der, die für die Kulturen verwendet wurde.

3. Ergebnisse

Im Inkubationszeitraum wurde in dem Medium ohne Glucose ein Anstieg der anfänglichen Dichte von *R. glutinis* von $1,08 \cdot 10^5$ N/ml auf 1,25 – 1,95 N/ml beobachtet. In den Kulturen mit Cosubstrat betrug die Endkonzentration $3,25 - 4,90 \cdot 10^8$ N/ml, was einem Anstieg der Zellzahl um zwei und drei Zehnerpotenzen in jedem Kulturmedium entspricht.

Die Veränderung der Biomasse von *F. solani*, die über das Trockengewicht am Anfang und am Ende der Inkubation bestimmt wurde, betrug 0,625 g/l bis 0,997 und 0,975 g/l, sowohl in dem Medium mit als auch in dem Medium ohne Glucose, was einer Biomassezunahme von 59,5 und 56,0% entsprach.

Die Pyrenkonzentration änderte sich bis zum 14. Kulturtag nicht signifikant. Die Abnahme der Konzentration betrug bei *R. glutinis* 11,7 – 13,9 mg/l (29,3 – 34,7%, Abb. 1) und für *F. solani* nur 1,1 – 6,9 mg/l (2,6 – 17,3%, Abb. 2).

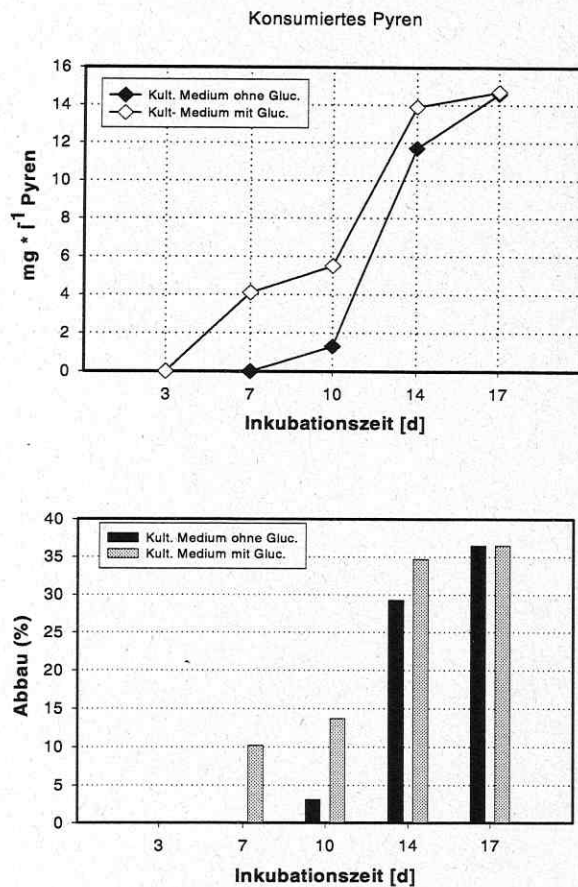


Abb. 1: Ergebnisse des Versuchs mit *R. glutinis*

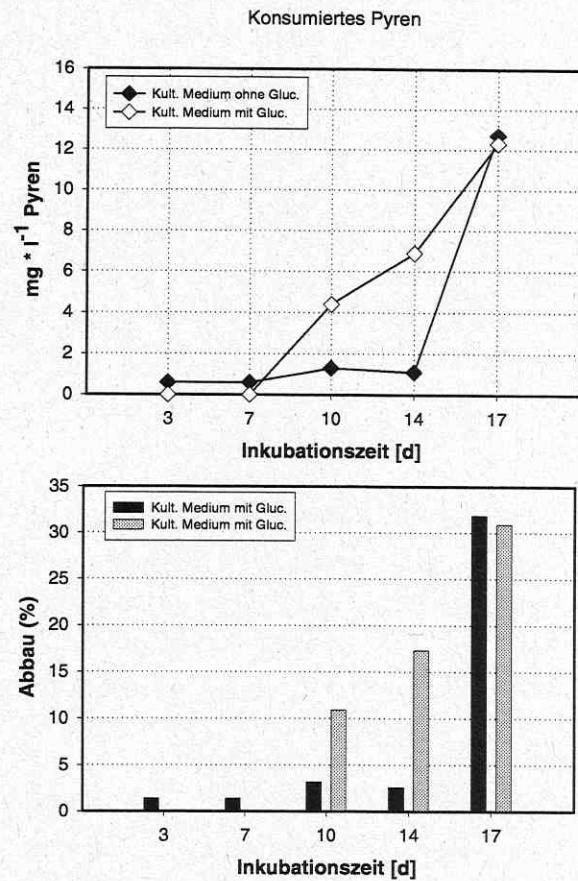


Abb. 2: Ergebnisse des Versuchs mit *F. solani*

Im Ansatz mit *R. glutinis* war die maximale Pyrenabnahme für die Kulturen mit und ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle 14,6 und 14,7 mg/l (Tab. 1). Diese Konzentrationen entsprachen einer Abnahme von 36,5% der anfänglichen Kohlenwasserstoffkonzentration. Die Pyrenkonzentration nahm in jedem Kulturmedium von *F. solani* auf 12,7 und 12,3 mg/l ab (Tab. 2). Der Prozentsatz der Kohlenwasserstoffabnahme am 17. Inkubationstag war etwas geringer (31,9 – 30,9%) als der in der Kultur mit *R. glutinis* ermittelte.

Beide Pilze eliminierten Pyren zu einem ähnlichen Prozentsatz bis zum Kulturende (17. Tag). Glucose als C-Quelle hatte lediglich einen Einfluß auf die Pyrenabnahme in den ersten Kulturtagen.

Tab. 1: Metabolismus von Pyren durch *Rhodotorula glutinis*

a) Pyren-Restkonzentration (mg/l)

Inkubationszeit	3 d	7 d	10 d	14 d	17 d
Medium ohne Gluc.	40	40	38,8	28,3	25,4
Medium mit Gluc.	40	35,9	34,5	26,1	25,3

b) Pyrenabnahmen (mg/l) (Ausgangskonzentration 40 mg/l)

Inkubationszeit	3 d	7 d	10 d	14 d	17 d
Medium ohne Gluc.	0	0	1,3	11,7	14,6
Medium mit Gluc.	0	4,1	5,5	13,9	14,7

c) Pyrenabnahmen (% der Ausgangskonzentration)

Inkubationszeit	3 d	7 d	10 d	14 d	17 d
Medium ohne Gluc.	0	0	3,1	29,3	36,5
Medium mit Gluc.	0	10,2	13,7	34,7	36,5

Tab. 2: Metabolismus von Pyren durch *Fusarium solani*

a) Pyren-Restkonzentration (mg/l)

Inkubationszeit	3 d	7 d	10 d	14 d	17 d
Medium ohne Gluc.	39,4	39,4	38,7	38,9	27,3
Medium mit Gluc.	40	40	35,6	33,1	27,7

b) Pyrenabnahmen (mg/l) (Ausgangskonzentration 40 mg/l)

Inkubationszeit	3 d	7 d	10 d	14 d	17 d
Medium ohne Gluc.	0,6	0,6	1,3	1,1	12,7
Medium mit Gluc.	0	0	4,4	6,9	12,3

c) Pyrenabnahmen (% der Ausgangskonzentration)

Inkubationszeit	3 d	7 d	10 d	14 d	17 d
Medium ohne Gluc.	1,4	1,4	3,2	2,6	31,9
Medium mit Gluc.	0	0	10,9	17,3	30,9

4. Diskussion

Die Bodenpilze, die aus kontaminierten Böden isoliert wurden, besitzen keine starke lignolytische Aktivität. Sie metabolisieren PAK langsam und haben die entsprechende metabolische Kompetenz erst durch die langandauernde Gegenwart von Kohlenwasserstoffen erworben (CERNIGLIA et al. 1992, SACK et al. 1992, SACK und GÜNTHER 1993).

Fusarium -Spezies wurden isoliert und auf ihre Abbaukapazität von Phenol (ANSELMO et al. 1989) und 2,4-Dinitrophenol (MADHOSINGH 1958) hin untersucht. Das Potential von *F. solani* zur Transformation von Rohöl in Gegenwart eines Cosubstrates wurde von CHAINEAU et al. (1995) in Mikrokosmosansätzen untersucht. In diesen Versuchen wurde mittels HPLC-Analyse eine Pyrenabnahme von 30% für *F. solani* -Kulturen (ohne Glucosezusatz) ermittelt.

In Experimenten mit Phenanthren und Benzo[a]anthracen beobachteten MACGILLIVRAY und SHIARIS (1993) kohlenwasserstoffspaltende Aktivität mit *R. glutinis*, die in der Lage war, mit 0,73 µmol Phenanthren/g zu wachsen. Pyren wurde bei diesen Spezies bislang nicht als alleinige C-Quelle eingesetzt.

Literatur

- ANSELMO, A. M., CABRAL, J. M. M. S., NOVAIS, J. M. (1989): The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on celite particles and their use in degradation of phenol. Microbiol. Biotechnol. 31, 200-03.
- CAZAU, C., MASELLI, G., ARAMBARRI, A. M. (1992): Utilización de diferentes especies de hongos como biodegradadoras de hidrocarburos Y: Ensayo preliminar. Bol. Micológico 7, 79-83.
- CERNIGLIA, C. E., SUTHERLAND, J. B., CROW, S. A. 1992, Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. In: WINKELMANN, G. (Ed.) Microbial degradation of natural products, Verlag Chemie, Weinheim, 193-217.
- CHAINEAU, C. H., MOREL, J. L., OUDOT, J. (1995): Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. Environ. Sci. Technol. 29, 1615-21.
- COLOMBO, J. C., CABELLO, M. N., ARAMBARRI, A. M. (1996): Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. Environ. Pollution 94, 355-62.
- International Agency for Research on Cancer. (1983): Polynuclear aromatic compounds, part 1. Int. Agency Res. Cancer Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 32, 355-64.
- KAGAN, J., KAGAN, E. D., KAGAN, I. A., KAGAN, P. A., QUIGLEY, S. (1985): The phototoxicity on non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. Chemosphere 14, 1829-34.
- LAMBERT, M., KREMER, S., STERNER, O., ANKE, H. (1994): Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK 375. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3597-01.
- LANGE, B., KREMER, S., STERNER, O., ANKE, H. (1994): Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK 364. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3602-07.

- MACGILLIVRAY, A. R., SHIARIS, M. P. (1993): Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeast isolated from coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1613-18.
- MADHOSNIGH, C. (1958): The metabolic detoxification of 2,4-dinitrophenol by *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* 7, 553-67.
- LOUDOT, J., DUPONT, J., HALOUI, S., ROQUEBERT, M. F. (1993): Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1167-73.
- POTHULURI, J. V., FREEMAN, J. P., EVANS, F. E., CERNIGLIA, C. E. (1993): Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1977- 80.
- ROMERO, M. C., CAZAU, M. C., GIORGIERI, S., ARAMBARRI, A. M. (1997): Phenanthrene degradation by microorganisms isolates from a contaminated stream. *Environ. Pollution* (in press).
- SACK, U., GÜNTHER, T. (1993): Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *J. Basic Microbiol.* 33, 1-9.
- SACK, U., RIEG, M., METZNER, H., FRITSCH, W. 1992: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by *Aspergillus versicolor* and autochthonous soil fungi. In: Soil decontamination using biological processes (Preprints of the International Symposium Karlsruhe/Germany), DECHEMA, Frankfurt/M., 342-50.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., MARTENS, R., ZADRAZIL, F., FRITSCH, W. (1997): Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3919-25.
- VAZQUEZ-DUHALT, R., WESTLAKE, D. W. S., FEDORAK, P. M. (1994): Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 459-66.

Geschlossenes Bioreaktorsystem zur mikrobiellen Behandlung stark kohlen-wasserstoffbelasteter Industrieschlämme

L. BERTHE-CORTI, B. CONRADI, R. HULSCH, B. SINN

Universität Oldenburg, FB Biologie, AG Mikrobiologie/Biotechnologie, Postf. 2503, 26111 Oldenburg, Deutschland

1. Einleitung

Bei der Förderung von Rohöl sowie der Produktion von petrochemischen Produkten und deren Entsorgung fallen große Mengen an unterschiedlich zusammengesetzten kohlenwasserstoffhaltigen Schlämmen an. Bei der biologischen Sanierung dieser Schlämme in Mieten oder Bioreaktoren sowie bei der Deponierung werden Abgase freigesetzt, die zu einer erheblichen Belastung der Umwelt mit Kohlenwasserstoffen führen können (PAYNE und PHILLIPS 1985, BARTHA 1986, MELCER et al. 1989, DOBBS 1990, SONG et al. 1990, CHANG und ALVAREZ-COHEN 1995, NARAYANAN et al. 1995). Daher wird die Prozessabluft von Mieten und Reaktoren in der Regel durch Bio- oder Aktivkohlefilter geleitet. Die Abluft dieser Filter bedarf einer permanenten Kontrolle. Wünschenswert wären Reinigungsprozesse mit geschlossenen Gaskreisläufen zur Vermeidung von potentiellen Umweltkontaminationen.

Das Kooperationsprojekt ENV 24 zwischen der Universidad Nacional de La Plata, Argentinien und der Universität Oldenburg, Deutschland hat Untersuchungen zur biologischen Sanierung von Kohlenwasserstoffschlämmen der petrochemischen Industrie zum Gegenstand.

An der Universität Oldenburg wurden in diesem Zusammenhang Untersuchungen zur aeroben Behandlung von petrochemischen Schlämmen in gerührten Schlammreaktoren durchgeführt. An der Universidad Nacional de La Plata erfolgten Untersuchungen zur biologischen Behandlung von Schlämmen im Boden. Bei beiden Behandlungsarten treten die leichtflüchtigen Bestandteile in die Gasphase über. Um eine Kontamination der Umwelt zu vermeiden, wurde daher ein Reaktorsystem mit geschlossenem Gaskreislauf entwickelt.

Dabei ist ausschlaggebend, daß dem System Sauerstoff zugeführt werden muß, soll der Kohlenwasserstoffabbau in ökonomisch vertretbaren Zeiträumen stattfinden. Dies hatte zur Folge, daß in der gasdichten Anlage der verbrauchte Sauerstoff ersetzt und das beim Abbau produzierte CO₂ entsorgt werden mußte. Für diese Funktion eignen sich insbesondere Algen, die CO₂ als C-Quelle nutzten und O₂ als Stoffwechselprodukt bildeten. Flüchtige Kohlenwasserstoffe in der Gasphase der Anlage wurden durch mikrobielle Aktivität eliminiert.

2. Verfahrensbeschreibung

Kohlenwasserstoffbelasteter Schlamm wird aerob in einem Rührreaktor (Schlammreaktor) solange vorbehandelt, bis die leichtflüchtigen Kohlenwasserstoffe durch Stripping bzw. Abbau weitgehend eliminiert sind. Die gestrippten (in die Gasphase übergetretenen) Kohlenwasserstoffe werden in einem nachgeschalteten Füllkörperreaktor aerob mikrobiell abgebaut. Das Abgas des Füllkörperreaktors gelangt in einen Photoreaktor, in dem Algen das bei der Kohlenwasserstoff-Mineralisation im Schlamm- und im Füllkörperreaktor gebildete Kohlendioxid assimilieren und die Gasphase, die anschließend wieder durch Schlamm und Füllkörper geleitet wird, mit Sauerstoff anreichern. Der Gasstrom der gesamten Anlage verbleibt in einem

geschlossenen Kreislauf, so daß weder Zuluft benötigt wird, noch Abluft entsteht. Das Verfahren ist somit emissionsfrei. Der Aufbau des Systems ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

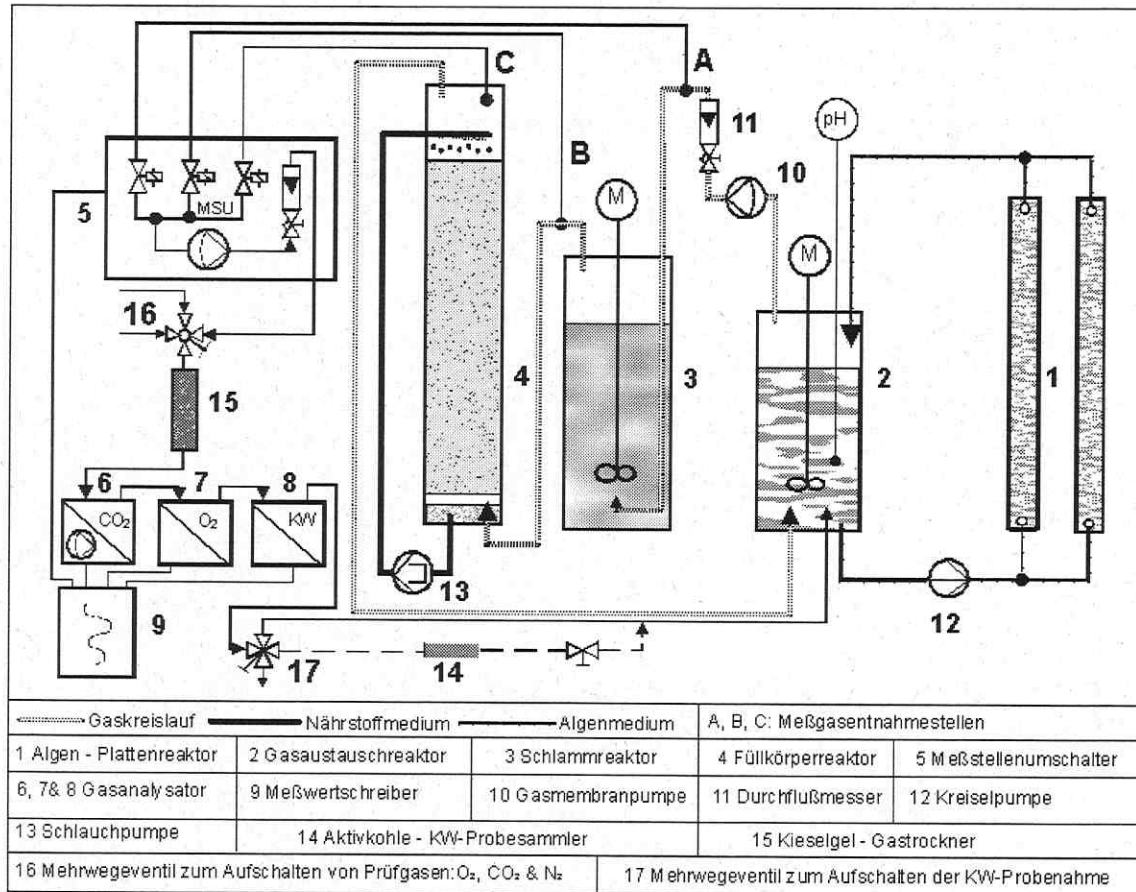


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Schlammbehandlungsanlage mit geschlossenem Gaskreislauf

3. Material und Methoden

3.1 Schlamm

Als Schlamm wurde kohlenwasserstoffhaltiges Industrieabwasser und Bilgenschlamm (Gemisch aus Öl-, Schmierfett- und Treibstoffresten sowie Wasser, das in der Bilge von Schiffen anfällt) eingesetzt.

3.2 Eingepfite Mikroorganismenkulturen

Der Füllkörper wurde mit Schlamm aus einer Pflanzenkläranlage zur Behandlung kohlenwasserstoffhaltiger Abwässer beimpft.

Der Photoreaktor wurde mit einer nicht näher spezifizierten Algen-Bakterien-Mischkultur beimpft. Der Hauptanteil der Algen setzt sich aus *Scenedesmus spec.* und *Chlorella spec.* zusammen.

3.3 Nährmedien

Nährlösung für Füllkörperkultur:

Die Nährlösung für den Füllkörperreaktor wurde mit Leitungswasser angesetzt: 4 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,25 g/l K_2HPO_4 , der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Nährmedium für Algenkultur:

Das Nährmedium für die Algenkultur wurde mit Leitungswasser angesetzt: 1 g/l KNO_3 , 0,1 g/l K_2HPO_4 , 50 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 $\mu\text{g/l}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 $\mu\text{g/l}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 $\mu\text{g/l}$ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 $\mu\text{g/l}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 $\mu\text{g/l}$ H_3BO_3 , 25 ng/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mg/l EDTA, keine pH-Wert-Einstellung.

3.4 Reaktoren

Schlammreaktor: Rührreaktor (Typ Biostat S[®], Fa. B. Braun Melsungen), Arbeitsvolumen 12,5 l, ausgestattet mit 1 Propellerrührer und 2 Scheibenblattrührern, Belüftung unterhalb der Rührer, Rührerdrehzahl 175 min⁻¹, Gasauslaß über Gaskühler mit Kondensatrückführung in den Reaktor.

Gasaustauschreaktor: Rührreaktor (Fa. L. H. Engineering Company, England), Arbeitsvolumen 5 l, ausgestattet mit 1 Propellerrührer und 2 Scheibenblattrührern, Belüftung unterhalb der Rührer, Rührerdrehzahl 275 min⁻¹, 2 Bodenausläufe mit Anschluß einer Kreislaspumpe (50 W, 38 l/min max., Fa. EHEIM) zum Umwälzen des Algenmediums (Durchströmung des Photoreaktors), 1 Deckeleinlaß als Rücklauf für das Algenmedium. Gasauslaß über Gaskühler mit Kondensatrückführung in den Reaktor.

Algen-Photoreaktor: Nachbau eines Systems der Fa. UMWELTSCHUTZ NORD GmbH & Co. aus modifizierten Acrylglas-Doppelstegplatten (PMMA: Polymethylmethacrylat) mit einer Gesamtfläche von 2 m² und einem Arbeitsvolumen von 18 l. Beleuchtung: 2 Leuchtstoffröhren, je 2100 Lux, 2 Hg-Dampflampen, je 4300 Lux.

Füllkörperreaktor: Eigenbau, Edelstahl, Doppelmantelreaktor mit Isolierung, Innendurchmesser: 12,3 cm, Innenhöhe: 92,5 cm, Arbeitsvolumen 10 l, Bodeneinlaß für Gaseintrag, 2 Deckelauslässe für Gas (Meßgas und Systemgas), externe Nährlösungsschleife (Bodenauslauf und Seiteneinlaß 11 cm unterhalb des Deckels).

Zur Fixierung der Mikroorganismen wurde Tongranulat verwendet. 4 l Nährlösung wurden ständig im Umlauf über den Füllkörper gepumpt.

3.5 Gasförderung und -rohrleitungen

Der Gasstrom wurde mittels einer Teflon-Membranpumpe im Umlauf gehalten und mit einem Rotameter auf einen konstanten Durchfluß von 0,150 Nm³/h eingestellt. Das Gasrohrleitungssystem bestand aus Dekabon 1300[®] (Polyäthylen-Aluminium Verbundwerkstoff, Fa. Serto-Installationstechnik), aus Edelstahl, PTFE (Polytetrafluorethylen, Teflon[®]) und aus PVC (Polyvinylchlorid).

3.6 Kontinuierliche Messung von Prozeßparametern

Folgende Prozeßparameter wurden on-line erfaßt: Temperatur im Schlammreaktor, pH-Wert der Algensuspension sowie Sauerstoff-, Kohlendioxid- und Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase des Systems.

Die Sauerstoffkonzentration wurde mit einem elektrochemischen Sensor (Typ KE 25 der Fa. Japan Storage Battery Co.) bestimmt, Kohlendioxidkonzentration mit einem Infrarot Analysator (Typ UNOR 6N, Fa. Maihak AG, Hamburg). Um die Querempfindlichkeit des Meßgeräts auf H₂O-Dampf zu eliminieren, wurde das Meßgas mit Silicagel mit Indikator getrocknet.

Die Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase wurde mit einem Metalldioxid-Halbleiter Gas-Sensor (Typ TGS 812, Fa. Unitronik) analysiert. Da der Sensor nicht spezifisch anspricht, konnten die Kohlenwasserstoffe lediglich als Summenparameter erfaßt werden.

3.7 Diskontinuierliche Messung von Prozeßparametern

Leichtflüchtige Kohlenwasserstoffe:

Zusätzlich zur on-line Messung wurde der Kohlenwasserstoffgehalt in der Gasphase mittels GC-Analysen erfaßt. Dazu wurde ein definierter Gasstrom über zwei hintereinander geschaltete Aktivkohleröhrchen ($0,6 \pm 0,05$ g Aktivkohlegranulat) geleitet. Das im Gasstrom nachgeschaltete Röhrchen diente zur Kontrolle der Beladung des Meßröhrchens (erstes Röhrchen). Die beladene Aktivkohle wurde jeweils in ein 7 ml-Headspace-Gläschen überführt und mit 1 ml Benzylalkohol versetzt und vor der Messung 60 min auf 73°C erhitzt.

Die Analyse des Dampfraumes des Headspace-Gläschen erfolgte mit einem Gaschromatographen der Fa. Perkin Elmer Auto-System; Silicaglaskapillarsäule Rtx-5, 30 m • 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke; S/SL Injektor mit 200°C, 1 ml Injektionsvolumen; Flammen-Ionisations-Detektor mit 280°C; N₂ als Trägergas: 3 ml/min; Brenngase: synthetische Luft (kohlenwasserstofffrei) 400 ml/min, H₂ (kohlenwasserstofffrei) 40 ml/min die Ofentemperatur wurde wie folgt programmiert: Anfangstemperatur 38°C, 5 min isotherm mit anschließender ramp rate von 8°C/min; ab 120°C Ofentemperatur Anstieg mit einer ramp rate von 20°C/min bis 220°C, 1 min isotherm.

Kohlenwasserstoffgehalt im Algen- und Füllkörpermedium sowie im Schlamm:

Der Gehalt an Kohlenwasserstoffen wurde im Ausgangsschlamm, im Medium des Photoreaktors und im Nährmedium des Füllkörperreaktors zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuche analysiert.

Untersuchungsmethoden:

- Schwerflüchtige, lipophile Stoffe in Anlehnung an die DIN 38 409-H17
- Kohlenwasserstoffe (KW) nach DIN 38 409-H18
- Trockensubstanz des Schlamms nach DIN 38 414-S2
- Leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) in Anlehnung an die DIN 38 407-F5
- Leichtflüchtige, aromatische Kohlenwasserstoffe (BTEX) in Anlehnung an die DIN 38 407-F9, GC-Headspace

Phosphat- und Stickstoffkonzentration:

In unregelmäßigen Abständen wurde der Gehalt an Phosphat und Ammonium bzw. Nitrat der Nährlösungen im Füllkörperreaktor und im Photoreaktor analysiert, um bei Bedarf N und/oder P nachzufüttern. Phosphat-Test (PMB): Typ Merckoquant 1.10428 (Fa. Merck), Ammonium-Test: Typ Merckoquant 1.10024 (Fa. Merck), Nitrat-Test: Typ Aquamerck 8032 (Fa. Merck).

3.8 Lebendkeimzahl

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu) im Schlamm (Schlammreaktor) sowie im Algen- und im Füllkörpersnährmedium erfolgte durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen auf Hefeextraktagar: 3 g Hefeextrakt, 5 g Pepton, 15 g Agar pro l A. dest., pH: 7,2. Verdünnt wurde mit steriler NaCl-Lösung (0,6%). Die Platten wurden bei 20°C inkubiert und nach

3 – 5 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien ausgezählt.

3.9 Toxizität

Die Zytotoxizität wurde mit dem LUMISTox-Test (Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 und Teil 341), Stamm: *Photobacterium fischeri* NRRL B-11177, bestimmt.

Die Genotoxizität wurde mit dem Ames-Mutagenitätstest (MARON und AMES 1983), Stamm *Salmonella typhimurium* TA98, mit und ohne metabolische Aktivierung bestimmt. Die metabolische Aktivierung erfolgte in einem Präinkubationstest nach AMES et al. (1975). Zur metabolischen Aktivierung wurde eine mit Aroclor induzierte S9-Fraktion aus Rattenleber (Organo Teknika) eingesetzt. Sie stammte von 8 bis 10 Wochen alten männlichen Spargue Ratten, die 5 Tage vor ihrer Tötung mit Aroclor 1254 behandelt wurden.

Die beimpften Platten wurden im Dunkeln bei 37°C für 48 h inkubiert und die gebildeten Kolonien (His⁺ Revertanten) ausgezählt. Die Rate an Spontanrevertanten pro Platte betrug für den eingesetzten Stamm 20 – 40 Kolonien pro Platte. Ab einer Revertanzahl, die um den Faktor zwei über der Anzahl an Spontanrevertanten lag, wurde die eingesetzte Probe als mutagen eingestuft.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kohlenwasserstoffkonzentration der Schlämme

Die Untersuchungen wurden mit zwei Schlämmen unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung durchgeführt. Die physikochemischen Parameter und die Kohlenwasserstoffzusammensetzung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Physikochemische Parameter und Kohlenwasserstoffzusammensetzung der im Schlammreaktor eingesetzten Schlämme

Schlammcharge	pH-Wert	Trockensubstanz (%)	Schwerfl. lipophile Stoffe (mg/l)	KW (mg/l)	BTEX (µg/l)	CKW (µg/l)
1) Bilgenschlamm	7	22,3	17000	14600	454	214
2) Industrieschlamm	7	13	1490	540	362	130

Für beide Schlämme wurde am Ende der Fermentationen (Charge 1: nach 65 Tagen; Charge 2: nach 30 Tagen) eine deutliche Reduzierung des Gehalts leichtflüchtiger Kohlenwasserstoffe nachgewiesen (Tab. 2). Um eine Vergleichbarkeit der Eliminierungsraten zu erzielen, wurde die BTEX- und CKW-Eliminierung der Charge 1 auf 30 Tage berechnet. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist und durch GC-Analysen bestätigt wurde, war der Gesamtkohlenwasserstoffgehalt der Gasphase nach 30 Tagen zu mehr als 95% eliminiert. Die geringere CKW-Eliminierung von Charge 2 ergibt sich aus der Inhomogenität des Schlammes. Es war eine starke Phasen-

trennung zu erkennen, wobei ein Teil der organischen Phase an der Reaktorwandung oberhalb der wäßrigen Phase niedergeschlagen war. Damit war ein Teil der schwer wasserlöslichen CKW dem mikrobiellen Abbau und dem stripping-Prozeß im Schlammreaktor entzogen und konnte somit nicht abgebaut werden.

Tab. 2: Konzentration an CKW und BTEX in den Schlämmen vor und nach der jeweiligen Behandlungszeit (*Eliminierungsrate in Klammern: Berechnung auf 30 Tage)

Schadstoff	Konzentration Anfang (µg/l)	Konzentration Ende (µg/l)	Eliminierung (%)	Eliminierungsrate (µg/l • d)
BTEX Charge 1	454	116	74	5,2 (11,3 *)
BTEX Charge 2	362	17	95	11,5
CKW Charge 1	214	24	89	2,9 (6,3 *)
CKW Charge 2	130	54	58	2,5

4.2 Kohlenwasserstoffkonzentration der Nährlösung

Um das skizzierte System über längere Zeiträume ohne Austausch an Nährlösung im Füllkörper- bzw. Photoreaktor führen zu können, muß gewährleistet sein, daß in den Nährlösungen keine wesentliche Aufkonzentration an Kohlenwasserstoffen stattfindet. Für CKW und BTEX konnte dies nachgewiesen werden. In der Nährlösung des Füllkörperreaktors erfolgte jedoch eine geringe Anreicherung an KW im gesamten Versuchslauf (Schlammcharge 1 und 2) (Tab. 3).

Tab. 3: Konzentration an CKW und BTEX in der Nährlösung des Füllkörpers und im Algenmedium des Photoreaktors (Beginn der Versuchsserie, Abschluß des ersten Versuchs und Ende der Versuchsserie)
<1*) Konzentration unter der Nachweisgrenze der Analysenmethode

Schlamm Behandlungszeit	Füllkörper			Photoreaktor		
	BTEX (µg/l)	CKW (µg/l)	KW (µg/l)	BTEX (µg/l)	CKW (µg/l)	KW (µg/l)
Anfang (0 d)	< 1*)	< 1*)	< 1*)	< 1*)	< 1*)	< 1*)
Ende Charge 1 (65 d)	30	4	600	15	< 1*)	< 100
Ende Charge 2 (95 d)	3	4	1.300	15	2	< 100

4.3 Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase und Gesamtkohlenwasserstoffabbau.

Innerhalb eines Versuchszeitraums von 4 Wochen wurde eindeutig eine Reduzierung der Kohlenwasserstoffkonzentration in der Gasphase des Systems nachgewiesen (Abb. 2, 3). Der Nachweis erfolgte durch zwei parallel durchgeführte Verfahren: On-line Messungen im Gasstrom mit einem Kohlenwasserstoff-Sensor (Abb. 2) und GC-Analysen der Kohlenwasserstoffe in Proben aus dem Gaskreislauf (Abb. 3a–c).

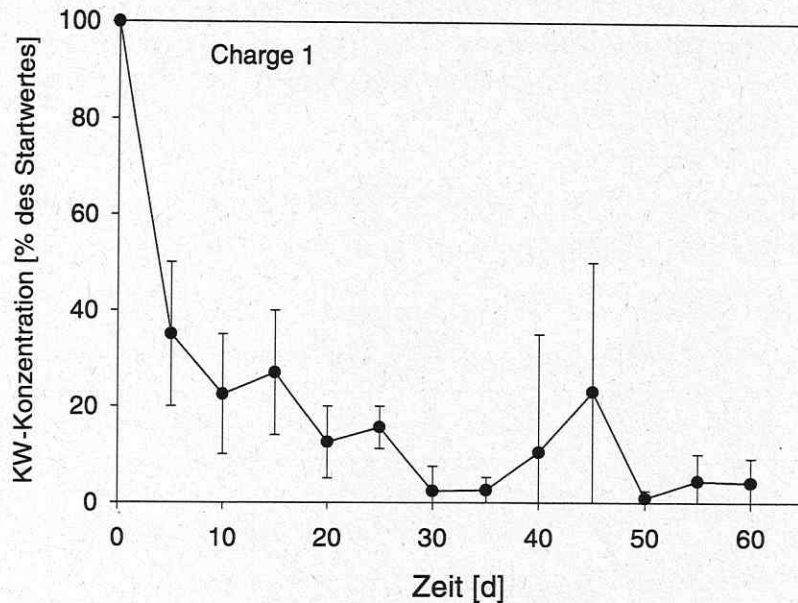


Abb. 2: On-line Messung (Sensor) des Gesamtkohlenwasserstoffes in der Gasphase, Werte gemittelt über 5 Tage mit Angabe der Extremwerte

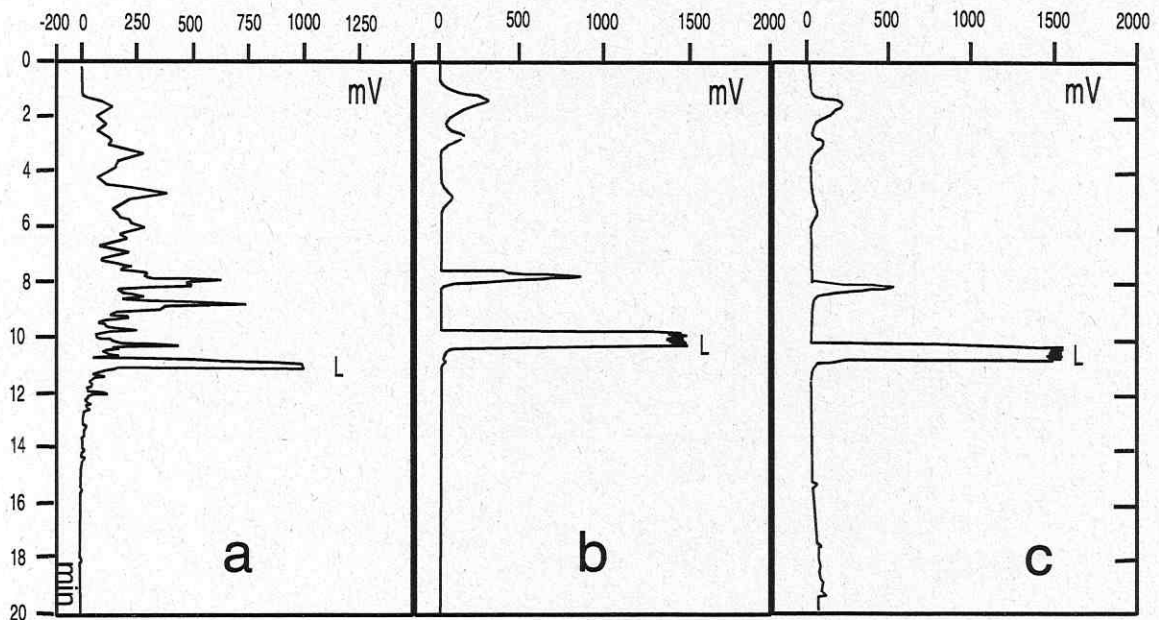


Abb. 3a–c: GC-Chromatogramme der Gasphase (Peak L kennzeichnet das Lösungsmittel):
a) zu Beginn, b) am Ende des Versuches und c) Blindwert

Die aus dem Schlamm gestrippten Kohlenwasserstoffe zirkulieren mit dem Gasstrom in der gesamten Anlage und werden, entsprechend ihrer Löslichkeit, auch in den wäßrigen Phasen des Systems (Nährlösung des Füllkörpers und des Photoreaktors) gelöst. Der Nachweis des Abbaus dieser Substanzen ist also erst dann erbracht, wenn die Gesamtmenge an flüchtigen KW im Gesamtreaktorsystem (Gasphase plus Flüssigphasen) abnimmt.

Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, sinkt die KW-Belastung der Gasphase bis unter die Nachweisgrenze der verwendeten Methode (Headspace Analyse von Gasproben).

Eine Aufsummierung der absoluten Mengen der flüchtigen KW in Schlammreaktor, Füllkörper und Photoreaktor zeigt, daß eine deutliche Reduzierung stattfand. Im ersten Versuch (Schlammcharge 1) nahm die Gesamtmenge an BTEX im System um 82% ab (entsprechend einer Abbaurate von 0,08 mg pro Tag) im zweiten Versuch (Schlammcharge 2) um 55% (entsprechend einer Abbaurate von 0,023 mg pro Tag). Die Abnahme der Gesamtmenge an CKW betrug im 1. Versuch 50% und im 2. Versuch 84%. Aufgrund der unterschiedlichen Anfangskonzentrationen und der unterschiedlichen Laufzeiten der Versuche (s. Tab. 2 u. 3) ergab sich daraus für beide Versuche eine Abbaurate von 0,017 mg pro Tag.

4.4 Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration in der Gasphase

Zusätzlich zum Kohlenwasserstoffgehalt wurde in der Gasphase on-line die O_2 - und die CO_2 -Konzentration bestimmt. Die CO_2 -Konzentration läßt Rückschlüsse auf die biologische Aktivität des Systems zu. Sie ist jedoch nur ein grober Summenparameter, da zwischen der CO_2 -Produktion der Bakterien und dem CO_2 -Verbrauch der Algen nicht differenziert werden kann. Die CO_2 -Konzentration lag überwiegend zwischen 0,9 und 5% mit einzelnen Maximalwerten bis 8% (Abb. 4). Die Sauerstoffkonzentration wurde vor und nach dem Photoreaktor bestimmt und ließ so Rückschlüsse auf die O_2 -Produktion der Algen zu. In der Regel lag die O_2 -Konzentration nach dem Photoreaktor um 2–8% höher als vor dem Photoreaktor, was als Beweis für die photosynthetische Aktivität der Algen gelten kann. Die in der Gasphase gemessenen Sauerstoffkonzentrationen lassen darauf schließen, daß zu keinem Zeitpunkt eine Sauerstofflimitierung im System vorlag. Die gemessenen Konzentrationsschwankungen sind ein Hinweis darauf, daß im System sowohl CO_2 -Produktion als auch O_2 -Verbrauch stattfand.

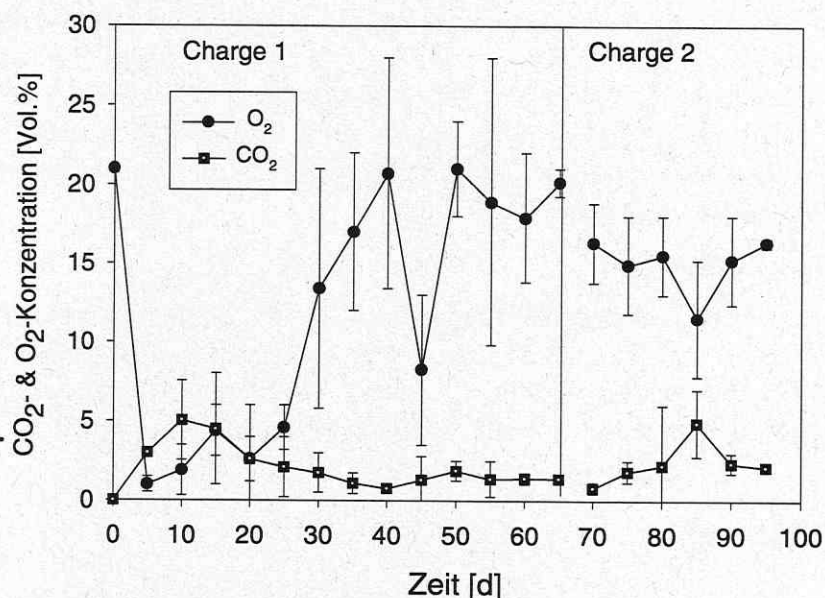


Abb. 4: On-line Messung von CO_2 - und O_2 -Konzentration im Abgas des Photoreaktors. Werte gemittelt über 5 Tage mit Angabe der Extremwerte

Die CO_2 - und die O_2 -Konzentration konnte durch die Intensität der Beleuchtung des Photoreaktors beeinflusst werden, was ein deutlicher Hinweis auf die Abhängigkeit der Zusammensetzung der Gasphase von der metabolischen Aktivität der Algen ist.

4.5 Biomasseentwicklung

In allen Reaktoren des Systems konnte Wachstum von Mikroorganismen nachgewiesen werden. Im Schlammreaktor betrug die Bakterienkonzentration zwischen 10^4 N/ml und 10^8 N/ml, was auf mikrobielle Aktivität im Schlammreaktor selbst hinweist, obwohl dem Schlamm keine Nährstoffe zugefügt wurden. Im Photoreaktor erfolgte ein heftiges Algenwachstum, so daß im Verlauf beider Versuche wiederholt Biomasse entfernt werden mußte. Die Biomasseproduktion konnte jedoch nicht quantifiziert werden, da die Algen im Photoreaktor die Wände besiedelten. Im Füllkörper konnten sowohl im Nährlösungskreislauf als auch fixiert auf dem eingesetzten Tongranulat, Bakterien nachgewiesen werden. In der Nährlösung stieg die Konzentration von anfänglich $3 \cdot 10^6$ N/ml auf $2 \cdot 10^{12}$ N/ml.

4.6 Monitoring der Toxizität im System

Hemmung der Leuchtintensität von *P. fischeri*:

Zu Beginn und am Ende der Versuche wurde das toxische Potential der Schlämme ermittelt. Dazu wurde ein organischer Extrakt der Proben (Extraktion mit Ethylacetat und Lösungsmittelaustausch gegen DMSO) in den LUMISTox-Test eingesetzt. Die Schlämme müssen als toxisch eingestuft werden. Der Ethylacetatextrakt von Schlamm 1 wies zu Beginn des Versuches einen EC_{50} Wert von 7,4 g/l auf, zu Ende des Versuches einen Wert von 142,2 g/l. Im gesamten Versuchszeitraum wurde in regelmäßigen Abständen die akute Toxizität der Nährlösung des Füllkörpers und des Photoreaktors bestimmt. Hierzu wurde das steril filtrierte Medium in den LUMISTox-Test eingesetzt und die Hemmung der Leuchtintensität von *P. fischeri* bestimmt.

Für das Medium des Photoreaktors konnten keine EC_{50} -Werte errechnet werden, da die maximal erzielte Hemmung in allen Proben unter 50% (5% bis 37%) lag. Proben der Nährlösung des Füllkörpers, die zu unterschiedlichen Behandlungszeiten gezogen wurden, zeigten deutlich Schwankungen im toxischen Potential, jedoch keine Akkumulation toxischer Substanzen in der Nährlösung. Die nachgewiesene Toxizität ist als gering einzuschätzen und schwankte zwischen EC_{50} -Werten von 250 und 500 g/l.

Mutagenität in *S. typhimurium*:

Zur Abschätzung inwieweit sich im Füllkörper und im Photoreaktor Substanzen anreichern, die kein hohes zytotoxisches jedoch ein mutagenes Potential aufweisen, wurde das mutagene Potential der Nährlösungen des Füllkörpers und des Algenreaktors analysiert. Sowohl in den wäßrigen Proben als auch im Ethylacetat-Extrakt war kein mutagenes Potential nachweisbar.

5. Schlußfolgerung

Das hier vorgeschlagene System zur mikrobiellen Reinigung kohlenwasserstoffbelasteter Abluft in einem Reaktorsystem mit geschlossenem Kreislauf konnte erfolgreich zur Eliminierung von BTEX, CKW und KW in der Gasphase eingesetzt werden. Das System hat ein Gesamtvolumen von ca. 50 l (Summe aller Systemkomponenten) und wies Abbauraten von 2 – 6 mg CKW und ca. 11 mg BTEX pro Tag auf. Der Vorteil gegenüber offenen Biofiltern liegt in der emissionsfreien Betriebsweise des Systems. Es ist kein Austausch an Filtermaterial nötig, und es werden weder Keime noch Sporen freigesetzt. Zur Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität sowohl im Füllkörper als auch im Photoreaktor muß N und P nachgefüttert

werden. Es ist jedoch nicht nötig die Nährmedien (Füllkörper und Photoreaktor) auszutauschen, um einem toxischen Potential, das sich durch Akkumulation von KW oder KW-Metaboliten aufbauen könnte, entgegenzuwirken. Allerdings fällt aufgrund der CO₂-Produktion im Füllkörper und im Schlammreaktor Algenbiomasse an, die entsorgt werden muß. Das vorgestellte System befindet sich noch in der Entwicklungsphase und muß weiterhin optimiert werden.

Danksagung

Wir danken Herrn Uwe Maschmann für seine geschickte und ausdauernde Hilfe bei der Betreuung der Anlage und der Durchführung des Mutagenitätstests. Der Firma UMWELTSCHUTZ NORD GmbH & Co. danken wir für die Durchführung der Kohlenwasserstoffanalysen in den Nährmedien und den Schlämmen.

Literatur

- AMES, B. N., MCCANN, J., YAMASKI, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.* 31, 347-364.
- BARTHA, R. (1986): Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* 12, 155-172.
- CHANG, H.-L., ALVAREZ-COHEN, L. (1995): Transformation capacities of chlorinated organics by mixed cultures enriched on methane, propane, toluene, or phenol. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 440-449.
- DOBBS, R. A. 1990: Effecting emissions of volatiles from waste water treatment plants. Workshop report and Proceedings air toxic emissions and POTWs, Appendix J, Cincinnati, Ohio.
- MARON, D. M., AMES, B. N. (1983): Revised method for the Salmonella mutagenicity testing. *Mut. Res.* 113, 173-215.
- MELCER, H., THOMPSON, D., BELL, J., MONTHEIT, H. 1989: Stripping of volatile organic compounds at municipal wastewater treatment plants. Internat. Symposium on hazardous waste treatment: Biosystems for pollution control, Cincinnati, Ohio.
- NARAYANAN, B., SUIDAN, M. T., GELDERLOOS, A. B., BRENNER, R. C. (1995): Anaerobic treatment of volatile and semivolatile organic compounds in municipal wastewater. *Water Environ. Res.* 67, 46-56.
- PAYNE, J. R., PHILLIPS, Ch. R. (1985): Photochemistry of petroleum in water. *Environ. Sci. Technol.* 19, 569-579.
- SONG, H-G., XIAOPING, W., BARTHA, R., (1990): Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 652-656.

Biologische Sanierung von mit komplexen Kohlenwasserstoffgemischen kontaminierten Böden

G. I. VECCHIOLI, O. R. COSTANZA, I. S. MORELLI, M. T. DEL PANNO, M. GARRÉ, M. T. PAINCEIRA

Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentinien

1. Einleitung

Die biologische Sanierung von kontaminierten Böden ist ein dynamischer Prozeß, in welchem Kontamination, Boden, Klima und biologische Aktivität interagieren, um die einzelnen Bestandteile der Kontamination abzubauen, zu transformieren und zu immobilisieren. In der Natur können Kohlenwasserstoffe durch einen der folgenden Prozesse eliminiert werden: biologischer Abbau, Emission, Perkolation oder Oberflächendrainage. In einer Matrix, die so komplex ist wie Boden, gibt es bislang keine Standardmethoden zur Evaluation und Verfolgung der Bioremediationsprozesse von Kohlenwasserstoffgemischen (Industrierückstände). Es wurden unterschiedliche Versuchssysteme eingerichtet, um so die Prozesse, die an der Bioremediation des Bodens beteiligt sind, erfassen zu können: Terrarien; geschlossene Systeme, um die CO₂-Produktion erfassen zu können; mit HgCl₂ vergiftete Systeme, um Verluste durch Stripping abschätzen zu können. Um die Systeme in ihrer Entwicklung zu verfolgen, wurden mikrobiologische, analytische und toxikologische Bestimmungen durchgeführt, die in dem vorliegenden und den drei folgenden Artikeln dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Einrichtung und Durchführung von Methoden, die zur Verfolgung der biologischen Prozessen eingesetzt wurden, gezeigt.

2. Material und Methoden

Erde: stark lehmig mit einer C : P : N Relation von 100 : 12 : 8.

Komplexes Kohlenwasserstoffgemisch: Rückstände aus der petrochemischen Industrie mit einem hohen Anteil an polynuklearen aromatischen Kohlenwasserstoffen.

Präparation der Systeme: Entsprechend den Empfehlungen von PRAMER und BARTHA (1972) wurden 5% Rückstand in den Boden eingearbeitet. Die kontaminierten und nicht kontaminierten Systeme wurden bei Zimmertemperatur und einer Feuchtigkeit von 21% gehalten.

Bestimmung der mikrobiellen Keimzahl: Extraktion der Mikroorganismen aus den Proben entsprechend den Empfehlungen der DECHEMA (1992). Mit 0,85% NaCl wurden Verdünnungsserien angelegt. Die Lebendkeimzahl der heterotrophen Bakterien wurde mit PC-Agar oder R2A-Agar bestimmt (REASONER und GELDREICH 1985), die der Pilze mit Cooke-Rose-Bengal-Agar unter Zusatz von 25 mg % Streptomycin (MARTIN 1950). Die Keimzahlbestimmung der kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien wurde entweder in mit Agar versetztem Mineralmedium durchgeführt, wobei die Kohlenwasserstoffe im Deckel der Petrischale appliziert wurden (VECCHIOLI et al. 1990), oder mittels MPN in flüssigem Mineralmedium (MORELLI 1995) unter Zusatz eines n-Hexanextraktes der Rückstände (MILLS 1978). Die Keimzahlbestimmung der Phenanthren abbauenden Bakterien wurde mit der von Bogardt (1992) beschriebenen Technik in festem Medium, die Keimzahlbestimmung der Bakterien,

die ein PAK-Gemisch abbauen, wurde mit der MPN-Methode in Mikrotiterplatten durchgeführt (WRENN und VENOSA 1996).

Bestimmung der biologischen Aktivität: Produktion von CO_2 entsprechend der Methode von PRAMER und BARTHA (1965), Hydrolaseaktivität anhand der Hydrolyse von Fluoreszindiace-tat (FDA) (SCHNÜRER und ROSWALL 1982). Die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität erfolgte durch Reduktion von Triphenylterazoliumchlorid (TTC) (THALMANN 1968).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Zunahme der lebenden Bakterienpopulationen, die in diversen Medien nachweisbar war (Abb. 1), korreliert mit der Zunahme der CO_2 -Produktion und der Dehydrogenaseaktivität (Abb. 2). Diese Korrelation gilt nur für die ersten Phasen des Bioremediationsprozesses, später stabilisieren sich die Keimzahlen, und die biologische Aktivität sinkt ab. Es besteht keine Korrelation mit der Hydrolaseaktivität, die sich immer auf dem Niveau des unkontaminierten Bodens befand.

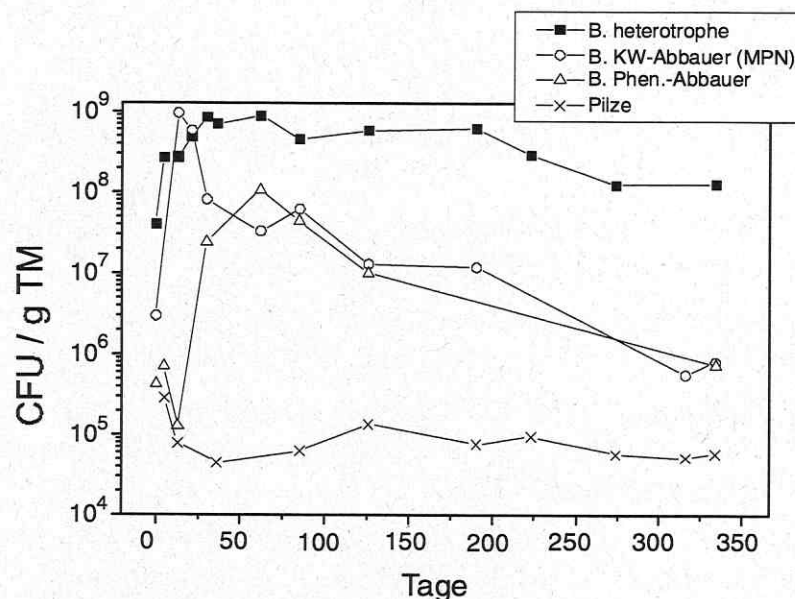


Abb. 1: Entwicklung der Pilz- und der Bakterien-Populationen im Versuchsverlauf

Die bakteriellen Keimzahlen erlauben nur eine Aussage über den frühen Effekt der Kontamination (anfänglicher Keimzahlanstieg bestimmbar mit einem beliebigen Kulturmedium).

Langfristig lagen die Keimzahlen kontaminierter Systeme signifikant über denen mit unkontaminiertem Boden, obwohl keine biologische Aktivität nachweisbar war. Auf dieser Grundlage können die bakteriellen Keimzahlen als Kriterium für eine existierende PAK-Kontamination in Böden genommen werden.

Zur Verfolgung des biologischen Prozesses bietet die Bestimmung der biologischen Aktivität, gemessen als CO_2 oder als Dehydrogenaseaktivität, bessere Information.

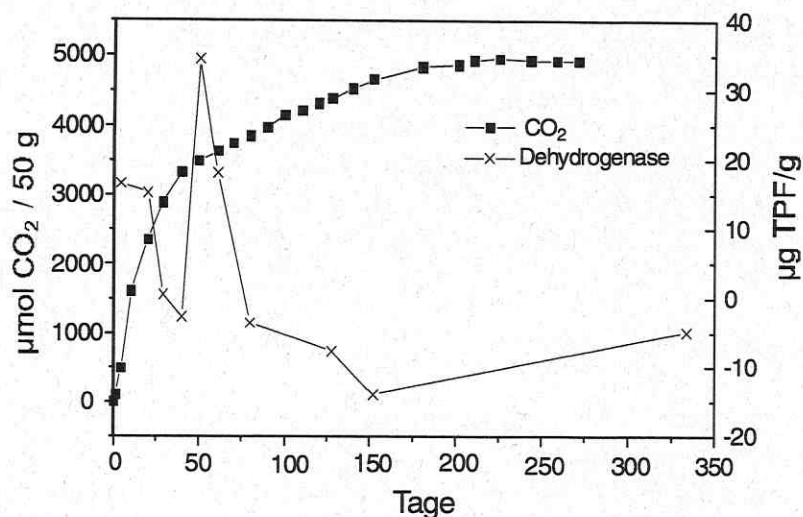


Abb. 2: Aktivität der Dehydrogenase und Produktion von CO₂ im Versuchsverlauf

Literatur

- DECHEMA, Germany. 1992: Soil decontamination using biological processes. International Symposium.
- MARTIN, J. P. (1950): Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci. Plant. Anal.* 7, 31–37.
- MILLS, A. (1978): Enumeration of petroleum degrading marine and estuarine microorganisms by the most-probable-number method. *Can. J. Microbiol.* 24, 552–557.
- MORELLI, I. S., VECCHIOLI, G. I., DEL PANNO, M. T., GARRÉ, M. I., COSTANZA, O. R., PAINCEIRA, M. T. (1995): Assessment of the toxic potential of hydrocarbon containing sludges. *Environ. Pollution* 89, 131–135.
- PRAMER, D., BARTHA, R. (1965): Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soils. *Soil Science* 100, 68–70.
- PRAMER, D., BARTHA, R. (1972): Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environ. Letters* 2, 217–224.
- REASONER, D., GELDREICH, E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 1–7.
- SCHNÜRER, J., ROSSWALL, T. (1982): Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256–1261.
- THALMANN, A. (1968): Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21, 249–258.
- VECCHIOLI, G., DEL PANNO, M. T., PAINCEIRA, M. T. (1990): Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environ. Pollution* 67, 249–258.
- WRENN, B. A., VENOSA, A. D. (1996): Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252–258.

Analytische Methoden zur chemischen Charakterisierung komplexer Kohlenwasserstoffgemische

O. R. COSTANZA, G. I. VECCHIOLI, S. A. GIORGIERI, M. T. PAINCEIRA

Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentinien

1. Einleitung

Das Hauptproblem der Analyse von Kohlenwasserstoffen in Altlasten und Böden ist das gleichzeitige Vorhandensein von hunderten von verschiedenen Komponenten, sowohl aliphatischer als auch aromatischer Art. Im allgemeinen ist vor der Analyse eine Auftrennung der Inhaltsstoffe in Klassen mit gleicher Struktur notwendig. Viele Vorschriften zur Fraktionierung umfassen Kombinationen von Trennmethoden, benötigen große Lösungsmittelvolumina und lange Prozesszeiten, die nicht vereinbar sind mit der für Routineanalysen benötigten Schnelligkeit (BUNDT et al. 1991). Die vorliegende Arbeit präsentiert verschiedene Ansätze, in denen die Implementation chromatographischer Techniken und Verfahren zur Charakterisierung von komplexen Kohlenwasserstoffgemischen beschrieben wird. Die Ergebnisse werden mit Daten verglichen, die mit anderen, anspruchsvolleren Techniken und mit gravimetrischen Techniken erhalten wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der komplexen Kohlenwasserstoffgemische

Industrierückstände und kontaminierte Erde.

2.2 Probenbearbeitung

2.2.1 Qualitative Bestimmungen

Extraktion der Rückstände: Ein Aliquot der Probe (50 mg), auf Papiertüchern teilweise entwässert, wurde in einen Kolben mit Extraktionsmittel (2 ml) überführt. Bei Zimmertemperatur wird durch Schütteln mit der Hand extrahiert (10 min). Vor der chromatographischen Analyse wird der Extrakt filtriert (Papierfilter).

Extraktion der Erde: Die kontaminierte Bodenprobe (25 g) wird mit Na_2SO_4 -Anhydrid (25 g) gemischt. Das Gemisch wird unter Verwendung von n-Hexan als Extraktionsmittel für 6 h im Soxhlet extrahiert. Anschließend wird das Volumen bis auf 5 ml eingeeengt. Dieses Konzentrat wird gaschromatographisch (GC) analysiert.

Die Charakterisierung der in der Probe vorhandenen Kohlenwasserstoffe wurde durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen eines Standards (44 Kohlenwasserstoffe) ermittelt.

2.2.2 Quantitative Bestimmungen

Gravimetrie: Die quantitative Analyse der Rückstände und der kontaminierten Erde erfolgte nach der Methode von DIBBLE und BARTHA (1979).

Chromatographien:

Extraktion der Rückstände: Die Form der Extraktion entspricht der unter qualitativen Bestimmungen beschriebenen, jedoch unter Zufügen eines internen Standards. Um den Kohlenwasserstoffgehalt pro g Trockengewicht des Rückstands angeben zu können, wurde ein Aliquot des teilweise entwässerten Rückstands für 12 h in einen Trockner mit CaCl_2 gegeben.

Extraktion der Erde: Die Probe wurde wie unter *Qualitative Bestimmungen* beschrieben bearbeitet, jedoch wurde vor der Extraktion ein interner Standard zugefügt.

Chromatographische Methode: Verwendet wurde ein Chromatograph der Fa. Perkin-Elmer mit einer Kapillarsäule (50 m - 0,25 mm ID) nicht polar (95% Methyl, 5% Phenyl) mit FID Detektor, Trägergas Stickstoff, Temperaturprogramm:

$T_1 = 50^\circ\text{C}$	$t_1 = 4 \text{ min}$	$r_1 = 4 \text{ K/min}$
$T_2 = 150^\circ\text{C}$	$t_2 = 0 \text{ min}$	$r_2 = 10 \text{ K/min}$
$T_3 = 300^\circ\text{C}$	$t_3 = 15 \text{ min}$	
$T_{\text{injector}} = 280^\circ\text{C}$	$T_{\text{detector}} = 300^\circ\text{C}$	

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Analyse von komplexen Kohlenwasserstoffgemischen

Es wurde mit zwei Rückständen unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung gearbeitet. Einer davon stammt aus der direkten Behandlung petrochemischer Abwässer (API-2) und hat einen hohen Gehalt an polycyclischen Kohlenwasserstoffen (PAKs). Der andere hat seinen Ursprung in der Extraktion von Rohöl (RCP) und besteht hauptsächlich aus Aliphaten.

Auswahl des Extraktionsmittels: Um qualitativ die Extraktionseffektivität zu bestimmen, wurden beide Rückstände mit n-Hexan, Chloroform und Aceton/Benzol (1:1 v/v) extrahiert. Die erhaltenen Extrakte beider Rückstände haben eine sehr komplexe Zusammensetzung unabhängig vom verwendeten Extraktionsmittel.

Die im API Rückstand enthaltenen Kohlenwasserstoffe wurden effizienter mit der Mischung Aceton/Benzol als mit Chloroform oder n-Hexan extrahiert, was an der Anzahl der Peaks und an der Peakfläche einzelner Kohlenwasserstoffe abzulesen war (GIORGIERI et al. 1996). Die Ergebnisse der Aceton/Benzol-Extraktion stimmen mit denen überein, die sowohl nach einer Extraktion mit Ultraschallbehandlung als auch durch konventionelle Extraktion unter Rückfluß erhalten wurden (REMMLER et al. 1995). In allen Fällen bestehen die Extrakte überwiegend aus PAKs.

Betrachtet man die Fraktion der leicht flüchtigen Kohlenwasserstoffe (BTEX) im RCP-Rückstand, so verlief die Extraktion mit Chloroform zufriedenstellend, obwohl eine Extraktion mit Aceton/Benzol effizienter war. Dagegen war eine Extraktion dieser Inhaltsstoffe mit

n-Hexan nicht möglich (GIORGIERI et al. 1996). In diesem Fall wiesen die Extrakte hauptsächlich Aliphaten auf.

Obwohl die untersuchten Rückstände von unterschiedlicher Herkunft waren und eine deutlich unterschiedliche Kohlenwasserstoffzusammensetzung aufwiesen, zeigten die Resultate der Analysen beider Rückstände, daß die Extraktion mit Aceton/Benzol die Effizienteste war.

3.2 Quantitative Analyse von komplexen Kohlenwasserstoffgemischen

Für diese Versuche wurden API2-Rückstand und mit 10% (g/g) des Rückstands versetzte Erde, eingesetzt. Der Kohlenwasserstoffgehalt beider Proben wurde gravimetrisch und chromatographisch ermittelt. Zur chromatographischen Bestimmung wurde n-Hexadekan als interner Standard verwendet. Durch Vergleich der erhaltenen Daten mit denen von REMMLER et al. (1995) wurde die Wiederfindungsrate der verwendeten Techniken bestimmt.

Rückstände: Berücksichtigt man die Heterogenität des Rückstandes, so stimmen die Ergebnisse der Chromatographie (91 g/kg) mit den Ergebnissen, die unter Verwendung thermoanalytischer Methoden in Kombination mit verschiedenen Extraktionsverfahren (REMMLER et al. 1995) erhalten wurden (93 g/kg), gut überein. Die Werte, die mit Hilfe der Gravimetrie erhalten wurden (116 g/kg), sind ebenfalls vergleichbar, sofern man berücksichtigt, daß diese Werte auch die Asphaltene einschließen, die per GC nicht detektiert werden können. Mittels der Gravimetrie wurde die Fraktion der Aromaten mit 62% als Hauptfraktion nachgewiesen (Tab. 1), was den Werten von REMMLER et al. (1995) entsprach. Ebenso wurden vergleichbare Resultate erzielt, indem 12 PAKs als Hauptbestandteile der Rückstände identifiziert wurden. Die Übereinstimmungen mit den von REMMLER et al. erzielten Daten beweisen, daß die angewendeten Methoden geeignet waren Ergebnisse zu reproduzieren, die mit erheblich anspruchsvolleren Techniken erzielt worden waren.

Tab. 1: Fraktionierung des API2 Rückstands in der FEE* Säule

Fraktion	g der Fraktion / 100g FEE*
Aliphaten	17,7
Aromaten	55,7
Asphaltene	26,6

* FEE = extrahierbarer Anteil

Erde: Es wurde die Wiederfindungsrate der verwendeten Extraktionstechnik bestimmt und mit den Ergebnissen der Charakterisierung der Rückstände mittels GC verglichen. Alle Kohlenwasserstoffe, die im API2-Rückstand nach Aceton/Benzol-Extraktion (ausgenommen Xylen, n-C26 und n-C27) nachweisbar waren, waren auch in der mit Rückstand versetzten Erdprobe nach einer n-Hexan-Extraktion im Soxhlet nachweisbar.

Die Kohlenwasserstoffkonzentration in Boden, dem 10% Rückstand zugegeben worden war, betrug 8 g/kg Trockengewicht, was mit einer nachgewiesenen Konzentration von 91 g/kg in diesem Rückstand übereinstimmte. Die jeweilige prozentuale Verteilung der ausgewählten Verbindungen in der Mischung aus Erde und Rückstand korrelierte ebenfalls ($r^2 = 0,9931$) mit der im Rückstand selbst (Tab. 2). Die gute Korrelation dieser Ergebnisse bestätigt die Effizienz des Lösungsmittels n-Hexan, wenn die Inhaltsstoffe des Rückstandes mittels Soxhletextraktion gewonnen werden.

Tab. 2: Relative Konzentration an ausgewählten PAKs im API-2A Rückstand und im Erde-Rückstand-System

VERBINDUNG	RÜCKSTAND (g PAK/100 g ausgewählter PAKs)	ERDE-RÜCKSTAND (g PAK/100g ausgewählter PAKs)
Naphthalin	35,02	29,71
Methylnaphthalin	16,10	14,90
Biphenyl	4,83	4,85
Acenaphthalin	11,25	10,59
Acenaphthen	3,63	2,54
Fluoren	6,75	7,08
Phenanthren	15,46	14,68
Anthracen	4,70	4,92
Fluoranthren	2,35	3,17
Pyren	5,18	5,38
Benzo(a)anthracen	1,52	1,49
Crysen	1,09	0,68

3.3 Verlauf der Elimination von Kohlenwasserstoffen in Bioremediationsprozessen

In diesem Ansatz wurde dasselbe System, das für den vorangegangenen Ansatz beschrieben wurde, eingesetzt (Erde mit Zusatz von 10% (g/g) API-2-Rückstand). Zu Beginn der Untersuchung und nach 365 Tagen biologischer Behandlung wurden Kohlenwasserstoffbestimmungen mit gravimetrischen und chromatographischen Methoden durchgeführt.

Die Ergebnisse der Chromatographie zu Beginn (Tag 0) wurden bereits im vorangegangenen Ansatz beschrieben. Die Ergebnisse der Gravimetrie zeigen einen etherextrahierbaren Anteil von 10,4 g/kg Trockengewicht. Nach 365 Tagen betrugen die Werte bei gaschromatographischer Bestimmung 0,4 g/kg Trockengewicht und 5,7 g/kg Trockengewicht bei gravimetrischer Bestimmung.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit beiden Methoden für den ersten Tag vergleichbare Werte für den Gesamtkohlenwasserstoffgehalt erzielt werden konnten. Obwohl von dem mit Ether extrahierbaren Anteil der Gehalt an Asphaltenen abgezogen worden war, erhielten wir einen Gesamtkohlenwasserstoffgehalt von 6,4 g. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die 8 g, die gaschromatographisch bestimmt wurden. Diese Übereinstimmung gilt jedoch nicht für die Analysendaten nach 365 Tagen. Dort ist der mit Ether extrahierbare Anteil eine Größenordnung größer als der Anteil, der per GC bestimmt werden kann. Diese Differenz könnte ihre Ursache in der Anwesenheit von Asphaltenen und in Abbauprodukten haben, die gaschromatographisch nicht nachweisbar sind.

Die Unterschiede zwischen den Methoden beeinflussen die Beurteilung der Kohlenwasserstoff-elimination des Systems stark. Mit der gravimetrischen Methode wurde eine Elimination von 45% des etherextrahierbaren Anteils bestimmt, während anhand der gaschromatographischen Bestimmung eine Elimination von 94% nachgewiesen wurde. Folglich führt die gravimetrische Bestimmungsmethode zu einer Unterschätzung der Effizienz des Biodegradationsprozesses.

4. Schlußfolgerungen

Es wurde eine einfache, schnelle und ökonomische Methode zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung von Kohlenwasserstoffen in Rückständen und Böden unterschiedlicher Herkunft entwickelt. Die Ergebnisse bezüglich der Analyse der Einzelkomponenten und Summenparameter zeigen, daß die Selektivität und Effizienz der hier vorgestellten Techniken mit denen vergleichbar ist, die an anderer Stelle mit anspruchsvolleren Methoden erhalten wurden. Unter Verwendung dieser Methoden war es möglich, Aliphaten, Monoaromaten, Diaromaten und Polyaromaten sowohl aus Rückständen als auch aus kontaminierter Erde zu extrahieren, aufzutrennen und gaschromatographisch zu identifizieren.

Der Vergleich der Ergebnisse der gaschromatographischen mit denen der gravimetrischen Methode zeigt, daß letztere effektiv und mit der GC-Methode in Bezug auf die Charakterisierung von Rückständen und die Erfassung von frisch kontaminierten Böden vergleichbar ist.

Literatur

- BUNDT, J., HERBEL, W., STEINHART, H., FRANKE, S., FRANKE, W. (1991): Structure-type separation of diesel fuels by solid phase extraction and identification of two- and three-ring aromatics by capillary GC-Mass spectrometry. *J. of High Resolution Chromatography* 14, 91-98.
- DIBBLE, J., BARTHA, R. (1979): Effect of environmental parameters on biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 729-739.
- GIOGIERI, S., COSTANZA, O., VECCHIOLI, G., DELLA VEDOVA, C., PAINCEIRA, M. T. 1996: Seguimiento cromatográfico de hidrocarburos durante la biorremediación de suelos. VI Congreso Latinoamericano de Cromatografía, Enero 23 -25, Caracas, Venezuela.
- GIOGIERI, S., COSTANZA, O., VECCHIOLI, G., DELLA VEDOVA, C., PAINCEIRA, M. T., REMMLER, M. 1996: Análisis cromatográfico de residuo de piletas de extracción de crudo de petróleo y de tierra contaminada con dicho residuo. VI Congreso Latinoamericano de Cromatografía, Enero 23 -25, Caracas, Venezuela.
- REMMLER, M., KOPINKE, F. D., STOTTMEISTER, U. (1995): Termoanalytical methods for characterizing hydrocarbon - sludge - soil mixtures. *Termochimica Acta* 263, 101-112.

Charakterisierung der Toxizität komplexer Kohlenwasserstoffgemische

I. S. MORELLI¹, G. I. VECCHIOLI¹, O. R. COSTANZA¹, M. T. DEL PANNO¹, M. I. GARRÉ¹,
L. BERTHE-CORTI², M. T. PAINCEIRA¹

¹Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentinien

²Universität Oldenburg, FB Biologie, AG Mikrobiologie/Biotechnologie, Postf. 2503, 26111 Oldenburg, Deutschland

1. Einleitung

Die Einschätzung der Toxizität eines komplexen Kohlenwasserstoffgemisches basiert unter anderem auf der Kenntnis der Prozesse, in deren Verlauf das zu untersuchende Gemisch anfällt und auf der biologischen und chemischen Charakteristik des Gemisches (BROWN et al. 1983).

Es gibt weder biologischen Tests noch gibt es einzelne Spezies, mit denen die toxischen Effekte aller chemischen Verbindungen oder einer Substanzmischung detektiert werden können. Daher ist es notwendig Testbatterien einzusetzen. Viele Aspekte der Toxizität von Substanzgemischen sind mit Hilfe von bakteriellen Tests erfaßt worden, da die Anwendung dieser Tests sehr praktisch ist (Mikroorganismen haben einen kurzen Lebenszyklus und sind stabil und leicht zu kultivieren). Die Erfassung der toxischen Wirkung von Substanzgemischen auf Bakterien ist unerlässlich, da u.a. die bakterielle Aktivität eine grundlegende Voraussetzung für Biodegradationsprozesse ist.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Batterie von Kurzzeittests vorgestellt, die es erlaubt, ausgewählte Aspekte der Toxizität der genannten Gemische zu bestimmen.

2. Material und Methoden

2.1 Rückstände

Es wurden vier kohlenwasserstoffhaltige Rückstände unterschiedlicher Herkunft untersucht (API-1, API-2, API-2N und RBT). Die Rückstände API-1 und API-2 wurden aus Lagerbecken gezogen, während API-2N und RBT nicht gelagerte Rückstände waren. Folgende Parameter wurden bestimmt:

a) Das toxische Potential für die Bodenflora: Test zur Hemmung der Aktivität der bakteriellen Bodenflora, die auf Plate-Count-Agar (Difco) kultivierbar ist (USEPA 1986). Test zur Keimung und zum Wurzellängenwachstum von *L. sativa* (KWAN 1991).

b) Charakterisierung der Toxizität: Wachstumsinhibitionstest von *B. cereus* auf festem Medium (LIU et al. 1989), Resazurinreduktionstest (THOMSON et al. 1986), Test zur Toxizität von Schwermetallen MetPLATE™ (Group 206 Technologies, Gainesville, Fl.).

c) Genotoxizität: Ames-Mutagenitätstest (MARON und AMES 1983). Verwendet wurde der Stamm *Salmonella typhimurium* TA98 mit und ohne Einsatz einer mikrosomalen S9-Fraktion. Die S9-Fraktion wurde aus mit 20-Methylcholanthren induzierter Hamsterleber isoliert

(PHILLIPSON et al. 1989). Die in den Ames-Tests eingesetzten Kohlenwasserstoffrückstände wurden mit Cyclohexan extrahiert und anschließend in DMSO gelöst (BLACKBURN et al. 1986).

2.2 Ether extrahierbare Fraktion der Rückstände

Bestimmt wurde: Wachstumshemmung von *B. cereus* auf festem Medium, Inhibierung des Wachstums in Flüssigmedium (MORELLI et al. 1995), Hemmung der Resazurinreduktion, Genotoxizität im Ames-Test.

2.3 Mit API-2-Rückstand kontaminierte Erde

Je 100 g trockene Erde wurden mit 2,5 g Rückstand versetzt. Die Erde-Rückstand-Systeme wurde bei einer Temperatur von 21°C mit regelmäßiger Befeuchtung und Belüftung gehalten. Die Toxizität wurde nach 0, 45, 90, 180 und 373 Tagen bestimmt. Für die Toxizitätsbestimmung wurden zwei Extraktionen pro System durchgeführt (MARK et al. 1987).

a) Wäßrige Fraktion: Test auf Samenkeimung und Wurzellängenwachstum, Test auf Schwermetalltoxizität MetPLATE™.

b) Acetonitril-Fraktion: Test auf Inhibierung des Wachstums von *B. cereus* auf festem Medium, Test auf Wachstumshemmung in flüssigem Medium, Test auf Hemmung der Resazurinreduktion, Mutagenitätstest von Ames.

3. Ergebnisse

3.1 Rückstände

Mit der vorgeschlagenen Testbatterie konnte gezeigt werden, daß die Rückstände auf Bakterien nicht toxisch wirken. Es wurde kein hemmender Effekt auf die Bakterienflora des Boden beobachtet (Abb. 1a). In keinem Fall konnte bei Wachstum von *B. cereus* auf festem Medium ein Hemmhof nachgewiesen werden, noch konnte eine Hemmung der Resazurinreduktion nachgewiesen werden. Nur im Schwermetalltoxizitätstest konnte Toxizität nachgewiesen werden. Hier wurde mit konzentriertem und 1:2 verdünntem API-2-Rückstand ein toxischer Effekt erzielt.

Im Gegensatz dazu wirkten alle Rückstände stark inhibitorisch auf die Keimung und Wurzelwachstum von *L. sativa* Samen (Abb. 1b).

Der API-2-Rückstand wirkte auf *Salmonella typhimurium* TA98 direkt und indirekt (mit metabolischer Aktivierung, S9) mutagen. Die Rückstände API-2N und RBT wiesen kein mutagenes Potential auf (Abb. 1c und d). API-1 konnte mit der verwendeten Methode nicht extrahiert werden.

3.2 Ether extrahierbare Fraktion der Rückstände

Die etherextrahierbare Fraktion aller Rückstände zeigte Bakterientoxizität. Alle Rückstände (etherextrahierbare Fraktion) inhibierten die Resazurinreduktion (Abb. 2a). Hierbei zeigte die

etherextrahierbare Fraktion von API-2N und RBT eine stärkere toxische Wirkung als die etherextrahierbare Fraktion der gelagerten Rückstände.

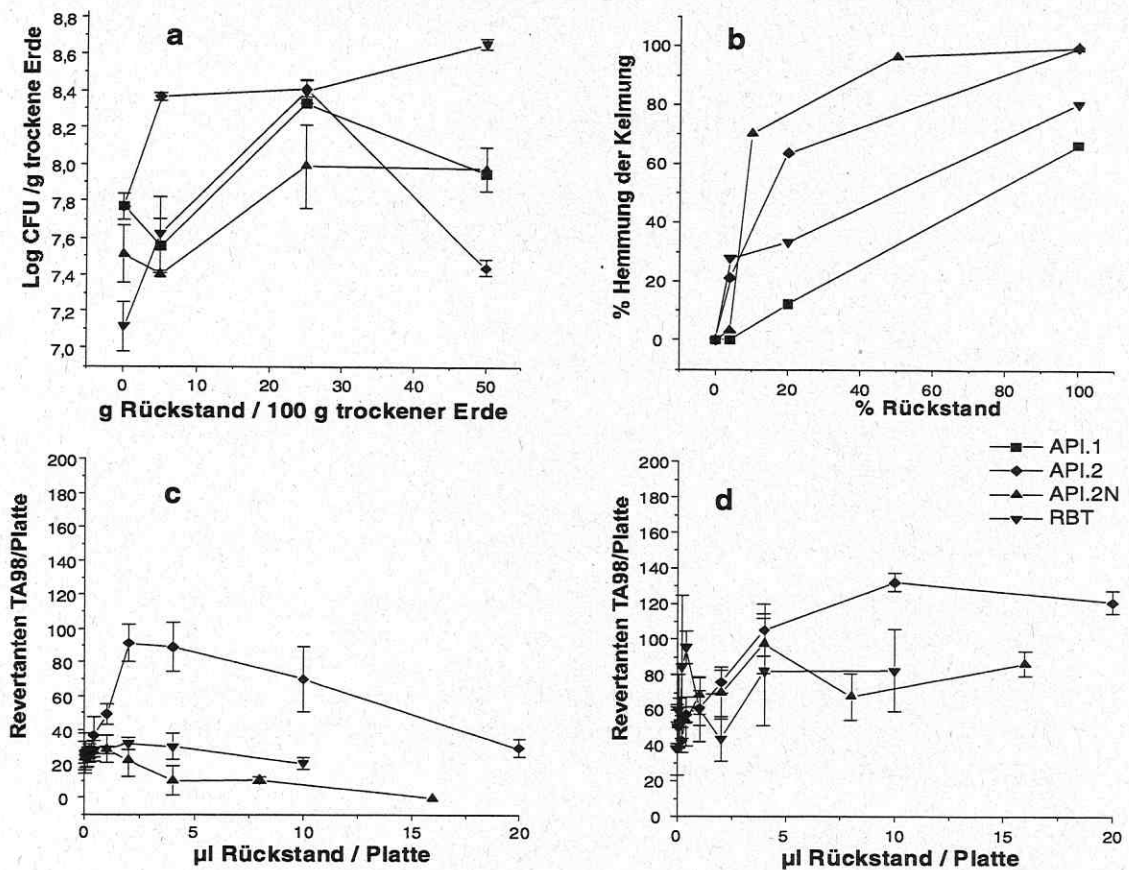


Abb. 1: Charakterisierung der Toxizität der Rückstände:

- a) Test zur Hemmung der auf Plate-Count-Agar kultivierbaren Bakterienflora des Bodens;
- b) Test auf Hemmung der Samenkeimung von *L. sativa*;
- c) Ames-Mutagenitätstest, Stamm *S. typhimurium* TA98;
- d) Ames-Mutagenitätstest, Stamm *S. typhimurium* TA98 mit metabolischer Aktivierung (S9-Fraktion)

Es konnte nachgewiesen werden, daß der von LIU et al. (1989) beschriebene Wachstumstest mit *B. cereus* auf festem Medium für die eingesetzte Probenart nicht geeignet war. Dasselbe galt für gesättigte Lösungen von Naphthalin und Benzo(a)pyren. Trotzdem konnte unter Verwendung einer *B. cereus* Kultur aus der frühen logarithmischen Phase die Toxizität von Naphthalin und der etherextrahierbaren Fraktion des API-2 Rückstandes nachgewiesen und der Test im Flüssigmedium durchgeführt werden (Abb. 2b).

Die etherextrahierbare Fraktion der Rückstände API-1 und API-2 zeigte nur eine indirekte mutagene Wirkung.

3.3 Kontaminierte Böden

Der wäßrige Extrakt war im MetPLATE™-Test nicht toxisch. Jedoch wurde zu Beginn des Versuchs (Tag 0) eine Hemmung der Keimung von *L. sativa* Samen festgestellt. Nach 45 Ta-

gen war der hemmende Effekt stärker und blieb bis zum 180. Tag konstant. Nach 1 Jahr Inkubation lag die Toxizität auf dem Niveau der Nullkontrolle (Abb. 3a). Im Gegensatz zur Keimung war für das Wurzelwachstum kein nennenswerter inhibitorischer Effekt nachweisbar.

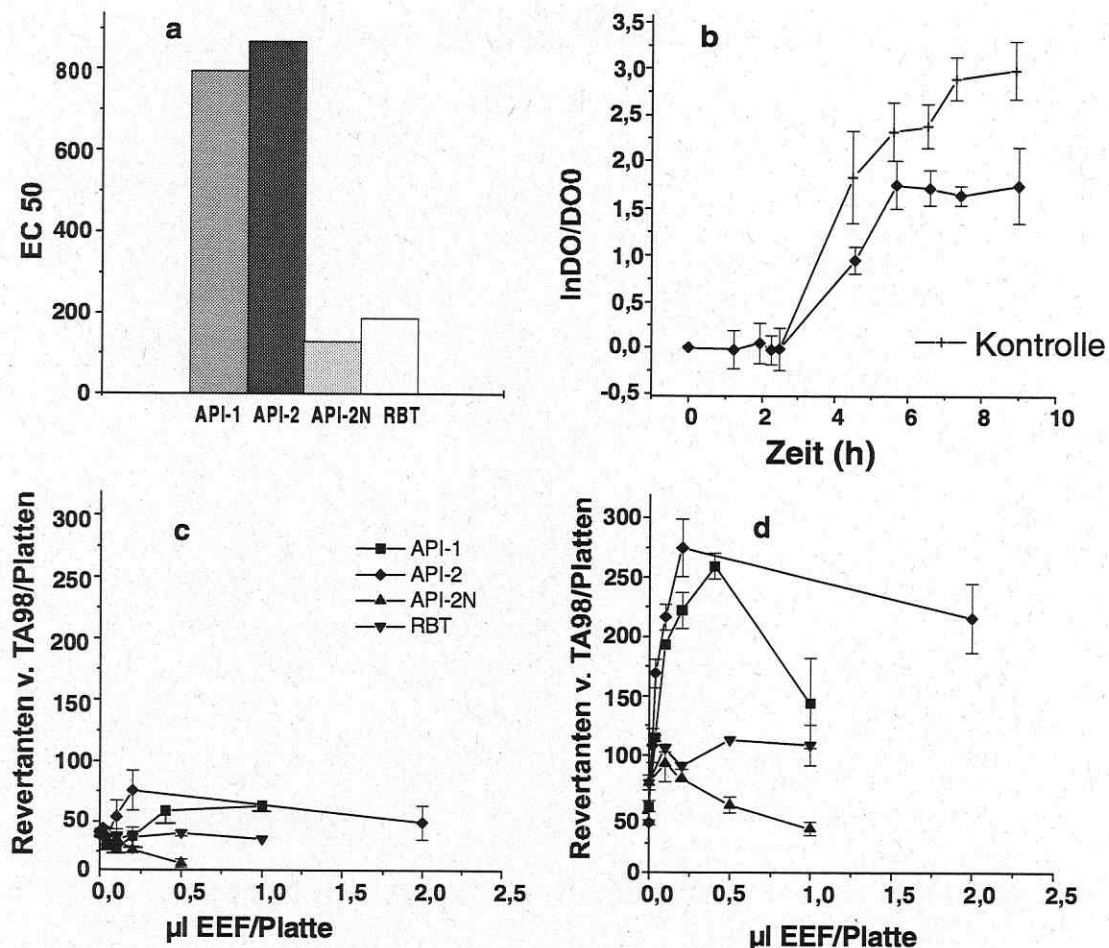


Abb. 2: Charakterisierung der Toxizität der etherextrahierbaren Fraktion der Rückstände:
a) Test auf Inhibierung der Resazurinreduktion;
b) Test auf Inhibierung des Wachstums von *B. cereus* in Flüssigkultur;
c) Ames-Mutagenitätstest Stamm *S. typhimurium* TA98;
d) Ames-Mutagenitätstest Stamm *S. typhimurium* TA98 mit metabolischer Aktivierung (microsomale S9-Fraktion)

Der Acetonitrilextrakt bewirkte keine Wachstumsinhibition von *B. cereus* (Abb. 3b), ebenso war keine Hemmung der Resazurinreduktion nachweisbar.

Er zeigte jedoch eine direkte und indirekte mutagene Wirkung. Der direkte mutagene Effekt nahm im Verlauf der Inkubation zwar ab, sank jedoch im kontaminierten Boden innerhalb eines Jahres nicht ganz auf den Wert des Kontrollbodens. Die Mutagenität blieb konstant auf einem Niveau oder stieg sogar an (Abb. 3c). Die indirekte Mutagenität wies nach der Kontamination nur steigende Werte auf (Abb. 3d).

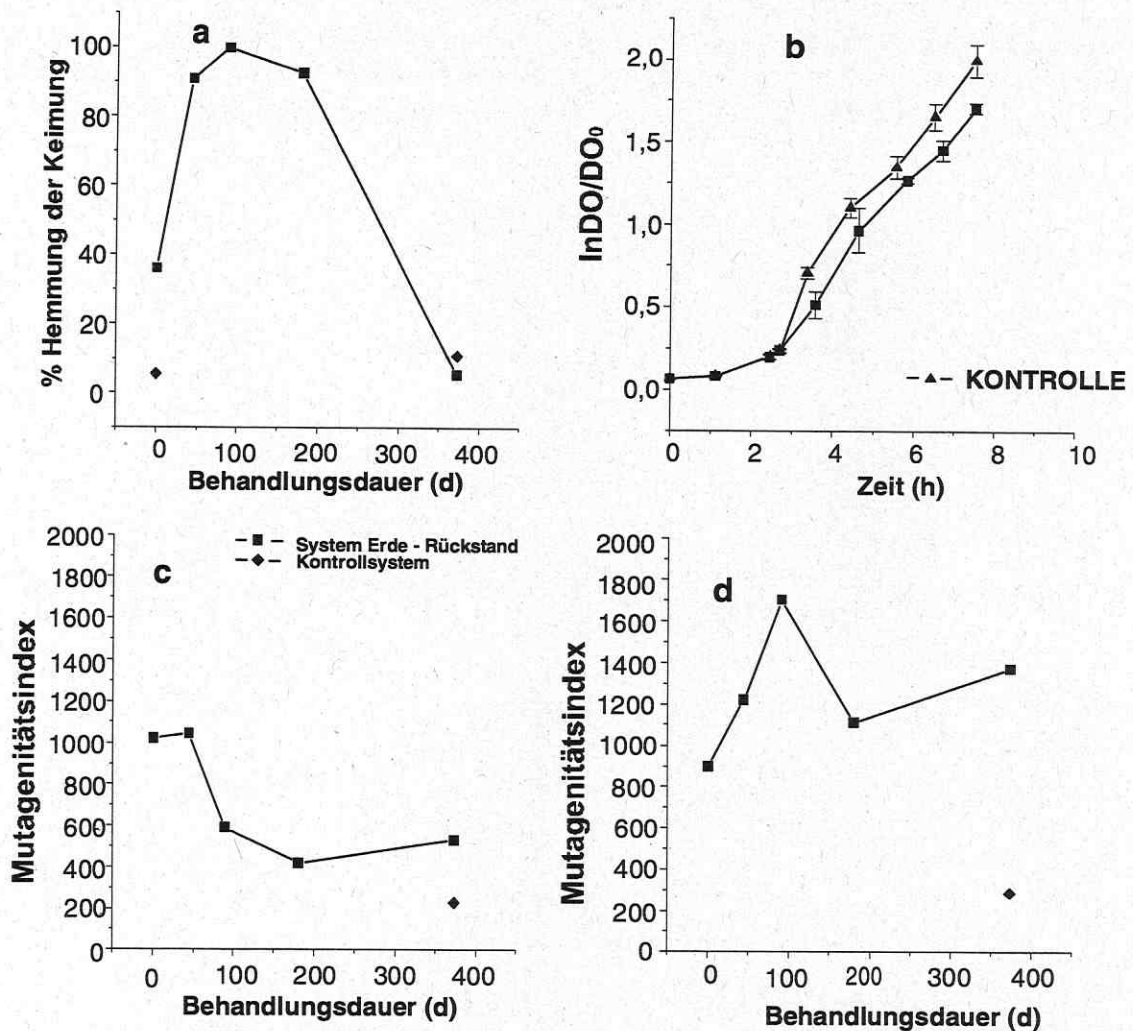


Abb. 3: Charakterisierung der Toxizität des mit API-2 kontaminierten Bodens. Monitoring der zeitlichen Veränderung:
a) Test der Samenkeimung von *L. sativa*.;
b) Test auf Wachstum von *B. cereus* in Flüssigmedium;
c) Ames-Mutagenitätstest mit dem Stamm *S. typhimurium* TA 98;
d) Ames-Mutagenitätstest mit dem Stamm *S. typhimurium* TA 98 mit metabolischer Aktivierung

4. Schlußfolgerung

Einige Tests mußten modifiziert werden, um sie an die untersuchten Systeme anzupassen. Keiner der Rückstände zeigte Bakterientoxizität (Wachstum und Resazurinreduktion). Damit wird deutlich, daß eine bakterielle Behandlung der Rückstände eine potentielle Möglichkeit zur Sanierung ist. Im Gegensatz dazu bewirkten alle Rückstände eine Hemmung der Keimung von Samen und einige erwiesen sich als mutagen. Die etherextrahierbare Fraktion zeigte in allen Fällen eine toxische Wirkung auf Bakterien (Wachstum und Resazurinreduktion), jedoch wies nur die etherextrahierbare Fraktion der gelagerten Schlämme (API-1, API-2) Mutagenität auf.

Mit der Testbatterie war es möglich, die Toxizität von kontaminierten Böden zu charakterisieren und die Toxizitätsveränderung im Untersuchungszeitraum zu verfolgen.

Literatur

- BLACKBURN, G. R., Deutch, R. A., Schreiner, C. A., Mackerer, C. R. (1986): Predicting carcinogenicity of petroleum distillation fractions using a modified *Salmonella* mutagenicity Assay. Cell. Biol. Toxicol. 2, 63-84.
- BROWN, K. W. and Associates, Inc. 1983: Hazardous waste land treatment. Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Washington, USA.
- KWAN, K. K. 1991: Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. Workshop.
- LIU, D. L., CHAU, Y. K., DUTKA, B. J. (1989): Rapid toxicity assessment of water soluble and water insoluble chemical using a modified agar plate method. Wat. Res. 23, 333-339.
- MARK, G., KUIZE, B., TAKEMOTO, E., PAT, K., LAMES, S. (1987): The characterization of the mutagenic activity of soil. Mutation Res. 192, 23-30.
- MARON, D. M., AMES, B. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res. 113, 173-215.
- MORELLI, I. S., GARRÉ, M. I., GARROTE, G., LOPEZ GARCÍA, S., PRADO, A., VECCHIOLI, G. I., PAINCEIRA, M. T. 1995: Estudio comparativo de bioensayos microbiológicos para determinar toxicidad de compuestos químicos insolubles en agua. C 14 en Actas del VII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires. 8 al 11 de mayo de 1995.
- PHILLIPSON, C. E., IOANNIDES, C. (1989): Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutagens in the Ames test by various animal specie including man. Mutation Res. 211, 147-151.
- THOMSOM, K., LIU, D., KAISER, K. L. E. (1986): A direct resazurin test for measuring chemical toxicity. Toxicity Assessment, An Internat. Quart. 1, 407-418.
- USEPA, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory. 1986: Office of research and development. U.S. Enviromental Protection Agency. Waste/Soil treatability studies for four complex industrial waste: Methodologies and results.

Mikrobielle Ökologie von mit komplexen Kohlenwasserstoffgemischen kontaminiertem Milieu

M. T. DEL PANNO, O. R. COSTANZA, I. S. MORELLI, M. GARRÉ, G. I. VECCHIOLI, M.T. PAINCEIRA

Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentinien

1. Einleitung

Die Kenntnis der qualitativen und quantitativen Wechselwirkung der Mikroorganismen in einem Ökosystem liefert wertvolle Information in Hinblick auf das Potential des Ökosystems im biogeochemischen Kreislauf. Die Umweltfaktoren in einem Ökosystem bestimmen die qualitative und quantitative Zusammensetzung seiner bakteriellen Population. Jede Veränderung, die Abbauprozesse betrifft, wie sie z.B. durch Kohlenwasserstoffkontaminationen hervorgerufen werden, führt zu Veränderungen in der Biozönose der autochthonen Bakterien (VESTAL et al. 1984).

In der vorliegenden Arbeit wird die bakterielle Population untersucht, die in zwei hochgradig mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Lebensräumen vorherrscht: in Lagunen gespeicherte petrochemische Rückstände und mit denselben Rückständen kontaminierte Böden. Zusätzlich wird die Veränderung der bakteriellen Biozönose im nicht belasteten Boden untersucht, die durch eine Kontamination des Bodens mit petrochemischen Rückständen hervorgerufen wird.

2. Material und Methoden

Rückstand: Es handelt sich um Schlämme der ersten Behandlungsstufe von Abwässern eines petrochemischen Betriebs, die mit Kohlenwasserstoffen, mehrheitlich Aromaten, kontaminiert sind (91 g/kg) (VECCHIOLI et al. 1997). Ihre Zusammensetzung ist der von Kohle-Teeröl (Creosote), einer Substanz die zur Unterdrückung des mikrobiellen Wachstums in Holz verwendet wird, vergleichbar (RITTER und SCARBOROUGH 1995).

Boden: Die Proben entsprechen dem A Horizont eines stark lehmigen Bodens.

Zusammensetzung: Organischer Kohlenstoff: 2,9%; Organische Substanz: 5%; Gesamtstickstoff: 0,27% und verfügbarer Phosphor: 0,0034%; pH: 5,5 – 5,7.

Kontaminierte Böden: Bodenproben wurden mit aufsteigenden Mengen an Rückständen kontaminiert: 2,5%, 5%, 10% g/g, äquivalent zu 1405 ppm, 2196 ppm und 7290 ppm chromatographierbarer Kohlenwasserstoff.

Monitoring des Bodens: Mittels der Bestimmung der Keimzahl heterotropher Bakterien, der Keimzahl kohlenwasserstoffabbauender Bakterien und der biologischen Aktivität analysiert als Dehydrogenaseaktivität mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Die Systeme wurden bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$ und einem Feuchtigkeitsgehalt von 20% inkubiert.

Keimzahlbestimmungsmethoden: Keimzahlbestimmung der auf R2A-Agar kultivierbaren heterotrophen Bakterien und der Bakterien, die die Kohlenwasserstoff-Fraktion der Rückstände im MPN-Ansatz verwerten können. Die Techniken wurden im Artikel „Biologische Sanierung von mit komplexen Kohlenwasserstoffgemischen kontaminierten Böden“ beschrieben.

Isolierung und Charakterisierung von Stämmen: Ausgehend von der Bestimmung der heterotrophen Bakterien in den Rückständen des nicht kontaminierten Bodens und des kontaminierten Bodens wurden von R3A-Agar-Platten identischer Verdünnungen 20 - 30 Kolonien abgeimpft. Ausgehend von den positiven Röhren aus der jeweils höchsten MPN-Verdünnung wurden die kohlenwasserstoffabbauenden Bakterien isoliert.

Die aus dem Schlamm isolierten Stämme wurden wie folgt charakterisiert: Gram-Färbung, Entwicklung auf Cetrimid-Agar, Fähigkeit auf der Kohlenwasserstofffraktion der Rückstände zu wachsen, Verwertung von Phenanthren und n-Hexadekan als alleiniger Energiequelle und Produktion von Tensiden (ZAJIC und MAHOMEDY 1984).

Die dominierenden Stämme in den Bodensystemen wurden 35 Tage nach Applikation des Rückstands (Phase der maximalen Zellzahl heterotropher und kohlenwasserstoffabbauender Bakterien und zeitlich dicht bei der höchsten bakteriellen Aktivität) und 1 Jahr nach der Kontamination isoliert. Diese Stämme wurden wie folgt charakterisiert: Gram-Färbung, Beweglichkeit, bakterielle Morphologie, Koloniefarbe, oxidative und fermentative Nutzung von Glucose, Katalase- und Oxidaseaktivität.

Die Gram-negativen Stämme, die Glucose nicht vergären, wurden mit Hilfe des API-20 NE-Systems von bioMerieux bestimmt, die übrigen wurden physiologisch und mittels manueller Identifikation auf dem Niveau von Familien oder Genera eingeordnet (TAKATA et al. 1992).

Datenanalyse: Die Profile der biochemischen Tests und die Substratverwertung der Gram-negativen Stämme, die Glucose nicht vergären, wurden analysiert und mit den Referenzstämmen des API 20NE-Systems mittels hierarchischer Gruppierung (Mittelwertsverknüpfung-UPGMA) verglichen. Basierend auf den resultierenden Dendrogrammen wurden die Stämme auf der Ebene der Genera mit einer Ähnlichkeit zu den Referenzstämmen zwischen 61 und 100% klassifiziert. Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse, PCA, wurde eine vergleichende Analyse der Profile der Gesamtheit der im unbelasteten Boden dominierenden Stämme und der Stämme, die nach 35 Tagen und nach 1 Jahr aus dem kontaminierten Boden isoliert worden waren, durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Rückstände: Die Rückstände wiesen Zellzahlen an heterotrophen Organismen von $1,8 \cdot 10^8$ cfu/g und im MPN-Ansatz $3,3 \cdot 10^8$ kohlenwasserstoffabbauende Organismen auf.

Die isolierten Stämme sind mehrheitlich Gram-negative Bazillen, die in der Lage sind auf den Rückständen zu wachsen. 84% wachsen auf Cetrimid-Agar, 45% produzieren Tenside, 30% wachsen mit Phenanthren (einer der hauptsächlich vorkommenden Kohlenwasserstoffe in den Rückständen). Es waren keine Stämme nachzuweisen, die auf n-Hexadekan wachsen. Hexadekan ist in den Schlämmen auch nicht enthalten. Die nachgewiesene bakterielle Population könnte als exogen bezeichnet werden, obwohl die nachgewiesenen biochemischen Eigenschaften als Hinweis dafür gelten können, daß eine Selektion von Organismen erfolgt, die durch die extremen Bedingungen, die in den Schlämmen herrschen, ausgelöst wird.

Boden: Der Gehalt an heterotrophen Bakterien im Boden ist $5 \cdot 10^7$ cfu/g trockene Erde und die Konzentration an abbauenden Bakterien, bestimmt mit der MPN-Methode, ist $1 \cdot 10^6$ N/g trockene Erde.

In der taxonomischen Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft überwiegen die coryneformen Bakterien (35%), gefolgt vom Genus *Pseudomonas* (20%) und von *Acinetobacter* (11%). Die Relation von Gram-positiven zu Gram-negativen Stämmen ist 57% : 43%.

Kontaminierte Böden: Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Charakteristik der Systeme zu dem Zeitpunkt, in dem die dominierenden Stämme isoliert wurden.

Alle Rückstandskonzentrationen, die dem Boden beigemischt wurden, führen zu einem Anstieg (mit einem Maximum am 35. Tag) der heterotrophen Population und der Population, die Kohlenwasserstoffe abbaut. Dieses Verhalten kann auf die Vielfalt an leicht metabolisierbaren Kohlenwasserstoffen in der frisch kontaminierten Erde (35 Tage) zurückgeführt werden die innerhalb eines Jahres durch die bakterielle Population abgebaut werden.

Tab. 1: Charakteristik der Systeme mit rückstandshaltiger Erde 35 Tage nach der Kontamination

Rückstand in der Erde (%)	Chromatographierbare Kohlenwasserstoffe (mg/kg)	Heterotrophe B. (cfu/g Boden)	KW-abbauende B. (MPN/g Boden)	Dehydrogenaseaktivität (µg/TPFg Boden)
2,5	1405	$7,5 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	20
5,0	2196	$7,0 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^7$	19,5
10,0	7290	$8,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	13,5
nicht kontam. Boden	32	$5,0 \cdot 10^7$	$1,11 \cdot 10^6$	20

Tab. 2: Charakteristik der Systeme mit rückstandshaltiger Erde 1 Jahr nach der Kontamination

Rückstand in der Erde (%)	Chromatographierbare Kohlenwasserstoffe (mg/kg)	Heterotrophe B. (cfu/g Boden)	KW-abbauende B. (MPN/g Boden)	Dehydrogenaseaktivität (µg/TPFg Boden)
2,5	292	$1,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^6$	19
5,0	239	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	28
10,0	487	$4,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^6$	65

Der mit 10% Rückstand kontaminierte Boden zeigte 35 Tage nach der Kontamination eine signifikante Veränderung des Verhältnisses von Gram-positiven zu Gram-negativen Bakterien: 33% : 67%. Am Ende des Versuchs stellte sich dieses Verhältnis wieder ein.

Tabelle 3 zeigt die dominierenden Genera 35 Tage nach der Kontamination und nach 1 Jahr. Nach 35 Tagen konnte man sehen, daß ansteigende Konzentrationen an Rückstand zu einer Zunahme des Genus *Pseudomonas* führten. Das System mit der geringsten Rückstandskonzentration hatte die höchste Diversität an Genera. Nach 360 Tagen überwog in den Systemen mit 5% und 10% Rückstand der Genus *Bacillus*.

Der Genus *Pseudomonas* nahm innerhalb eines Jahres in allen Systemen ab.

Nach 35 Tagen spiegelten die Werte der Dehydrogenaseaktivität im kontaminierten Boden nicht den erheblichen Anstieg der heterotrophen und abbauenden Population wider. Diese Aktivität erreichte maximale Werte erst 10 Tage nach dem Maximum der bakteriellen Keimzahlen.

Tab. 3: Aus den kontaminierten Systemen isolierte dominierende Genera

Kontrollboden (nicht kontam.)	35 Tage		360 Tage		
	5%	10%	2,5%	5%	10%
<i>Coryneforme</i> (35%)	<i>Coryneforme</i> (50%)	<i>Coryneforme</i> (15%)	<i>Coryneforme</i> (40%)	<i>Bazillus</i> (40%)	<i>Bazillus</i> (60%)
<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> (30%)	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> (40%)	<i>Pseudomonas</i> (60%)	<i>Agrobacterium</i> <i>Alcaligenes</i> (30%)	<i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i> (24%)	<i>Pseudomonas</i> <i>Agrobacterium</i> <i>Xantomonas</i> (32%)

Die Gram-negativen, nicht fermentativen bakteriellen Subpopulationen, die im System dominierten, wurden vergleichend mittels PCA analysiert. Eine erste Analyse umfaßte die dominierenden Stämme der kontaminierten Systeme und des nicht kontaminierten Systems zum Zeitpunkt 35 Tage. Die dreidimensionale Darstellung entspricht den ersten drei Hauptkomponenten. Aus Abbildung 1 läßt sich schließen, daß die Profile der dominierenden Stämme, die aus den kontaminierten Systemen stammen, denen aus dem nicht kontaminierten Boden ähneln. Dieses Verhalten könnte damit verknüpft sein, daß der Genus *Pseudomonas* proportional mit der Erhöhung der Kontamination zunimmt (Tab. 3). Nur in dem zu 2,5% kontaminierten Boden kann man eine Gruppierung von Stämmen erkennen, die von der Hauptgruppe in Bezug auf die PC 1 abgetrennt ist. Die geringe Konzentration an Kohlenwasserstoff war vermutlich nicht ausreichend, um hauptsächlich *Pseudomonas* zu selektionieren. Dessen ungeachtet führte sie zu einem Anstieg der heterotrophen und der abbauenden Population und einer erhöhten Diversität von Genera, die sich in den verschiedenen Profilen äußert. Vermutlich erfolgte dies auf Kosten von Verbindungen, die keine Kohlenwasserstoffe sind.

Eine zweite Analyse umfaßte die dominierenden Gram-negativen Stämme der kontaminierten Systeme und des nicht kontaminierten Systems nach Ablauf eines Jahres (Abb. 2). Zu diesem Zeitpunkt ist in allen Systemen die Keimzahl der heterotrophen und der abbauenden Population abgesunken. *Pseudomonas* ist nicht mehr dominierend, und es erscheint eine höhere Diversität an abbauenden Genera.

Die PCA in Abbildung 2 weist darauf hin, daß eine Gruppe von Stämmen des zu 5% kontaminierten Bodens, eine Gemeinschaft bildet, die in Bezug auf die PC1 sich klar vom nicht kontaminierten Boden abgrenzt. Dies weist auch darauf hin, daß das System mit 2,5% eine Verteilung an Stämmen aufweist, die auch nach 35 Tagen Kontamination beobachtet wurde. Die genannten Systeme zeigten Dehydrogenaseaktivitäten, die mit denen im nicht kontaminierten Boden vergleichbar sind. Sogar in dem System mit 10% Rückstand waren Stämme nachweisbar, deren Profile denen aus sauberem Boden sehr ähnlich sind, und die Werte für die Dehydrogenaseaktivität waren hoch. Diese kontaminierte Erde zeigte im Zeitraum zwischen 45 Tagen und einem Jahr nach der Kontamination die höchste Aktivität. Trotzdem erfolgte eine erhebliche Abnahme der kohlenwasserstoffabbauenden Population. Man muß dabei berücksichtigen, daß die untersuchten Stämme nur einen Teil der Gesamtpopulation des Bodens darstellen: lebende kultivierbare Bakterien.

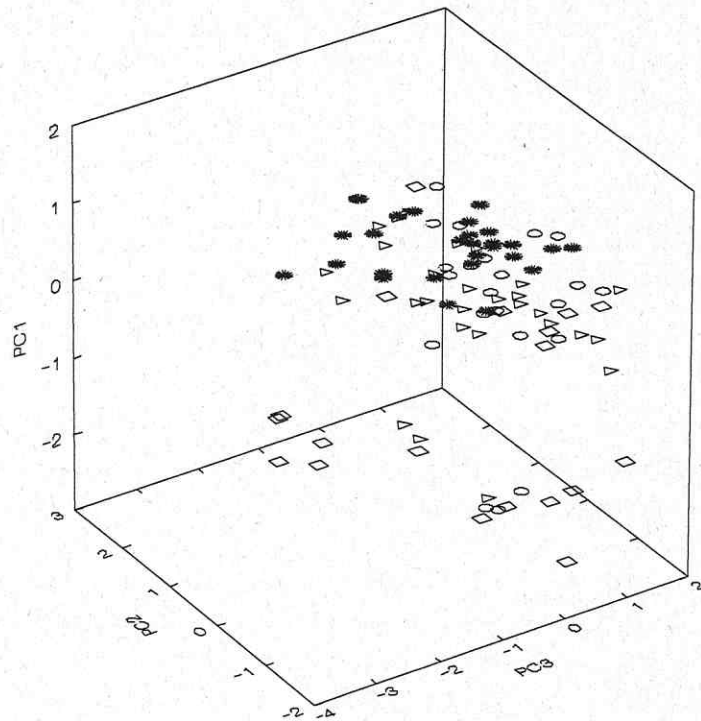


Abb. 1: Verteilung der Population der Gram-negativen Bakterien, die in kontaminierten Böden und in nicht belastetem Boden dominieren. Kontaminationsdauer: 35 Tage. Symbole: * = nicht belasteter Boden, □ = Boden mit 2,5% Rückstand, O = Boden mit 5% Rückstand und Δ = Boden mit 10% Rückstand

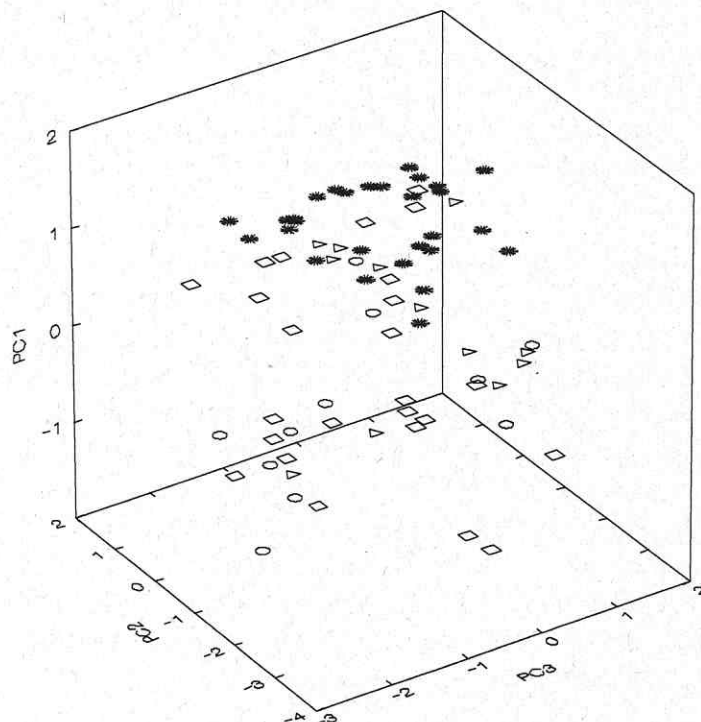


Abb. 2: Verteilung der Population der Gram-negativen Bakterien, die in kontaminierten Böden und in nicht belastetem Boden dominieren. Kontaminationsdauer: 1 Jahr. Symbole: * = nicht belasteter Boden, □ = Boden mit 2,5% Rückstand, O = Boden mit 5% Rückstand und Δ, = Boden mit 10% Rückstand

Das Verhalten nach einem Jahr Kontamination könnte mit dem Verbrauch der leicht metabolisierbaren Substrate und mit dem Anhäufen von Stoffwechselprodukten der frühen bakteriellen Population zusammenhängen. Davon ausgehend wird wahrscheinlich eine späte bakterielle Population selektioniert, die die metabolischen Aktivitäten zum Abbau dieser Produkte aufweist.

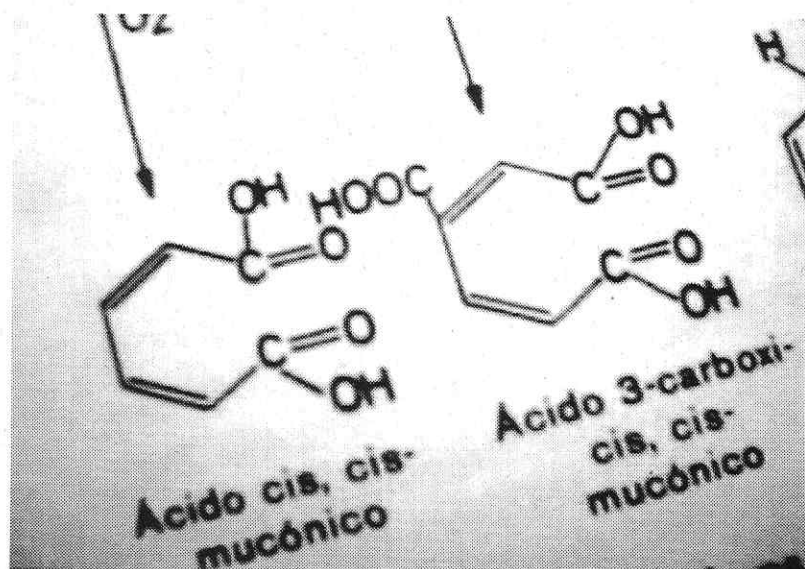
Verbleibt noch zu sagen, daß die geringen Prozentanteile der Variationen, die durch die ersten drei PC bestimmt werden, 44% in Abbildung 1 und 52% in Abbildung 2, nicht ausreichen, um eine eindeutige Interpretation des Verhaltens der Stämme zu geben. Trotzdem reichen sie aus, um die Selektion bakterieller Populationen, die durch eine Kontamination von sauberem Boden ausgelöst wurde, anhand sehr unterschiedlicher Profile zu erfassen. Nach einem Jahr Kontamination, wenn in dem System die schwerabbaubaren Kohlenwasserstoffe überwiegen, ist die Selektion deutlich ausgeprägt.

Literatur

- RITTER, W., SCARBOROUGH, R. (1995): A review of bioremediation of contaminated soil and groundwater. *J. Environ. Sci. Health*, A30, 2, 333-357.
- TAKATA, S., OGO, A., OISHI, O., TOKUNAGA, T. (1992): Correlations between heterotrophic bacterial populations and water quality variables in stream waters. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 38, 28-37.
- VECCHIOLI, G. I., COSTANZA, O., GIORGIERI, S., REMMLER, M. (1997): Extent of cleaning achievable by bioremediation of soil contaminated with petrochemical sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 70, 331-336.
- VESTAL, J. R., COONEY, J. J., CROW, S., BERGER, J. 1984: The effects of hydrocarbons on microorganisms. *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas (Ed.), Macmillan Publ. Comp., New York 475-505.
- ZAJIC, J., MAHOMEDY, A. 1984: Biosynthesis of surface active agents. *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas (Ed.), Macmillan Publ. Comp., New York, 221-297.

„Bioremediation of polluted areas“

Workshop en el margen de la cooperación científica y tecnologica (WTZ)
entre Argentina y Alemania



Prefacio

B. GROBER

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Alemania

El grupo integrado de proyectos „Microbial degradation of hydrocarbon contaminated media – biorremediation of liquid-solid and solid systems“ es un proyecto cooperativo que existe en la forma actual desde 1993 en el marco de la colaboración bilateral científico-técnica entre Argentina y Alemania. Sostenedores de esta cooperación son SECyT (Secretaría de Ciencia y Técnica-Ministerio de Educación de Argentina), Buenos Aires y por encargo del Ministerio para Educación, Ciencia, Investigación y Tecnología de Alemania la Oficina Internacional del DLR en Bonn (hasta 1995 la Oficina Internacional del GKSS Geesthacht).

Antes de 1993 se iniciaron proyectos comunes entre La Universidad Nacional de La Plata por la parte argentina y las Universidades de Jena y Oldenburg por la parte alemana. Ampliándose a las Universidades en Comodoro Rivadavia y Mendoza y a UFZ (Centro para la Investigación del Medio Ambiente Leipzig-Halle). El resultado de esta colaboración es una Unidad en la que todos los integrantes de la misma participaron de los resultados de los otros grupos y pudieron armonizar recíprocamente sus trabajos. Con la formación de esta unidad se trató de alcanzar una solución a través de determinados planes de investigación al problema de la contaminación con hidrocarburos del agua y suelo, producidos sobre todo por la industria petrolera. Con esto permanecieron y permanecen en el centro de interés, junto a la investigación base, también las investigaciones orientadas a la aplicación.

El ex-ministro de Investigaciones y Técnica Dr. Paul Krüger al visitar La Plata en 1994 fue portador de instrumental de análisis como una contribución de Alemania para formar la base de un laboratorio que ha sido usado primariamente en los proyectos bilaterales.

El Workshop realizado en La Plata entre el 5 y 7 de Noviembre de 1997, se dedicó a presentar los resultados de los trabajos realizados y por otra parte se discutió sobre las posibilidades de futuras colaboraciones.

En esta oportunidad debe agradecerse cordialmente a los organizadores que prepararon este Workshop, especialmente merece este reconocimiento SECyT por su apoyo a la organización de este Acto. Un especial reconocimiento merecen las coordinadoras de la Universidad, Sra. Prof. Arambarri, La Plata y Sra. Dra. Berthe-Corti de Oldenburg, ya que sin su esforzada actividad no hubiese podido realizarse esta Reunión.

A principios de Abril de 1997 se realizó en Buenos Aires una reunión de la comisión mixta Argentino-Alemana en el marco de la colaboración de Investigación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico. En esta reunión se hizo un balance de todos los proyectos y también se discutió cuales serían en el futuro los contenidos fundamentales de la cooperación bilateral de la Investigación. Hubo consenso que la Investigación en el campo del medio ambiente, tecnología del medio ambiente y biotecnología continúan siendo los campos más importantes de la cooperación.

En las consultas se puso especialmente de relieve que le corresponde un alto valor a la participación de la Industria en el marco de la cooperación. Deben establecerse las posibilidades de contacto entre la pequeña y mediana industria de ambos países con lo que se induce que tanto la industria como la investigación tienen que hacer aporte económico.

Se hizo evidente que la investigación en el campo del medio ambiente y biotecnológico en que se encuentran los trabajos presentes, le corresponde una creciente importancia.

Debido a que la investigación no debe realizarse sólo por el „placer“ de ciencia, sino que se debe trabajar con el objetivo concreto de realizar métodos y medidas de saneamiento, se realizó y se realizan por ambas partes una colaboración con la industria en el marco nacional. Como ya se mencionó, se ha declarado por ambos países en una reunión, que ahora debe darse un nuevo paso, en el que además de los contactos bilaterales científicos también debe participar la industria de ambos países. Los representantes de la misma pueden informarse de los resultados que existen o se pueden obtener, en base a esto resultarán múltiples iniciativas de la investigación que son relevantes para la industria y que no obstante se manifieste la necesidad de ser investigadas, no pueden ser llevadas a cabo sólo por la industria. A partir de este punto deberían desarrollarse los futuros temas centrales para la investigación, que deben realizarse en estrecha cooperación entre la ciencia y la industria. Con esto se intenta que los proyectos sean elaborados en la forma 2 + 2. Esta forma de cooperación debe congregarse en un proyecto a la ciencia y la industria de ambas partes. Sin embargo el 2 + 2 no es un esquema rígido, pueden participar varios interesados, así como también sólo dos instituciones científicas.

El objetivo de esta nueva forma de colaboración es el desarrollo en conjunto de procedimientos innovativos y productos con buenas posibilidades de comercialización económica.

Ambas partes han convenido en fomentar los correspondientes proyectos flexibles y no burocráticos.

Las primeras conversaciones para convenios pudieron realizarse a continuación del Workshop en La Plata y en Mendoza. Es de esperar que estas iniciativas positivas conduzcan a una activación de la cooperación en ciencia e industria Argentino-Alemana.

CONTENIDO

	pagina
Prefacio	114
B. GROßER	
 Proyecto ENV 19: Microbial biocenoses	
Biorremediación <i>in situ</i> de un área altamente contaminada con hidrocarburos en Cerro Dragón Patagonia Argentina.....	118
O. H. PUCCI, M. A. BAK, S. R. PERESSUTTI, I. KLEIN, C. HÄRTIG, L. WÜNSCHE	
Caracterización de una cepa utilizada como inoculante en biorremediación „ <i>in situ</i> “.....	127
S. R. PERESSUTTI, H. M. ALVAREZ, I. KLEIN, C. HÄRTIG, L. WÜNSCHE, O. H. PUCCI	
Incidencia de Plásmidos en Bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos.....	130
F. O. GRAÑA, O. H. PUCCI	
 Proyecto ENV 21: Intensive soil remediation	
Tratamiento biológico de barros contaminados con aceite mineral.....	134
A. NOKE, R. A. V. KOLCZYNSKI, R. A. MÜLLER, U. STOTTMEISTER	
Tratamiento intensivo de suelos biorremediados en reactor Airlift.....	146
E. ERCOLI, J. GÁLVEZ, R. MUELLER, U. STOTTMEISTER	
 Proyecto ENV 23: Oil decomposition by fungi	
El potencial de los hongos para la biorremediación de las contaminaciones con hidrocarburos.....	156
W. FRITSCHÉ, M. HOFRICHTER, U. SACK, K. SCHEIBNER, D. SCHLOSSER, A. ARAMBARRI, M. CABELLO	
Fitorremediación y landfarming de suelos contaminados con hidrocarburos.....	164
T. GÜNTHER, B. KIRSCHÉ, M. LÄTZ, W. FRITSCHÉ	
Crecimiento de <i>Rhodotorula glutinis</i> en pireno, aislada de áreas contaminadas.....	173
M. C. ROMERO, M. C. CAZAU, S. GIORGIERI, A. M. ARAMBARRI	
Actividad oxidasa-peroxidasa ligninolítica extracelular de algunos micromicetes aislados de distintas regiones de la republica Argentina.....	179
M. C. N. SAPARRAT, A. M. M. BUCSINSKY, A. M. ARAMBARRI	
Biotransformación fúngica de pireno.....	184
M. C. ROMERO, M. L. SALVIOLI, M. C. CAZAU, A. M. ARAMBARRI	

Projekt ENV 24: Sludge remediation process

Sistema cerrado de biorreactores para el tratamiento microbiológico de barros industriales altamente contaminados con hidrocarburos.....	190
<i>L. BERTHE-CORTI, B. CONRADI, R. HULSCH, B. SINN</i>	
Biorremediación de suelos contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos.....	200
<i>G. I. VECCHIOLI, O.R. COSTANZA, I.S. MORELLI, M.T. DEL PANNO, M. GARRÉ, M.T. PAINCEIRA</i>	
Métodos analíticos para el análisis de mezclas complejas de hidrocarburos.....	203
<i>O. R. COSTANZA, G. I. VECCHIOLI, S. A. GIORGIERI, M. T. PAINCEIRA</i>	
Caracterización de la toxicidad de mezclas complejas de hidrocarburos.....	208
<i>I.S. Morelli, G.I. Vecchioli, O.R. Costanza, M.T. Del Panno, M.I. Garré, L. Berthe-Corti, M.T. Paineira</i>	
Ecología microbiana de ambientes contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos.....	214
<i>M. T. DEL PANNO, O. R. COSTANZA, I. S. MORELLI, M. GARRÉ, G. I. VECCHIOLI, M.T. PAINCEIRA</i>	

Biorremediación *in situ* de un área altamente contaminada con hidrocarburos en Cerro Dragón Patagonia, Argentina

O. H. PUCCI¹, M. A. BAK¹, S. R. PERESSUTTI¹, I. KLEIN², C. HÄRTIG², L. WÜNSCHE²

¹CEIMA – Centro de Estudios e Investigaciones en Micorbiología Aplicada, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Geronimo Maliqueo 120, 9000 Comodoro Rivadavia, Argentina

²UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Alemania

1. Introducción

La producción petrolera es la principal actividad industrial en la Patagonia central, en esta actividad, pese a tomarse todas las precauciones, existen roturas en las instalaciones que producen derrames de petróleo. Estas contaminaciones con hidrocarburos en suelos son susceptibles de remediarse mediante tratamientos microbiológicos *in situ*. Para que estos tratamientos sean efectivos debe determinarse si es suficiente la población microbiana local o si es necesario o ventajoso usar un cultivo starter que permita incrementar la velocidad de eliminación del contaminante.

2. Materiales y métodos

Area de estudio: Se realizó un proceso de biorremediación sobre un área de explotación petrolera contaminada con crudo, que se encuentra ubicada en “Cerro Dragón” aproximadamente a 120 Km de la ciudad de Comodoro Rivadavia.

Método de biorremediación: El estudio se desarrolló en 2 etapas:

Primera etapa (agosto 1995 – diciembre 1996): Luego del acondicionamiento del área contaminada (mezclado del petróleo con la matriz del suelo) el tratamiento de biorremediación consistió sólo en el agregado nutrientes, agua y aireación mediante métodos mecánicos.

Segunda etapa (diciembre 1996 – mayo 1997): Un sector del área contaminada tratada en la primera etapa fue dividida en cuatro subáreas de 16 m² cada una, las cuales recibieron diferentes tratamientos:

Sector I.	Fertilización.
Sector II.	Inoculación.
Sector III.	Fertilización e Inoculación.
Sector IV.	Control (sin fertilización ni inoculación).

Los cuatro sectores fueron periódicamente aireados en forma mecánica y humidificados artificialmente.

Los nutrientes inorgánicos fueron PO₄HNa₂, CINH₄ y NO₃K manteniendo una relación de C:P y C:N de 800:1 y 60:1, respectivamente (DIBBLE y BARTHA 1979).

La cepa inoculada fue *Dietzia maris* CR 053 aislada de ambientes patagónicos, la cual se describe posteriormente. El inóculo fue cultivado en Medio Base Mineral (MBM) (g/l: ClNa,

5; PO_4HK_2 , 1; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$, 1; $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 1; SO_4Mg , 0,2, NO_3K , 3; pH: 7) suplementado con 0,025 g/l de extracto de levadura y 0,5% de gas-oil. El medio de cultivo fue dispuesto en recipientes estériles de 4 litros de capacidad e incubado a temperatura ambiente hasta una concentración bacteriana de aproximadamente 10^7 ufc/ml.

Muestreos y preparación de la muestra: Durante la primera etapa se recolectaron muestras de suelo contaminado y no contaminado mientras que en la segunda etapa se analizaron muestras de las cuatro subáreas en estudio. Todas las muestras de suelo fueron recolectadas mediante un método aleatorio y sistemático, siendo luego homogeneizadas (WEBSTER y OLIVER 1990) en el laboratorio.

Análisis de hidrocarburos: Las muestras de suelo fueron periódicamente evaluadas, en cuanto al contenido de hidrocarburos, mediante el método de extracción con cloroformo y determinación gravimétrica del hidrocarburo extraído. La variación en la composición del contaminante fue determinada por cromatografía en columna de silica-gel (Kieselgel 60, 35-70 mesh, Merck) de los extractos obtenidos. Las fracciones alifática, aromática y asfáltica fueron eluidas sucesivamente con aproximadamente 300 ml de hexano, benceno y cloroformo-metanol (1:1 v/v), respectivamente. Las mismas fueron recogidas en volúmenes de 25 ml, obteniéndose un total de 33 fracciones cuyo peso fue determinado gravimétricamente previa evaporación del solvente (método de DIBBLE y BARTHA 1979 modificado).

Análisis microbiológico:

Enumeración de microorganismos: Se analizaron los cambios en el número de bacterias aerobias totales y bacterias degradadoras de hidrocarburos utilizando el método de diseminación en superficie. Con tal fin se prepararon suspensiones de la muestra de suelo en solución fisiológica a partir de la cual se realizaron las diluciones apropiadas. Las bacterias aerobias totales fueron cuantificadas utilizando el medio R2A (g/l: extracto de levadura, 0,5; peptona, 0,5; casaminoácidos, 0,5; glucosa, 0,5; almidón, 0,5; piruvato de sodio 0,3; PO_4HK_2 , 0,3; SO_4Mg , 0,5; agar, 12; pH: 7,2). Para el recuento de las bacterias degradadoras se utilizó MBM sólido suplementado con 20 μl de una mezcla petróleo - gas oil (1:1) que se disemina sobre la superficie del agar (método implementado por este grupo).

Aislamiento de las bacterias principales de la biocenosis: A partir de los recuentos en MBM y medio R2A se tomaron todas las colonias de las placas correspondientes a la dilución donde el número de las mismas fuese entre 30 y 300 ufc. Cada cepa fue caracterizada según la morfología de las colonias, coloración de Gram y pruebas bioquímicas mínimas (calatasa, reducción de nitratos, oxidasa, SIM, crecimiento en tioglicolato y O-F) (MAC FADDIN 1980).

Identificación bacteriana: Las bacterias aisladas fueron identificadas en la División de Microbiología Ambiental, Leipzig (Alemania) mediante: Sistema de Identificación Automatizado BIOLOG con base de datos para GN y GP (Biolog, Inc. Hayward, Calif, USA) y el sistema de identificación microbiana MIS/SHERLOCK, con base de datos para bacterias aerobias (TSBA standard library, version 3.9, 1995) y Actinomycetes (ACTINI standard library, version 3.8, 1993), Microbial II (Inc. Newark, Del, USA).

Estructura y dinámica de la biocenosis se estimó según el espectro de los sustratos utilizados en las placas de Biolog GN y GP por la comunidad bacteriana presente, obtenida por inoculación de la suspensión de la muestra (WÜNSCHE et al. 1995)

3. Resultados y discusión

3.1 Resumen del proceso de biorremediación

Los resultados obtenidos en el seguimiento de la biorremediación se presentan en el gráfico N° 1. En el mismo pueden observarse las variaciones ocurridas en los recuentos bacterianos, tanto de bacterias totales como degradadoras, y en el contenido de hidrocarburos, en ambas etapas del estudio realizado.

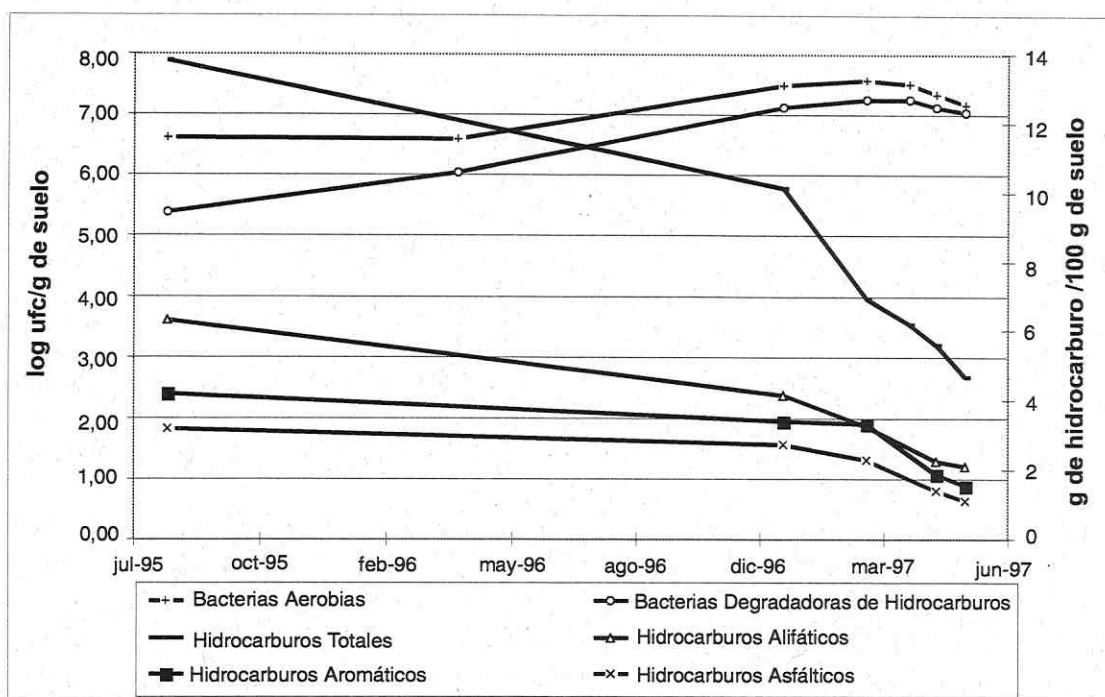


Fig. 1: Variación de hidrocarburos y recuentos bacterianos en la biodegradación a campo (explicación en el texto)

En el primer período, desde agosto de 1995 a diciembre de 1996, se efectuó una biorremediación en la que sólo se mezcló el suelo con el residuo y se adicionó nutrientes y agua en dos oportunidades durante todo el período. Este agregado se realizó a partir del mes de noviembre, por lo que pasaron 6 meses desde el derrame ocurrido en mayo de 1995, lo que permitió la volatilización de los compuestos livianos del contaminante. El resultado que se obtuvo fue una degradación del 25% de los hidrocarburos presentes, que puede considerarse baja en relación al tiempo transcurrido. En este período la mayor disminución se produjo en los hidrocarburos alifáticos, seguido en orden decreciente por la degradación de aromáticos y de los hidrocarburos polares o asfaltenos.

Las bacterias aerobias y degradadoras de hidrocarburos se incrementaron en 1 y 2 logaritmos respectivamente.

Se realizó a partir de diciembre de 1996 y continúa, habiéndose interrumpido los trabajos por razones climáticas, durante el período invernal. El desarrollo de esta etapa, en el sitio fertilizado e inoculado se puede observar en el gráfico N° 1, donde se muestran las variaciones en los recuentos bacterianos y en el contenido de hidrocarburos. En esta segunda etapa el aumento del número de bacterias fue de un logaritmo tanto para bacterias aeróbicas como para bacterias degradadoras de hidrocarburos. Pese a este modesto aumento la degradación de

hidrocarburos se incrementó sustancialmente, llegándose a degradar un 55% de los hidrocarburos que se encontraban presentes al inicio de la segunda etapa, en un período de 6 meses. Es importante destacar que las tres fracciones de hidrocarburos decrecieron hasta obtenerse porcentajes muy similares entre sí (ver fig. 3).

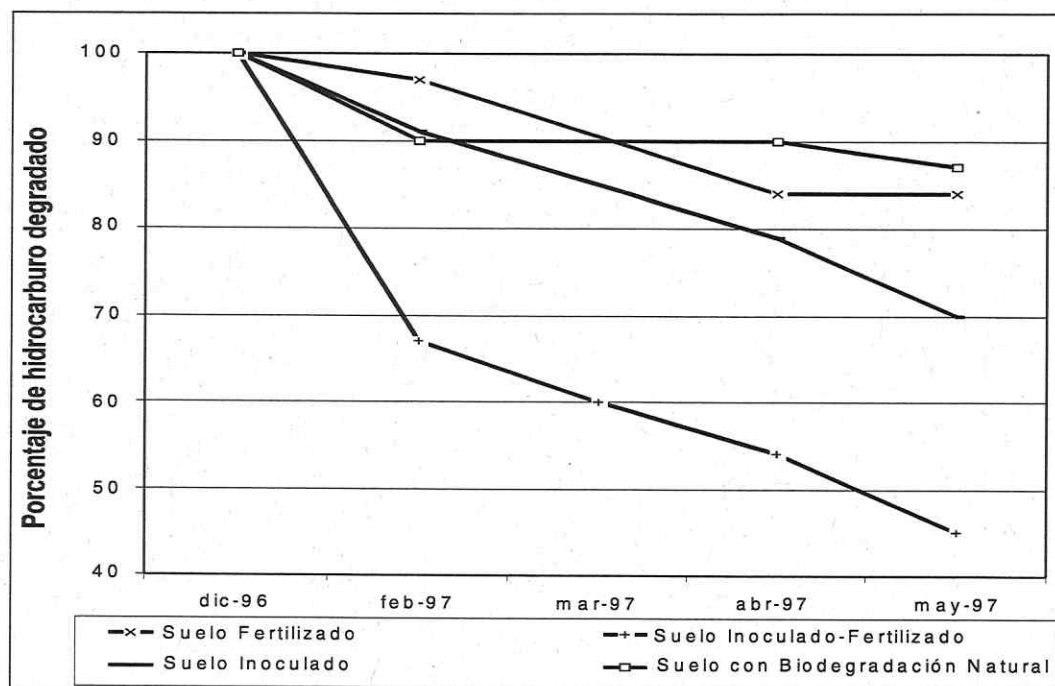


Fig. 2: Disminución del contenido de hidrocarburos totales (extractables con cloroformo) de suelos en las cuatro variantes de biodegradación ensayadas

Los porcentajes de biodegradación obtenidos en el resto de los sitios tratados fueron: 13% en suelo sin fertilización ni inoculación, 16% en suelo con fertilización y 30% en el suelo inoculado. Como puede observarse estos valores fueron significativamente menores a los alcanzados en el suelo inoculado y fertilizado (ver fig. 2)

3.2 Degradación de los componentes principales de la contaminación con petróleo crudo en condiciones óptimas de biorremediación

En el gráfico N° 3 se presenta la variación en la composición de los hidrocarburos durante la biodegradación ocurrida en el sitio inoculado y fertilizado. Se muestran en el mismo los resultados de las cromatografía en columna fraccionada en cinco tiempos diferentes de control, desde el hidrocarburo sin que sufriera la acción de los microorganismos (agosto 1995) hasta mayo de 1997. Como puede apreciarse el petróleo derramado contiene predominantemente hidrocarburos alifáticos y podemos observar a través del tiempo la facilidad de biodegradación de las tres fracciones estudiadas, siendo los hidrocarburos alifáticos la fracción más rápidamente degradable seguida por los aromáticos y por último los hidrocarburos polares o asfaltenos.

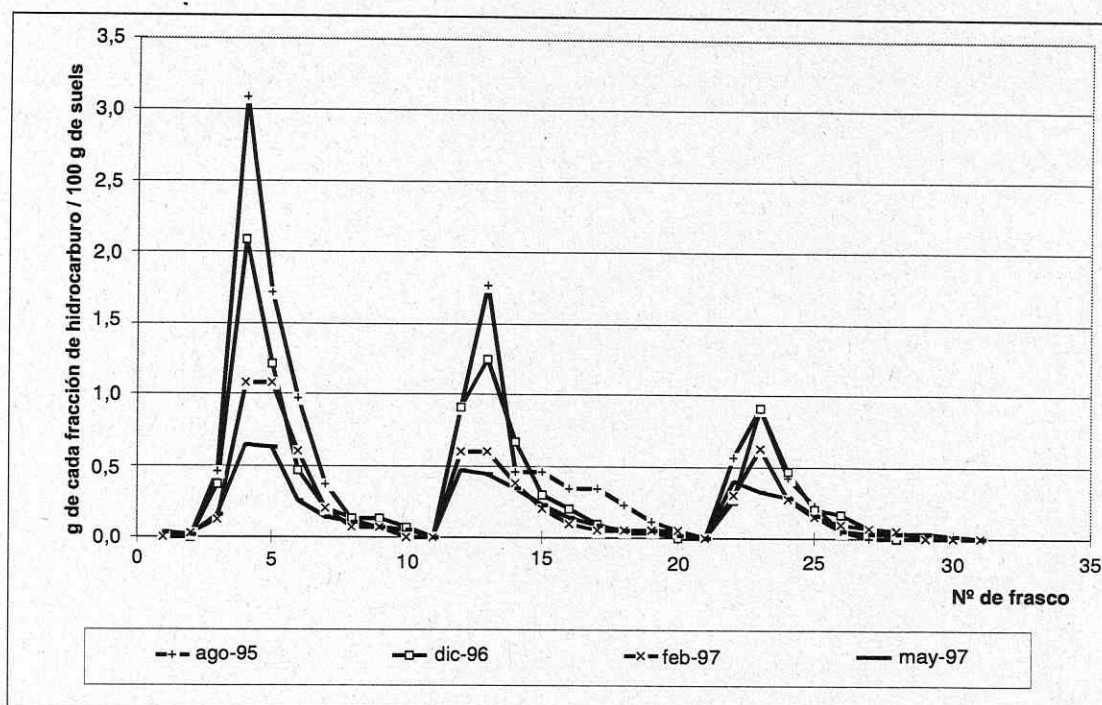


Fig. 3: Variación de las diferentes fracciones de hidrocarburos en el proceso de biodegradación de en el sitio inoculado y fertilizado (explicación en el texto)

3.3 Desarrollo de la biocenosis bacteriana en el transcurso del ensayo de biorremediación

3.3.1 Cambios en el espectro de los sustratos utilizados por la totalidad de los componentes microbianos

La dinámica de la composición de la bacteriocenosis autóctona fue estimada evaluando los perfiles de utilización de diferentes sustratos (método BIOLOG modificado).

Durante los primeros cuatro meses del proceso de biorremediación, desde diciembre de 1996 hasta abril de 1997, el número de sustratos del BIOLOG utilizados por la biocenosis total se incrementó continuamente en todas las variantes de biorremediación inclusive en el sitio no inoculado ni fertilizado (fig. 4). Esto indica cambios significativos de la composición de la biocenosis en todas las variantes. El aumento de la diversidad taxonómica fue debido al surgimiento de algunas especies con otros patrones de utilización de sustratos significativamente diferentes de los iniciales. Estas variaciones son causadas por la disponibilidad de hidrocarburos utilizables en todas las variantes experimentales.

Luego de 4 o 5 meses el número de sustratos utilizados no se incrementó. En este punto el 80 - 90% de los sustratos probados fueron utilizados por la biocenosis y cambios adicionales sólo pueden ser posibles dentro del 10 al 20% residual. Este hecho enmascara un posible cambio: la composición de la biocenosis no continúa cambiando por que no hay nuevos sustratos disponibles en el ecosistema (zona contaminada del campo).

La adición de nutrientes inorgánicos y/o la inoculación de la cepa seleccionada (*D. maris* CR 053), muestra sólo temporariamente (en los 3 primeros meses) una leve diferencia en el patrón de utilización de sustratos si se compara con la biorremediación en el sitio no inoculado ni

fertilizado (Sj: 0,813 y 0,860). Este hallazgo indica que la composición de la bacteriocenosis de suelos tratados y no tratados son relativamente similares en este período (tab. 1).

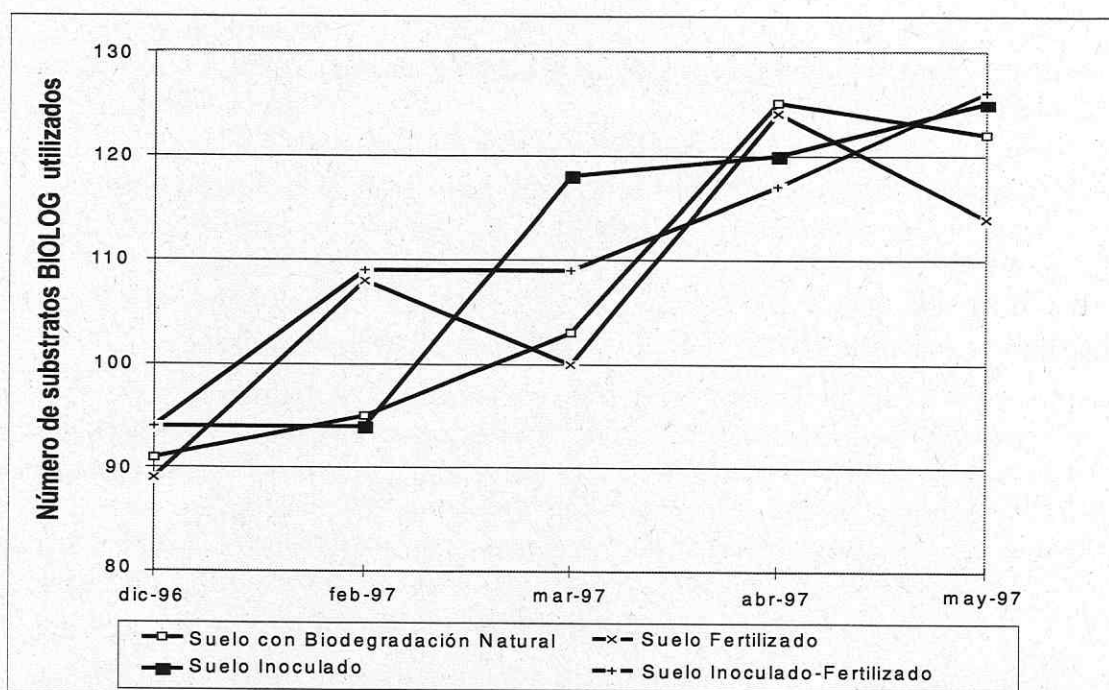


Fig. 4: Utilización de sustratos BIOLOG por las comunidades bacterianas en las cuatro variantes estudiadas

Tab. 1: Comparación (Sj) de la utilización de sustratos entre la biocenosis de los sitios inoculado y/o fertilizado y la biocenosis del suelo no inoculado ni fertilizado (Sector IV)

Período de biorremediación	Meses	Sector I	Sector II	Sector III
Febrero de 1997	2	0,813	0,817	0,829
Marzo de 1997	3	0,845	0,842	0,860
Abril de 1997	4	0,960	0,937	0,936

En los últimos 4 meses luego del comienzo del proceso de biorremediación esas pequeñas diferencias entre los patrones de utilización del sustrato observados en las variantes tratadas y la biorremediación natural se iguala casi completamente (Sj entre 0,936 y 0,976)(ver tab. 1), indicando que la biocenosis de todas las variantes son muy similares en cuanto a su composición en este período.

3.3.2 Caracterización de la bacteriocenosis por aislamiento e identificación de los componentes principales

Los resultados obtenidos con respecto a los patrones de utilización de sustratos de la biocenosis completa son sustentados por los resultados de los análisis taxonómicos. Estos análisis fueron llevados a cabo por aislamiento de colonias morfológicamente distinguibles de los principales integrantes de la comunidad bacteriana (concentración entre 10^5 a 10^6 ufc/g de suelo) y la siguiente identificación de los cultivos puros en base al aspecto morfológico, las características quimiotaxonómicas y la aplicación de sistemas de identificación automáticos (BIOLOG y MIS). De esta forma la composición de la biocenosis del suelo fertilizado e inoculado en comparación con la del suelo no inoculado ni fertilizado, fue analizada al iniciar la experiencia y después de 2 meses de biorremediación (febrero de 1997).

La composición de la biocenosis en el sitio no inoculado ni fertilizado y de la variante inoculada y fertilizada al comienzo de la biorremediación no muestra diferencia significativa: las especies gram positivas predominaron claramente y la biocenosis prácticamente consistió de diferentes géneros de los actinomicetales (*Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus*). Debería mencionarse, al respecto que las cepas de *Dietzia maris* encontradas en el área no inoculada es claramente diferente del cultivo starter. Aproximadamente el 10% de los aislamientos de las bacterias gram positivas no pudieron ser identificados con seguridad.

Como único representante de los gram negativos y presentes en ambos sitios estudiados, se encontró *Alcaligenes xylosoxidans*.

Luego de 2 meses de experiencia (febrero de 1997) se encontraron cambios significativos, marcados por la aparición de bacterias gram negativas como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas mendocina* en el suelo no inoculado ni fertilizado, y *Pseudomonas stutzeri* (en un relativo alto porcentaje) y *Pseudomonas fluorescens* en el suelo inoculado y fertilizado. Además de los géneros de actinomicetes *Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, especialmente *fascians* y *erhitropolis*, presentes también en las muestras de suelo de diciembre de 1996, se encontraron taxas de gram positivos como *Arthobacter*, en ambas variantes, *Microbacterium* (sin tratamiento) y *Bacillus* (en suelo tratado).

3.3.3 Destino del cultivo starter de *Dietzia maris* 053 en el ecosistema

En suelos de la Patagonia está presente, como población autóctona, *Dietzia maris* y se la encuentra tanto en zonas que han sufrido contaminación con hidrocarburos como en áreas no contaminadas. La cepa CR-053 fue identificada como *Dietzia maris* y fue seleccionada para ser utilizada como starter en el presente trabajo. En los seguimientos periódicos que se efectuaron a la 4 áreas de biorremediación se halló este género tanto en la zona no inoculada como en la zona inoculada y fertilizada. Para discriminar entre la cepa inoculada, de amplio rango de biodegradación de hidrocarburos, y las cepas no inoculadas se efectuó un perfil de los ácidos grasos de membrana celular y sólo se encontró coincidencia entre los perfiles de la cepa

CR-053 con las bacterias encontradas en la zona inoculada en el muestreo de febrero de 1997. Las cepas aisladas en el mes de diciembre de 1996 en el sector inoculado y fertilizado así como las obtenidas de los muestreos de diciembre de 1996 y febrero de 1997, presentan distinto perfil de ácidos grasos por lo que se consideran cepas diferentes a *D. maris* CR-053. Se deberá confirmar con futuros ensayos el verdadero valor de los perfiles de ácidos grasos, determinados en condiciones estandarizadas, en la identificación de cepas. El hecho de no

haber encontrado dicha cepa en la zona inoculada después de la siembra podría deberse a que la densidad de bacterias inoculadas correspondió a 10^5 ufc/g y los recuentos de bacterias debieron efectuarse a partir de concentraciones de 10^6 ufc/g.

El análisis por DGGE muestra la presencia del género en estudio tanto en suelo no inoculado como en suelo fertilizado e inoculado. Esta técnica permite detectar tanto bacterias cultivables como no cultivables a nivel de género pero no a nivel de cepas.

El cultivo starter crece hasta representar el 10% de la población total después de dos meses de inoculada. Se debe considerar la presencia de depredadores y la competencia bacteriana.

4. Conclusiones

La biorremediación *in situ* de suelos semiáridos de la Patagonia central se aplicó con éxito bajo condiciones optimizadas. La inoculación con un cultivo starter seleccionado, en combinación con la adición de nutrientes inorgánicos, aceleró significativamente la biorremediación.

Bajo condiciones optimizadas el 66% de los hidrocarburos totales contenido en el suelo fueron degradados. Las diferentes tasas de biodegradación de las fracciones alifáticas, aromáticas y asfálticas dieron como resultado concentraciones finales semejantes y cambios significativos en la composición de los hidrocarburos residuales.

La composición de la biocenosis autóctona cambió continuamente durante el proceso de biorremediación, sin embargo diferencias significativas entre las comunidades de los cuatro sitios estudiados podrían no ser detectados por los métodos utilizados.

El cultivo starter de *Dietzia maris* CR-053 pudo ser diferenciado de otras cepas presentes naturalmente en estos suelos, en base a su perfil de ácidos grasos. Esta bacteria se inoculó en concentraciones de 8×10^5 ufc/g y aumentó considerablemente en tres meses hasta una densidad de 2×10^6 ufc/g.

Agradecimiento

Se agradece especialmente a la empresa AMOCO ARGENTINA OIL COMPANY por haber subsidiado el presente trabajo.

Bibliografía

- ALLISON, L. E., BROWN, J. W., HAYWARD, H. E., RICHARDS, L. A., BERNSTEIN, L., FIREMAN, M., PEARSON, G. A., WILCOX, L. V., BOWER, C. A., HATCHER, J. T., REEVE, R. C. 1993: Diagnostico y rehabilitacion de suelos salinos y sodicos. Ed. L. A. Richards, Editorial Limusa, Mexico.
- DIBBLE, J. T., BARTHA, R. (1979): Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37, 729-739.
- GARCIA TREJO, A. 1981: Experimentos en microbiología del suelo. Ed. Compania Editorial Continental, S. A. Mexico.

- MACFADDIN, J. F. 1980: Biochemical test for identification of medical bacteria. 2th edition,, Willams and Wilfins, Baltimore-London.
- WEBSTER, R., OLIVER, M. A. 1990: Sampling and estimation. In: Spatial Information Systems. Oxford University Press, pp. 27-56.
- WÜNSCHE, L., BRÜGGEMANN, L., BABEL, W. (1995): Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. FEMS Microbiol. Ecol. 17, 295-306.
- WÜNSCHE, L., HÄRTIG, C., PUCCI, H. O., BABEL, W. 1997: Combined application of BIOLOG and MIS/SHERLOCK for identifying bacterial isolates from hydrocarbon-polluted Argentinian soils. In: Insam, H., Rangger, A. (Eds.) 1997: Microbial communities. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York-Barcelona-Budapest-Hong Kong-London-Milan-Paris-Santa Clara-Singapore-Tokyo.

Caracterización de una cepa utilizada como inoculante en biorremediación „*in situ*“

S. R. PERESSUTTI¹, H. M. ALVAREZ¹, I. KLEIN², C. HÄRTIG², L. WÜNSCHE², O. PUCCI¹

¹CEIMA – Centro de Estudios e Investigaciones en Micorbiología Aplicada, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Geronimo Maliqueo 120, 9000 Comodoro Rivadavia, Argentina

²UFZ – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Alemania

1. Introducción

La industria petrolera, principal recurso económico de la Patagonia Central (Argentina), genera derrames accidentales de petróleo. La biorremediación (decontaminación microbiológica) *in situ* es una tecnología aplicable para decontaminar ecosistemas contaminados con hidrocarburos. Una variante consiste en la estimulación de bacterias indígenas degradadoras de hidrocarburos mediante el suplemento de factores limitantes esenciales para el desarrollo de las bacterias (BOGART y HEMMINGSEN 1992, CATALLO y PORTIER 1992). Este biotratamiento también pueden involucrar el uso de bacterias autóctonas cultivadas exteriormente, con amplio potencial de degradar hidrocarburos que permiten, incrementar la velocidad de degradación. La efectividad de la inoculación de microorganismos en ambientes naturales depende de múltiples factores, por ejemplo estabilidad genética, viabilidad durante el almacenamiento del inóculo, alta actividad enzimática y crecimiento en el ambiente, habilidad para competir con los microorganismos autóctonos. Además los inóculos no deben producir metabolitos tóxicos ni deben ser patógenos (GOLDSTEIN et al. 1985, LEAHY y COLWELL 1990).

El objetivo de ese estudio fue la caracterización de una cepa bacteriana usada como inoculante para un tratamiento de biorremediación *in situ* de un sitio contaminado con petróleo crudo. Este microorganismo (cepa 053) fue aislado a partir de una muestra de suelo proveniente de un otro sitio contaminado con petróleo crudo. Ese sitio se encuentra situado a 30 Km de la ciudad de Comodoro Rivadavia (Patagonia, Argentina).

2. Resultados y discusión

Identificación taxonómica: La cepa investigada fue identificada taxonomicamente en base a las siguientes determinaciones:

- morfología de células y colonias
- coloración de Gram
- presencia de ácido DL-diaminopimélico y azúcares relevantes para un agrupamiento taxonómico en el hidrolizado de las células
- contenido de G + C de la ADN
- espectro de sustratos metabolizados (Automated Microbial Identification System, Fab. BIOLOG, USA)
- perfiles de ácidos grasos (Microbial Identification System MIS, Fab. MIDI, U.S.A.)

La cepa produce en medio sólido colonias características de color naranja-rojiza. En el microscopio se observan células de forma de cocos o bacilos irregulares. Cepa 053 es Gram-positiva, el contenido de G + C del ADN es 70,5 mol%.

En la composición de la pared celular (hidrolizado de células) se detectaron ácido DL-diaminopimélico, y, como azúcares relevantes para el diagnóstico, arabinosa y galactosa.

El análisis de los ácidos grasos con cromatografía de gas reveló que las células bacterianas contienen, principalmente, ácidos grasos lineales de cadena de C₁₄ a C₂₀ átomos de carbono (tab. 1). Como componente principal fue detectado el ácido graso octadecenoico (18:1 w9c = 29,2% del contenido total de los ácidos grasos). Además, fue detectado ácido tubercosteárico (10Me 18:0 = 5,2%), componente típico del género *Rhodococcus* (incluido *Dietzia*). El perfil de los ácidos grasos analizado bajo condiciones estándar se corresponde con una similitud de 0,481 al perfil del especie *Dietzia maris* usado en la base de datos de MIS. La misma cepa se analizó con el sistema de BIOLOG (la cepa utilizó 35 de los 95 fuentes de carbono que utiliza este sistema) y se calculó una similitud de 0,656.

Tab. 1: Composición de ácidos grasos (MIS) por G.C.

ácido graso	%
14:0	0,53
15:0	6,53
16:1 w7c/15 iso 2OH	1,17
16:0	13,95
17:1 w8c	13,91
17:0	10,78
17:0 10 methyl	1,19
18:1 w9c	29,24
18:0	14,29
TBSA 10 Me 18:0	5,16
19:0	2,34
20:1 w9c	0,90
15:0 iso 2OH/16:1w7c	1,17

Los resultados de identificación obtenidos con diferentes sistemas de identificación muestran que la cepa 053 tiene que ser agrupada a la especie *Diezia* (anteriormente *Rhodococcus*) *maris*.

Degradación de hidrocarburos: En un test de screening se evaluó la capacidad que presenta la cepa de degradar hidrocarburos diferentes hidrocarburos alifáticos, aromáticos y asfaltenos así como mezclas como nafta, gas oil, parafinas y otras, como única fuente de carbono y energía. Se determinó que la cepa 053 posee un amplio espectro para metabolizar hidrocarburos. El 90% de los compuestos probados fueron usados como sustratos. En continuación se investiga la presencia de plásmidos que forman parte de la degradación de hidrocarburos.

Crecimiento en condiciones subóptimas de desarrollo: Para evaluar la capacidad de la cepa para ser usada en suelos semi-áridos, se llevan a cabo estudios en

condiciones no óptimas (baja humedad y baja concentración de nutrientes de los suelos). Los resultados preliminares indican que la cepa 053 tiene una resistencia elevada a la desecación y habilidad para crecer en condiciones nutricionales desbalanceadas.

Bibliografía

- BOGART, A. H., HEMMINGSEN, B. B. (1992): Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2579-2582.
- CATALLO, W. J., PORTIER, R. J. (1992): Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal of organic chemicals from soils and sediments. *Water Sci. Tech.* 25, 229-237.
- GOLDSTEIN, R. M., MALLORY, L. M., ALEXANDER, M. (1985): Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 977-983.

LEAHY, J. G., COLWELL, R. R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.

Incidencia de plásmidos en bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos

F. O. GRAÑA, O. H. PUCCI

CEIMA – Centro de Estudios e Investigaciones en Micorbiología Aplicada, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Geronimo Maliqueo 120, 9000 Comodoro Rivadavia, Argentina

1. Introducción

Comodoro Rivadavia es una ciudad ubicada sobre el litoral marítimo del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina. En dos sitios cercanos al casco urbano se realizan tareas de carga de petróleo crudo y descarga de destilados. Estas labores se realizan desde hace setenta años y debido a pequeños derrames accidentales, relativamente frecuentes, se da en esos sitios una contaminación crónica.

La degradación biológica de hidrocarburos puede ser el resultado del catabolismo de distintos microorganismos o el resultado del catabolismo concertado de una biocenosis. Existen publicaciones que marcan el aumento en la incidencia de ADN plasmídico en ecosistemas contaminados por hidrocarburos (LEAHY et al. 1990, HADA y SIZEMORE 1981).

El interés en demostrar la presencia de plásmidos en bacterias degradadoras de hidrocarburos se basa en las capacidades específicas que están codificadas a nivel del ADN plasmídico (VAN BEILEN et al. 1994, RAMOS GONZÁLEZ et al. 1991, FOSTER 1983, LENNON y DE CICCIO 1991, HADA y SIZEMORE 1991).

En tantos años de polución la presión de selección puede haber operado y debido a esto sería posible aislar cepas con capacidades de biodegradación. Esta potencialidad estaría relacionada con la presencia de plásmidos. El objetivo del presente trabajo es determinar la frecuencia de plásmidos en bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos y relacionar su presencia con el proceso de biodegradación natural en ambientes crónicamente contaminados.

2. Materiales y métodos

Sitios de muestreo: Las muestras fueron tomadas de dos sitios de contaminación crónica relacionados a carga de crudo y descarga de destilados. Estos puntos están ubicados a treinta kilómetros y tres kilómetros, respectivamente, de la zona central de Comodoro Rivadavia.

Toma de muestras: Se tomaron dos muestras diferentes en cada sitio de muestreo: agua de mar de superficie con un colector plástico estéril de 1,5 l de capacidad, sedimentos intermareales fueron recogidos con una espátula estéril y colocados en frascos estériles. En todos los casos las muestras fueron transportadas de inmediato al laboratorio.

Medios de cultivo utilizados (VENKATESWARAN et. al. 1993): Para los aislamientos de bacterias se utilizó medio según Bushnell-Haas: $MgCl_2$ 0,3 g, $CaCl_2$ 0,02 g, KH_2PO_4 1 g, NH_4NO_3 1 g, $FeCl_3$ (30%) 2 gotas, NaCl 20 g, Agua destilada c.s.p. 1 l. Para crecer los microorganismos para el análisis de plásmidos se utilizó el medio LB con el agregado de 1% gasoil o un antibiótico que correspondiese.

Aislamiento y cultivos bacterianos (VENKATESWARAN et al. 1993, VENKATESWARAN y TANAKA 1995): Las muestras fueron inoculadas en frascos de 1 l de capacidad conteniendo 0,5 l de medio Bushnell-Haas mas una mezcla de petróleo crudo-gasoil al 1% a temperatura ambiente durante treinta días con aireación estéril. Se midieron las concentraciones de fósforo y nitrógeno antes de comenzar y durante el transcurso de la experiencia por los métodos de azul de molibdeno y azul de indofenol, respectivamente. En caso de ser necesaria la reposición de elementos se agregó fósforo como mezcla de fosfatos *mono y diácido potasio* en solución al 4% y de amonio como cloruro de amonio en solución estéril al 40%. Los días tres, catorce y treinta se extrajeron submuestras de los frascos y fueron cultivadas en placas del medio según Bushnell-Haas enriquecidas con 0,05 g/l de extracto de levadura 0,25 g/l de peptona y 0,15 g/l de extracto de carne.

Identificación de las cepas aisladas: Las cepas fueron presuntivamente identificadas por los sistemas API 20NE y/o API 20E.

Pruebas de crecimiento en hidrocarburos: Se inoculó con células de las cepas aisladas el medio Bushnell-Haas conteniendo mezclas de hidrocarburos al 1% (en el caso de la mezcla Benceno-Xileno-Tolueno solo 0,1%). La incubación fue a temperatura ambiente con agitación discontinua. El crecimiento fue evaluado por análisis de turbidez entre los dos y los quince días de haber realizado la siembra.

Aislamiento de plásmidos (AUSUBEL et al. 1987): Los plásmidos fueron aislados por una modificación del método de BIRNBOIM y DOLY (1979).

Electroforesis del ADN (AUSUBEL et al. 1987): El ADN fue separado en geles de agarosa al 0,6% usando buffer TBE 0,5x. Posterior a la corrida los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) y se revelaron por transiluminación con luz UV.

Determinación del tamaño de los plásmidos: Los tamaños fueron obtenidos a base de una curva logarítmica (tamaño vs movilidad). Como referencia se utilizó el plásmido pWWO (de *Pseudomonas spec.*) y el plásmido pRF30 (de *E. coli 1061*).

3. Resultados y discusión

Con la metodología descrita para el aislamiento fueron recuperadas 23 colonias morfológicamente diferentes. El medio de cultivo suplementado con peptona, extracto de levadura y extracto de carne previno la formación de colonias diminutas, permitiendo una mejor diferenciación durante su aislamiento. En el primer aislamiento (con 3 días de incubación) se recuperaron 8 cepas, en el día 14 se recuperaron 7 cepas y 8 cepas en el día 30.

Las mediciones de los nutrientes tuvo la finalidad de aportar al medio las cantidades apropiadas de N y P. Al empezar del ensayo las concentraciones en el medio fueron de 175 ppm de nitrógeno y 465 mg de fósforo, luego de diez días de cultivo se analizaron 190 ppm de fósforo, y de 5 ppm de amonio. No fue necesario agregar fósforo ya que la concentración se mantuvo dentro de valores apropiados, para el caso del amonio se observó una disminución muy marcada y fue necesaria su reposición.

Los resultados de los experimentos de crecimiento en diferentes mezclas de hidrocarburos, de identificación y de presencia de plásmidos en los 23 aislamientos se muestran en la tabla 1.

Por medio del sistema de identificación API 20NE y/o API 20E pudieron agruparse 11 de las 23 cepas a un taxón. Las reacciones de crecimiento con mezclas de hidrocarburos mostraron que una alta proporción de las bacterias (18 de 23) son capaces de crecer en tres o mas

mezclas y que 6 de 23 cepas crecieron en 5 o más mezclas. 5 cepas fueron capaces de crecer en la mezcla BXT al 0,1%, dos de ellas contenían plásmidos únicos.

Tab. 1: Cepas aisladas, capacidad de degradar mezclas de hidrocarburos, identificación y presencia de plásmidos

Cepa	Petróleo	Gas-oil	Querosen	Nafta	Aceite Lubricante	BXT ⁽¹⁾	Identificación	Plásmidos (Número)
201	+	+	+	+	+	-		0
202	+	+	-	-	+	-		0
203	+	+	-	+	+	+	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0
204	+	+	+	-	+	+	<i>Alcalcaligenes faecalis</i>	0
205	+	+	-	-	+	-		0
206	+	+	+	-	+	-		0
207	D	+	-	-	-	-		0
208	+	+	+	-	-	-		0
301	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas picketti</i>	0
302	+	+	+	-	+	-	<i>Achromobacter CDC gr VD</i>	0
303	++	++	+	+	++	+		0
304	+	+	+	+	+	D	<i>Achr.CDC gr VD</i>	1
305	++	+	+	-	+	+	<i>Pseudomonas picketti</i>	1
306	++	+	+	-	+	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1
307	-	+	-	+	-	-		1
401	+	+	+	-	+	-		1
402	+	+	+	+	+	-		2
403	-	+	+	-	-	D		1
404	+	+	+	+	-	-		1
405	+	+	+	+	+	-	<i>Achromobacter CDC gr VD</i>	1
406	+	+	+	+	+	D	<i>Pseudomonas sp.</i>	1
407	+	+	+	+	-	-	<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	1
408	+	+	+	-	+	-	<i>Achromobacter CDC gr VD</i>	0

⁽¹⁾BTX = benceno + tolueno + xileno

D = dudoso

El aislamiento de plásmidos fue realizado en todos los casos por duplicado y permitió demostrar que 11 de las 23 cepas contienen plásmidos, en general de peso molecular elevado y con excepción de la cepa 402 un plásmido único. Los tamaños de los plásmidos se indican en la tabla 2. Para poder correlacionar tamaño con función es necesario concluir las pruebas de utilización de hidrocarburos individuales y también los resistencias a antibióticos y metales pesados. La proyecciones de este trabajo implican la realización de análisis de restricción de los plásmidos aislados y su correlación con las pruebas de resistencia a antibióticos, metales pesados y utilización de hidrocarburos únicos como fuente de carbono. En base a las potencialidades de las cepas estudiadas se realizará un estudio de microcosmos.

Tab. 2: Tamaño de los plásmidos

Cepa	Tamaño (Kb)
304	158
305	199
306	223
307	223 y 7
401	223
402	223
403	223
404	223
405	223
406	223
407	223

Bibliografía

- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SELDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. (Eds.) 1991: Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Vol. 1.
- BIRNBOIM, S. L., DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.
- FOSTER, T. J. (1983): Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev. 47, 361-409.
- HADA, H., SIZEMORE, R. (1981): Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 41, 199-202.
- LEAHY, J. G., SOMERVILLE, C. C., CUNNINGHAM, K. A., ADAMANTIADIS, G. A., BYRD, J. J., COLWELL, R. R. (1990): Hydrocarbon mineralization in sediments and plasmid incidence in sediment bacteria from the Campeche Bank. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1565-1570.
- LENNON, E., DE CICCIO, T. (1991): Plasmids of *Pseudomonas cepacia* of diverse origins. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2345- 2350.
- RAMOS GONZALES, M. I., DUQUE, E., RAMOS, J. L. (1991): Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: Host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3020-3027.
- VAN BEILEN, J., WUBBOLD, M. G., WITHOLT, B. (1994): Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. Biodegradation 5, 161-174.
- VENKATESWARAN K., TANAKA, H. (1995): Degradation and mineralization of aromatic hydrocarbon of crude oil in the coral reef environment. Biomedical Letters 52: 63-73.
- VENKATESWARAN, K., IWABUCHI, T., MATSUI, Y., TOKI, H., HAMADA, E., TANAKA, H. (1993): Evaluation of various media with reference to the growth and biodegradation potential of oil degrading microorganisms. Biomedical Letters 48, 43-45.

Tratamiento biológico de barros contaminados con aceite mineral

A. NOKE, R. A. v. KOLCZYNSKI, R. A. MÜLLER, U. STOTTMEISTER

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung,
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Alemania

1. Introducción

La contaminación de suelos, de aguas subterráneas y superficiales representa un problema global del medio ambiente. En todos los lugares, donde se procesan aceites minerales, se pueden producir contaminaciones debido a derrames, averías, fallas en los procesos de limpieza, o similares. Las contaminaciones ocurren también en gran medida durante el proceso y la extracción del petróleo crudo.

El proyecto de cooperación ENV 21 entre la Universidad Nacional de Cuyo en Mendoza y el UFZ Leipzig tiene como objetivo científico y tecnológico el tratamiento intenso de tierras y barros contaminados con aceite mineral.

En el Centro de Biotecnología Ambiental (UbZ) del UFZ se hicieron investigaciones sobre el tratamiento del lodo de la perforación en relación con el proyecto mencionado. Estos lodos consisten mayoritariamente en una matriz de grano fino de arcilla y de bentonita. Debido a la escasa permeabilidad de los mismos, el transporte del oxígeno y sustancias nutritivas es reducido, por lo que no son tratable en hacinas convencionales sin que se incorporen materias que aporten estructuras porosas. Como alternativa biológica a un tratamiento en vertedero o tratamiento térmico, se ofrece el método de tratamiento en suspensión en un biorreactor.

El uso de un biorreactor tiene las siguientes ventajas (KNORR y V.SCHELL 1997): debido a la mezcla permanente del material, se aumenta la biodisponibilidad y se produce un alto suministro de oxígeno. Esto tiene como consecuencia tiempos de tratamiento relativamente cortos. Además con ayuda de métodos de control y de mando se pueden optimizar otros parámetros importantes del proceso. Después de un saneamiento biológico el material es biológicamente activo y dado el caso se puede usar nuevamente.

2. Materiales y métodos

2.1 Caracterización del fango de perforación

El material que se usó para los distintos test de degradación proviene de un antiguo terreno de extracción de crudo. El contenido de aceite mineral de la muestra investigada fue 19000 mg/kg sustancia seca, analizado según DIN 38409 H18.

El material correspondía a arena movediza arcillosa según sus fracciones granulométricas analizado según DIN 4220. El porcentaje de grano fino ($< 63 \mu\text{m}$) fue de 80% de la masa.

La mayor parte del material de lavados de perforaciones profundas son bentonitas. Estos forman parte de los minerales arcillosos y tienen una gran capacidad de hinchamiento así como un considerable poder adsorbente para compuestos orgánicos y también para iones de nutrientes especialmente para fosfatos (SCHEFFER y SCHACHTSCHNABEL 1992).

Conforme a eso el análisis de la muestra de lodo de perforación mostró una alta capacidad de adsorción para los iones nutrientes PO_4^{2-} y NH_4^+ . Después de un equilibrio de adsorción y desorción se observó una adsorción para fosfato de cerca de 3 g/kg peso seco y para amonio de 0,6 g/kg peso seco.

La cromatografía de intercambio de iones (según DIN 38405, parte 20) de la desintegración acuosa (según DIN 38414, p 4) mostró que el lodo de perforación tenía una gran concentración de iones de cloro (aproximadamente 12000 mg/kg peso seco). Con el método de la espectrometría de emisión de átomos (DIN 38406, parte 22) se detectaron grandes contenidos de azufre (5600 mg/kg peso seco) y hierro (40000 mg/kg peso seco) (DIN 38414, parte 7).

Además el lodo era anóxico. Al empezar la aireación se observó un gran consumo de oxígeno, lo cual probablemente estaba relacionado a la oxidación química de sulfuro ferroso a férrico.

2.2 Reactores del tipo Airlift

Para la planta piloto descrita aquí se usaron dos tipos de reactores airlift:

Reactores de vidrio (Jenaer Glas) accionados en forma neumática con un volumen de trabajo de 4,5 l que tiene un cilindro interno central con un sistema de rotación vertical. La aireación se produce a través de un aireador en el fondo del reactor.

Biorreactor del tipo airlift (Biolift® Reactor, Eimco) de 65 l de capacidad. La aireación se produce en el fondo del reactor a través de un inyector en el interno del cilindro central. Esto provoca una rotación vertical externa del líquido del reactor. Para un suministro de oxígeno intensivo existen adicionalmente cuatro difusores en el fondo del reactor. El volumen de aire añadido se puede regular independientemente del airlift por medio de un rotámetro. Debajo de los difusores existe un mecanismo de remoción que se puede manejar independientemente de la aireación. Este mecanismo de remoción sirve para evitar la sedimentación de partículas de la suspensión. Así se transportan las partículas más gruesas del suelo en el cilindro central donde son arrastradas en la corriente y resuspendidas. En la parte superior del reactor se encuentra adicionalmente un extintor mecánico de espuma.

2.3 Manejo del proceso y medición on-line de los parámetros del proceso

En ambos tipos de reactores se regula el flujo de aire con un rotámetro. En los reactores de 4,5 l de capacidad este fue de 600 l/h. En el reactor de acero inoxidable de 65 l se ajustó en los tubos para los difusores y en los tubos para los inyectores centrales en el fondo del reactor un flujo de 20 l/min respectivamente; así que el flujo en total alcanzó a 40 l/min.

La temperatura se mantuvo por medio de una camisa de agua en todos los reactores a 30°C. Se utilizó un condensador exhausto en la salida del aire para evitar la pérdida de líquido.

Como parámetros del proceso se determinaron on-line el oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y el potencial redox.

Se midió el pH con un electrodo de pH (405-DPAS-Sc-K8S/200 electrodo de combinación, Mettler Toledo) y por medio de un medidor-controlador (pH-Transmitter 2500, Mettler Toledo) se obtuvo la señal para el control del proceso. El proceso se realizó sin ajustar el pH, ya que éste mantuvo en un margen de un valor fisiológico de 6,5 a 8,6 pH.

El potencial redox de los barroes se analizó en el proceso con un electrodo redox (Pt 80b-S8/120 electrodo de acero, Mettler Toledo).

Para analizar el oxígeno disuelto se usó un sensor de oxígeno (12/120T-type, Mettler Toledo) que estaba conectado con un medidor de oxígeno (O₂ Transmitter 4500, Mettler Toledo) y que permitió al mismo tiempo analizar la temperatura de las muestras.

2.4 Ensayos experimentales de reactores

Para los test de degradación se usó un medio mineral sin fuente de carbono con adición de fosfato en forma de K₂HPO₄ y amonio en forma de NH₄Cl. El análisis de los nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito) se realizó diariamente. Cuando fue necesario, se agregó amonio y fosfato. Con esta medida se excluyó una limitación de nutrientes en relación a los componentes mencionados. Para el control de la degradación del aceite mineral se tomaron diariamente muestras que se conservaron a -16°C hasta su análisis por el método de H18. Se realizaron análisis de microorganismos mediante recuentos con un intervalo de uno a tres días.

Ensayos en reactores de airlift de un volumen de 4,5 l

Para investigar la degradación de hidrocarburos de aceite mineral que forman parte de los lodos de perforación se utilizaron dos reactores de airlift de un volumen de 4,5 l con diferentes contenidos de compuestos sólidos:

- Reactor 1, 20% de compuestos sólidos
- Reactor 2, 30% de compuestos sólidos

Para estos ensayos se reguló el lodo inicial (60% del contenido de sustancia seca) con agua potable que contenía disuelto los nutrientes necesarios y que correspondía al contenido de compuestos sólidos.

Después de un período de cultivo de 7 días se hizo la primera recarga del reactor usando lodo no tratado con una relación de 1:2 (que significa el recambio de la mitad del contenido del reactor por lodo no tratado de un peso seco idéntico) y después de 13 días la segunda recarga con una relación de 1:4 (se reemplazó el 75% del contenido del reactor con lodo no tratado).

Ensayo en el reactor airlift de 65 l

El ensayo en escala piloto se realizó con 65 l de lodo de un contenido de peso seco de 30%. En este ensayo se realizó la primera incorporación de los nutrientes después de la oxidación del lodo y se hicieron otros agregados dependiendo de la concentración de los mismos en las muestras centrifugadas. El ensayo tuvo que ser interrumpido después de 6 días por causa de una fuerte formación de espuma.

2.5 Análisis

Determinación cuantitativa de los hidrocarburos del aceite mineral (HAM)

Los HAM fueron analizado según el método DIN 38409 H18.

Para el análisis se pesó en un frasco de Erlenmeyer de un volumen de 250 ml, 1 g de una muestra congelada. Después de añadir 50 ml Freón (1,1,2,-Triclorotrifluoretano) se extrajeron las muestras por agitación (30 min) a 25°C y 130 revoluciones/min. A continuación se filtró el

eluido con un filtro plegado (Whatman 113V, No. 1213185) en una columna de cromatografía cerrada que contenía 8 g de óxido de aluminio. Las muestras se analizaron a continuación en una cubeta de cuarzo de 1 cm en un espectrofotómetro (FTIR espectrofotómetro 8000, Shimadzu) con una longitud de onda de 3080 a 2700 cm^{-1} .

Análisis de los compuestos orgánicos en el aire de salida del reactor

Se analizó el aire de salida del reactor por su contenido de hidrocarburos volátiles. Para esto se extrajo con un muestreador de gases en distintos tiempos del ensayo una definida subcorriente de gas (GS 312, DESAGA). Este gas se introdujo en un tubo de vidrio que contenía carbón activo (tipo G, Dräger). Los hidrocarburos volátiles retenidos en los tubos de carbón activo (muestras y controles correspondientes) fueron extraídos con 5 ml de sulfuro de carbono (en un tubo de vidrio cerrado e impermeable al gas); después de 10 min de tratamiento con ultrasonido. El extracto obtenido fue filtrado con un filtro de Nalgene (0,45 μm). Los extractos así obtenidos se analizaron por cromatografía gaseosa.

Los análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones:

- CG Perkin Elmer con tomamuestras automático
- Columna capilar DMS llena de sílica, 50 m • 0,32 mm, espesor de la capa 1 μm
- Detector FID 280°C
- Programa de temperatura: T₁: 40°C, 0 min; tasa 2 K/min, T₂: 150°C, 2 min
- carrier gas N₂ (pureza 5.0, Linde), 14,5 kPa
- FID, gas combustible: aire sintético (libre de hidrocarburo, Linde), H₂ (libre de hidrocarburo, Linde)

La cuantificación se realizó con el método de estándar externo con ayuda de una mezcla estándar (Supelco). Con el programa de CG se registraron 49 componentes de C₁ (metano) hasta C₁₃. Se sumó la concentración de las sustancias individuales y se calculó la concentración de los hidrocarburos volátiles en el aire de salida del reactor en las distintas tomas de muestra. A través de la integración de los datos durante el test de degradación se pudo evaluar la cantidad total de los hidrocarburos que salieron del reactor en el aire de salida.

Análisis del extracto de hexano por CG-SM

Para obtener información detallada de la composición de los hidrocarburos de aceite mineral se sacaron con frecuencia muestras del reactor airlift; se liofilizaron y luego se trató 0,5 g de cada muestra con 2,5 ml de n- hexano durante 15 min, con ultrasonido en ampollas impermeables al gas y a continuación fueron centrifugadas (10000 r/min) durante diez minutos. El análisis cualitativo de los extractos se realizó bajo las siguientes condiciones:

- CG HP 5890 series II, MS HP 5971 series (Quadrupol)
- columna HP-5 MS, 30m • 0,25 mm, grosor de la capa 0,25 μm
- full scan m/z 40...600
- programa de temperatura: T₁: 60°C, 1 min; tasa 5 K/min, T₂: 300°C, 20 min
- gas portador He, 10 psi
- Temperatura del inyector 280°C, volumen de inyección 1 μl , temperatura de la línea de transferencia 280°C

Con este programa de análisis se detectaron alcanos de un tamaño de moléculas de C₁₄ a C₄₀ en la muestra del fango de perforación.

Determinación del peso seco de las suspensiones de barro

La sustancia seca se analizó en una balanza para determinación de humedad (Sartorius MA40) secando con infrarrojo a temperatura de 105°C hasta que se estabilizó un peso constante.

Determinación de nutrientes en las muestras de barro centrifugadas

En los lodos centrifugados se analizó con varillas de análisis (Merck) en forma semi cuantitativa la concentración de fosfato, amonio, nitrato y nitrito.

Recuento microbiano en las muestras de lodo

La determinación de las unidades formadoras de colonias (ufc) en las muestras de lodo se realizó por siembra en placas que contenían R2A -agar. Se mezcló 10 ml de muestra de lodo con 90 ml de una solución estéril de pirofosfato sódico al 0,2%. La mezcla se llevó a agitador durante 30 minutos a 25°C y 150 revoluciones/min. Después de 2 – 5 minutos de sedimentación de la mezcla se sacó en forma estéril 1 ml del sobrenadante. Después de una serie de diluciones con 0,9% NaCl se sembraron 0,1 ml en placas con R2A -agar. Las placas se incubaron 10 días a 20°C. Los recuentos se hicieron los días 5, 7 y 10 del período de incubación tomándose los valores del décimo día como resultado experimental.

3. Resultados de los test de degradación en el reactor airlift

El objetivo experimental fue la investigación de biorremediación de los fangos de perforación contaminados con aceite mineral. Se determinaron los parámetros esenciales para un desarrollo positivo del proceso como la cinética de degradación y de la concentración final alcanzable de los hidrocarburos del aceite mineral. En el reactor de 4,5 l se determinó en qué medida se puede acelerar la degradación de aceite mineral por medio de un proceso semicontínuo. También se investigó la influencia de distintas concentraciones de masa sólida y de la aplicabilidad de la analítica. El mayor tamaño en que se realizó el experimento fue en un reactor airlift de 65 l.

3.1 Ensayos en reactores airlift de 4,5 l

La cinética de la degradación microbiana del aceite mineral en la muestra de fango de perforación contaminado se presenta en la figura 1.

Después de una corta fase de adaptación en la cual se produjo la oxidación del barro anóxico, se observó una gran disminución de la concentración del aceite mineral. Después de 140 h de tratamiento se terminó el proceso de degradación. En el ensayo 1 la eficiencia de degradación fue de 82% y en el ensayo 2 de 77%, siendo las concentraciones finales de 35000 y 45000 mg/kg peso seco. Después de la primera recarga la degradación del aceite mineral se realizó más rápido en comparación con la primera etapa del proceso. Así la fuente de carbono disponible se extendió por 60 h más. La concentración final en ambos procesos fue aproximadamente de 2800 mg de hidrocarburos de aceite mineral por kg de sustancia seca. La eficiencia de degradación obtenida en A1 y A2 en este lapso alcanzó a 85% en relación a la concentración inicial del barro no tratado que tenía 19500 mg/kg de sustancia seca. En el día 13 del ensayo se realizó una nueva recarga con una relación 1:4. En un plazo de 110 h después

de la segunda recarga se metabolizaron 80,5% en el ensayo 1 y 82,5% en el ensayo 2 logrando las concentraciones finales de 3800 y 3400 mg/kg de peso seco.

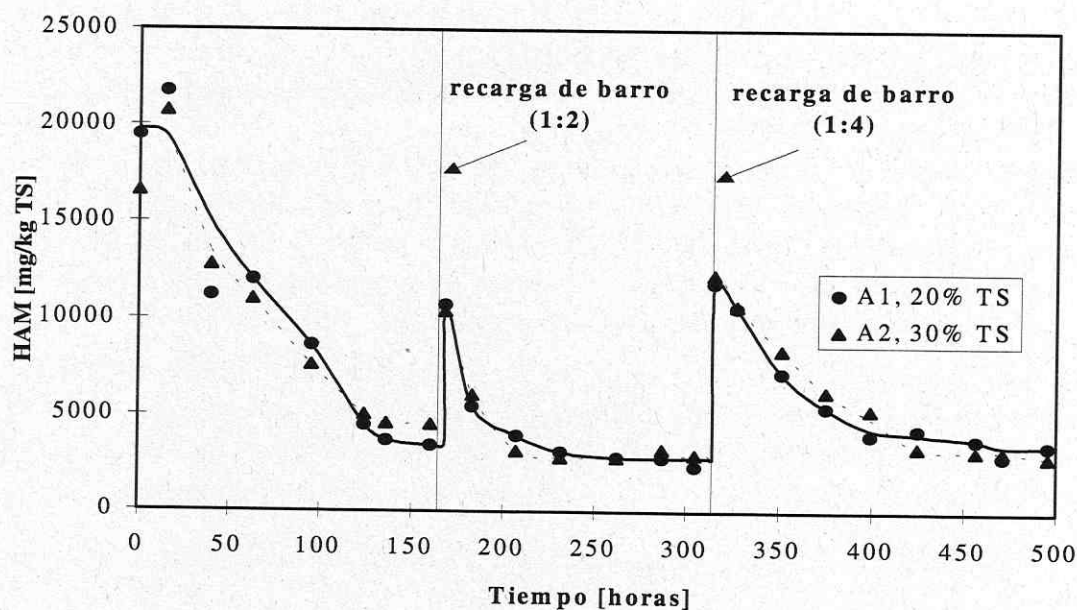


Fig. 1: Cinética de la degradación del aceite mineral (HAM). Tratamiento de fango de perforación contaminado con aceite mineral en un reactor airlift de 4,5 l. Las flechas indican el momento del recambio de una parte del contenido del reactor con barro no tratado (TS = masa seca)

En la figura 2 se presenta el desarrollo de los microorganismos autóctonos en los tres ciclos discontinuos de ambos reactores que funcionan con diferentes concentraciones de masa sólida.

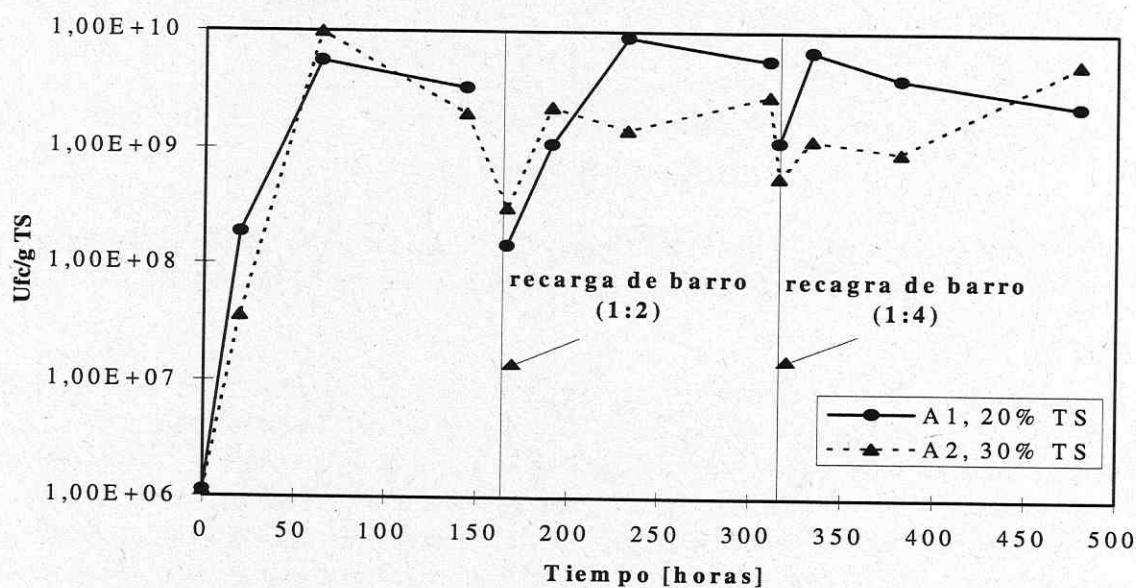


Fig. 2: Desarrollo de las ufc (unidades formadoras de colonias). Tratamiento de lodos de perforación contaminados con hidrocarburos de aceite mineral en un reactor airlift de 4,5 l con diferentes contenidos de masa seca (TS)

La concentración de células aumentó en un lapso de tres días más de 3 órdenes de magnitud. En todos los tres ciclos discontinuos se estabilizó un nivel de células entre $10 \cdot 10^9$ ucf/g y $10 \cdot 10^{10}$ ucf/g sustancia seca.

El pH se analizó directamente en el proceso durante todo el ensayo y no se realizó ningún ajuste ya que el pH no sobrepasó su rango fisiológico durante todo el tiempo del ensayo. En los diferentes ensayos se puede ver una buena coincidencia de las curvas del contenido de aceite mineral y del pH. Después de un corto aumento del pH al empezar del experimento que posiblemente estaría relacionado con un estado de equilibrio de ajuste, el pH disminuyó en el transcurso del experimento y se ajustó a un valor estable más o menos al mismo tiempo que finalizó la degradación microbiana del hidrocarburo de aceite mineral. La disminución del pH se explica por la síntesis de ácidos orgánicos que resultan de la degradación de los hidrocarburos y la oxidación de amonio y su incorporación en la biomasa.

El pH resultó ser un parámetro útil para el control simple del consumo metabólico de los hidrocarburos de aceite mineral. Se puede concluir que en el caso de la matriz investigada los valores de pH de 6,6 a 6,7 señalan el término del metabolismo de hidrocarburos de aceite mineral.

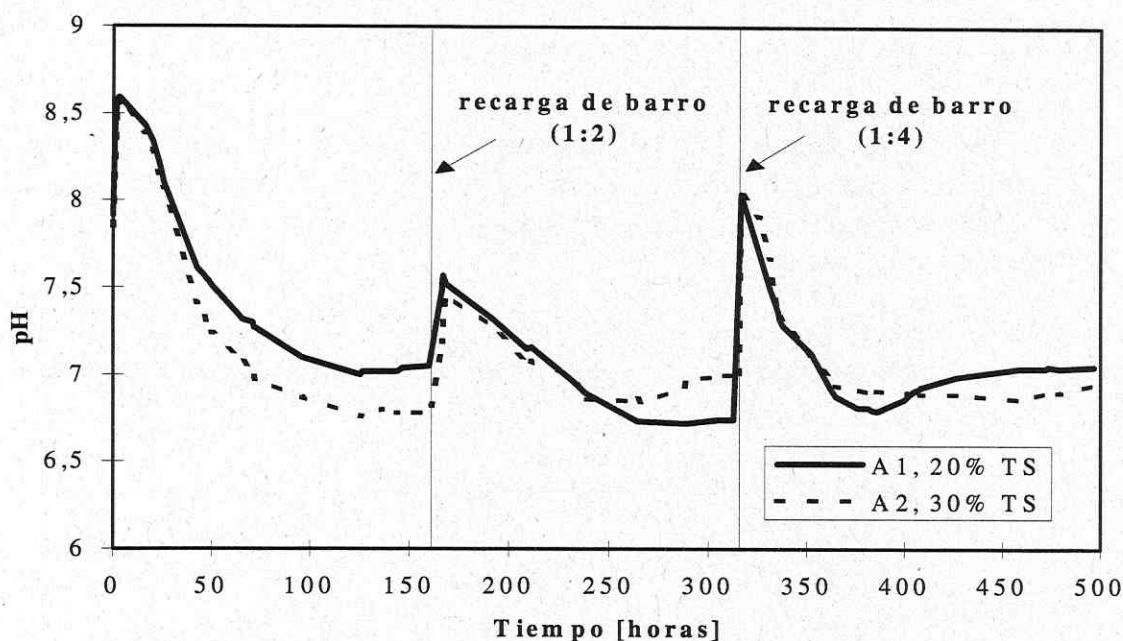


Fig. 3: Cinética del valor pH. Tratamiento de lodos de perforación contaminados con hidrocarburos en reactores airlift de 4,5 l que contienen diferentes cantidades de masa seca (TS)

El potencial redox (fig. 4) aumenta fuertemente al inicio de un ciclo batch y va de un nivel negativo a un nivel positivo durante las 10 primeras horas. En este tiempo se realizó la oxidación química del barro anóxico. El aumento ulterior del potencial redox es producido en gran medida por los procesos de oxidación biológicos que coinciden con el incremento de la biomasa y con la degradación microbiana de hidrocarburos de aceite mineral. Se puede ver en las dos recargas que al agregarse el barro anóxico no tratado el potencial redox se reduce y que a continuación vuelve a aumentar debido al suministro de oxígeno y la oxidación consiguiente.

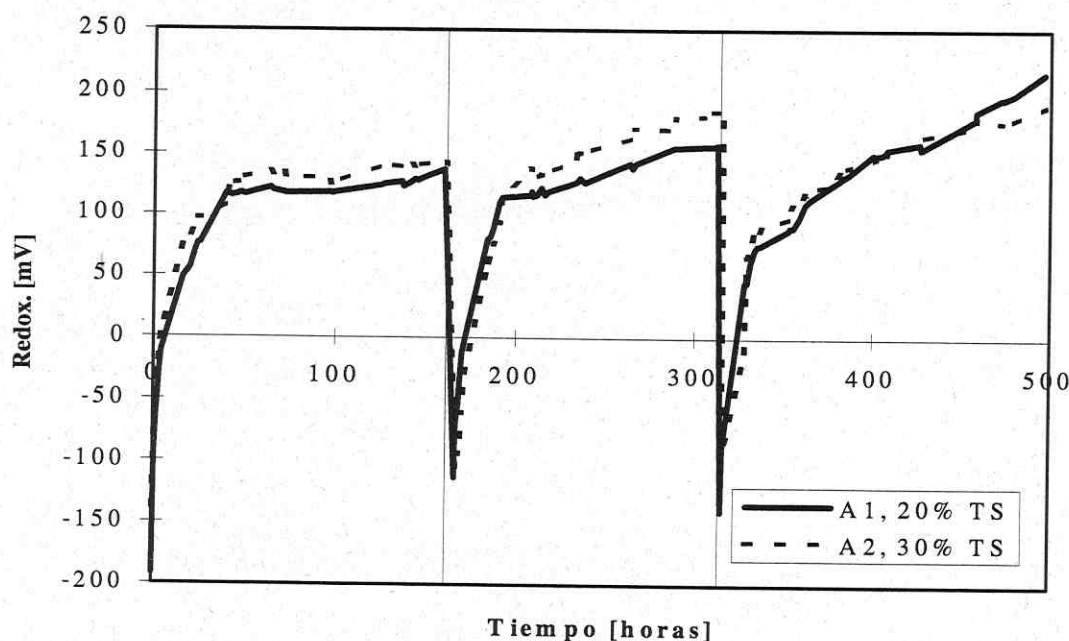


Fig. 4: Cinética del potencial redox. Tratamiento de fangos de perforación contaminados con hidrocarburos de aceite mineral en un reactor airlift de 4,5 l que contiene diferentes cantidades de masa seca (TS)

El análisis del oxígeno disuelto en los distintos ensayos fue muy difícil, debido al que los electrodos para oxígeno disuelto se ensuciaron con barro y mostraron una pequeña deriva de los valores calibrados a larga duración. Los valores no están representados en el gráfico. Debido a la aireación intensa en el airlift se puede suponer, con excepción de la fase de la oxidación química al inicio de los ciclos batch, que siempre se puede garantizar un suministro suficiente de oxígeno disuelto para los microorganismos. La cinética de eliminación de hidrocarburos de aceite mineral así como la cinética del pH y del potencial redox muestran una correlación para ambos contenidos de sustancia seca. Ya que un reactor con un contenido más alto de sustancia seca es más económico, se realizó el siguiente ensayo con una sustancia seca de 30%.

3.2 Ensayo en el reactor airlift de 65 l

El objetivo fue transferir los conocimientos adquiridos anteriormente a una planta piloto e investigar la estabilidad del proceso. Para esto se trataron lodos de perforación con un contenido de sustancia seca de 30% en el reactor airlift de acero inoxidable con un volumen de 65 l. Después de 142 h se tuvo que interrumpir el ensayo debido a una gran producción de espuma. Durante este tiempo no se logró ningún nivel constante. La concentración de hidrocarburos de aceite mineral al fin del ensayo fue de 6500 mg/kg de peso seco. Esto corresponde a un grado de degradación del 64% en relación a la concentración inicial de 18000 mg/kg de peso seco.

Las concentraciones de células aumentaron rápidamente en analogía con los ensayos en los reactores airlift de 4,5 l. Después de 48 h se obtuvieron concentraciones de $10 \cdot 10^9$ ufc/g a $10 \cdot 10^{10}$ ufc/g peso seco las cuales se estabilizaron en este nivel (los resultados no están representados en un gráfico).

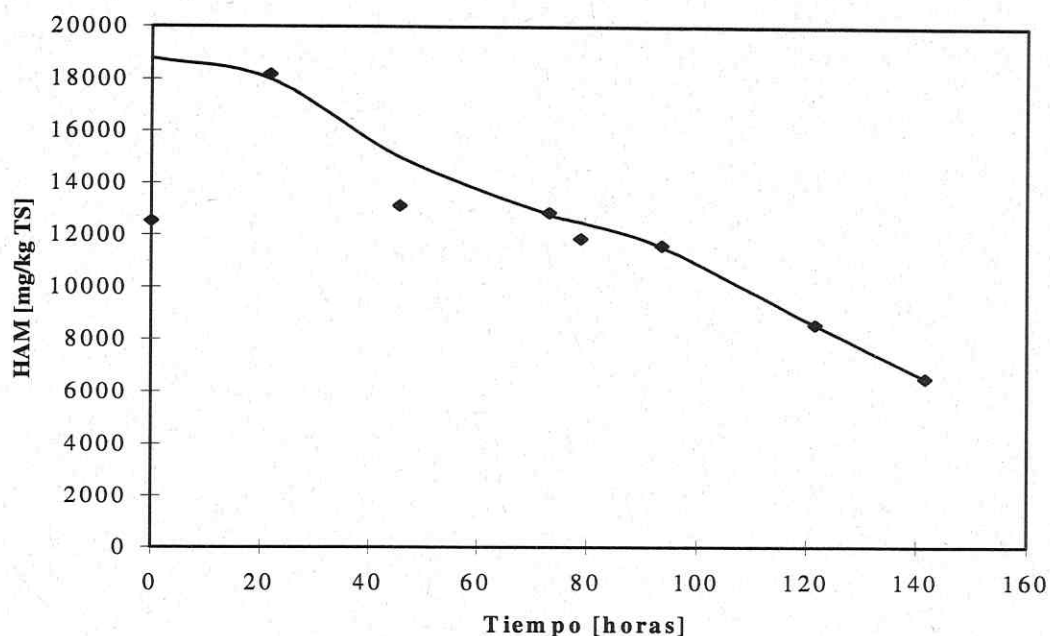


Fig. 5: Cinética de la degradación de aceite mineral en fangos de perforación con un tratamiento intenso en un reactor airlift de 65 l (TS = masa seca)

El pH se comportó también como en los ensayos de 4,5 l. Disminuyó de un valor inicial de aproximadamente 8,2 a 6,6 al final del ensayo. Se pudo comprobar también en este ensayo que el pH disminuye dependiendo del metabolismo de los hidrocarburos de aceite mineral y por consecuencia se puede tomar como parámetro sencillo para el control del proceso.

Los experimentos en la planta piloto sólo servirían para hacer una balance preliminar de las sustancias nocivas. Para esto se determinó la concentración de hidrocarburos fácilmente volátiles en el aire de salida y la concentración de los hidrocarburos de aceite mineral en el agua del proceso.

La mayor parte de los compuestos fácilmente volátiles se fugaron durante las primeras 5 horas del proceso, con lo cual disminuyó con el tiempo en forma exponencial. Se evaluó la cantidad absoluta de los compuestos orgánicos que escaparon del fermentador en los primeros 5 días. Esta alcanzó cerca de 3500 mg. En un reactor de 65 l con una concentración de hidrocarburo inicial de 18000 mg/kg de masa seca y con un contenido de 30% de sustancia seca este valor evaluado significa 0,87% de la cantidad de sustancias nocivas que estaban presente al inicio del experimento. Por consecuencia la porción de sustancias nocivas que salió con el aire de salida del reactor es insignificante. La reducción de la concentración de las sustancias nocivas en el transcurso del ensayo es claramente atribuible a un metabolismo de los microorganismos autóctonos.

En la fase acuosa no se detectaron por el método de H 18 en ningún momento del experimento cantidades relevantes de hidrocarburos de aceite mineral.

Como efecto positivo adicional del tratamiento biológico se determinó que se mejoró en forma significativa la sedimentación de los granos finos. Después de 6 horas el volumen del barro se redujo a 62%, pero al extraer el sobrenadante claro se pudo reducir la cantidad de barro que se seguía tratando a cerca del 40%. En comparación el barro no tratado permaneció estable y después de un plazo de 48 horas no se pudo detectar ninguna sedimentación. Por una parte, la notable mejoría de la sedimentación del material es debido a un cambio de la

estructura de la superficie de las partículas de grano fino por la eliminación de los contaminantes orgánicos. Por otra parte, el crecimiento de la biomasa en la superficie de las partículas de arcillas produce a una floculación que al aumentar el tamaño de las partículas acelera la velocidad de sedimentación.

4. Discusión y perspectiva

Con los ensayos de degradación en los reactores airlift de 4,5 l se obtuvieron degradaciones reproducibles de alrededor de un 80% durante un lapso de tratamiento de tres a cuatro días. Las concentraciones finales de los hidrocarburos de aceite fueron de 2800 a 4500 mg/kg de sustancia seca. CROFT et al. (1997) lograron en el plazo de 5 días una descontaminación del 90% en un reactor slurry al tratar suelos contaminados con aceite Diesel. En casos de derrames más viejos o con material de grano fino provenientes de los lavaderos de suelos se obtuvieron en la mayoría de los casos grados de degradación más pequeños a pesar de aplicarse tiempos de tratamiento más largos (ELIAS y WIESMANN 1995). El alto grado de degradación del 80% es debido al hecho que la contaminación no se puede considerar como envejecida a pesar de que los barros estuvieron almacenados por varios años. Los lodos de perforación se almacenaron en cavidades de tierra directamente después su producción y debido a la baja permeabilidad de la matriz no se produjo un suministro de oxígeno y nutrientes.

Comparando los grados de degradación y las cinéticas de las dos concentraciones de sustancia seca de 20% y 30% no se detectaron diferencias importantes. Por razones económicas se recomienda el funcionamiento del reactor con sustancias de alto contenido sólido, porque así se puede descontaminar más material en el mismo plazo de tiempo.

Las tasas específicas de degradación en las fases activas de los tres ciclos batch fueron de 2700, 2800 y 1800 mg degradación de hidrocarburo por kg de sustancia seca por día. Con esto se puede ver que sólo con la primera dosificación se produjo una aceleración de la degradación de hidrocarburos de aceite mineral. La cinética después de la segunda recarga no reveló un aumento de la velocidad de degradación. Debido a una dosificación evidentemente retrasada, la biomasa no logró nuevamente su actividad máxima. Un análisis rápido y confiable del proceso puede ayudar de manera tal que al final del proceso degradador se puede recambiar una gran parte del barro por barro no tratado.

En el reactor airlift de 65 l disminuyó la concentración inicial de aceite mineral del fango de perforación de 18000 mg/kg sustancia seca a 6500 mg/kg sustancia seca. La tasa específica de la degradación fue cerca de 2200 mg/kg sustancia seca por día, la cual es comparable con los datos obtenidos en los ensayos de airlift de 4,5 l. Con estos datos los rendimientos de degradación se encuentran en el mismo margen y el aumento de escala puede considerarse como eficaz.

Los análisis de CG-SM de extractos de hexano señalaban, que las concentraciones residuales de hidrocarburos de aceite son compuestos de alto peso molecular ($> C_{40}$), los cuales debido a su peso molecular o su fijación a la matriz orgánica no son disponibles a la degradación biológica. Todo lo contrario a la muestra inicial no se detectaron después de 6 días de tratamiento en un reactor más alcanos en el margen de C_{14} a C_{40} . Las concentraciones finales de los hidrocarburos de aceite mineral de un mínimo de 2800 mg/kg de sustancia seca eran claramente más altas que los valores que permiten reintroducir suelos tratados en sitios limpios (según LAGA 1995). El límite máximo para reintroducir suelo fue fijado con el valor Z2 en 1000 mg/kg de sustancia seca. Pero, ANGEHRN et al. (1997) discuten si tiene sentido

mantener en forma rígida un factor limitante ya que un material saneado con éxito normalmente no representa ningún peligro potencial. El contenido residual consiste en su mayoría en compuestos apolares, hidrófobos, de alto punto de ebullición. Estos alcanzan el agua subterránea sólo en cantidades insignificantes en forma de eluato y no tienen ningún efecto tóxico en microorganismos, plantas y animales. En la fase acuosa de los lodos de perforación tratados se detectaron sólo muy pequeñas concentraciones de hidrocarburos de aceite mineral, los cuales estaban en el nivel del límite de determinación del método H18.

En todos los ensayos se observó, que la degradación de hidrocarburos de aceite mineral y la reducción del pH estaban en correlación. En consecuencia el pH parece ser un parámetro simple que sirve para evaluar la degradación de los hidrocarburos de aceite mineral. Luego se tiene que considerar, que un alto suministro de nutrientes de una vez tiene un efecto directo en el pH y que igualmente la oxidación de sulfuro a sulfato baja el pH.

La producción de espuma observada con frecuencia y que ocasionó el término del ensayo en el reactor airlift de 65 l, se debe a una producción de surfactantes o a una lisis de una parte de las células que intervienen en la degradación. La causa de la lisis es la limitación de uno o varios compuestos de los nutrientes.

Un abundante suministro con iones nutrientes de amonio y fosfato para los microorganismos resultó problemático ya que la matriz de la arcilla de los lodos de perforación tiene una gran capacidad de adsorción, especialmente para el fosfato. Los minerales arcillosos son filosilicatos en cuyas capas intermedias existen fuertes interacciones electrostáticas. El tamaño pequeño de las partículas y la carga estratificada son las causas de la gran capacidad de reacción de los minerales arcillosos (SCHEFFER y SCHACHTSCHNABEL 1992). El fosfato puede reaccionar con los filosilicatos. Esto produce la precipitación de fosfato de aluminio (ZIECHMANN y MÜLLER-WEGNER 1990).

Perspectiva

- Para mejorar el proceso podría oxidarse el lodo anóxico en un recipiente por medio de una aireación intensa antes de añadirlo en el fermentador. Así el cambio del ambiente relacionado con la alimentación del reactor sería minimizado, lo que seguramente aceleraría el proceso de degradación.
- La causa de la formación de espuma tiene que ser estudiada para evitar interrupciones de los procesos.
- La dosificación de los nutrientes tiene que ser optimizada ya que tanto una dosificación de nutrientes excesiva, así como una insuficiente, produce una inhibición de la degradación microbiana de los hidrocarburos de aceite mineral.

5. Resumen

Se puede demostrar, que la contaminación de hidrocarburos de aceite mineral en material de grano fino puede disminuirse significativamente en reactores airlift a escala de laboratorio como a escala piloto. En este material se trata de lodos de perforación que resultan de la producción de petróleo. Los barros contenían una contaminación de hidrocarburos de alrededor de 19000 mg/kg de sustancia seca.

Este material de grano fino puede aplicarse a un biorreactor sin realizar ninguna selección previa. En el proceso de tratamiento de suspensiones se obtuvo en un lapso de 3 a 4 días una disminución de cerca de 80%. Los microorganismos autóctonos se activaron por medio de una

aireación intensa y un suministro suficiente de nutrientes en el medio nutritivo del reactor, con lo que se lograron concentraciones de células de 10^9 a 10^{10} ufc/kg sustancia seca y tasas específicas de degradación de 1800 a 2800 mg HAM/kg de sustancia seca por día.

Debido a stripping con el aire de salida del biorreactor se perdió menos del 1% de la cantidad inicial de hidrocarburos. Una degradación completa de los alcanos C_{14} a C_{40} se comprobó con CG-SM.

Se demostró que la matriz de lodo de perforación exige condiciones especiales en el suministro de nutrientes. Los compuestos de fosfato fueron notoriamente más adsorbidos que los compuestos de amonio. Durante los ensayos de degradación se estableció que el pH tiene una buena correlación con la degradación de hidrocarburos y en consecuencia sirve como parámetro simple para describir en forma adecuada el proceso de degradación. Esto es especialmente importante porque en un proceso semicontinuo al momento de finalizar la degradación microbiana es necesario reemplazar la nueva fuente de carbono (lodo no tratado), ya que esperar demasiado tiempo baja la actividad biológica de los microorganismos.

Se comprobó que el tratamiento en un biorreactor mejoró considerablemente la capacidad de sedimentación del fango de perforación. Este tiene un efecto positivo para el siguiente paso de la deshidratación.

Bibliografía

- ANGHERN, D., GÄLLI, R., SCHLUEP, M., ZEYER, J. (1997): Biologisch saniertes Bodenmaterial aus Mineralölschadensfällen: Abfall oder Produkt? Terra Tech. 3, 51-56.
- CRAFT, B., PITTMAN, S., DAVIES, S. 1997: Combined *ex situ* physical and bioreactor treatment of diesel in soil. *In situ* and *on-site* bioremediation: Vol.5. Batelle Press. S. 83-84.
- ELIAS, F., WIESMANN, U. (1995): Biologische Behandlung von Reststoffen der Bodenwäsche in einer 4-stufigen Rührreaktorkaskade im Labormaßstab. Altlasten-Spektrum. 3, 148-157.
- KNORR, C., v.SCHELL, T. (Hrsg.) 1997: Mikrobieller Schadstoffabbau. Vieweg. Braunschweig/Wiesbaden.
- LAGA-Länderarbeitsgemeinschaft Abfall 1995: Technische Regeln Teil 6/4.3.17.1.
- SCHEFFER, F., SCHACHTSCHNABEL, P. 1992: Lehrbuch der Bodenkunde. Enke Verlag. Stuttgart.
- ZIECHMANN, W., MÜLLER-WEGNER, U. 1990: Bodenchemie. BI-Wissenschaftsverlag.

Tratamiento intensivo de suelos biorremediados en reactor Airlift

E. ERCOLI¹, J. GÁLVEZ¹, R. MÜLLER², U. STOTTMEISTER²

¹Laboratorio de Bioprocesos, Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ingeniería, 5500 Mendoza, Argentina

²UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Alemania

1. Introducción

El tratamiento microbiológico de suelos, sedimentos y otros sólidos contaminados con hidrocarburos en la forma usual de aplicación lleva varios meses y los resultados muestran un decrecimiento asintótico del contaminante degradable. En casi todos los casos estudiados descritos en la literatura puede ser observado un remanente del contaminante después del tratamiento (ARENDE et al. 1993).

La razón de este fenómeno no resulta clara hasta el momento. Probablemente sean los equilibrios de sorsión-desorsión o la distribución no homogénea en la materia sólida los responsables de este comportamiento. Trabajos recientes analizan individualmente los tres tipos de limitación mencionados anteriormente: degradabilidad, difusividad y desortividad (ARENDE et al. 1993). Algunos trabajos sugieren que la difusión desde los agregados es el mecanismo limitante en la degradación hidrocarburos. Experimentos realizados con reactores tipo slurry para estudiar la biodegradabilidad de hexadecano y diesel oil muestran que la concentración residual de hidrocarburo después del tratamiento no es causada por incapacidad de los microorganismos presentes para degradar dichos substratos o por la formación de sustancias inhibitoras del desarrollo microbiano, ya que bajo otras condiciones de desarrollo mineralizan completamente el contaminante (GEERDINK 1995).

Los suelos contaminados poseen una distribución no uniforme de contaminante según la granulometría del mismo y el contenido de materia orgánica. En los suelos biorremediados ocurre un fenómeno similar. (NEEBE y FEIL 1993).

Las alternativa de usar reactores biológicos para realizar un tratamiento intensivo se encuentra seriamente limitada por los costos que implica mover grandes volúmenes de suelo. (ARENDE et al. 1993).

La base de planteo de este trabajo consiste en tratar solamente la parte altamente contaminada, o sea la fracción de partículas más finas, en un biorreactor aireado neumáticamente. La hipótesis de este trabajo se fundamenta en que en un sistema de depuración intensiva es posible lograr altas velocidades de transferencia de masa, fases homogéneas y condiciones controladas de desarrollo microbiano lo cual permite una descontaminación más profunda.

2. Materiales y métodos

Unidad de tratamiento (fig. 1): Esta unidad está formada por un tanque de lodos, un hidrociclón para separar la fracción fina del suelo y el reactor biológico. Todos están construidos en acero inoxidable AISI 316. El hidrociclón tiene 400 mm de altura, 100 mm de diámetro, 45 mm de diámetro de la salida superior y 5 mm de diámetro de la salida inferior. El reactor airlift tiene 218 mm de diámetro y 1025 mm de altura con un cilindro interior de 140 mm de diámetro y 900 mm de altura con fondo toriesférico de 35 mm de flecha máxima.

Posee una camisa de agua, para termostatación. Se puede controlar pH, temperatura y caudal y presión de aire de ingreso.

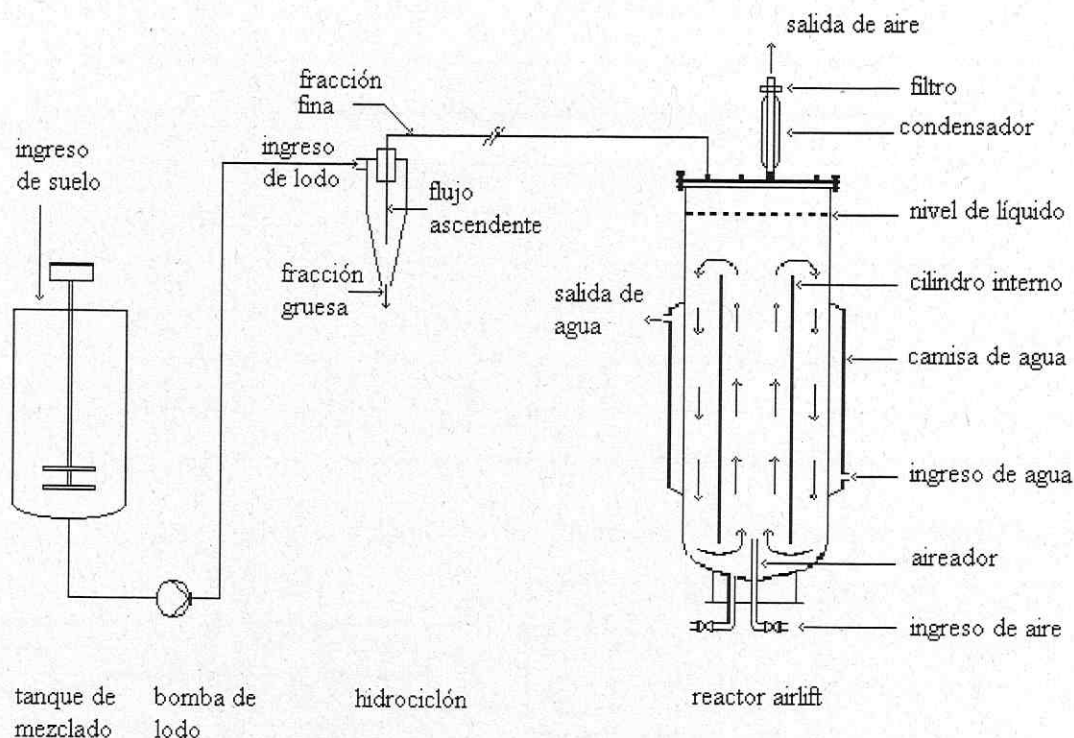


Fig. 1: Unidad de tratamiento

Microorganismos: Se utilizó un consorcio microbiano aislado del suelo de un campo petrolero de la provincia de Mendoza, Argentina, mediante la siguiente técnica: una cantidad de suelo fue transferida a un erlenmeyer conteniendo el siguiente medio de cultivo 5,0 g/l de NaCl; 0,2 g/l de $MgSO_4$; 1,0 g/l de $NH_4PO_4H_2$; 1,0 g/l de K_2PO_4H ; 0,5 g/l de $(NH_4)_2SO_4$; 0,02 g/l de extracto de levadura. Este erlenmeyer fue incubado en un agitador a 30°C y adaptado a concentraciones crecientes de contaminante durante 45 días. Posteriormente fue transferido asépticamente a un tubo de ensayo con el siguiente medio de mantenimiento: 5,44 g/l de KPO_4H_2 ; 5,68 g/l de Na_2PO_4H ; 1,00 g/l de NH_4Cl ; 1,50 mg/l de $FeCl_3$; 0,15 mg/l de $CaCl_2$; 1,0 g/l de extracto de levadura; 16,00 g/l de gasoil parafínico; 25,0 g/l de agar. Posteriormente se almacenó en refrigeración a 4°C. El cultivo obtenido está formado por un bacilo esporulado Gram positivo aerobio facultativo y una levadura aerobia.

Microscopio: Se utilizó un microscopio Fisher Scientific, con objetivo de inmersión de 100 X y objetivos normales de 40 X y 60 X.

Medio de cultivo: Para los ensayos de degradación en proceso semicontinuo se utilizó el medio de cultivo A (tab. 1 y 2) disuelto en el producto de cabeza del hidrociclón. Para la preparación del inóculo se utilizó el mismo medio pero en lugar del producto de cabeza del hidrociclón se utilizó agua deionizada para la disolución y se incorporó 16 g/l de gasoil hidrogenado como fuente de carbono. Para los ensayos de optimización de medios se usaron los medios A y B (tab. 1 y 2) combinando sus componentes de acuerdo a la tabla 4.

Suelo contaminado: Se ha utilizado un suelo modelo compuesto por arena tamizada (diámetro menor o igual a 2 mm): 95%; humus de lombriz (sin tamizar): 4,5%, gas oil hidrogenado: 0,5%.

Se prepararon dos tipos de suelo modelo (tab. 3).

Tab. 1: Composición de los medios de cultivo

Medio A		Medio B	
KH ₂ PO ₄	5,4 g/l	NaCl	5,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	5,6 g/l	MgSO ₄	0,2 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l	NH ₄ HPO ₄	1,0 g/l
Extracto de levadura	1,0 g/l	K ₂ HPO ₄	1,0 g/l
Micronutrientes A	0,15 ml/l	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g/l
		Extracto de levadura	1,0 g/l
		Micronutrientes B	10,0 ml/l

Tab. 2: Composición de los micronutrientes

Micronutrientes A		Micronutrientes B	
FeCl ₃	10 g/l	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	275 ml
CaCl ₂	1 g/l	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	550 mg/l
		CaCl ₂ • 2 H ₂ O	110 mg/l
		MnCl ₂ • 4H ₂ O	275 mg/l
		CuSO ₄ • 5 H ₂ O	110 mg/l
		CoSO ₄ • 7 H ₂ O	110 mg/l
		KCl	2750 mg/l
		NaCl	2750 mg/l

Tab. 3: Composición de los suelos modelo

Diámetro \ Arena	Grueso	Fino
Arena 0,501-2,000 mm	57,0%	9,5%
Arena 0,101-0,500 mm	28,5%	28,5%
Arena 0-0,100 mm	9,5%	57,0%
Humus	4,5%	4,5%
Gasoil hidrogenado	0,5%	0,5%

Los suelos modelo se almacenaron durante 90 días. Durante este período los recipientes se rotaron diariamente para homogeneizar el contenido. Posteriormente el suelo fue hidrociclado y el producto de cabeza fue utilizado para los ensayos de degradación. La distribución granulométrica se muestra en los gráficos 2 y 3 para los productos de cabeza de hidrociclón de los suelos modelos grueso y fino respectivamente.

Metodología experimental: Se realizó un ensayo preliminar para cada suelo modelo contaminado. Posteriormente se siguió trabajando sólo con el suelo modelo fino en todos los ensayos en proceso discontinuo. En los ensayos en proceso semicontinuo se utilizó el suelo modelo fino. El volumen de trabajo del reactor fue de 40 l. Se utilizaron dos tipos de aireadores: el primero en forma de boquilla elíptica para los ensayos preliminares y una placa perforada en los demás ensayos. El aire se introdujo con un caudal de 13 a 34 l/min. El pH se mantuvo en 6,80 y la temperatura en 30°C. Para el estudio de la influencia de la temperatura, ésta se elevó hasta 40°C. También se realizó un agregado de Tween 80.

Tab. 4: Combinaciones de los nutrientes en la optimización del medio de cultivo y concentraciones finales logradas en ensayos en erlenmeyers agitados

Componente	Medio base	Concentración de macro/micronutrientes	Concentración de hidrocarburo (ppm)	Degradación (%)
Testigo	A	Medio de referencia (Sin degradación)	956	0
	B	Medio de referencia (Sin degradación)	991	0
Fósforo	A	1,0 g/l KH_2PO_4 1,0 g/l NaH_2PO_4	n.d.	n.d.
	A	5,4 g/l KH_2PO_4 5,6 g/l NaH_2PO_4	198,81	79,2
	B	1,0 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,0 g/l K_2HPO_4	101,23	89,8
	B	5,0 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5,0 g/l K_2HPO_4	234	76
	A	1,0 g/l NH_4Cl	198,81	79,2
	A	5,0 g/l NH_4Cl	137,07	85,6
Nitrógeno	B	3,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	101,23	89,8
	B	15,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	274,48	72
Micronutrientes Inorgánicos	A	micronutrientes A	198,81	79,2
	A	micronutrientes B	198,81	79,2
	B	micronutrientes A	139,06	86
	B	micronutrientes B	101,23	89,8
Micronutrientes Orgánicos	A	0 g/l de extracto de levadura	95,25	90
	A	0,2 g/l de extracto de levadura	n.d.	n.d.
	A	1,0 g/l de extracto de levadura	198,81	79,2
	B	0 g/l de extracto de levadura	81,31	91,8
	B	0,2 g/l de extracto de levadura	89,28	91
	B	1,0 g/l de extracto de levadura	101,23	89,9
Condiciones Ambientales	A	pH constante (medio sin modificar)	198,81	79,2
	A	11,0 g/l KH_2PO_4 , pH libre (final 5,75)	53,43	94
	B	pH constante (medio sin modificar)	101,23	89,8
	B	2,0 g/l KH_2PO_4 , pH libre (final 8,60)	109,19	89

n.d.: no determinado

Determinaciones analíticas: Los hidrocarburos totales se determinaron mediante técnicas de espectrofotometría infrarroja por la norma Stichting CONCAWE I-72 (ANONIMOUS 1972). El método consta de las siguientes etapas: se toma una muestra homogénea de lodo y se lleva el contenido a pH = 5 con ácido clorhídrico. Se agregan 5 g de cloruro de sodio y 50 ml de tetracloruro de carbono y se agita vigorosamente por 15 minutos. Luego se deja sedimentar por 10 minutos y se extrae un volumen de 10 ml de la capa de tetracloruro de carbono.

Se agrega un gramo de Florisil y se agita por 2 minutos. Se deja sedimentar. El sobrenadante se analiza en la región espectral comprendida entre 3,2 y 3,6 μm comparándola contra un blanco de tetracloruro de carbono. Se determina el peso de los sólidos presentes en la muestra mediante filtrado o secado de la misma.

3. Resultados y discusión

Ensayos preliminares: los resultados se muestran en los gráficos 4 y 5 para los suelos modelo grueso y fino respectivamente. Se observa que se puede tratar eficientemente una suspensión de partículas finas altamente contaminada en un reactor airlift. Se han logrado degradaciones del 77% del hidrocarburo presente en un período de 62 horas para el suelo grueso y 55% en el modelo fino en 14 horas.

Se pueden distinguir dos fases: una inicial de degradación rápida y una lenta. La fase inicial puede deberse a un efecto combinado de degradación y evaporación. Este comportamiento coincide con las experiencias reportadas en la literatura: una primera en donde el contaminante presente en la superficie de la partícula se desorbe rápidamente y es consumido por los microorganismos y una segunda etapa en donde se produce la desorción del contaminante presente en el interior de la partícula (GEERDINK 1995).

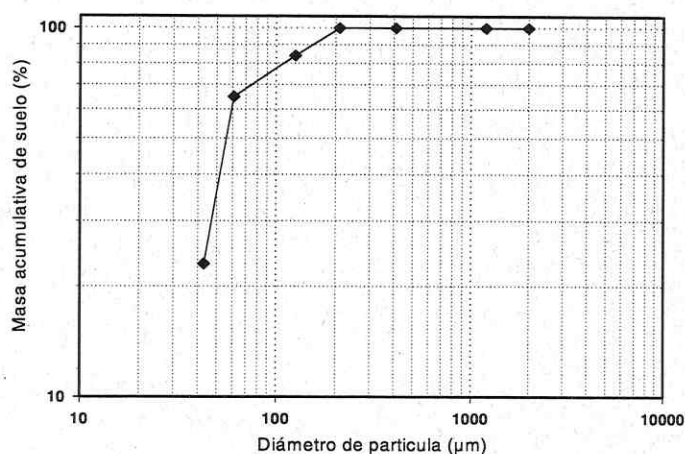


Fig. 2: Distribución de partículas en el producto de cabeza del hidrociclón para el suelo modelo grueso

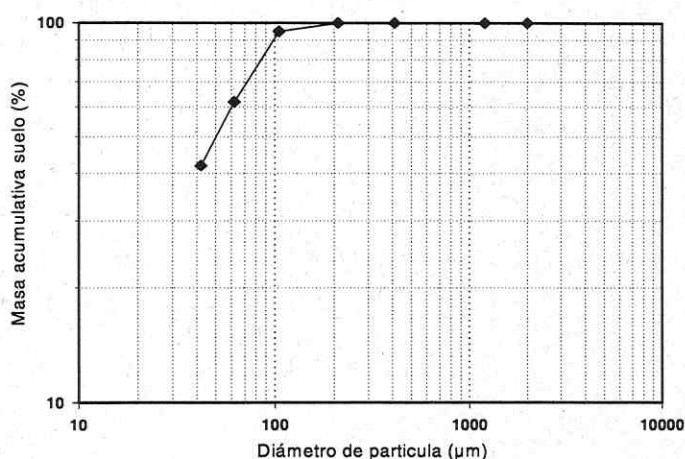


Fig. 3: Distribución de partículas en el producto de cabeza del hidrociclón para el suelo modelo fino

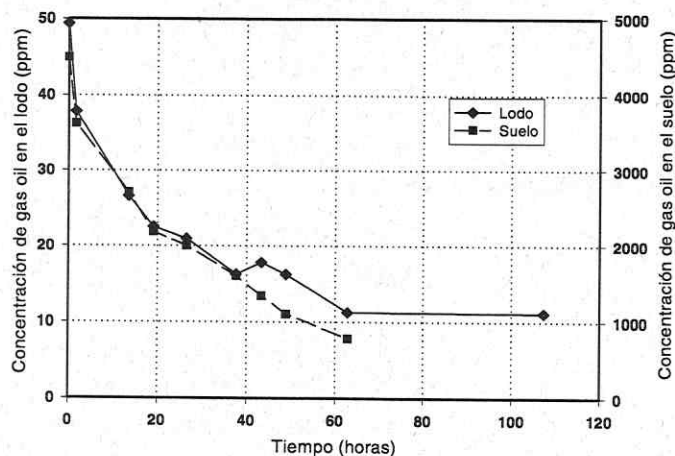


Fig. 4: Degradación de gas oil adsorbido sobre suelo modelo grueso

En los dos tipos de suelo estudiados se llega a una concentración final residual de hidrocarburo que no disminuye aunque se aumente el tiempo de tratamiento. Este valor límite representa alrededor del 25% de la concentración inicial del suelo para el suelo modelo grueso, mientras que para el suelo modelo fino la concentración residual corresponde al 50%.

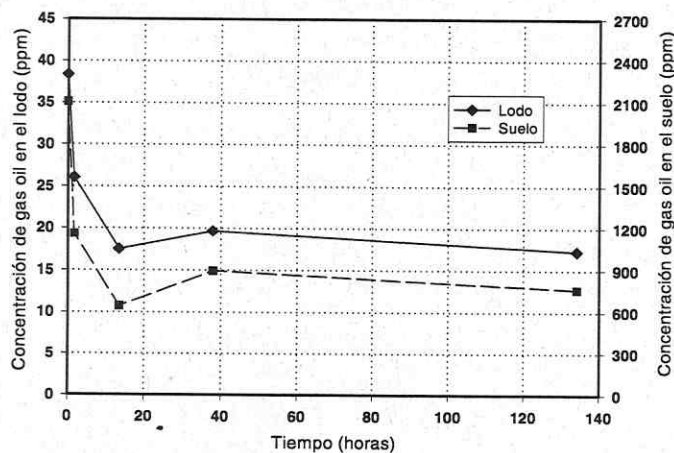


Fig. 5: Degradación de gas oil adsorbido sobre suelo modelo fino

Si se comparan los ensayos realizados con el suelo modelo grueso y el fino se observa que la concentración inicial del slurry dentro del reactor difiere en un 25%, pero si se analiza la diferencia correspondiente a la fase sólida, tenemos una diferencia del orden del 95% entre el modelo fino y el modelo grueso (se considera a los efectos de la

comparación la concentración menor; correspondiente al fino; como 100%). Este fenómeno se explica debido a la diferente composición granulométrica de los modelos y al efecto de la superficie específica en los fenómenos de sorción. En el modelo fino se tiene mayor proporción de partículas con baja granulometría (60%) mientras que en el grueso, dicha proporción es del 10%; por consiguiente, para una masa dada de contaminante, la concentración por unidad de superficie de partícula es menor en el modelo fino que en el modelo grueso. Dado que el hidrociclón separa las partículas de un determinado tamaño, en el modelo fino tendremos una masa mayor de suelo que es enviado al reactor que en el modelo grueso, lo que explicaría la menor diferencia observada en la concentración de contaminante en el slurry.

La tasa de degradación es más baja en el suelo modelo grueso que en el fino (fig. 4). Este comportamiento se puede explicar sobre la base de que en el modelo grueso el contaminante se hallaría en su mayor parte en los poros y en el interior de la partícula y en menor medida en la superficie. El contaminante presente en el interior de la partícula se desorbe lentamente. En los finos (fig. 5) ocurre un fenómeno opuesto: hay mayor superficie específica y menor longitud de poro por lo cual la desorción es más rápida (BOSMA et al. 1997).

Influencia de la concentración de oxígeno disuelto: El efecto de la concentración de oxígeno debido al cambio de aireador se puede observar en las figuras 6 y 7. Para mejorar la transferencia de oxígeno

dentro del reactor se modificó el aireador cambiándolo por uno tipo placa circular con perforaciones múltiples. Si se analizan los resultados y curvas se puede concluir que el cambio de aireador produjo una mejora en la degradación desde 50% al 77% si consideramos la variación en la masa total en degradación. Esta diferencia no se refleja en la variación que experimenta la concentración final de hidrocarburos totales en fase sólida donde solo se produce una mejora del 6%, hecho que debe ser estudiado.

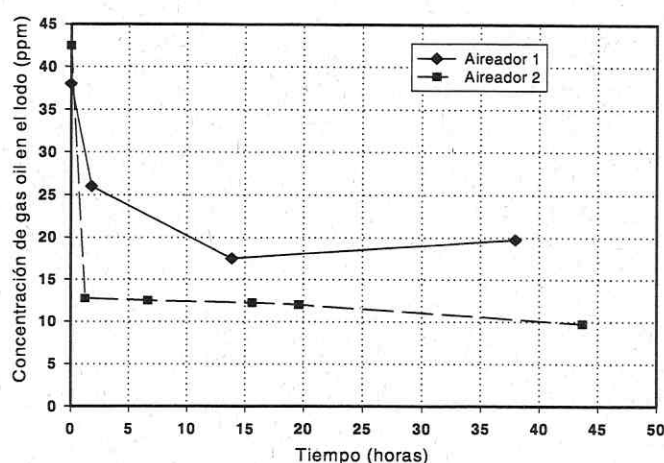


Fig. 6: Efecto de la concentración disuelta en el lodo

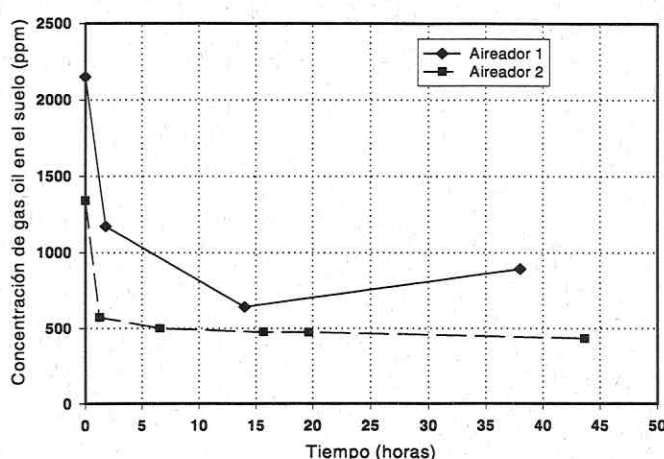


Fig. 7: Influencia de la concentración de oxígeno disuelto en el suelo

Una posible explicación es que en procesos donde se consume biológicamente un sustrato carbonado en muy bajas concentraciones, el oxígeno disuelto no constituye un sustrato limitante, por lo que la leve

mejora observada se podría deber a la mayor turbulencia que favorece la transferencia de materia desde la superficie de la partícula al microorganismo (BAILEY y OLLIS 1986)

Influencia del incremento de la temperatura y efecto de surfactantes: Los efectos del incremento de la temperatura y el efecto de la adición de surfactantes se muestra en el figura 8. Una vez que se llegó a la etapa asintótica se incrementó la temperatura para lograr una mayor desorción. Con este tratamiento se ha logrado una disminución global de la concentración de hidrocarburo del 86% en 90 horas, lo cual significa un incremento del orden del 15% en la degradación.

Los microorganismos necesitarían un período de 30 horas para adaptarse a las nuevas condiciones térmicas y recuperar una diversidad y concentración altas para el proceso degradativo.

El agregado del tensioactivo (Tween 80) no introduciría una mejora por lo menos si se coloca posteriormente de haber efectuado un incremento de temperatura.

Influencia del caudal de aire: La influencia del caudal de aire se muestra en la figura 9. El caudal de aire influye significativamente en el proceso de degradación, con un caudal de 30 litros por minuto la concentración de contaminante disminuye rápidamente alcanzándose una degradación del orden de 55% en 2,5 horas y una final de 70% en 16 horas. Cuando el caudal de aire es 13 litros por minuto se llega a 20% de degradación en 1,6 horas y 55% en 20 horas.

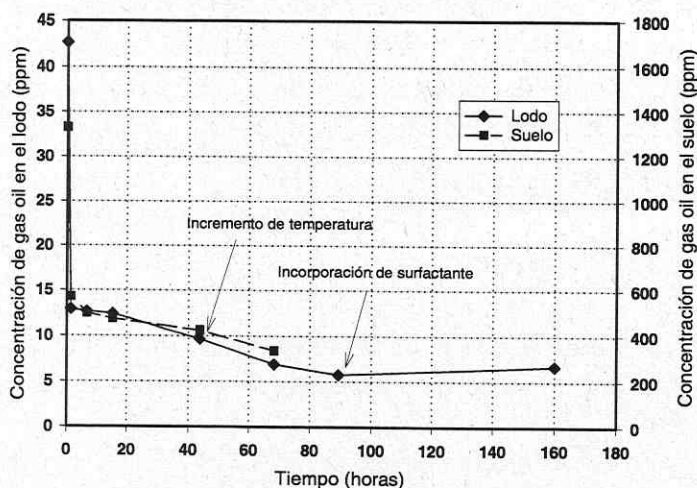


Fig. 8: Efecto del incremento de la temperatura e incorporación de surfactantes

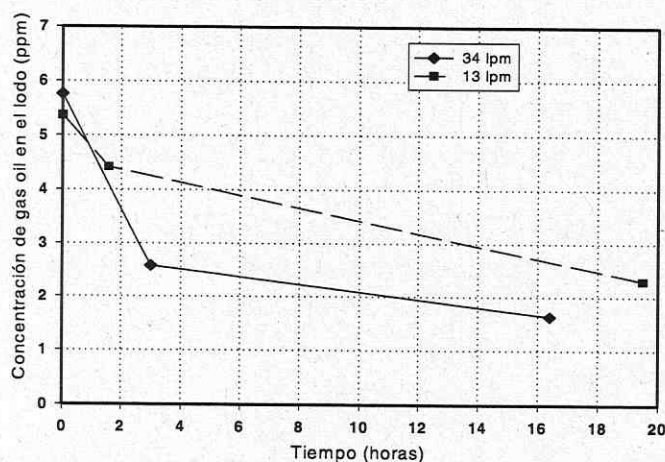


Fig. 9: Influencia del caudal de aire

Se observa una mayor degradación final cuando el caudal de aire es alto. Hay un desplazamiento del "piso" de concentración residual al incrementar el caudal de aire.

Análisis de la influencia de macro- y micronutrientes:
Los resultados se indican en la tabla 4. La influencia de cada nutriente y grupos de micronutrientes se analizó por separado.

Nitrógeno: Los mejores resultados se obtuvieron cuando la concentración se mantuvo entre 0,97 g/l y 1,33 g/l de NH_4^+ . Tanto un exceso como un déficit disminuyen la degradación alcanzada en un orden del 10 al 15%.

Fósforo: En una concentración del orden de 1,36 g/l de PO_4^{-3} , se obtienen los mejores resultados. En concentraciones más altas se produce una disminución en la degradación del hidrocarburo del orden del 15%.

Micronutrientes inorgánicos: Al trabajar con dos soluciones de micronutrientes, una rica y otra pobre, con distintas formulaciones de macronutrientes, no se observan diferencias apreciables en la degradación final obtenida. Este hecho se debe a que los micronutrientes se encuentran en cantidades adecuadas en el suelo (arena y humus) y en el agua del medio de cultivo.

Micronutrientes orgánicos: Al trabajar con tres concentraciones de extracto de levadura como micronutriente orgánico no se observaron diferencias significativas en el medio B, mientras que en el medio A se observó que desfavorece la degradación. En el primer caso se podría explicar porque los componentes pueden ser aportados en cantidad suficiente por el humus y no es necesario incorporar el extracto de levadura.

Cuando el pH se dejó evolucionar libremente en el medio B, el proceso de degradación llevó el pH a 8,6 y no se observó ningún efecto en la biodegradación final. En el caso del medio A el pH descendió y se incrementó la degradación en el orden de 15% (la disminución de pH favorecería el desarrollo de las levaduras).

La composición del medio optimizado es: 5,00 g/l de NaCl; 0,20 g/l de MgSO₄; 1,0 g/l de (NH₄)H₂PO₄; 1,0 g/l de K₂PO₄H; 3,00 g/l de (NH₄)₂SO₄; 1,00 g/l de extracto de levadura; 2,75 mg/l de FeSO₄ • 7H₂O; 5,50 mg/l de ZnSO₄ • 7H₂O; 1,10 mg/l de CaCl₂ • 2H₂O; 2,75 mg/l de MnCl₂ • 4H₂O; 1,10 mg/l de CuSO₄ • 5H₂O; 1,10 mg/l de CoSO₄ • 7H₂O; 27,50 mg/l de NaCl y 27,50 mg/l de KCl.

4. Conclusiones

- Se demostró la factibilidad de combinar un hidrociclón con un reactor airlift para lograr la degradación de la fracción de hidrocarburo remanente de un suelo biorremediado en un período de tiempo suficientemente corto.
- La degradación máxima lograda para el proceso discontinuo es de 75% a 30°C, alcanzando concentraciones de 15 - 20 ppm a temperatura ambiente. Se llega a una concentración de 6 ppm a 40°C, lo que representa una degradación del 86%.
- Se distinguen dos etapas en la desorción del contaminante: la primera en donde el gasoil presente en la superficie de la partícula se desorbe rápidamente y es consumido por los microorganismos. En esta fase, la etapa controlante, es la biodegradación del contaminante. En la segunda fase se produce la desorción del contaminante presente en el interior de la partícula, donde la etapa controlante es la transferencia de masa intrapartícula. Ambas etapas estarían limitadas por las características químicas del residuo.
- Un tiempo prolongado de tratamiento no produce un incremento significativo de la degradación en el proceso discontinuo.
- El aumento de la temperatura en la fase final del proceso favorece el proceso.
- El agregado del tensioactivo (Tween 80®) no introduciría una mejora, por lo menos si se coloca posteriormente de haber efectuado un incremento de temperatura.

Bibliografía

- ANONYMOUS 1972: Methods for the analysis of oil in water and soil. Report No. 9/72. Stichting Concawe, The Hague, Belgium.
- ARENDT, F., ANNOKKEE, G. J., BOSMAN, R., VAN DEN BRINK, W. J. (Eds) 1993: Contaminated Soil '93, Fourth International KFK/TNO Conference on Contaminated Soil. Volume I and II. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. 1986: Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Ed. McGraw-Hill.
- BOSMA, T. N. P., MIDDELDORP, P. J. M., SCHRAA, G., ZEHNDER, A. (1997): Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. Environ. Sci. Technol. 31, 248-252.
- CHISTI, M. Y. 1989: Airlift bioreactors, 1st Ed. Elsevier Applied Science, London.
- DEITSCH, J. J., SMITCHE, J. A. (1995): Effect of triton X-100 on the rate of trichloroethene desorption from soil to water. Environ. Sci. Technol. 29, 4, 1069-1080.
- GEERDINK, M. J. 1995: Kinetics of the microbial degradation of oil in soil slurry reactors. Technische Universiteit Delft. The Netherlands.

NEEßE, T. H., FEIL, A. (1993): The decontamination characteristic of polluted soils for assessment of suitability for treatment of former industrial sites. Rev. Aufbereitungstechnik 34, 27-35.

El potencial de los hongos para la biorremediación de las contaminaciones con hidrocarburos

W. FRITSCHÉ¹, M. HOFRICHTER¹, U. SACK¹, K. SCHEIBNER¹, D. SCHLOSSER¹,
A. ARAMBARRI², M. CABELLO²

¹Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 12, 07743 Jena, Alemania

²Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentina

Las contaminaciones del suelo que resultan de la extracción y del proceso de destilación del petróleo contienen un amplio espectro de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Mientras que los hidrocarburos alifáticos y aromáticos bajo condiciones adecuadas son relativamente fáciles de degradar, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) muestran una persistencia que aumenta cuando sube la suma de los anillos aromáticos. Por una parte esta persistencia se basa en la estructura química estable y por otra parte en la baja biodisponibilidad. La baja disponibilidad está condicionada por diferentes factores, sobre todo por la baja solubilidad en agua y la adsorción a la matriz del suelo. Los HAP se encuentran en el petróleo como componentes menores, pero en el proceso de la pirólisis su porcentaje sube. Debido al hecho que los HAP polinucleares son especialmente tóxicos al hombre y al medio ambiente, los objetivos del proyecto se centraron en este grupo de sustancias.

Las bacterias son capaces de utilizar como fuente de carbono y energía los HAP de hasta cuatro anillos aromáticos. La cantidad de especies capaces de realizar la degradación disminuye con el aumento del tamaño de las moléculas. Para la degradación del pireno, que contiene cuatro anillos, hasta ahora sólo algunas cepas de *Mycobacterias* han sido descritas en la literatura. Sobre la participación de los hongos en el proceso de la degradación de HAP polinucleares hay pocas publicaciones. En general la capacidad degradadora de los hongos ha sido menos investigada que la de las bacterias. En la concepción conjunta del proyecto del convenio, se acordó investigar más intensamente la capacidad degradadora de hongos aislados en ambos países. El objetivo fue aclarar las posibilidades y límites de este grupo de organismos en la biorremediación de contaminaciones con aceite mineral. En un amplio screening se investigaron diversos grupos ecológicos y taxonómicos de Deuteromycetes, Zygomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes. Se han publicado resultados seleccionados (COLOMBO et al. 1996, SACK et al. 1997a). A continuación se presentan sobre todo los resultados con Basidiomycetes ligninolíticos que fueron aislados en diversas regiones de los países del convenio.

Screening para Basidiomycetes con alta actividad ligninolítica.

Los Basidiomycetes ligninolíticos se caracterizan por su capacidad para producir enzimas extracelulares, que tienen un alto potencial para degradar sustancias persistentes biógenas y antropógenas. La degradación de sustancias xenobióticas se efectúa en condiciones cometabólicas, es decir, que junto al elemento xenobiótico que no sirve como fuente de energía hay que agregar un sustrato para el crecimiento como, por ejemplo, azúcar.

Un screening directo para la degradación de HAPs es extremadamente difícil. Debido a esta causa se desarrollaron dos métodos de screening para detectar altas actividades degradadoras

de los hongos ligninolíticos, la depolimerización de ácidos húmicos de carbono (HOFRICHTER y FRITSCH 1996, 1997) y la mineralización (liberación de CO₂) de 2,4,6-Trinitrotolueno radioactivo (SCHEIBNER et al. 1997). Los resultados presentados en las publicaciones llevan a la conclusión que sólo algunos representantes de los 200 hongos investigados tienen un alto potencial para la degradación de sustancias persistentes. Estos son Basidiomycetes aislados de maderas en descomposición, hongos de pudrición blanca, o de hojarasca. Dentro de los Micromycetes no se detectaron hongos que mostraran un rendimiento parecido. A las investigaciones de los hongos de la hojarasca se le dio una especial atención porque estarían muy bien adaptados al sustrato *suelo*. En ambos métodos las siguientes especies mostraron actividades especialmente altas y fueron seleccionadas para investigaciones futuras:

Hongos que degradan la hojarasca:

- *Stropharia rugoso-annulata*
- *Agrocybe praecox*

Hongos de pudrición blanca:

- *Kuehneromyces mutabilis*
- *Trametes versicolor*
- *Nematoloma frowardii*
- *Clitocybula dusenii*

Las cepas de *Nematoloma* y *Clitocybula* fueron aislados en Argentina en el marco de la cooperación. Agradecemos a las coautoras argentinas y al Dr. M. Rajchenberg (Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino-Patagónico, CIEFAP), que identificaron los aislamientos de los hongos, a continuación son especialmente mencionadas las cepas correspondientes.

Cometabolismo y mineralización de HAP

Investigaciones comparadas con gran cantidad de hongos de diferentes grupos revelaron que, tanto Micromycetes como Basidiomycetes cometabolizan HAP con tres o más anillos condensados. Sólo determinados Basidiomycetes son capaces de efectuar una mineralización. Evidentemente, Micromycetes y Basidiomycetes tienen monooxigenasas intracelulares que a través de un arenóxido inestable forman dos grupos principales de metabolitos: transdihidrodióles y fenoles. Las hidrolasas forman parte de la conversión de arenóxidos a trans-dihidrodióles. La formación de fenoles es un proceso espontáneo. Pocos hongos son capaces de metilizar estructuras de fenoles. Figura 1 representa los datos para el metabolismo de pireno.

Usando hongos seleccionados de pudrición blanca y HAP radioactivos se puede demostrar que los hongos son capaces de degradar HAP. La cantidad y el plazo de la mineralización depende en gran parte de las condiciones de los cultivos. Figura 2 muestra que bajo condiciones similares se produce una mineralización relativamente baja en cultivos líquidos, mientras que en cultivos con paja la mineralización es alta. El cultivo con paja significa, cultivos de hongos en paja como sustrato sólido. Las altas actividades degradadoras con paja, están relacionadas al intenso contacto de micelio, paja y HAP, así como a la alta producción de enzimas ligninolíticas extracelulares.

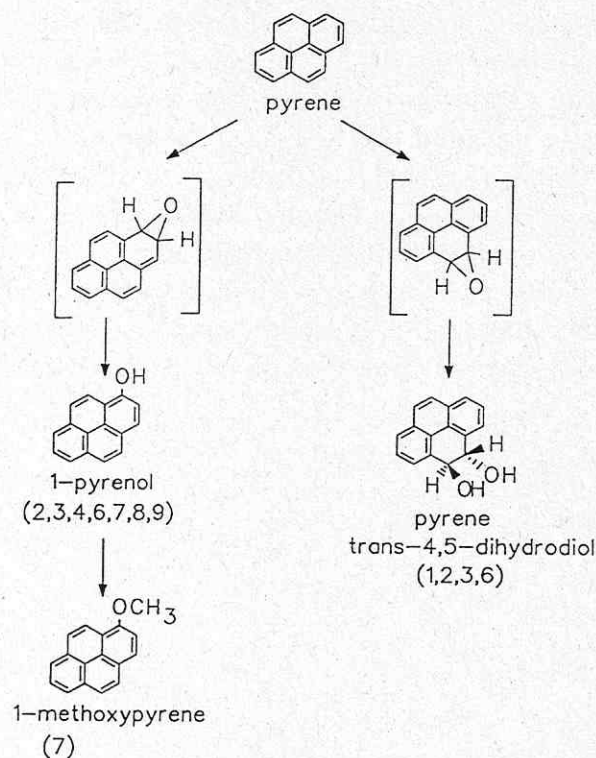


Fig. 1: Cometabolismo de pireno con hongos de diferentes grupos taxonómicos. Las cifras indican las especies de los hongos, con las cuales se determinaron los metabolitos correspondientes. 1: *Trametes versicolor*, 2: *Kuehneromyces mutabilis*, 3: *Nematoloma frowardii*, 4: *Laetiporus sulphurus*, 5: *Flammulina velutipes*, 6: *Agrocybe aegerita*, 7: *Aspergillus niger*, 8: *Penicillium* sp., 9: *Fusarium* sp.

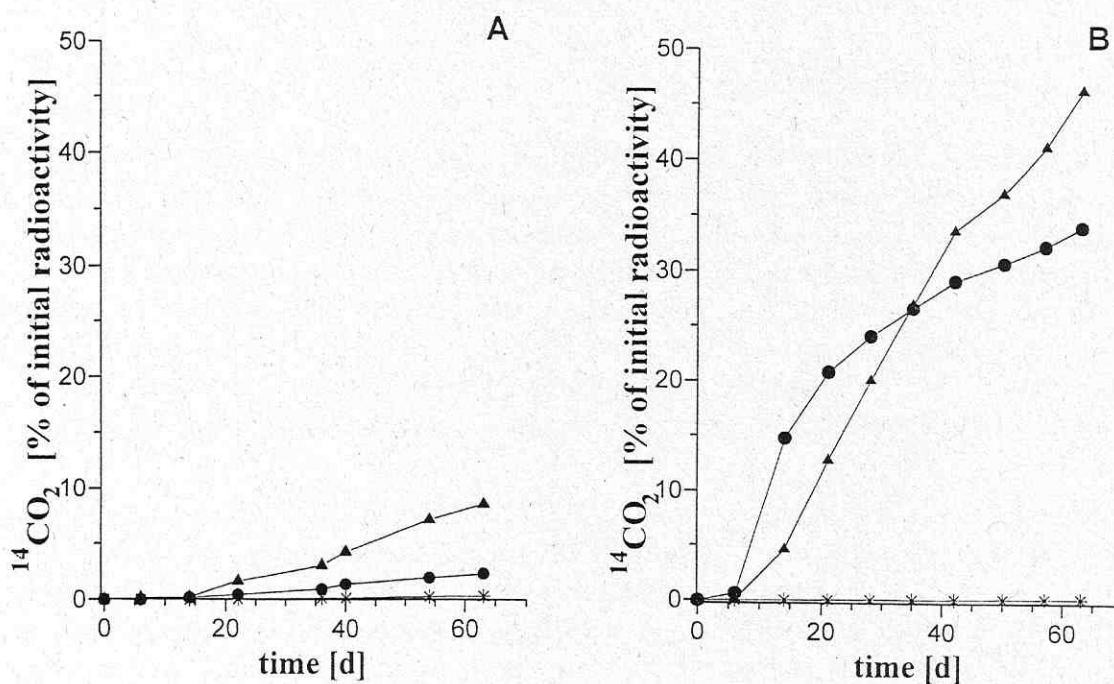


Fig. 2: Mineralización de pireno en cultivo líquido (A) y en el sustrato sólido paja (B). ● *Trametes versicolor*, ◆ *Nematoloma frowardii*, * control. Se uso 4,5,9,10 ^{14}C -pireno

Rol de la actividad de la manganeso-peroxidasa en la mineralización de HAP

En cultivos líquidos de *Trametes versicolor*, *Kuehneromyces mutabilis* y *Nematoloma frowardii* se determinaron las actividades de las enzimas extracelulares ligninolíticas peroxidadas, lignina peroxidasa, lacasa. En estos hongos ligninolíticos la manganeso-peroxidasa fue la enzima dominante. La actividad de este enzima es fuertemente inducida por iones de manganeso en *Nematoloma frowardii* (fig.3). Al mismo tiempo son reprimidas las actividades de las enzimas lignina peroxidasa y lacasa. Debido a este fenómeno fue posible obtener preparados crudos de manganeso-oxidasa y de ser utilizados para hacer ensayos enzimáticos.

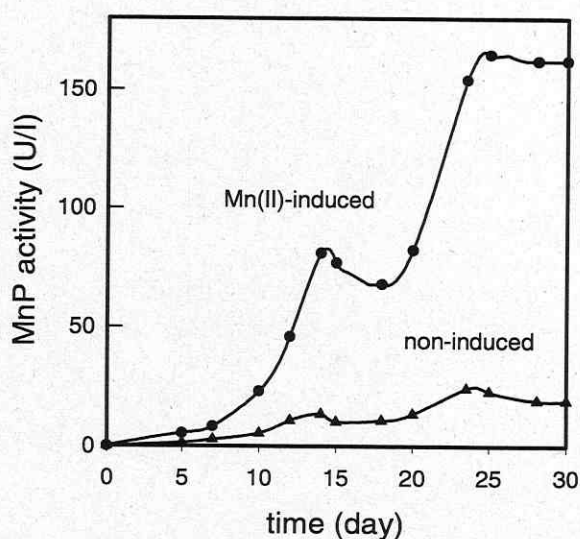


Fig. 3: Actividad de manganeso peroxidasa en cultivos de *Nematoloma frowardii* no inducidos e inducidos con iones manganeso (método HOFRICHTER y FRITSCHÉ 1997)

Figura 4 muestra los resultados de una reacción de distintos HAP con manganeso-peroxidasa. Esta enzima ligninolítica extracelular cataliza la mineralización de HAP polinucleares. La actividad depende fuertemente del agregado de diversos mediadores, entre los cuales el glutatión reducido tiene una importancia especial como fuente de radicales tiol. Hace poco tiempo que se reveló la función de la manganeso-peroxidasa como catalizador en la mineralización de un amplio espectro de sustancias aromáticas y alifáticas que provienen de orígenes antropógenos y bióticos (HOFRICHTER et al. 1998). El principio es la "combustión enzimática" la cual fue inicialmente descrita por KRICK y FARELL (1987). Debido a este principio universal se degradan no sólo sustancias bióticas persistentes como la lignina sino también un amplio espectro de xenobióticos como por ejemplo pentaclorofenol y TNT. Comparando con estas sustancias, la mineralización de HAP es más baja porque su estructura dificulta el ataque electrofílico en la reacción peroxidasa. Plazos y grados de degradación dependen mayoritariamente de las condiciones ambientales, como muestra la comparación presentada en la figura 2.

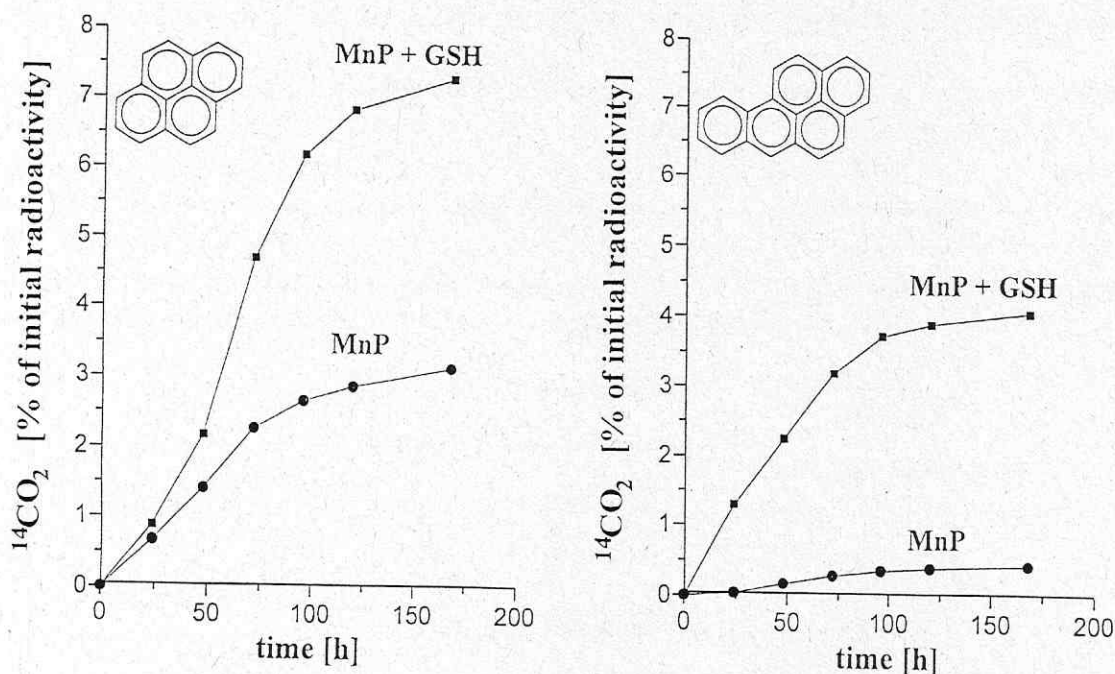


Fig. 4: Mineralización con manganeso peroxidasa (MnP) de ^{14}C -pireno y ^{14}C -Benceno(a)pi-reno radioactivo, marcado al anillo, en dependencia de un agregado de glutatión (GSH) (método SACK et al. 1997b)

Degradación de HAP en el suelo

Mediante las enzimas ligninolíticas extracelulares de los Basidiomycetes resulta una amplificación del potencial para una degradación biológica de HAP. En la figura 5 se hipotetizan las reacciones y sus productos. Adicionalmente a la oxidación interna llega la oxidación extracelular causada por radicales generados por las peroxidasas, ambos procesos interactúan (fig. 5).

Se investigó en qué medida el potencial ligninolítico degradador adicional de los Basidiomycetes ligninolíticos es de importancia para la biorremediación de HAP en los suelos. Con respecto a este problema se hicieron ensayos de orientación en los cuales se inoculó el hongo *Kuehneromyces mutabilis* en suelos contaminados con ^{14}C -pireno. El hongo que crece en paja o en aserrín puede incorporarse con ese material en el suelo. De un interés especial es la actividad de este hongo en un suelo no estéril en el que a través de una microflora autóctona ya tiene una capacidad para degradar HAP. La figura 4 muestra la situación en la columna 4; la mineralización que se determina en forma de producción de CO_2 es estimulada con la inoculación del hongo. De esta manera aumenta en paralelo el plazo total de la biorremediación, que se da de la suma de la mineralización y la formación de residuos fijos. La fracción de los residuos fijos comprende metabolitos que son incorporados en la materia húmica a través de enlaces covalentes. En estos ensayos el suelo fue artificialmente contaminado con pireno. Las condiciones no corresponden realmente a suelos contaminados en el medio ambiente. Pero estos y otros experimentos muestran que ciertos hongos ligninolíticos son capaces de aumentar la capacidad degradadora que existe en el suelo, cuando ellos son aplicados al suelo junto con un sustrato de crecimiento (paja u hojarasca). A través de este proceso en el sustrato de crecimiento se combina la inoculación con la estimulación biológica.

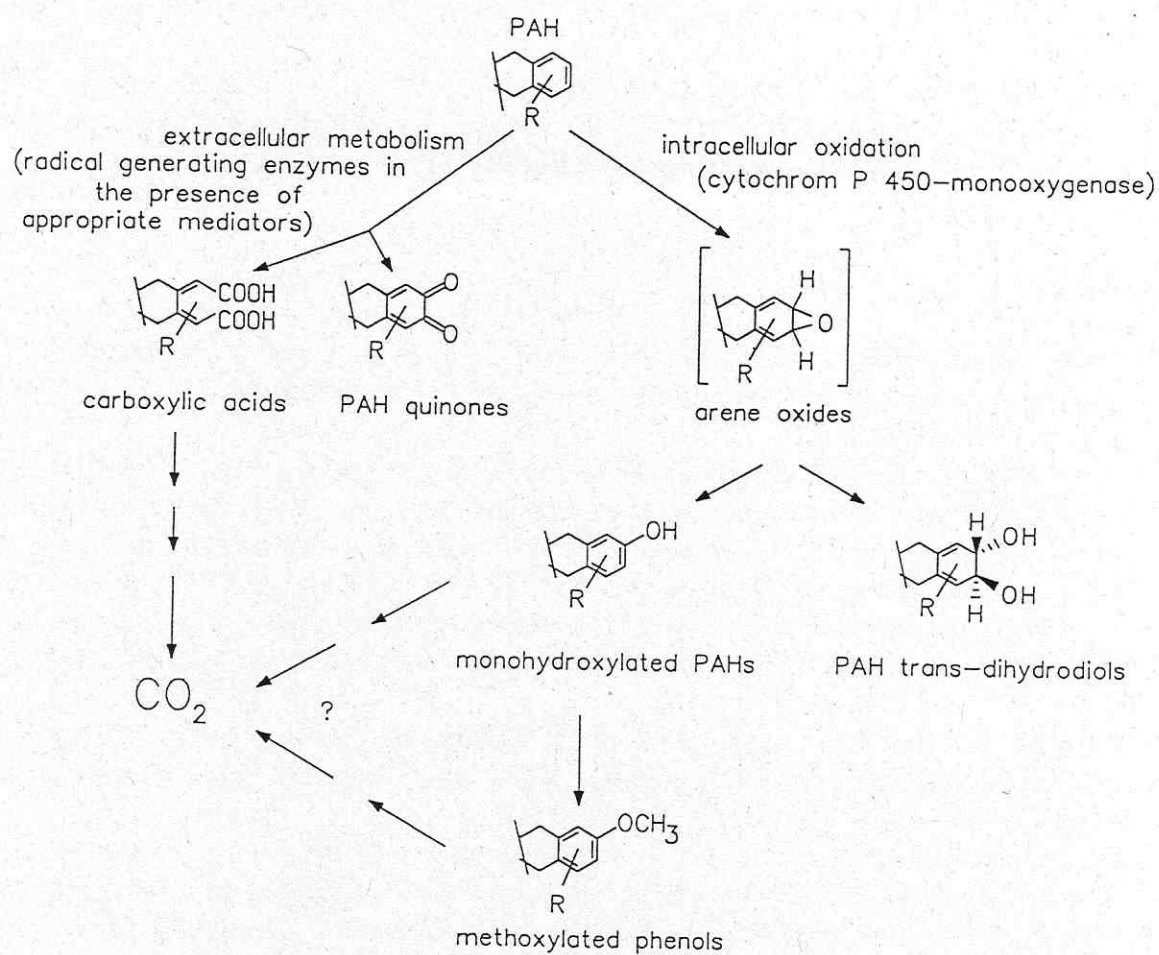


Fig. 5: Vías de degradación de HAP por Basidiomycetes ligninolíticos

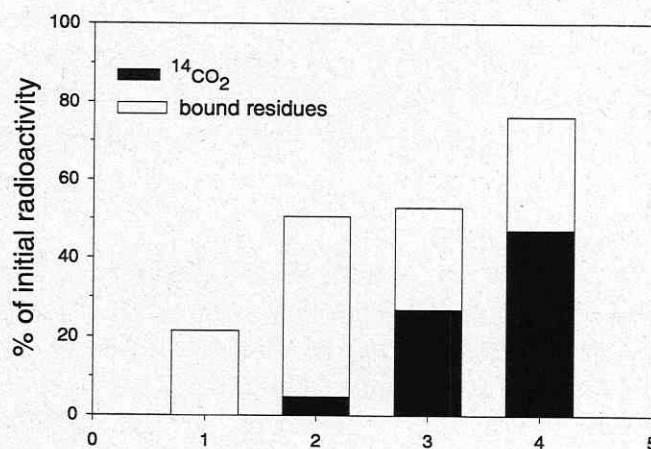


Fig. 6: Aceleración de la eliminación de ^{14}C -pireno de suelo con agregado de *Kuehneromyces mutabilis* después de un ensayo de 63 días de duración. 1. Suelo estéril (control), 2. Agregado de hongo a un suelo estéril, 3. Suelo no inoculado con la microflora autóctona, 4. Estimulación de la actividad de la microflora autóctona después de inocular con el hongo (método SACK y FRITSCHÉ 1997)

Conclusiones

- Las investigaciones sobre la degradación de los HAP através de hongos muestran, que este grupo de organismos tiene capacidades específicas en su metabolismo que amplían el potencial de biodegradación.
- Algunos Basidiomycetes ligninolíticos (hongos de pudrición blanca y hongos que degradan la hojarasca) tienen enzimas extracelulares que generan radicales y así tienen un potencial de degradación xenobióticas y bióticas. Este potencial no está presente en ningún otro grupo de organismos. Estas enzimas producen una "combustión enzimática" de HAP entre otras sustancias xenobióticas y bióticas persistentes. La manganoso peroxidasa juega un papel importante debido a su gran actividad la cual se puede analizar en los medios de cultivo.
- El amplio screening con hongos de diferentes regiones de Europa central y de Argentina llevó a encontrar nuevas cepas de hongos, que tienen un potencial degradador más alto que las cepas hasta ahora descritas en la literatura.
- La aplicabilidad de las nuevas cepas aisladas para nuevos procesos de biorremediación de hidrocarburos de suelos necesita futuras investigaciones en condiciones más cercanas a la realidad. Debido al hecho de que los Basidiomycetes ligninolíticos desarrollan su potencial degradador bajo condiciones de cometabolismo, se tiene que investigar especialmente la combinación de inoculación y agregado de sustancias cometabólicas.
- Para la biorremediación son importantes dos procesos, la mineralización y la humificación. Con la humificación los metabolitos que fueron formados durante la degradación de los HAP son fijados en la fracción de la materia húmica, así ellos pierden su individualidad química. Por esta razón en la degradación de humus a largo plazo no deben producirse sustancias tóxicas. El proceso de humificación de los HAP es comparable con los procesos naturales de la producción de humus a base de compuestos biógenos aromáticos.

Agradecimiento

Agradecemos al Prof. Dr. H. Metzner, presidente de la Academia Europea para el Medio Ambiente por haber obtenido esta relación de cooperación. Nos sentimos igualmente agradecidos de la Dra. Berthe-Corti de la Facultad de Biología de la Universidad de Oldenburg por la iniciativa para la publicación de los trabajos de la investigación conjunta alemana-argentina. Los trabajos fueron promovidos por el BMBF en el marco de la Cooperación Técnico- Científica (WTZ) Alemana-Argentina, proyecto ENV 23 así como por el fondo de la Industria Química.

Bibliografía

- COLOMBO, J. C., CABELLO, M., ARAMBARRI, A. (1996): Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental Pollution* 94, 355-362.
- HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1996): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank coal depolymerizing activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 220-225.
- HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1997): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal humic acid depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 419-424.
- HOFRICHTER, M., SCHEIBNER, K., SCHNEEGAß, I., FRITSCH, W. (1998): Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 399-404.
- KIRK, T. K., FARRELL (1987): Enzymatic „combustion“: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- SACK, U., FRITSCH, W. (1997): Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 77-83.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., CAZAU, M.C., FRITSCH, W. (1997a): Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2906-2909.
- SACK, U., HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1997b): Degradation of PAHs by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 227-234.
- SCHEIBNER, K., HOFRICHTER, M., HERRE, A., MICHELS, J., FRITSCH, W. (1997): Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 452-457.

Fitorremediación y landfarming de suelos contaminados con hidrocarburos

T. GÜNTHER, B. KIRSCH, M. LÄTZ, W. FRITSCH

Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 12,
07743 Jena, Alemania

1. Introducción

Los procesos de fitorremediación utilizan las actividades de las plantas en el tratamiento de suelos, barros y desagües contaminados con hidrocarburos (APRIL y SIMS 1990, ANDERSON et al. 1993, SCHNOOR et al. 1995, HÖPPNER et al. 1997). Introduciendo una vegetación apropiada en suelos contaminados se puede estimular la actividad biológica de la comunidad de organismos autóctonos y con eso se puede acelerar la degradación de contaminantes. En su totalidad esta interacción microbiovegetal lleva a una estimulación permanente del potencial autodepurador del hábitat contaminado. En el „Landfarming“ se observan efectos similares por causa de tratamiento agrícola intensivo y por la fertilización. La fitorremediación en el campo de la biorremediación de suelos es potencialmente apropiada para tratar contaminaciones superficiales en grandes áreas. Los tratamientos de suelos que comprenden actividad vegetal son propuestos para el tratamiento „*in situ*“ o sea para „Landfarming“ de contaminaciones orgánicas. Además se examina la aptitud de plantas especiales y tolerantes, que pueden ser usadas para eliminar metales pesados de los suelos y de lodos de aguas residuales (SALT et al. 1995, CUNNINGHAM et al. 1996).

En el presente trabajo se muestran algunos principios y datos experimentales de como las plantas y los microorganismos asociados en la rizosfera influyen en la eliminación de hidrocarburos de suelos, especialmente los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

2. Aumento del metabolismo de sustancias nocivas en la rizosfera

Las plantas actúan en forma compleja, en relación a la permanencia de sustancias orgánicas ambientales en el suelo. De gran importancia son las interacciones sinérgicas de los macro- y microorganismos en la rizosfera (fig. 1), este hábitat se distingue del suelo sin raíces por su actividad biológica incrementada. Las plantas influyen en la degradación de sustancias orgánicas nocivas por vía directa e indirecta (fig. 2). La capa vegetal contribuye principalmente a la estabilización de los factores microclimáticos y biológicos del suelo, debido a ésto y por la exudación de sustancias fácilmente aprovechables, exudado radical, se mejora el crecimiento y la actividad de los microorganismos y con eso aumenta el metabolismo de sustancias orgánicas nocivas. Junto a esta influencia indirecta producida por los microorganismos, las plantas actúan también directamente en la permanencia de contaminantes de suelos ya que incorpora, transporta y metaboliza el contaminante y lo fija en forma irreversible. Además, la raíz de la planta exuda varias enzimas (peroxidasas, polifenoloxidasas) en el suelo, estas enzimas son capaces de oxidar extracelularmente hidrocarburos aromáticos (GÜNTHER et al. 1989). El significado de esta influencia directa de las plantas en los contaminantes es en gran parte desconocido.

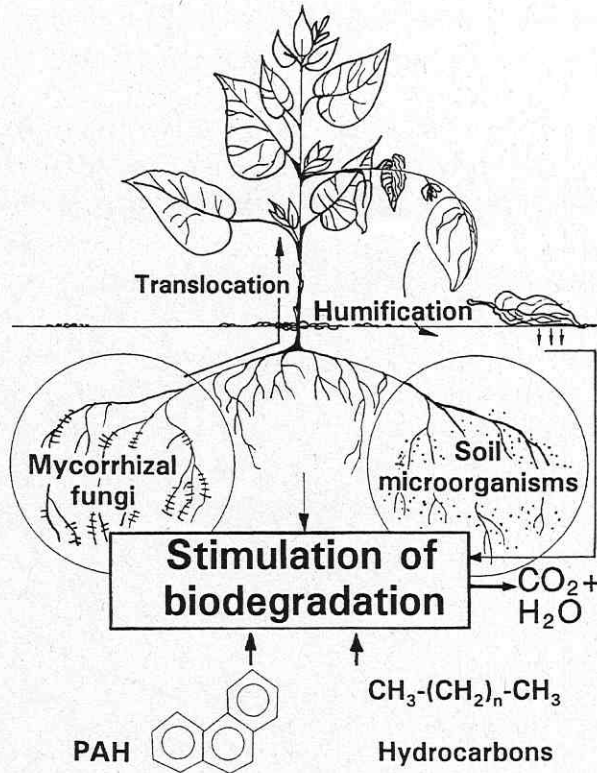


Fig. 1: Comunidad específica de organismos de la rizosfera, que contribuyen através de un rendimiento cooperativo a la eliminación de hidrocarburos en suelo

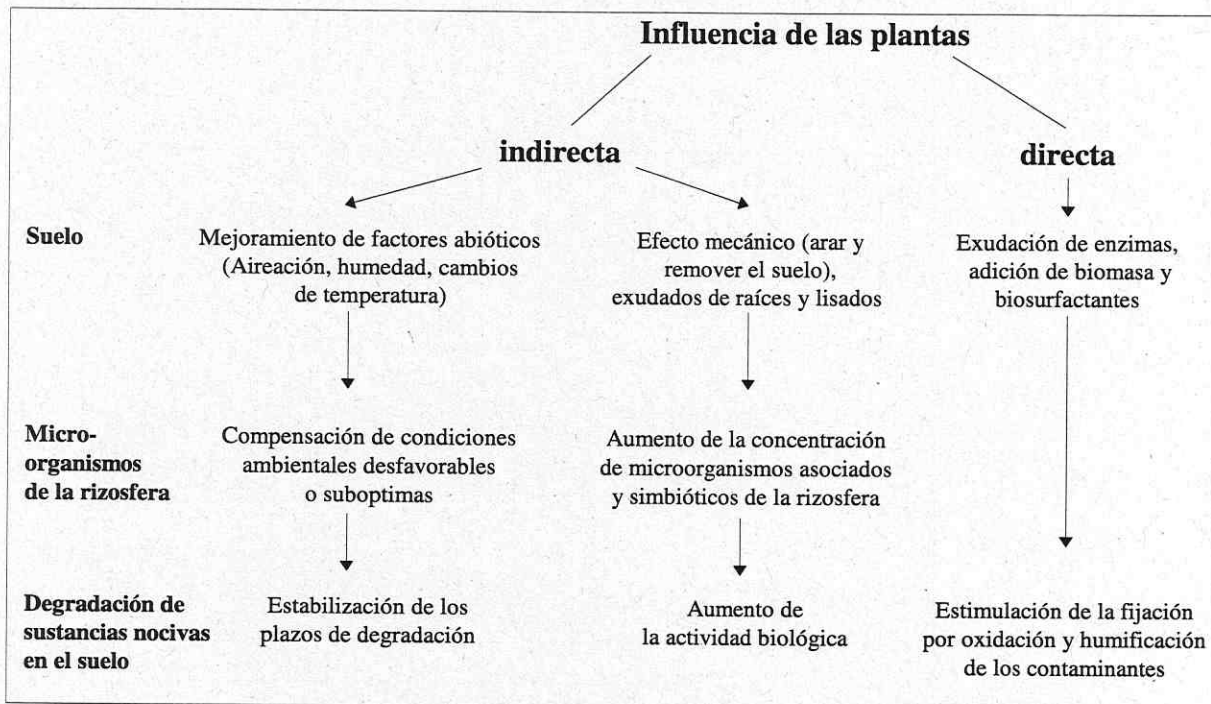


Fig. 2: La influencia directa e indirecta de las plantas en la permanencia de contaminantes químicos en suelo

3. Sitio de contaminación permanente de la empresa de asfalto Rositz: Posibilidades y límites de la biorremediación de suelos

El terreno de la antigua empresa de asfalto Rositz/Ostthüringen presenta la contaminación permanente más grave de Thüringen en el campo de la Carboquímica. Durante el período de producción en este sitio que duró más de 70 años se procesaron más de 19 millones de toneladas de alquitrán de lignito, de destilación lenta y 10 millones de toneladas de petróleo crudo. Fundada antiguamente por la Marina de Guerra del Kaiser en el año 1917, para asegurar el establecimiento de lubricantes y combustibles, se amplió más tarde considerablemente la paleta de productos. En 1990 se paralizó la actividad de la empresa de asfalto por razones ecológicas y económicas. Una enorme superficie del terreno de la empresa está fuertemente contaminada con crudos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y fenoles, debido por una parte a que se depositaron los residuos de la producción en sitios no adecuados, así como también, por los bombardeos masivos en la segunda guerra mundial.

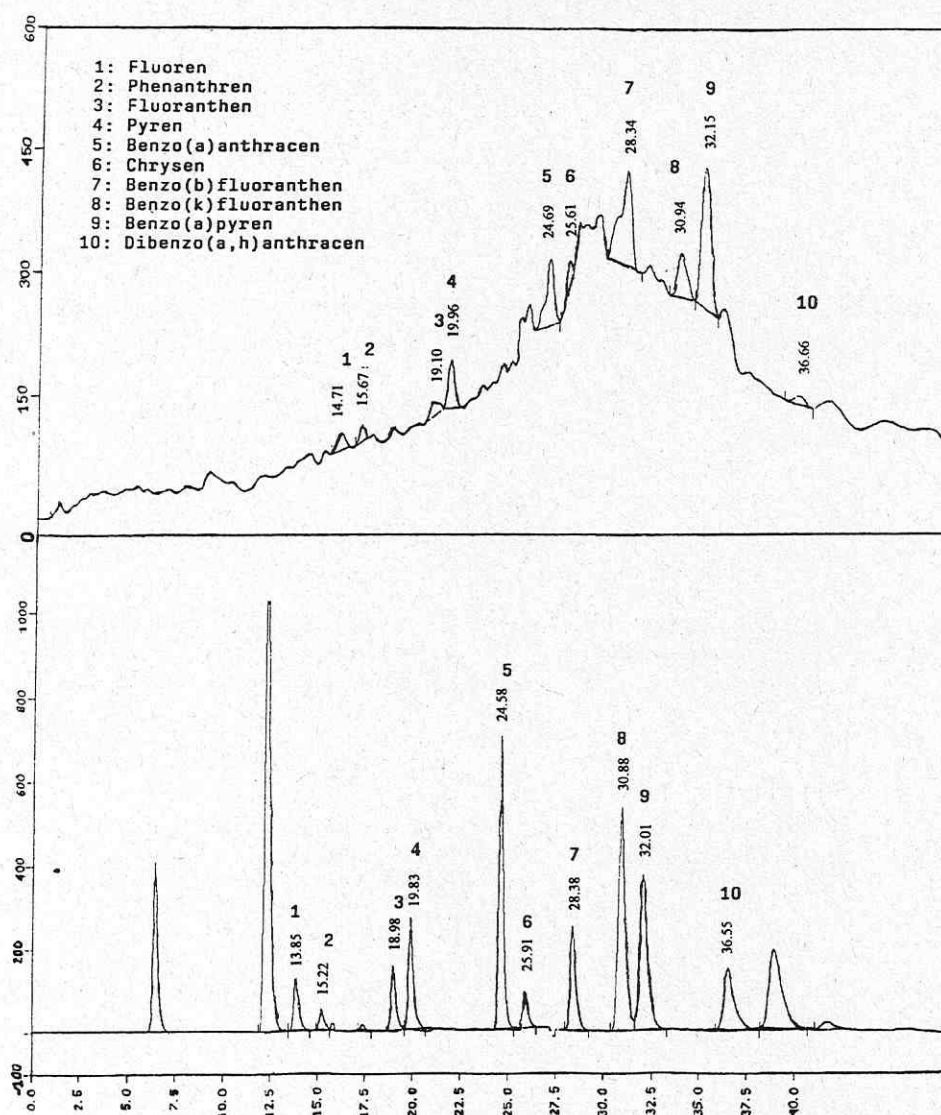


Fig. 3: Cromatograma HPLC de un extracto del suelo de Rositz (arriba) y del estándar de HAP (abajo). Extracción del suelo con etilacetato/ tratamiento con ultrasonido, condiciones del HPLC: columna: 150/4 Nucleosil 100-5C 18 PAH, Eluyente: metanol /agua [70.30, v/v], Detector fluorescente: excitación/emisión- 265/430 nm

Una característica de la capa superficial del suelo contaminado son los altos valores de $C_{org.}$. Estos son en gran parte producidos por la contaminación con hidrocarburos y partículas de asfalto (tab. 1). Los HAP aportan al promedio una concentración de 100 mg/l y representan sólo una pequeña parte de la compleja contaminación total. En el cromatograma HPLC de una muestra típica de suelo existe junto al HAP separable, una considerable parte no detectable, no diluible, que posiblemente está representada esencialmente por los derivados de HAP (HAP alquílico) (fig. 3). Estas sustancias se encuentran con gran frecuencia en suelos que están contaminados desde hace mucho tiempo (KÄSTNER et al. 1993).

Tab. 1: Propiedades del suelo usado y concentraciones de HAP

Parámetro	Valor
Textura	Arenoso limoso
pH (0,01 M M Cloruro de calcio)	7,58
C_{org} (%)	14,10
N_{tot} (%)	0,16
HAP _{totales} (mg/kg)*	103,0
Fenantreno	n.d.
Antraceno	n.d.
Fluoranteno	10,9
Pireno	13,8
Benzo(a)antraceno	8,0
Criseno	32,0
Benzo(a)fluoranteno	10,6
Benzo(k)fluoranteno	1,9
Benzo(a)pireno	9,9
Dibenzo(a,h)antraceno	15,8

* La concentración de los HAP en los extractos de suelo se analizaron con el estándar de la EPA.

n.d.: no determinado

Por medio de la distribución del tamaño de granos, junto con la oxidación de la matriz orgánica, por separación microscópica de los compuestos residuales, se pudo establecer que las muestras examinadas contenían predominante partículas de asfalto y carbono y que estas partículas forman cerca 1/5 de la fracción de grano grueso (fig. 4). El contenido relativo de HAP de la fracción de asfalto y carbono es altamente superior al nivel de otras fracciones de tamaños de granos. Los HAP, que están adsorbido a estas matrices, están normalmente sólo bio-disponibles en *tasas bajas* (WEISENFELS et al. 1992). Por esta razón su rápida eliminación biológica es limitada. Investigaciones de laboratorio sobre la degradación de HAP polinucleares por medio de hongos de pudrición blanca, confirman estos datos (WOLTER 1993) y para obtener una efectiva eliminación de los contaminantes tiene que aumentarse su actividad, para esto puede utilizarse la actividad de las raíces de las plantas.

4. Estimulación de la degradación de hidrocarburos en la rizosfera de plantas autóctonas a largo plazo de la empresa de asfalto de Rositz

Grandes superficies del terreno de la empresa, entre otros, sedimentos altamente contaminados y los bordes de los vertederos de residuos, exhiben una vegetación que no muestra ningún daño evidente o retraso en el crecimiento, causada por el contenido de

sustancias nocivas en el suelo. Entre los representantes de estas plantas tolerantes, adaptadas se encuentran *Solidago canadensis* L., *Tanacetum vulgare* L., *Arrhenatherum elatius* (L.) Presl, *Artemisia vulgaris* L. y *Oenothera biennis* L. Tales especies se encuentran con frecuencia en lugares de terrenos baldíos (REBELE y DETTMAR 1996).

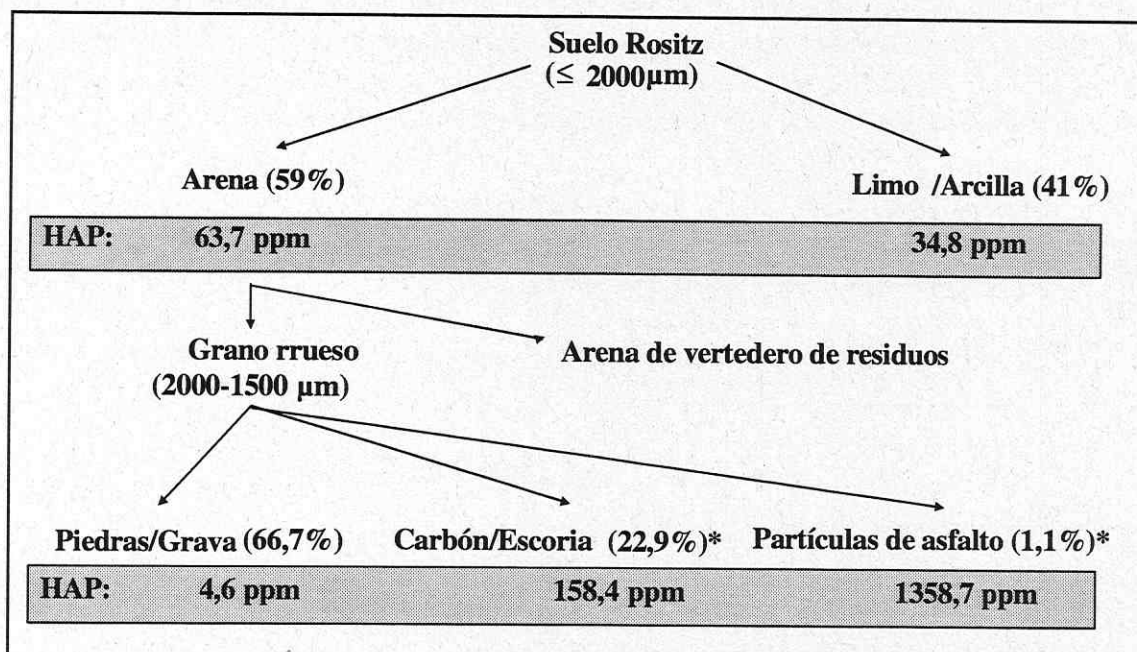


Fig. 4: Test granulométrico del suelo y de la fracción tamizada (1500 - 2000 µm). Las partículas de la fracción tamizada se separaron bajo el estereomicroscopio después de una oxidación (ácido sulfúrico/H₂O₂) de la matriz orgánica del suelo. Se muestra la concentración de los HAP (µg/g) para las fracciones (rayado)

Para investigar el aumento potencial de la degradación de hidrocarburos a través de la vegetación ruderal, se realizaron durante largo tiempo ensayos en recipientes sometidos a condiciones de campo y de invernadero. Se investigó la disminución de HAP y hidrocarburos alifáticos en la rizosfera de determinadas plantas durante dos períodos de crecimiento. Vasos de Mitscherlich con plantas y sin plantas se fertilizaron dos veces (nitrógeno, fosfato, potasio) y se regaron con regular frecuencia. En un período de 16 meses se tomaron 4 muestras de suelo de la rizosfera de las plantas y de los vasos de control sin plantas y fueron sometidos a un análisis químico. Después de terminar los ensayos se determinó la biomasa de las plantas, el crecimiento de las raíces y parámetros físico-químicos.

La influencia de las plantas en la eliminación de los contaminantes de los suelos fue diferente según la especie vegetal. *Solidago canadensis* mejoró de manera más intensiva los procesos de degradación (fig. 5 y 6). Durante el primer período vegetativo, la concentración inicial de los HAP de 103 mg/kg disminuyó significativamente, esta disminución se puede evaluar como efecto de Landfarming y probablemente es originada al mullir el suelo, en la fertilización y en el mejoramiento de las condiciones ambientales. Dependiendo del tipo de plantas se analizaron valores de 46 - 60 mg/kg en la rizosfera, que en la mayoría de los casos estaban debajo de las concentraciones de los vasos de control (64 mg/kg). En el segundo período vegetal la eliminación de las sustancias nocivas fue considerablemente menor con excepción de los casos de *Solidago*. La concentración de HAP de 24 mg/kg que se analizó en la rizosfera de *Solidago canadensis* fue considerablemente la más baja de todos los valores de los ensayos (fig. 5).

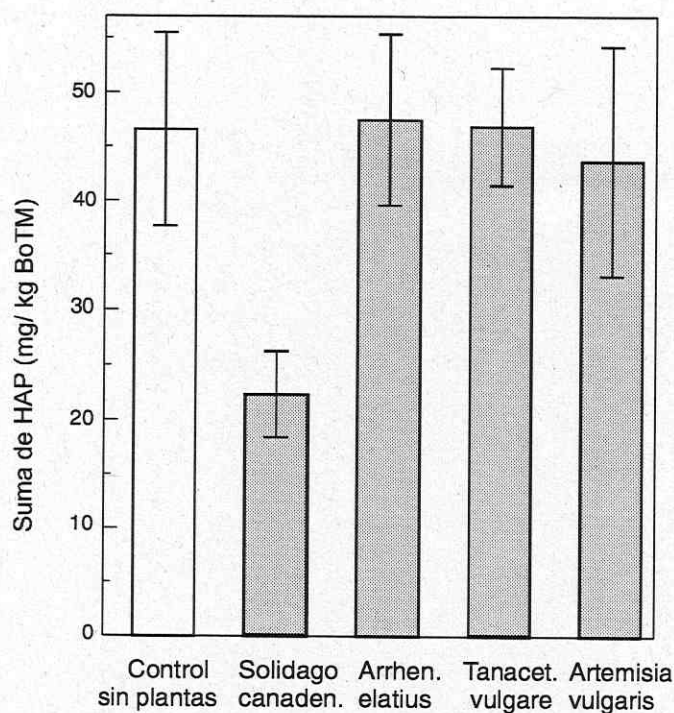


Fig. 5:

La concentración residual de hidrocarburos policíclicos aromáticos (valores medios $\pm$ desviación estándar; $n = 3$) en vasos, con suelo contaminado de la empresa de asfalto en Rositz, en la rizosfera de plantas y en el testigo sin plantas, después de 16 meses (BoTM = materia seco del suelo)

En las plantas analizadas se puede descartar que se produzca una incorporación significativa de HAP en el tallo o en la raíz. También se puede excluir la evaporación de los HAP, porque estos compuestos de 3 a 5 anillos tienen sólo una baja presión de evaporación. Después de una extracción alcalina de la matriz del humus (ESCHENBACH et al. 1994) se detectaron sólo insignificantes concentraciones de HAP en el humus. Este resultado señala que los procesos de fijación de HAP en los suelos investigados son de menor importancia, por eso se puede concluir que en primer lugar el metabolismo microbiano y los procesos de degradación son responsables en la disminución de la contaminación de HAP.

La concentración de los hidrocarburos alifáticos (residuos de aceite mineral) se determinó en un espectrofotómetro IR (fig. 6) después de la extracción y purificación de los extractos. Comparando el control de los no plantados, la concentración de los alifáticos tuvo un fuerte descenso en la rizosfera de las plantas. *Solidago canadensis* provocó una reducción del 41% en comparación con el control.

Después de 16 meses de cultivo se observó en la mayoría de las plantas un fuerte desarrollo del tallo y de las raíces, una penetración intensiva en el suelo, así como modificaciones de las características adicionales del suelo (tab. 2).

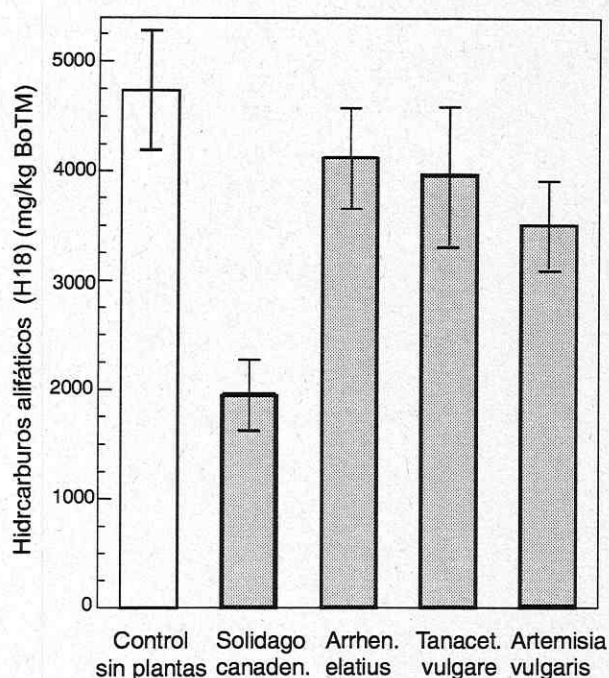


Fig. 6:

La concentración residual de hidrocarburos alifáticos (valores medios $\pm$ desviación estándar; $n = 3$) en vasos con suelo contaminado de la empresa de asfalto en Rositz, en la rizosfera de plantas y en el testigo sin plantas, después de 16 meses de cultivo. (Los hidrocarburos se detectaron con el método DEV H18, DIN 38409) (BoTM = materia seco del suelo)

Tab. 2: Valoración del grado de crecimiento de las raíces, cambios del suelo y de carbono orgánico (C_{org}) en los ensayos en vasos después de 16 meses de cultivo de plantas con ensayos en vasos

Especie	Indice de la raíz ¹⁾	Cambio del suelo ²⁾	C_{org} (%) ³⁾
<i>Solidago canadensis</i>	++++	fuerte	2,2
<i>Arrhenatherum elatius</i>	++++	fuerte	2,4
<i>Tanacetum vulgare</i>	++	escasa	n.d.
<i>Artemisia vulgaris</i>	+++	fuerte	1,5

¹⁾ Valoración visual del crecimiento de raíces en el suelo contaminado (B):

„+“ muy escaso crecimiento de raíces, „++“ Sistema de raíz desarrollado, suelo no completamente penetrado por raíces, „+++“ crecimiento fuerte de raíces, suelo predominantemente penetrado por raíces, „++++“ fuerte crecimiento de raíces, gran cantidad de raíces finas, suelo completamente penetrado por raíces.

²⁾ Valoración del cambio del suelo comparado con el control sin plantas:

„escaso“ ninguno o insignificante cambio, „medios“ estructura blanda del suelo y variaciones en el color, „fuerte“ marcado cambio de la estructura del suelo y removido así como diferencias de colores.

³⁾ Disminución del carbono orgánico en el suelo con raíces después de 16 meses de cultivo. En el control sin plantas el valor bajó por 1,7% (valor inicial C_{org} : 14,1%)

n.d.: no determinado

5. Conclusiones

En la rizosfera de plantas como *Solidago canadensis* se activa la degradación de HAP e hidrocarburos alifáticos en los suelos contaminados por largo tiempo. Este no es el caso para otras especies de plantas autóctonas que crecen en terrenos contaminados durante mucho tiempo, en ellas la disminución de hidrocarburos en su rizosfera no fue elevada. Por consecuencia se puede suponer que bajo las condiciones dadas, las actividades comunes

independientes de las especies, como la estabilización de las condiciones microclimáticas, no son responsables de la mejor eliminación de hidrocarburos sino que existen efectos más específicos de una interacción de los microorganismos y de las plantas.

Los resultados muestran que ciertas plantas son capaces de colonizar suelos altamente contaminados con hidrocarburos y naturalmente estimulan el proceso autodepurador, tales especies se pueden usar como capa vegetal apropiada para la fitorremediación. Es de esperar que esta tecnología puede servir como amplificación y suplementación de la técnica del „Landfarming“.

Agradecimientos

Agradecemos a la Sra. Prof. Angelica M. Arambarri, Dra. Marta Cabello y a los ayudantes del Instituto de Botanica "C. Spegazzini", de la Universidad de la Plata, Argentina, por el provechoso trabajo en conjunto, así como por sus valiosas indicaciones al igual que las estimulantes discusiones.

Los trabajos fueron apoyados por el BMBF en el marco de la colaboración tecnológica científica Alemana - Argentina (ARG ENV 23). Parte de las investigaciones fueron financiadas por el Ministerio de Ciencias, Investigación y Cultura de Thüringen. Agradecemos además la subvención otorgada por el Fondo de la Industria química Frankfurt/M.

Bibliografía

- ANDERSON, T. A., GUTHRIE, E. A., WALTON, B. T. (1993): Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2630-2636.
- APRILL, W., SIMS, R. C. (1990): Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20, 253-265.
- CUNNINGHAM, S. D., ANDERSON, T. A., SCHWAB, A. P., HSU, F. C. 1996: Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. In: D. L. Sparks (Ed.) *Advances in Agronomy* (Vol. 56), Academic Press, San Diego 55-114.
- ESCHENBACH, A., KÄSTNER, M., BIERL, R., SCHÄFER, G., MAHRO, B. (1994): Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Chemosphere* 28, 683-692.
- GÜNTHER, T., SACK, U., HOFRICHTER, M., LÄTZ, M. (1998): Oxidation of PAH and PAH-derivatives by fungal and plant oxidoreductases. *J. Basic Microbiol.* (im Druck).
- HÖPPNER, H., GÜNTHER, T., FRITSCH, W. (1997): Biologische Prinzipien der Eliminierung von organischen Umweltchemikalien in Pflanzenkläranlagen. *Wasser & Boden* 49 (12), 18-21.
- KÄSTNER, M., MAHRO, B., WIENBERG, R. 1993: Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. In: R. Stegmann (Hrsg.): *Hamburger Berichte*, Band 5, Economia Verlag, Bonn.
- REBELE, F., DETTMAR, J. 1996: *Industriebrachen-Ökologie und Management*. Ulmer, Stuttgart.

- SALT, D. E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N., DUSHENKOV, V., ENSLEY, B. D., CHET, I., RASKIN, I. (1995): Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnol.* 13, 468-474.
- SCHNOOR, J. L., LICHT, L. A., MC CUTCHEON, S. C., WOLFE, N. L., CARREIRA, L. H. (1995): Phytoremediation of organic and nutrient contamination. *Environ. Sci. Technol.* 29, A, 318-323.
- WEIßENFELS, W. D., KLEWER, H.-J., LANGHOFF, J. (1992): Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: Influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 689-696.
- WOLTER, M. 1993: Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Weißfäulepilze. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig.

Crecimiento de *Rhodotorula glutinis* en pireno, aislada de áreas contaminadas

M. C. ROMERO, M. C. CAZAU, S. GIORGIERI, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentina

1. Introducción

En ambientes contaminados con hidrocarburos, el pireno es uno de los compuestos aromáticos más persistentes debido a su estructura de cuatro anillos bencénicos y elevada hidrofobicidad. A pesar de no ser considerado carcinogénico, es mutagénico en base a determinaciones del Test de Ames (HOLDER et al. 1985, CERNIGLIA 1992). La degradación microbiana de los hidrocarburos aromáticos es uno de los mayores logros en la decontaminación de sedimentos y suelos superficiales (SCHNEIDER et al. 1996, THIBAUT et al. 1996).

La mayoría de las investigaciones se hallan orientadas al aislamiento y estimación de la capacidad de mineralizar pireno, siendo significativo el número de especies bacterianas y hongos filamentosos identificados (KELLEY et al. 1993, STRINGFELLOW y AITKEN et al. 1995, SWANNELL et al. 1996; SACK et al. 1997, LAMBERT et al. 1994).

Con la finalidad de emplear las especies degradadoras en la remediación y remover hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) del medio ambiente, el objetivo del presente trabajo fue aislar y evaluar la capacidad degradadora de levaduras autóctonas, frente a pireno como única fuente de carbono y energía.

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento e identificación

Los microorganismos fueron aislados de muestras de sedimentos contaminados con hidrocarburos, del Canal Este, Ensenada - Argentina. Diluciones decimales de los sedimentos fueron sembradas en placas con medio basal mineral (K_2HPO_4 200 mg, KH_2PO_4 50 mg, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 50 mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,75 mg, $Cl_2Ca \cdot 2H_2O$ 25 mg/l de agua destilada) agarizado con el agregado de solución etanólica de pireno (0,041 mg de pireno por placa). Mediante repiques sucesivos en agar-pireno se purificó y aisló la cepa dominante. La misma fue identificada por sus características morfológicas y pruebas bioquímicas, como el desarrollo sobre nitrato como única fuente de N (LODDER 1970, PHAFF et al. 1978); confirmando su identificación mediante el método API-Yeast-Ident y API 20C (Analytab Products 1992).

2.2 Biotransformación

Una suspensión de la especie aislada fue cultivada en 100 ml de MBS estéril con el agregado de 40 mg/l de solución etanólica de pireno. Fueron mantenidos a $27 \pm 1^\circ C$ durante tres días y una alícuota de 2 ml de este precultivo fue empleada como inóculo, conteniendo $1,5 \cdot 10^3$ cel./ml.

Los ensayos de biotransformación de pireno se realizaron en 2l-Erlenmeyers conteniendo 0,5 l MBS- líquido y estéril, el que se suplementó con 40 mg/l de pireno. Los cultivos fueron incubados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, a 140 rpm y en oscuridad. El pH fue mantenido constante durante todo el ensayo, en un valor de 6,8 – 7,0, semejante al de muestras naturales. Los experimentos se realizaron por duplicado, empleando un tercer Erlenmeyer con igual concentración de etanol, como control y controles abióticos, sin inocular.

Periódicamente se extrajeron alícuotas de los cultivos con pireno y de los respectivos controles, con las cuales se realizaron recuentos totales de células en cámara de Neubauer.

La tasa de crecimiento específica ($\mu = d [\ln x / x_0] / dt$) y el tiempo de duplicación ($t_d = [\ln 2] / \mu$) se calcularon en base a la fase lineal de la curva de crecimiento de la levadura. El peso seco microbiano se estimó gravimétricamente, mediante la centrifugación de 10 ml de cada alícuota de la suspensión celular, a 8000 rpm durante 10 min; se descartó el sobrenadante secándose el residuo a 90°C por 24 h y peso constante (GÜNTHER et al. 1995).

2.3 Análisis químicos

Las concentraciones de hidrocarburos de la muestra natural y del pireno proveniente de las alícuotas obtenidas periódicamente del cultivo, fueron analizadas por cromatografía gaseosa, por triplicado. Se empleó la técnica de microextracción en fase sólida (SPME fiber assembly, 100 μm polydimethyl-siloxanecoating, SUPELCO). La muestra fue procesada en solución acuosa, agitada magnéticamente durante 20 min a temperatura ambiente, empleando fenantreno como estándar interno, y con un factor de respuesta 0,60.

Para dichas determinaciones se empleó Perkin-Elmer Autosystem Gas Chromatograph, equipado con Flame Ionisation Detector. Nitrógeno gaseoso fue utilizado como carrier (10 psi). El detector fue mantenido a 300°C . La temperatura del horno fue programada entre 50 (tiempo inicial 3 min) y 250°C (tiempo final 7 min), a una tasa de $15^\circ\text{C}/\text{min}$. Para todas las determinaciones se utilizó una columna capilar de silica- fusionada, fase líquida (metyl 5% fenyl silica) permafase PVMS/54 (25 m • 0,32 mm ID, 1,0 μm de espesor).

3. Resultados y discusión

La concentración media de pireno en la muestra natural fue de 159,4 ppm. (fig. 1). La especie dominante en las muestras en un 80% fue identificada como *Rhodotorula glutinis* (HARRISON 1958) (Subdivision Ascomycotina, Clase Hemiascomycetes, Orden Cryptococcales) (tab. 1).

Tab. 1: Características morfológicas y bioquímicas de *Rhodotorula glutinis*

<u>Crecimiento:</u>	a 37°C (+); pellicle in broth (-); pseudo-true hypha (-); ascospores (-); chlamydosp.(-); tubo germinativo (-) ; capsula, India ink (-); ureasa (+); consumo KNO (+); phenol oxidasa (-).
<u>Asimilación:</u>	Glucosa (+); Glycerol (-); Gly-2-Keto-D-gluconato (+); L-Arabinosa (-); D-Xylosa (-); Adonitol (+); Xylitol ($\pm$); Almidón (+); Galactosa (-); Inositol (-); Sorbitol (+); methyl-D-Glucosido (+); N-Acetyl-D-glucosamina (-); Cellobiose (+); Lactose (-); L-Ramnose (-); Maltose (+); Sucrose (+); Trehalose (+); Melezitose (+); Citric acid (+); Raffinose ($\pm$).
<u>Fermentación:</u>	Glucose (-); Maltose (-); Sucrose (-); Lactose (-); Galactose(-); Trehalose (-).

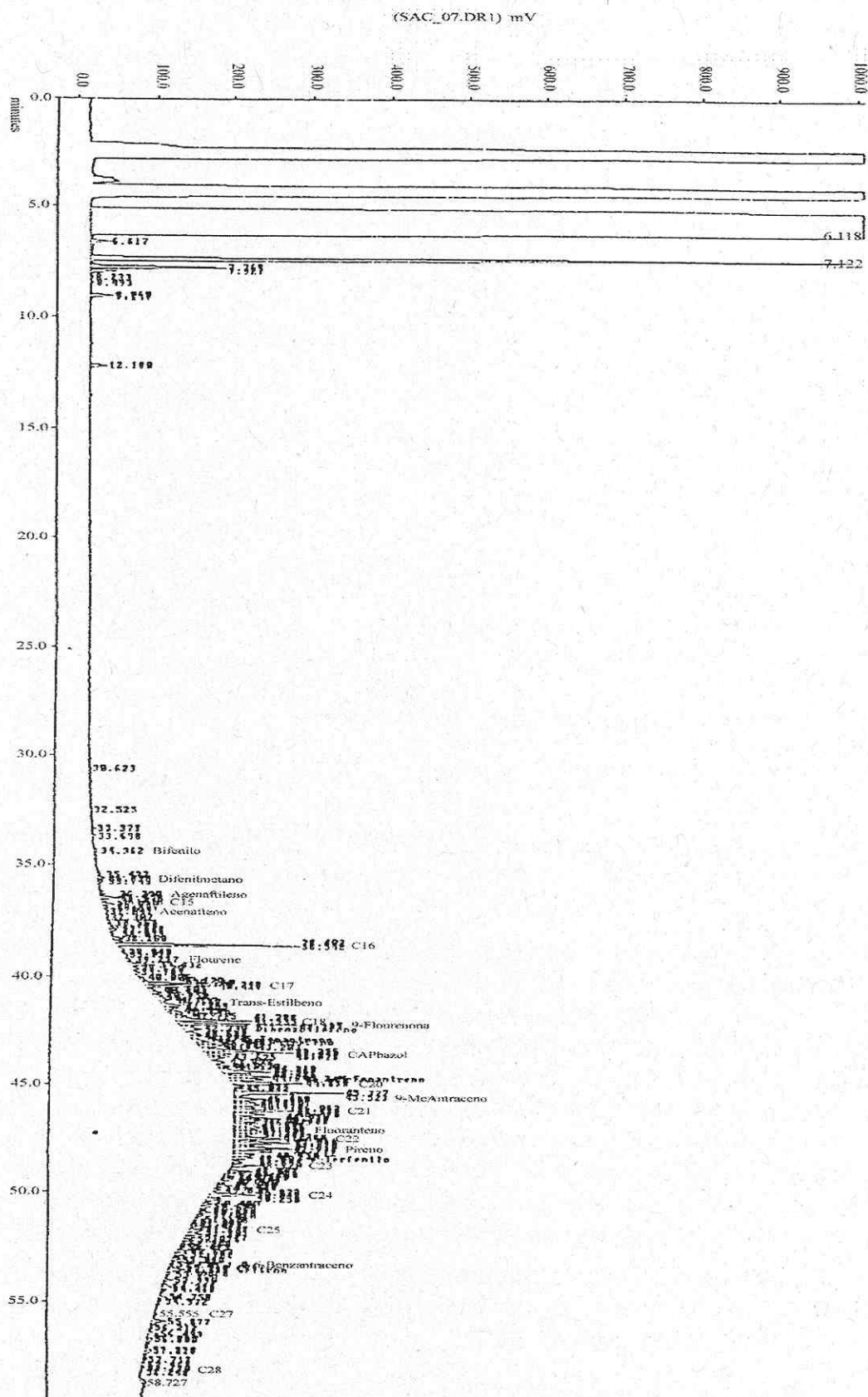


Fig. 1: Chromatogram of natural sediment

El desarrollo de *R. glutinis* en el medio con pireno y en el control fue similar hasta los 16° días de incubación, obteniéndose una densidad celular de $41,5 \cdot 10^5$ cél./min y $39,8 \cdot 10^5$ cél./min respectivamente; correspondiendo dicho período a la adaptación metabólica de la levadura al hidrocarburo (fig. 2). Al 20° día $458,0 \cdot 10^5$ cél./min se obtuvieron en los frascos con pireno.

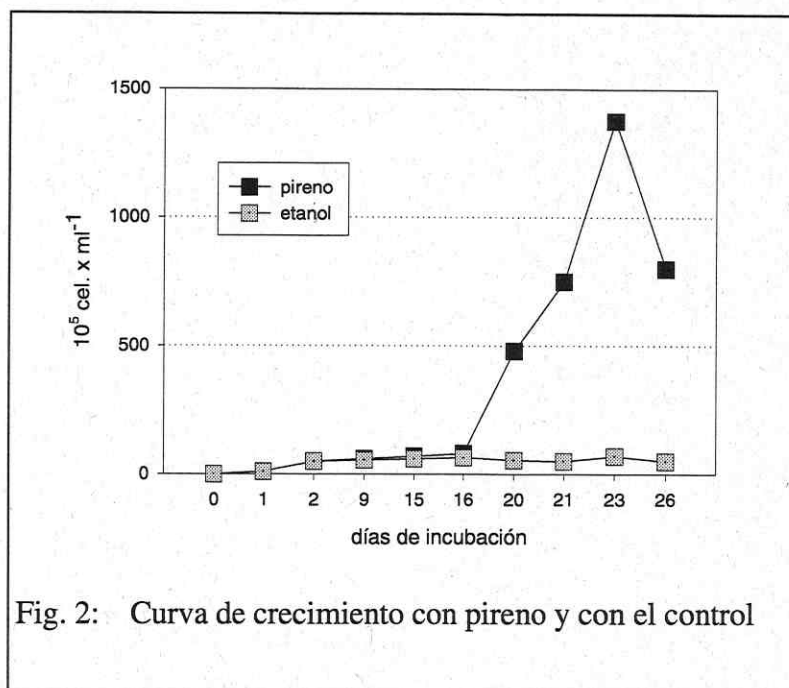


Fig. 2: Curva de crecimiento con pireno y con el control

El número celular máxima se alcanzó al 23° día, siendo de $1342,5 \cdot 10^5$ cél./min, disminuyendo luego a $815,0 \cdot 10^5$ cél./min al 26° día con pireno y a $14,0 \cdot 10^5$ cél./min en el blanco de etanol. Dicha disminución se debió a la degradación total de ambos sustratos.

El desarrollo exponencial observado a partir del 16° día de cultivo con pireno, no se correspondió con el respectivo control, el cual se mantuvo en el valor promedio de $31,2 \pm 5,9 \cdot 10^5$ cél./min hasta finalizar la incubación.

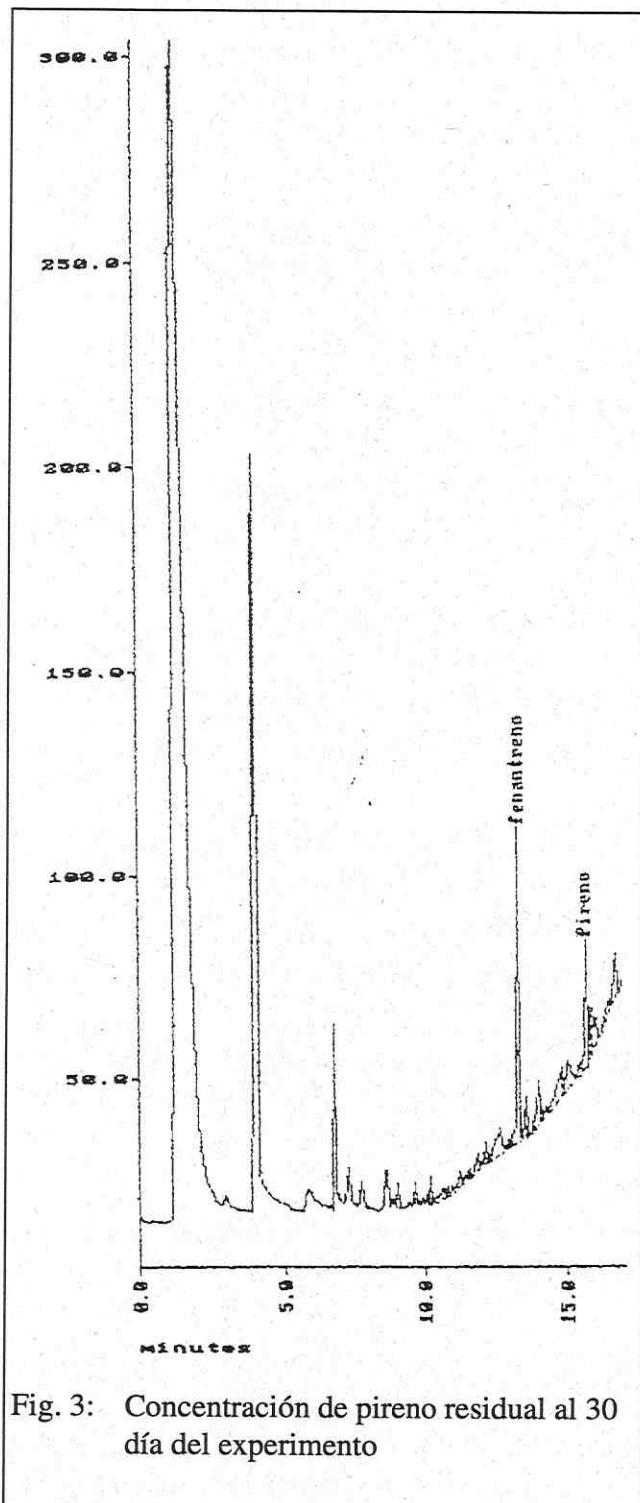
La tasa de crecimiento específico fue de $\mu = 0,026 \text{ h}^{-1}$ ($\mu = d [\ln n/n_0] / dt$) y el tiempo de duplicación $t_d = 26,7 \text{ h}$ ($t_d = [\ln 2] / \mu$), durante la fase logarítmica comprendida entre el 16° y 23° días de cultivo.

Valores de μ bajos y tiempos de duplicación prolongados como los obtenidos, son propios de la única fuente carbonada ensayada. Otros autores en cultivos de microorganismos con pireno como única fuente de C observaron tasas de crecimiento comprendidas entre $0,056 \text{ h}^{-1}$ (*Mycobacterium* sp., BOLDRIN et al. 1993) y $0,023 \text{ h}^{-1}$ (*Rhodococcus* sp., WALTER et al. 1991). Debe destacarse que estas tasas de crecimiento fueron obtenidas en cultivos *in vitro*, donde los procesos de degradación no se vieron limitados por la disponibilidad de sustrato. El desarrollo de microorganismos en condiciones naturales bajo las cuales la degradación de PAH depende de la solubilidad de los mismos y de las condiciones físico-químicas, sería inferior a las obtenidas en laboratorio. La mayoría de los ensayos realizados han sido con especies bacterianas o con hongos filamentosos, siendo escasos los resultados obtenidos con levaduras.

La concentración inicial de pireno residual disminuyó significativamente, obteniéndose 3,6 – 5,8 mg/l de pireno remanente (fig. 3) al finalizar el experimento. Dicha disminución correspondió al 90% del hidrocarburo inicial.

La biomasa inicial de $5,30 \pm 0,75 \text{ mg/l}$ se incrementó a $14,50 \pm 0,85 \text{ mg/l}$, por lo cual el coeficiente de rendimiento del pireno en biomasa celular fue de 0,23, cifra que sobreestima ligeramente el rendimiento ya que no se corrigió por el carbono proveniente del control de

etanol. Coeficientes comprendidos entre 0,10 – 0,31 fueron observados en especies bacteriana con cresol como sustrato (GÜNTHER et al. 1995).



4. Conclusión

Rhodotorula glutinis fue capaz de crecer en forma exponencial con una fase lag previa, con pireno como única fuente de carbono y energía. La tasa de crecimiento específica al igual que el rendimiento obtenido con esta levadura sobre pireno, semejante a la observada en especies bacterianas, permitiría su utilización en la biorremediación de ambientes contaminados.

Agradecimientos

Se agradece a Bact. M.E.Gatti (Cát. Microbiología, Fac. Cs. Veterinarias, UNLP) la identificación y mantenimiento del cultivo de *R. glutinis*; y al Dr. J. A. Arcas (CINDEFI, Fac. Cs. Exactas, UNLP) el apoyo técnico y sugerencias para la realización de los cultivos.

Bibliografía

- Analytab Products. 1992: API 20EN analytical profile index, 5th ed. Analytab Products, Marcy-l'Etoile, France. „Anal. Proc. 1992“.
- BOLDRIN, B., TIEHM, A., FRITZSCHE, C. (1993): Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1927-30.
- CERNIGLIA, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351-68.
- GÜNTHER, K., SCHLOSSER, D., FRITSCHE, W. (1995): Phenol and cresol metabolism of *Bacillus pumilus* isolated from contaminated groundwater. J. Basic. Microbiol. 35, 83-92.
- HOLDER, C. L., KORFMACHER, W. A., SLIKKER, D. W., THOMPSON, H. C., CERNIGLIA, C. E. (1985): Mass spectral characterization of doxylamine and its rhesus monkey urinary metabolites. Biomed. Mass Spectrom. 12, 151-58.
- KELLEY, Y., FREEMAN, J. P., EVANS, F. E., CERNIGLIA, C. E. (1993): Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. Appl. Environ. Microbiol. 59, 800-06.
- LAMBERT, M., KREMER, S., STERNER, O., ANKE, H. (1994): Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK 375. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3597-01.
- LODDER, J. 1970: The yeast: a taxonomy study, 2nd ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- PHAFF, H. J., MILLER, M. W., MRAK, E. M. 1978: The life of yeast, 2nd. ed. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., MARTENS, R., ZADRAZIL, F., FRITSCHE, W. (1997): Comparison of phenantrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3919-25.
- SCHNEIDER, J., GROSSER, R., JAYASIMHULU, K., XUE, W., WARSHAWSKY, D. (1996): Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]apyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. Appl. Environ. Microbiol. 62, 13-19.
- STRINGFELLOW, W. T., AITKEN, M. D. (1995): Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes nd fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61, 357-62.
- SWANNELL, R. P. J., LEE, K., MCDONAGH, M. (1996): Field evaluations of marine oil spill bioremediation. Microbiol. Rev. 60, 342-65.
- THIBAUT, S. L., ANDERSON, M., FRANKENBERGER, Jr., W. T. (1996): Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. Appl. Environ. Microbiol. 62, 283-287.
- WALTER, U., BEYER, M., KLEIN, J., REHM, H. J. (1991): Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 671-76.

Actividad oxidasa-peroxidasa ligninolítica extracelular de algunos micromicetes aislados de distintas regiones de la republica Argentina

M. C. N. SAPARRAT, A. M. M. BUCSINSKY, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentina

1. Introducción

Varias enzimas – fenoloxidasas – como las oxidasas: lacas, y aril-alcohol oxidasa (AAO); y peroxidasas: lignina peroxidasa (Lig-P), manganeso peroxidasa (Mn-P), y peroxidasa independiente de Mn (MIP), están involucradas en el proceso de modificación y/o degradación de la lignina (ODIER y ROUAU 1985, HEINZKILL y MESSNER 1997). Estas enzimas ligninolíticas se caracterizan por presentar una amplia especificidad de sustratos (GUILLÉN 1991, HOFRICHTER y FRITSCH 1996), propiedad por la cual degradan además de lignina, otros compuestos de similitud estructural, como ácidos húmicos, contaminantes complejos como DDT e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (BUMPUS y AUST 1987). Sin embargo, a causa de la estructura aromático-recalcitrante de la lignina (KIRK 1983), los mecanismos y funciones de aquellas enzimas no son aún completamente conocidos.

La escasa información en relación a los sistemas enzimáticos ligninolíticos, sintetizados por cepas fúngicas aisladas de materia orgánica en descomposición – presente en suelo y zonas ribereñas –, nos lleva a investigarlos.

La habilidad de 12 cepas fúngicas de diferentes grupos taxonómicos – Ascomycetes y Deuteromycetes –, para producir enzimas ligninolíticas extracelulares se llevó a cabo con el fin de contribuir al conocimiento de su fisiología y potencial aplicación en el campo de la biorremediación de sitios contaminados con HAPs.

El objetivo de este trabajo es determinar cualitativamente la capacidad para producir oxidasas y/o peroxidasas por diferentes especies de micromicetes, aislados de materia orgánica en descomposición.

2. Materiales y métodos

2.1 Cepas fúngicas

Se utilizaron diferentes micromicetes, pertenecientes a la Subdivisión *Ascomycotina* y Subdivisión-Forma *Deuteromycotina*, que forman parte de la colección de cultivos del Cepario del Instituto Spegazzini (CLPS). Estas cepas se aislaron a partir de materia orgánica en descomposición, presente en suelo y zonas costeras de distintos cuerpos de aguas de la República Argentina.

Subdivisión *Ascomycotina*: *Emericella nidulans* (Eidam) Vuillemin (CLPS cult n° 29); *Sordaria fimicola* (Roberge) Cesati et de Notaris (CLPS cult n° 30); y *Talaromyces helicus* (Raper y Fennell) C. R. Benjamin (CLPS cult n° 553).

Subdivisión-Forma *Deuteromycotina*: *Alternaria alternata* (Fries: Fries) Keissler (CLPS cult n° 267); *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud (CLPS cult. n° 2); *Epicoccum*

purpurascens Ehrenb. ex Schlecht. (CLPS cult n° 23); *Fusarium solani* (MARTIUS) Saccardo (CLPS cult n° 555); *Graphium putredinis* (Corda) HUGHES (CLPS cult n° 423); *Phaeoisaria clematidis* (Fuckel) Hughes (CLPS cult. n° 154); *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. y Hochapfel (CLPS cult. n° 469); *Scopulariopsis brumptii* Salvanet-Duval (CLPS cult. n° 135); y *Trichoderma saturnisporum* Hammil (CLPS cult. n° 264).

El stock de cultivos se mantuvo a 4°C, en estrías con agar-malta (2%), y en aceite mineral.

2.2 Sustrato

La identificación de oxidasas y peroxidasas fúngicas extracelulares se llevó a cabo utilizando el medio sólido Czapek Dox modificado con ABTS: Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotialina-6-sulfónico) (Sigma), un sustrato muy sensible que permite la rápida selección de hongos productores de las enzimas ligninolíticas por medio de una reacción de color (HIGHLEY 1987, BOURBONNAIS y PAICE 1990). El empleo de este test permite no sólo la identificación de fenoloxidasas – como la lacas –, sino también de enzimas de tipo peroxidasa - Mn-P - (HOFRICHTER y FRITSCH 1996). Por lo tanto, la actividad oxidasa se correlacionó con la actividad peroxidasa.

2.3 Inoculación y condiciones de cultivo

Se trabajó en cápsulas de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 20 ml del medio sólido Czapek Dox modificado, que consta de: 10 g de glucosa, 1 g de NaNO₃, 1 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄ • H₂O, 0,5 g de KCl, 0,2 g de extracto de levadura, 0,2 g de ABTS, 20 g de agar-agar, por litro de medio (la preparación se ajustó a pH: 6,0 – 7,0, antes de autoclavar a 1 atm., durante 20 min). Se inoculó con discos de 5 mm de diámetro, con micelio activo, previamente cultivado en placas de agar-malta (2%). Cada cepa se hizo por triplicado, bajo condiciones controladas (en cámara a 25°C).

2.4 Interpretación

Para una mejor interpretación de los resultados obtenidos se siguió una serie relativa de color. Los resultados de la actividad enzimática oxidasa-peroxidasa extracelular de las especies ensayadas se expresaron, de acuerdo a las siguientes características:

1. reacción positiva (++) : halo de color verde intenso en zonas definidas.
2. reacción levemente positiva (+) : halo de color verde pálido.
3. reacción negativa – sin actividad oxidasa-peroxidasa – (-) : ausencia de halo verde.

Las observaciones se realizaron cada siete días, durante seis semanas, midiéndose el halo de coloración y el frente de crecimiento.

3. Resultados y discusiones

Coloración del Medio Czapek Dox modificado (Oxidación del ABTS) y crecimiento fúngico: Se estimó el poder enzimático ligninolítico de cada una de las cepas analizadas: la tabla n° 1 muestra el grado de reacción y las referencias sobre la producción de las especies ensayadas.

El test reveló producción enzimática ligninolítica (reacción positiva para oxidasas y/o peroxidasas) en *Graphium putredinis*, *Phaeoisaria clematidis*, *Phoma glomerata*, *Sordaria fimicola* (éstas tres últimas especies citadas por primera vez como productoras de las enzimas ligninolíticas) y *Talaromyces helicum*. La producción de oxidasas y/o peroxidasas extracelulares sólo se registró en el 40 % de las cepas de micromicetes utilizadas, donde la oxidación se observó como:

1. reacción positiva (++) en:

Graphium putredinis
Phaeoisaria clematidis
Talaromyces helicus

Graphium putredinis y *Talaromyces helicus* - especies capaces de oxidar y degradar hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (OUDOT et al. 1993) -, de acuerdo con los resultados obtenidos bajo otras condiciones de cultivo, produjeron niveles detectables de enzimas ligninolíticas extracelulares (SAPARRAT et al. 1996).

2. reacción levemente positiva (+) en:

Phoma glomerata
Sordaria fimicola

3. sin actividad oxidasa-peroxidasa (-) en:

Alternaria alternata
Aureobasidium pullulans
Emericella nidulans
Epicoccum purpurascens
Fusarium solani
Scopulariopsis brumptii
Trichoderma saturnisporum

En relación al geo-hongo, *Alternaria alternata*, es una especie capaz de degradar compuestos alifáticos, como el kerosene –habilidad demostrada en experimentos realizados por RUBDIGE (1974)– y la fracción aromática de residuos petroquímicos –en cultivos mixtos–, utilizando a los mismos como única fuente de carbono y energía (CAZAU et al. 1992); sin embargo, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, no produjo niveles detectables de peroxidasas (Mn-P), anteriormente citadas para el género en medios con ácidos húmicos; el efecto inductor de éstos parece estar relacionado con su producción (HOFRICHTER y FRITSCHÉ 1996).

En *Aureobasidium pullulans*, a pesar de no detectarse actividad oxidasa/peroxidasa, bajo las condiciones citadas, investigaciones previas revelaron la producción de enzimas oxidasas extracelulares – lacas –, cuya síntesis está altamente afectada por el tipo de compuesto carbonado utilizado en el medio de cultivo, encontrando que una cepa de este hongo levaduriforme, mantenida en un medio con lactosa es inducida a una mayor producción de fenoloxidasas – en comparación con otros azúcares simples – (como glucosa o maltosa) (DESHPANDE et al. 1992). Por lo tanto, el efecto represor de la glucosa – en la expresión y producción de la enzima lacas (EGGERT et al. 1995) –, sustrato de crecimiento del medio aquí utilizado, podría determinar la no producción enzimática ligninolítica en esta cepa fúngica.

Salvo en el caso de *Talaromyces helicum*, cuyo medio Czapek Dox mod. se intensificó (++) hasta la segunda semana, sólo durante la primer semana se detectó la actividad enzimática ensayada. Sin embargo, a lo largo de las seis semanas, se visualizaron tonalidades violáceas en el medio de cultivo de distintos hongos – excepto en *Epicoccum purpurascens*; *Graphium putredinis*; y *Trichoderma saturnisporum* –. Estos resultados sugieren la presencia de sistemas enzimáticos extracelulares no específicos que actúan sobre el ABTS y/o sus

productos de oxidación y dan distintas sustancias coloreadas (propiedad característica de los compuestos aromáticos) no identificadas.

Tab. 1: Resultados del test ABTS con diferentes especies de micromicetes y referencias sobre la producción de enzimas ligninolíticas

Especies	Reacción del test ABTS	Otros autores
<i>Alternaria alternata</i>	–	HOFRICHTER y FRITSCH, 1996
<i>Aureobasidium pullulans</i>	–	DESHPANDE et al. 1992
<i>Emmericella nidulans</i>	–	–
<i>Epicoccum nigrum</i>	–	–
<i>Fusarium solani</i>	–	IWAHARA et al., 1980 GUILLÉN et al. 1990
<i>Graphium putredinis</i>	++	SAPARRAT et al. 1996
<i>Phaeoisaria clematidis</i>	++	–
<i>Phoma glomerata</i>	+	–
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	–	–
<i>Sordaria fimicola</i>	+	–
<i>Talaromyces helicum</i>	++	SAPARRAT et al. 1996
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	–	–

El crecimiento miceliar sobre el medio Czapek Dox mod. - en todas las cepas probadas - no mostró diferencias en comparación a aquel desarrollado sobre placas de extracto de malta (M.E.).

Bibliografía

- BOURBONNAIS, R., PAICE, M. G. (1990): Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267, 99-102.
- BUMPUS, J. A., AUST, S. D. (1987): Biodegradation of environmental pollutants by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. BioEssays 6, 166-170.
- CAZAU, M. C., MASELLI, G., ARAMBARRI, A. M. (1992): Utilización de diferentes especies de hongos como biodegradadores de hidrocarburos I. Ensayo preliminar. Bol. Micol. 7, 79-83.
- DESHPANDE, M. S., VINAY, B. R., LYNCH, J. M. (1992): *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. Enzyme Microbiol. Technol. 14, 514-527.
- EGGERT, C., TEMP, U., ERIKSSON, E. L. (1995): The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1151-1158.

- GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, A. T., MARTÍNEZ, M. J. (1990): Production of hydrogen peroxide by aryl alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 465-469.
- GUILLÉN, F. 1991: Aril alcohol oxidasa de *Pleurotus eryngii* - Estudio en relación con la 45degradación de lignina -. Unpublished thesis. 120 pp. Universidad de Alcalá de Henares, Facultad de Ciencias, Madrid.
- HEINZKILL, M., MESSNER, K. 1997: The ligninolytic system of fungi. In: Fungal Biotechnology, (Chapman & Hall) Anke, T. (Eds.), London, chapter 8, 213-227.
- HIGHLEY, T. (1987): Effect of carbohydrate and nitrogen on hydrogen peroxide formation by wood decay fungi in solid medium. FEMS Microbiol. Lett. 48, 373-377.
- HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. (1996): Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. Y. Screening for low-rank-coal-depolymerizing activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 220-225.
- IWAHARA, S., NISHIHARA, T., JOMORI, T., KUWAHARA, M., HIGUCHI, T. (1980): Enzymic oxidation of α,β -unsaturated alcohols in the side chains of lignin-related aromatic compounds. J. Ferm. Technol. 58, 183-188.
- KIRK, T. K. 1983: Degradation and conversion of lignocellulosics. In: SMITH, J. E., BERRY, B. R., KRISTIANSEN, B. (Eds.), Arnold, London, The Filamentous Fungi, Vol. 4. Fungal technology. 266-294.
- ODIER, E., ROUAU, X. 1985: Les cellulases et les enzymes de dépolimérisation de la lignine. In: MOURANCHE, A., COSTES, C. (Eds.), Gauthier-Villares, París, Hydrolases et Dépolimérases. Enzymes d'intérêt industriel. 199-237.
- LOUDOT, J., DUPONT, J., HALOUI, S., ROQUEBERT, R. (1993): Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. Soil Biol. Biochem. 25, 1167-1173.
- RUBDIGE, T. (1974): A new selective medium for the screening of aircraft fuels for biodeteriogenic fungi. Int. Biodeterior. Bull. 10, 53-55.
- SAPARRAT, M. C. N., BUCSINSZKY, A. M. M., TOURNIER, H. A., ARAMBARRI, A. M. 1996: Análisis de la producción de enzimas ligninolíticas por diferentes especies de *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*. En: Libro de resúmenes de las XXV Jornadas Argentinas de Botánica, Mendoza, 17-22 Noviembre, p. 10.

Biotransformación fúngica de pireno

M. C. ROMERO, M. L. SALVIOLI, M. C. CAZAU, A. M. ARAMBARRI

Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 53 n° 477, 1900 La Plata, Argentina

1. Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) como el pireno volcados frecuentemente a los ecosistemas son clasificados como contaminantes prioritarios por U.S. Environmental Protection Agency (Int. Agency Res. 1983, KAGAN et al. 1985). La degradación microbiológica y transformación de los hidrocarburos es un proceso importante en la biorremediación de ambientes contaminados (LAMBERT et al. 1994, CHAINEAU et al. 1995).

Se ha prestado mayor atención a la capacidad para degradar los PAH por parte de zygomycetes y basidiomycetes, habiéndose estudiado extensivamente el metabolismo degradativo y producción de metabolitos intermedios por *Crinipellis stipitaria*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella elegans* (POTHULURI et al. 1993, LANGE et al. 1994, VAZQUEZ-DUHALT et al. 1994, SACK et al. 1997). Especies de deuteromycetes como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., provenientes de suelos contaminados han sido consideradas con menor potencial degradativo (OUDOT et al. 1993, SACK y GÜNTHER 1993).

El aislamiento de especies fúngicas capaces de degradar PAH provenientes de áreas contaminadas y su identificación, ha sido desarrollado por diversos grupos de investigación en Argentina. El estudio de especies fúngicas con capacidad degradadora está documentado en CAZAU et al. (1992), COLOMBO et al. (1996) y ROMERO et al. (1997), habiéndose encarado sobre hidrocarburos alifáticos y aromáticos con dos o tres anillos bencénicos, como modelo.

Fusarium solani y *Rhodotorula glutinis* fueron aislados de suelos contaminados del área de la Destilería YPF - La Plata, Argentina. Las especies mencionadas fueron identificadas y cultivadas en agar-placa con pireno, como única fuente de carbono. Dichas especies fueron seleccionadas para la realización de este ensayo por haber tenido un buen desarrollo en presencia de pireno, siendo el objetivo de los experimentos estimar el consumo *in-vitro* de dicho compuesto aromático, con y sin cosustrato.

2. Materiales y métodos

2.1 Cultivo de las especies fúngicas

Fusarium solani y *Rhodotorula glutinis* fueron cultivados en 20 ml de medio basal mineral (MBM) conteniendo 40 mg/l de pireno (solución stock: 0,8 mg de pireno /2,5 ml de dimetilformamida), y (a) con 0,5% de glucosa, (b) sin otra fuente carbonada, ajustándose a pH 6,5. La composición de MBM en mg/l fue: (NH₄) SO₄ 400; K₂HPO₄ 320; KH₂PO₄ 80; Mg SO₄ • 7H₂O 80; CaCl₂ 40; FeCl₂ 2.

Se determinó la biomasa inicial de *F. solani*, extrayendo de una placa con desarrollo sobre pireno-agar, 3 discos de 7 mm² de diámetro, los mismos fueron secados durante 48 horas a 60°C hasta peso constante, sobre un papel de filtro previamente tarado. Igual cantidad de cultivo fue agregado a los frascos con pireno y a los respectivos controles, como inóculo.

Los cultivos correspondientes a *R. glutinis* fueron inoculadas con 0,2 ml de suspensión celular, obtenida agitando un anza de material de cultivo en solución fisiológica estéril; el número de células por ml agregadas a cada frasco se obtuvo por recuento directo en la cámara de Thoma (Fein-Optik Bad Blankenburg).

Por duplicado y en condiciones estériles, frascos de 100 ml con 20 ml de cada medio de cultivo mencionado (con y sin otra fuente carbonada), fueron inoculados con las especies fúngicas a ensayar, e incubados conjuntamente con los controles abióticos (sin inóculo). Se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 140 rpm, en oscuridad durante 20 días.

Se realizaron dos muestreos semanales, procesándose las muestras por duplicado para cada medio de cultivo, especie fúngica y controles abióticos, obteniéndose periódicamente la concentración de pireno remanente.

2.2 Procesamiento de las muestras

Periódicamente se analizó mediante HPLC la concentración de pireno residual presente en ambos medios de cultivo, e inoculados con *F. solani* y *R. glutinis*. La extracción consistió en cinco tratamientos consecutivos con 30 ml de etilacetato (volumen final 150 ml), y luego mediante una ampolla de decantación se separó la fase acuosa de la fase orgánica de cada cultivo. El extracto fue secado con Na_2SO_4 , sonicado, filtrado y evaporado en rotavapor (temp. columna -6°C , temp. baño 40°C), llevado hasta presión 50 mPa. El residuo fue disuelto en 1500 μl de etilacetato, evaporado y resuspendido nuevamente en 1500 μl metanol.

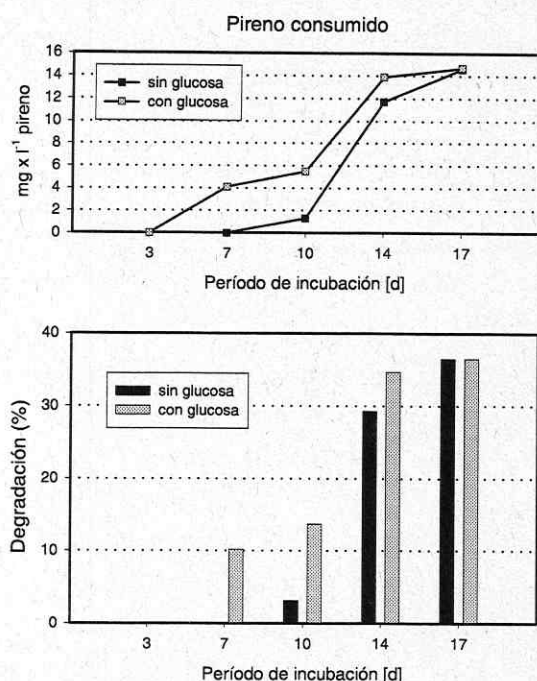
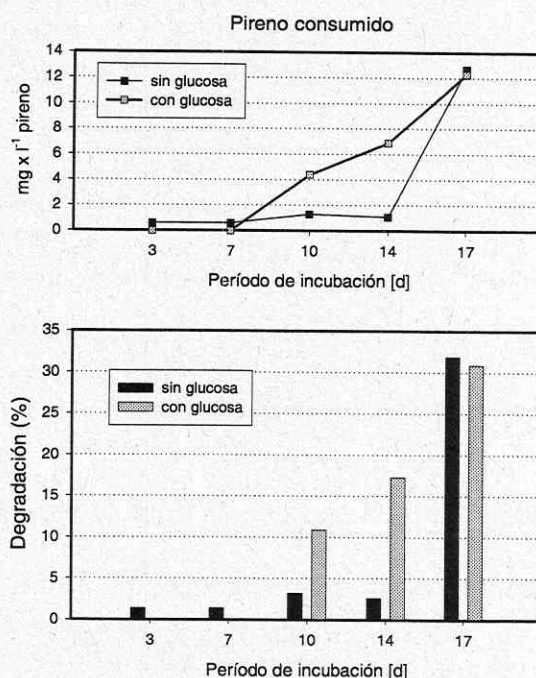
Las respectivas muestras fueron sonicadas y analizadas mediante HPLC (Merck Hitachi), equipada con L-4200 detector, Chromato-Integrator D-2500; columna RP 18 (125 • 4 mm, diám. int.); solvente acetonitrilo: agua - 80:20 ; flujo 1,0 ml/min; long. de onda 254 nm. Las inyecciones repetidas de los extractos de los cultivos fueron convertidas en concentraciones de pireno (mg/l) mediante el empleo de una curva de calibración; leyéndose en todos los casos las muestras dos veces y referidas a un standard. Los datos tabulados se obtuvieron con un desvío standard promedio del 15%. La curva de calibración se obtuvo mediante la lectura por triplicado, de diferentes diluciones (5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/l) de una solución stock de pireno-dimetilformamida, igual a la empleada para los cultivos.

3. Resultados

Durante el período de incubación se observó un incremento de la densidad inicial de *R. glutinis*, de $1,08 \cdot 10^5$ cél./ml a $1,25 - 1,95 \cdot 10^7$ cél./ml en el medio sin glucosa; en los cultivos con cosustrato, la densidad final del cultivo fue de $3,25 - 4,90 \cdot 10^8$ cél./ml, lo que representó un incremento de la numerosidad celular de dos y tres órdenes de magnitud, para cada medio de cultivo.

La variación de biomasa de *F. solani*, obtenida por peso seco al inicio y al final de la incubación, fue de 0,625 g/l a 0,997 y 0,975 g/l, en el medio con y sin glucosa respectivamente. Por lo tanto se correspondió con un aumento del 59,5 y 56,0% de biomasa.

La concentración de pireno no mostró variaciones significativas hasta el 14° día con *R. glutinis*, siendo el mismo de 11,7 – 13,9 mg/l (29,3 – 34,7%, fig. 1); y sólo de 1,1 – 6,9 mg/l (2,6 – 17,3%, fig. 2) en el cultivo de *F. solani*.


 Fig. 1: Resultados del ensayo con *R. glutinis*

 Fig. 2: Resultados del ensayo con *F. solani*

En el ensayo con *R. glutinis* el consumo máximo de pireno fue 14,6 y 14,7 mg/l de pireno (tab. 1), para los cultivos con y sin otra fuente de carbono; dichas concentraciones se correspondieron con una disminución del 36,5% del hidrocarburo inicial. La concentración de pireno disminuyó a 12,7 y 12,3 mg/l, en cada medio de cultivo, con *F. solani* (tab. 2). El porcentaje de disminución del hidrocarburo a los 17 días de incubación fue algo menor (31,9 – 30,9%) que el obtenido en el cultivo de *R. glutinis*.

Con ambas especies se observó un porcentaje similar de desaparición de pireno, a los 17 días de incubación, sin variaciones importantes por la presencia de cosustrato al final del ensayo; influyendo la presencia de glucosa en el comienzo de la degradación de pireno.

 Tab. 1: Desarrollo de *Rhodotorula glutinis*

a) Concentración de Pireno remanente (mg/l)

Período de incubación	3 d.	7 d.	10 d.	14 d.	17 d.
M. de cultivo sin gluc.	40	40	38,8	28,3	25,4
M. de cultivo con gluc.	40	35,9	34,5	26,1	25,3

b) Concentración de Pireno consumido (mg/l)

Período de incubación	3 d.	7 d.	10 d.	14 d.	17 d.
M. de cultivo sin gluc.	0	0	1,3	11,7	14,6
M. de cultivo con gluc.	0	4,1	5,5	13,9	14,7

c) Porcentaje de pireno consumido (%)

Período de incubación	3 d.	7 d.	10 d.	14 d.	17 d.
M. de cultivo sin gluc.	0	0	3,1	29,3	36,5
M. de cultivo con gluc.	0	10,2	13,7	34,7	36,5

Tab. 2: Desarrollo de *Fusarium solani*

a) Concentración de Pireno remanente (mg/l)

Período de incubación	3 d.	7 d.	10 d.	14 d.	17 d.
M. de cultivo sin gluc.	39,4	39,4	38,7	38,9	27,3
M. de cultivo con gluc.	40	40	35,6	33,1	27,7

b) Concentración de pireno consumido (mg/l)

Período de incubación	3 d.	7 d.	10 d.	14 d.	17 d.
M. de cultivo sin gluc.	0,6	0,6	1,3	1,1	12,7
M. de cultivo con gluc.	0	0	4,4	6,9	12,3

c) Porcentaje de pireno consumido (%)

Período de incubación	3 d.	7 d.	10 d.	14 d.	17 d.
M. de cultivo sin gluc.	1,4	1,4	3,2	2,6	31,9
M. de cultivo con gluc.	0	0	10,9	17,3	30,9

4. Discusión

Los hongos de suelo, aislados de ambientes contaminados, a pesar de no tener una fuerte actividad lignolítica, metabolizan lentamente los PAH por haber desarrollado dicha capacidad degradadora por adaptación metabólica frente a la exposición crónica con hidrocarburos (CERNIGLIA et al. 1992, SACK et al. 1992, SACK y GÜNTHER 1993).

Otras especies de *Fusarium*, fueron aisladas y probadas por su capacidad degradadora de fenoles (ANSELMO et al. 1989) y 2,4-dinitrofenol (MADHOSINGH 1958). El potencial transformador de crude-oil fue estimado en microcosmos con *F. solani* en presencia de cosustrato, por CHAINEAU et al. (1995). En estos ensayos, a través del análisis por HPLC del pireno residual, se comprobó una tasa de consumo de pireno del 30% para *F. solani*, pero sin glucosa.

En experimentos con fenantreno y benzo(a)antraceno, MACGILLIVRAY y SHIARIS (1993), observaron actividad hidrocarburofítica con *R. glutinis*, siendo capaz de desarrollar con 0,73 μmol fenantreno/g. El pireno no ha sido empleado como única fuente de C, con dicha especie.

Bibliografía

- ANSELMO, A. M., CABRAL, J. M. M. S., NOVAIS, J. M. (1989): The adsorption of *Fusarium flocciferum* spores on celite particles and their use in degradation of phenol. Microbiol. Biotechnol. 31, 200-03.
- CAZAU, C., MASELLI, G., ARAMBARRI, A. M. (1992): Utilización de diferentes especies de hongos como biodegradadoras de hidrocarburos Y: Ensayo preliminar. Bol. Micológico 7, 79-83.
- CERNIGLIA, C. E., SUTHERLAND, J. B., CROW, S. A. 1992, Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. In: WINKELMANN G. (Ed.), Microbial degradation of natural products Verlag Chemie, Weinheim, 193-217.
- CHANEAU, C. H., MOREL, J. L., OUDOT, J. (1995): Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. Environ. Sci. Techn. 29, 1615-21.
- COLOMBO, J. C., CABELLO, M. N., ARAMBARRI, A. M. (1996): Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. Environ. Pollution 94, 355-62.
- International Agency for Research on Cancer. (1983): Polynuclear aromatic compounds, part 1. Int. Agency Res. Cancer Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 32, 355-64.
- KAGAN, J., KAGAN, E. D., KAGAN, I. A., KAGAN, P. A., QUIGLEY, S. (1985): The phototoxicity on non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. Chemosphere 14, 1829-34.
- LAMBERT, M., KREMER, S., STERNER, O., ANKE, H. (1994): Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK 375. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3597-01.
- LANGE, B., KREMER, S., STERNER, O., ANKE, H. (1994): Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of trans-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK 364. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3602-07.
- MACGILLIVRAY, A. R., SHIARIS, M. P. (1993): Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeast isolated from coastal sediments. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1613-18.
- MADHOSNIGH, C. (1958): The metabolic detoxification of 2,4-dinitrophenol by *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol. 7, 553-67.
- OUDOT, J., DUPONT, J., HALOUI, S., ROQUEBERT, M. F. (1993): Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. Soil Biol. Biochem. 25, 1167-73.
- POTHULURI, J. V., FREEMAN, J. P., EVANS, F. E., CERNIGLIA, C. E. (1993): Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1977- 80.
- ROMERO, M. C., CAZAU, M. C., GIORGIERI, S., ARAMBARRI, A. M. (1997): Phenanthrene degradation by microorganisms isolates from a contaminated stream. Environ. Pollution (in press).
- SACK, U., GÜNTHER, T. (1993): Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. J. Basic Microbiol. 33, 1-9.

- SACK, U., RIEG, M., METZNER, H., FRITSCH, W. 1992: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by *Aspergillus versicolor* and autochthonous soil fungi. In: Soil decontamination using biological processes (Preprints of the International Symposium Karlsruhe/Germany), DECHEMA, Frankfurt/M., 342-50.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C. E., MARTENS, R., ZADRAZIL, F., FRITSCH, W. (1997): Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3919-25.
- VAZQUEZ-DUHALT, R., WESTLAKE, D. W. S., FEDORAK, P. M. (1994): Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. Appl. Environ. Microbiol. 60, 459-66.

Sistema cerrado de biorreactores para el tratamiento microbiológico de barros industriales altamente contaminados con hidrocarburos

L. BERTHE-CORTI, B. CONRADI, R. HULSCH, B. SINN

Universität Oldenburg, FB Biologie, AG Mikrobiologie/Biotechnologie, Postf. 2503, 26111 Oldenburg, Alemania

1. Introducción

En la extracción de petróleo así como en la producción de productos petroquímicos se producen grandes cantidades de barros que contienen un amplio espectro de hidrocarburos. El proceso de biorremediación de estos barros en hacinas, en biorreactores o al depositarlos en vertederos produce una enorme contaminación del medio ambiente con hidrocarburos, debido a que se escapan gases que van al ambiente (PAYNE y PHILLIPS 1985; BARTHA 1986; MELCER et al. 1989; DOBBS 1990; SONG et al. 1990; CHANG y ALVAREZ-COHEN 1995; NARAYANAN et al. 1995). Por eso el aire de escape de hacinas y biorreactores en general pasa através de biofiltros o de filtros de carbón activo. La salida de estos filtros necesita un control permanente. Procesos de descontaminación con un circuito cerrado de gas serían deseable para evitar contaminaciones potenciales del medio ambiente.

El proyecto de cooperación ENV 24, entre la Universidad Nacional de La Plata, Argentina y la Universidad de Oldenburg, Alemania, tiene como objetivo investigar sobre la remediación biológica de barros contaminados con hidrocarburos que resultan de la industria petroquímica.

En este contexto se hicieron ensayos en la Universidad de Oldenburg sobre el tratamiento aeróbico de los barros en biorreactores. En la Universidad Nacional de La Plata se hicieron ensayos sobre la biorremediación de dichos barros en el suelo. En ambos tipos de tratamiento los compuestos fácilmente volátiles escapan al medio ambiente. Para evitar la contaminación causada por estos hidrocarburos volátiles se construyó un sistema de reactores que están conectados con un circuito cerrado de gas.

2. Descripción del proceso

El barro contaminado con hidrocarburos se procesa con aireación en un biorreactor (reactor de barro) hasta que los hidrocarburos fácilmente volátiles son eliminados en su mayor parte ya sea a través de stripping o a través de una biodegradación. Los hidrocarburos que están en el gas después del proceso de stripping atraviesan un reactor cuerpo activado (reactor con material sólido con microorganismos fijados en el que llega el agua de arriba a abajo y el aire de abajo hacia arriba) y son degradados por microorganismos. El gas de escape del cuerpo activado pasa a un fotorreactor en el que las algas asimilan el CO₂ que resulta de la mineralización de los hidrocarburos en el reactor de barro y en el cuerpo activado. Al pasar el gas através del fotorreactor las algas enriquecen el gas con oxígeno, que luego atraviesa de nuevo el reactor de barro y el cuerpo activado. Toda la corriente de gas permanece en un circuito cerrado, así que no se produce escape de gas ni se necesita añadir aire. De esta manera el proceso funciona sin emisiones. El esquema del sistema de biorreactores se presenta en figura 1.

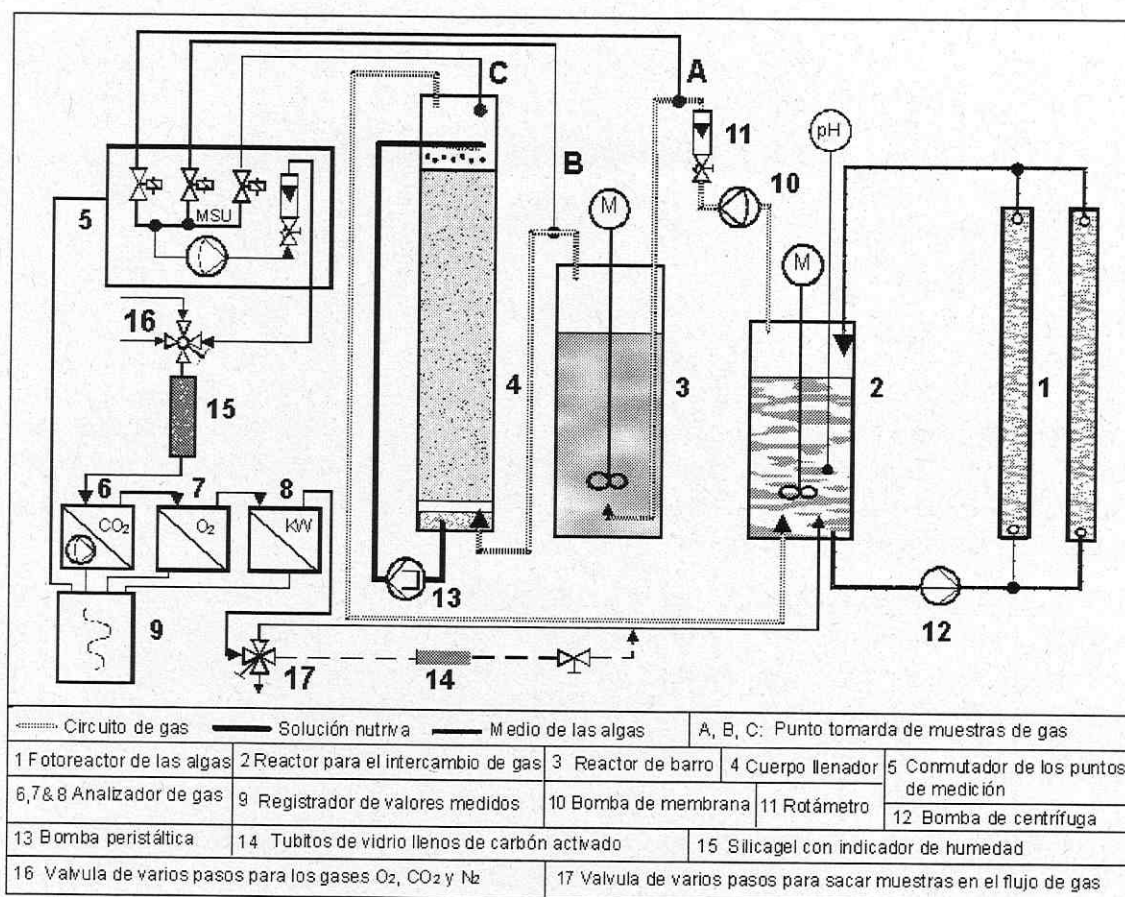


Fig. 1: Esquema del sistema de tratamiento de barros con el circuito cerrado de gas

3. Materiales y métodos

3.1 Barro

Se utilizó barro de industria contaminado con hidrocarburos y barro de sentinas (mezcla de aceite, lubricante y combustibles así como agua del barco).

3.2 Cultivos inoculados

El cuerpo activado se inoculó con lodo proveniente de una planta depuradora de fitorremediación que sirve para limpiar desagües contaminados con hidrocarburos.

El fotorreactor se inoculó con un cultivo mezclado no especificado de algas y bacterias. La parte principal de las algas se compuso de *Scenedesmus* spp. y *Chlorella* spp.

3.3 Medios de cultivo

La solución nutritiva para el cuerpo activado: 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,25 g K_2HPO_4 y se completa a 1 litro con agua potable. El pH se ajustó a un valor de 7,0.

La solución nutritiva para las algas: 1 g KNO_3 , 0,1 g K_2HPO_4 , 50 mg $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 μg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 μg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 μg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 μg H_3BO_3 , 25 ng $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mg EDTA, se completa a un litro con agua potable, no se ajustó el pH.

3.4 Reactores

El reactor de barro: un reactor de agitación (Tipo Biostat S[®], Fab. Braun Melsungen), volumen de trabajo 12,5 l, equipado con un agitador de hélice y dos agitadores de discos, aireación debajo de los agitadores, 175 revoluciones $\cdot \text{min}^{-1}$ y salida del gas a una trampa de frío para que regrese el condensado en el reactor.

Reactor para el intercambio de gas: reactor de agitación (Fab. L.H. engineering company, Gran Bretaña), volumen de trabajo 5 l, equipado con un agitador de hélice y dos agitadores de discos, aireación debajo de los agitadores, 275 revoluciones $\cdot \text{min}^{-1}$, con dos salidas en el fondo conectada con una bomba centrífuga (50 W, 38 l/min max., Fab. EHEIM) para revolver el medio de algas a través del fotorreactor y una entrada en la tapa para el medio de algas.

Fotorreactor de las algas: construcción según modelo, de un reactor desarrollado de la Fab. UMWELTSCHUTZ NORD GmbH. & Co. de doble lamina con pasarelas de vidrio acrílico (PMMA: polimetilmetacrilato) con una superficie total de 2 m² y un volumen de 18 l, alumbrado de dos lámparas fluorescentes (cada una de 2100 Lux) y dos lámparas de vapor de mercurio (cada una de 4300 Lux).

Reactor cuerpo activado: la construcción fue hecha por nuestro grupo en acero inoxidable, camisa doble rellena con material aislante, diámetro interno: 12,3 cm, altura interna: 92,5 cm, volumen 10 l, con ingreso de aire en el fondo y dos salidas en la tapa para gas (flujo de gas del sistema de circuito y flujo de gas para análisis), un tubo externo para la solución nutritiva (salida en el fondo e ingreso 11 cm debajo de la tapa). Para fijar microorganismos se utilizó arcilla granulada. Por medio de un bombeo circularon permanentemente, por el cuerpo activado, 4 l de solución nutritiva.

3.5 Transporte de gas y sistema de tubos

El circuito de gas fue movido por medio de una bomba de membrana de teflon y fue ajustado con un rotámetro a un flujo contante de 0,015 Nm³/h. El sistema de tubos de gas estuvo compuesto de Dekabon 1300[®] (material compuesto de polietileno y aluminio, Fab. Serto - Installationstechnik), de acero inoxidable, PTFE (Politetrafluoretileno, Teflon[®]) y de PVC (polienvilcloruro).

3.6 On-line análisis de parámetros del proceso

Los siguientes parámetros se analizaron en modo on-line durante todo el proceso: temperatura en el reactor de barro, pH de la suspensión de las algas, y las concentraciones de oxígeno,

dioxido de carbono e hidrocarburos en la fase gaseosa del proceso.

La concentración de oxígeno fue analizada con un sensor electro químico (tipo KE 25, Fab. Japan storage battery Co.), la concentración de dioxido de carbono con un analizador infrarrojo (tipo UNOR, Fab. Maihak AG, Hamburg). Se secó el gas antes del análisis con un silicagel con indicador de humedad para eliminar la sensibilidad del analizador al vapor de agua.

La concentración de hidrocarburos en el gas se analizó con un semiconductor dioxido metálico (tipo del sensor de gas: TGS 812, Fab. Unitronik). En razón de que el sensor no reacciona específicamente, se dieron los hidrocarburos sólo en forma de un parámetro de suma.

3.7 Análisis discontinuo de los parámetros del proceso

Hidrocarburos fácilmente volátiles:

Adicionalmente al análisis on-line de los hidrocarburos se analizó el contenido de hidrocarburos en la fase gaseosa, con una frecuencia irregular, por medio de cromatografía gaseosa. Para sacar la muestra se montaron en serie dos pequenos tubos de vidrio llenos con carbón activo (0,6 g gránulos de carbón activo) en el flujo de gas. El segundo tubito sirvió para controlar la carga del primer tubito lo cual se tomó para la análisis. El carbón activado se trasladó en un frasquito de headspace y se agregó 1 ml de alcohol benzílico. Antes del análisis se calentó el frasco a 73°C durante 60 min.

El análisis del vapor del frasco de headspace se efectuó con un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Auto-system; columna capilar Rtx-5, 30 m • 0,25 mm, espesor 0,25 µm (Restek); S/SL inyector con 200°C, 1 ml de volumen de inyección, Flame Ionisation Detector de 280°C, carrier gas nitrógeno: 3 ml/min, gas combustible: aire sintético (libre de hidrocarburos) con un flujo de 400 ml/min, H₂ (libre de hidrocarburo) 40 ml/min. La temperatura inicial del horno fue programada a 38°C (5 min isotérmica) con una tasa de 8°C/min hasta 120°C y apartir de 120°C una tasa de 20°C/min hasta 220°C (al final 1 min isotérmica).

Concentración de hidrocarburos en el medio de las algas y en el medio del cuerpo activado:

Durante el ensayo se analizó en los barros, en el medio del fotorreactor y en el medio del cuerpo activado la concentración de hidrocarburos en distintos momentos.

Métodos de análisis:

- Sustancias lipofílicas poco volátiles (SLPV) según la norma DIN 38 409-H17
- Hidrocarburos (HC) según la norma DIN38 409-H18
- Materia seca de los barros según la norma DIN 38 414-S2
- Hidrocarburos clorurados fácilmente volátiles (CKW) según la norma DIN 38 407-F5
- Hidrocarburos aromáticos fácilmente volátiles (BTEX) según la norma DIN 38 407-F9, GC-Headspace

Concentración de fosfato y nitrógeno:

En intervalos irregulares se analizaron las concentraciones de fosfato, amonio y nitrato en el cuerpo activado y en el fotorreactor, agregándose nutrientes en el caso de ser necesario. Test de fosfato: (PMB) Merckoquant 1.10428, test de ammonio: tipo Merckoquant 1.10024, test de nitrato: tipo Aquamerck 8032 (todos los test: Fab. Merck).

3.8 Recuentos de bacterias viables

Se analizaron las unidades formadoras de colonias (ufc) en el barro (reactor de barro) y en el medio del cuerpo activado. Para esto se diluyeron muestras con 0,6% NaCl y se aplicaron diluciones adecuadas a placas con medio sólido: 3 g de extracto de levadura, 5 g peptona, 15 g agar por l de agua dest., pH 7,2. Las placas fueron incubadas a 20°C, después de 3 - 5 días se contaron las colonias formadas.

3.9 Toxicidad

La citotoxicidad se determinó con el test de LumisTox (test con bacterias luminescentes según la norma de DIN 38 412 parte 34 y 341), cepa: *Photobacterium fischeri* NRRL B-1117.

La genotoxicidad se determinó según el test de mutagenicidad de Ames (MARON y AMES 1983) con la cepa *Salmonella typhimurium* TA98, con y sin activación metabólica. La activación metabólica se realizó con un test de preincubación según AMES et al. (1975). Para la metabolización se utilizó una fracción-S9 del hígado de ratas que fue activada con Aroclor (Organo Teknika), se tomaron ratas machos de 8 a 10 semanas de edad que fueron tratados con Aroclor 1254, 5 días antes de ser sacrificados.

Las placas inoculadas se incubaron en la oscuridad durante 48 h a 37°C y se contaron las colonias formadas (revertantes de His⁺). El número de revertantes espontáneas para la cepa utilizada fue 20 - 40 colonias por placa. A partir de una cantidad de revertantes que fue el doble del número de las revertantes espontáneas se consideró la muestra como mutágena.

4. Resultados y discusión

4.1 Concentración de hidrocarburos en los barros

Los ensayos se realizaron con dos barros provenientes de diferentes orígenes y de distinta composición. Los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de hidrocarburos son presentados en la tabla 1.

Tab. 1: Parámetros fisicoquímicos y composición de hidrocarburos en los barros

Carga de barro	pH	Materia seca (%)	Sustancias lipofílicas poco volátiles (mg/l)	HC (mg/l)	BTEX (µg/l)	CKW (µg/l)
1) Barro de sentinas	7	22,3	17000	14600	454	214
2) Barro de industria	7	13	1490	540	362	130

Al finalizar los ensayos se comprobó en ambos barros (carga 1: después de 65 días; carga 2: después de 30 días) una considerable reducción de los hidrocarburos fácilmente volátiles (tab. 2).

Para comparar los plazos de eliminación se calculó la pérdida de la carga de barro 1 en base a 30 días. Como se pudo verificar con un análisis de CG (fig. 2), después de 30 días se eliminó más del 95% del total de la concentración de hidrocarburos de la fase gaseosa. La baja eliminación de CKW del barro 2 resulta de la heterogenicidad del barro. En el barro se

produjo una considerable separación de fases y una gran parte de la fase orgánica se adhirió a la pared. Debido a esto una parte de los CKW difícilmente hidrosolubles no fueron accesibles al proceso de stripping y a la degradación microbiana.

Tab. 2: Concentración de CKW y BTEX en los barros antes y después del correspondiente plazo de tratamiento. La tasa de eliminación, indicada en paréntesis, es calculada en base a 30 días

Sustancia	Concentración inicial (µg/l)	Concentración final (µg/l)	Eliminación (%)	Tasa de eliminación (µg/l d)
BTEX carga 1	454	116	74	5,2 (11,3)
BTEX carga 2	362	17	95	11,5
CKW carga 1	214	24	89	2,9 (6,3)
CKW carga 2	130	54	58	2,5

4.2 Concentración de hidrocarburos en las soluciones de nutritivas

En un período largo de tiempo, para mantener el potencial degradador del sistema esbozado, sin necesidad de cambiar los medios en el cuerpo activado y en el fotorreactor, tiene que asegurarse que no se produzca una gran acumulación de hidrocarburos en los correspondientes medios. Esto se pudo probar para los BTEX y los CKW, en el medio del cuerpo activado, se produjo no obstante una baja acumulación de HC en el transcurso del ensayo (carga de barro 1 y barro 2) (tab. 3).

Tab. 3: Concentración de BTEX y CKW en los medios del cuerpo activado y en el medio de algas (fotorreactor) en el transcurso del ensayo (inicio del ensayo, termino de la primera fase con la carga de barro 1 y termino del ensayo)
<1^{*} significa, que la concentración estuvo debajo del límite de determinación del análisis

	Concentración (µg/l)					
	Cuerpo activado			Fotorreactor		
Barro (Plazo de tratamiento)	BTEX (µg/l)	CKW (µg/l)	HC (µg/l)	BTEX (µg/l)	CKW (µg/l)	KW (µg/l)
Inicio (0 d)	< 1 [*]	< 1 [*]	< 1 [*]	< 1 [*]	< 1 [*]	< 1 [*]
Termino carga 1 (76 d)	30	4	600	15	< 1 [*]	< 100
Termino carga 2 (107 d)	3	4	1300	15	2	< 100

4.3 Concentración de hidrocarburos en la fase gaseosa y degradación total de los hidrocarburos

En un plazo de 4 semanas de ensayo se verificó claramente una reducción de la concentración de hidrocarburos en la fase gaseosa del sistema de biorreactores (fig. 2 y 3). La comprobación se realizó por medio de dos métodos distintos: análisis con un sensor de hidrocarburos, on-line en el flujo de gas (fig. 2) y análisis de CG de los hidrocarburos en muestras sacadas del flujo de gas del sistema (fig. 3a-c).

Los hidrocarburos que escapan del barro por stripping circulan con el flujo de gas en todos los compartimentos del sistema y correspondiendo a sus solubilidades, se disuelven también en la fase acuosa del sistema (medio del cuerpo activado y medio del fotorreactor). Un testimonio

de la eliminación de estas sustancias se prueba cuando la cantidad total de los hidrocarburos fácilmente volátiles se reduce en todo el sistema de reactores (fase gaseosa y fase acuosa).

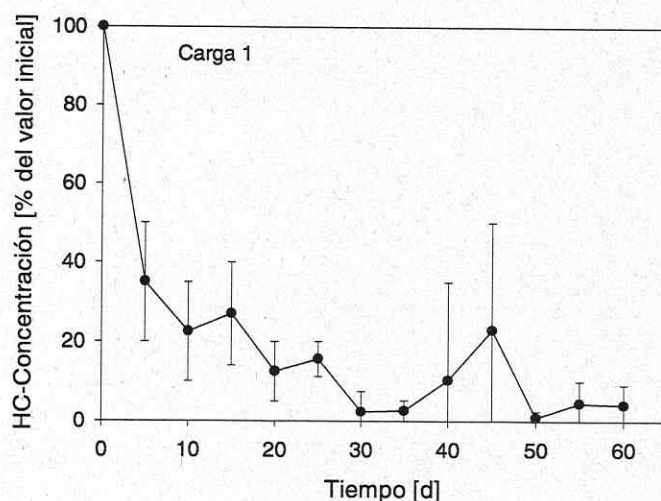


Fig. 2: Análisis on-line (sensor) de la concentración de hidrocarburos totales en la fase gaseosa. Datos dan los valores promedios de 5 días con una indicación de los valores extremos

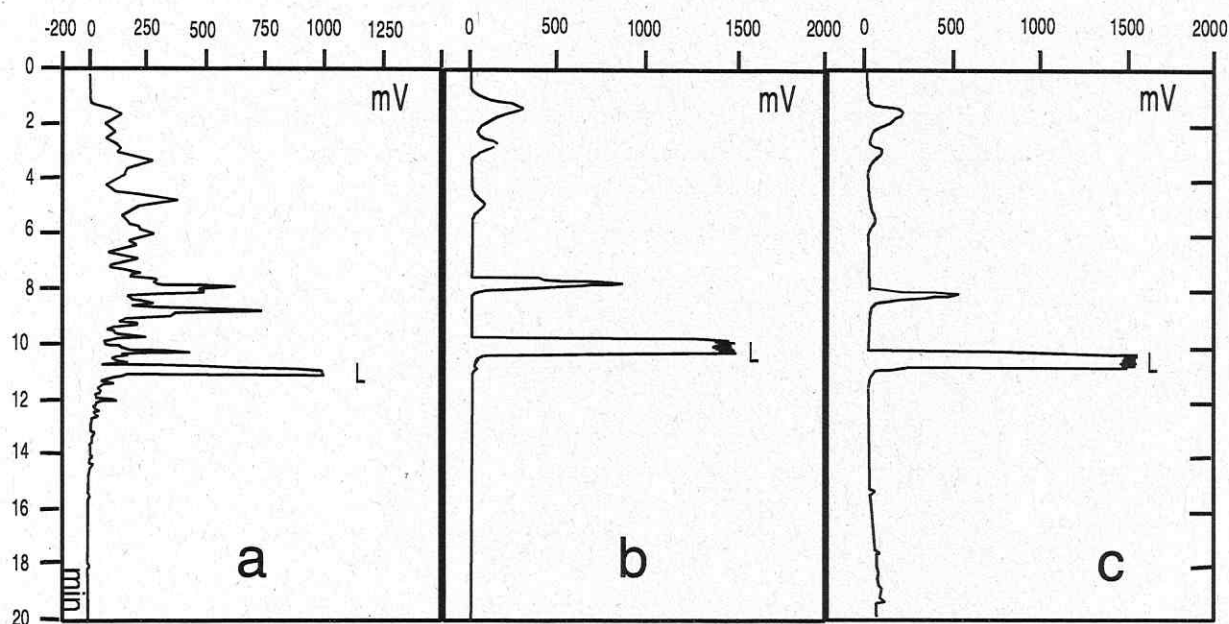


Fig. 3a-c: Cromatogramas de CG de la fase gaseosa (peak L da el disolvente)
a): inicio del ensayo, b) fin del ensayo, c) testigo

Como se puede ver (fig. 3a-c), la concentración de hidrocarburos en la fase gaseosa se reduce debajo del límite de determinación (CG-análisis con head space). La suma de las cantidades absolutas de los hidrocarburos fácilmente volátiles en el reactor de barro, el cuerpo activado y el fotorreactor muestra que se realizó una considerable reducción de hidrocarburos. En el primer ensayo (carga de barro 1) la cantidad de BTEX en el sistema se redujo en un 82% (correspondiendo a una tasa de reducción de 0,08 mg/d), en el segundo ensayo (carga de barro

2) en un 55% (correspondiendo a una tasa de reducción de 0,023 mg/d). La disminución de la cantidad total de CKW en el ensayo 1 fue de 50% y en el ensayo 2 fue de 84%. Al comparar la degradación en los primeros 30 días de los ensayos, se obtiene para ambos una cuota de degradación de 0,017 mg CKW por día.

4.4 Concentración de oxígeno y dióxido de carbono en la fase gaseosa

Adicionalmente a la concentración de hidrocarburos en el flujo de gas se determinaron on-line las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono.

La concentración de CO_2 refleja la actividad biológica (actividad degradadora) pero sólo puede ser un parámetro aproximando de suma, porque no fue posible de diferenciar entre la producción de CO_2 de las bacterias y el consumo de CO_2 de las algas. La concentración de CO_2 predominó entre 0,9% y 5% con valores aislados máximos de 8% y 15% (fig. 4).

La concentración de oxígeno se analizó en la entrada y la salida del fotorreactor, de esta manera se pudo determinar la producción de O_2 de las algas. En general la concentración de oxígeno fue de 2% a 8% más alta a la salida del fotorreactor que a la entrada del mismo. Esto se puede tomar como prueba de la actividad fotosintética de las algas. Las concentraciones de O_2 medidas en la fase gaseosa permiten concluir que no hubo en ningún momento de los ensayos una limitación de la actividad degradadora.

Las variaciones en las concentraciones de CO_2 y O_2 indican que en el sistema hubo así producción de CO_2 como también consumo de O_2 . Las concentraciones de O_2 y CO_2 se pueden influenciar con la intensidad de la iluminación del fotorreactor. Esto es una señal clara que la composición de la fase gaseosa depende de la actividad metabólica de las algas.

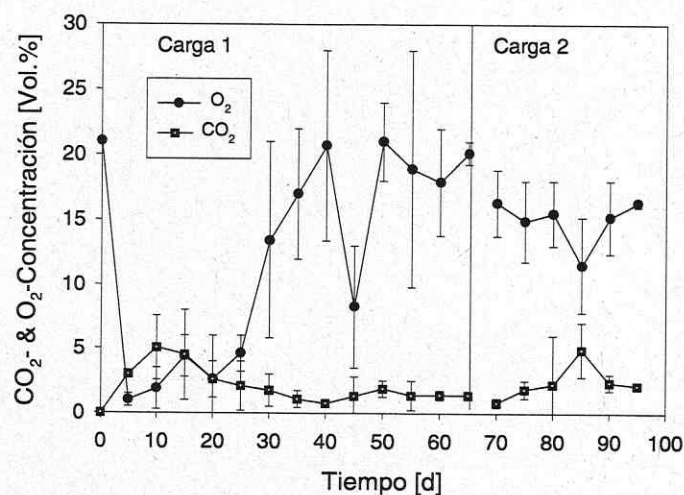


Fig. 4: Análisis on-line de las concentraciones de O_2 y CO_2 en el gas de salida del fotorreactor, valores promedios de 5 días con indicación de los valores extremos

4.5 Desarrollo de la biomasa

Se pudo demostrar un crecimiento de microorganismos en todos los reactores del sistema. En el reactor de barro la concentración de bacterias varió entre 10^4 y 10^8 cel./ml. Eso es una señal que hubo desarrollo de bacterias en el barro sin que se agregaran nutrientes.

En el fotorreactor tuvo lugar un fuerte crecimiento de las algas, de manera tal que en el transcurso de ambos ensayos fue necesario sacar biomasa. Pero no se pudo cuantificar la producción de la misma porque las algas crecieron en las paredes del reactor. En el cuerpo activado se comprobó un crecimiento de bacterias en el circuito de la solución nutritiva así como en a la superficie de los granulos de arcilla, la concentración bacteriana subió de $3 \cdot 10^6$ cel./ml a $2 \cdot 10^{12}$ cel./ml en la solución nutritiva.

4.6 Monitoreo de la toxicidad

Inhibición de la intensidad de la bioluminescencia de *Photobacterium fischeri*:

Al inicio y al término de los ensayos (carga de barro 1 y 2) se determinó la toxicidad potencial de los barros en un extracto orgánico (extracción con etilacetato y cambio del disolvente a DMSO) y los mismos pueden ser clasificados como tóxicos. El extracto de etilacetato de barro 1 al inicio del ensayo tenía un valor EC50 de 7,4 g/l y al final del ensayo un valor de 142,2 g/l. El extracto de etilacetato de barro 2 al inicio del ensayo tenía un valor EC50 de 26,5 g/l a al final del ensayo de 19,3 g/l.

En el transcurso del ensayo se analizó la toxicidad en la solución nutritiva del cuerpo activado y en el medio del fotorreactor. Para eso se sacaron muestras con una frecuencia regular y se esterilizaron por filtración y fueron introducido en el test de LUMISTox.

Para el medio del fotorreactor no se pudo calcular un valor EC50 porque las inhibiciones máximas en todas las muestras estuvieron por debajo del 50% (5% a 37%). Las muestras del cuerpo activado, tomadas en diferentes plazos de tiempo, mostraron considerables oscilaciones en el potencial tóxico, pero no indicaron una acumulación de sustancias tóxicas en el medio. La toxicidad determinada puede ser clasificada como baja y estuvo entre valores de EC50 de 250 g/l a 500 g/l.

Mutagenicidad de *Salmonella typhimurium* TA98:

Para estimar en que medida se acumulan en el cuerpo activado y en el medio de las algas sustancias con un bajo potencial tóxico, pero con potencial mutagénico, se analizaron las soluciones nutritivas del cuerpo activado y de las algas. No se detectó un potencial mutagénico ni en el medio acuoso ni en el extracto de etilacetato.

5. Conclusiones

El sistema presentado en este trabajo para la biorremediación de aire de escape contaminado con hidrocarburos se pudo aplicar con éxito para eliminar BTEX, CKW y HC de una fase gaseosa. El sistema tiene un volumen total de casi 50 l (suma de todos los componentes del sistema) y se determinaron tasas de degradación de 2 - 6 mg por l y día para CKW y casi 11 mg por l y día para BTEX. La ventaja comparado con los biofiltros abiertos es que funciona sin producir emisiones, no es necesario cambiar el material del filtro y no hay emisión de esporas o de gérmenes. Para mantener la actividad biológica es necesario agregar nitrógeno y fósforo al cuerpo activado, así como al fotorreactor de las algas, pero no es necesario recambiar las soluciones nutrientes (cuerpo activado y/o fotorreactor) para contrarrestar un potencial tóxico, que se podría formar debido a una acumulación de hidrocarburos o sus metabolitos. Sin embargo, debido a la producción de CO₂ en el cuerpo activado y en el reactor de barro se produce biomasa que tiene que ser eliminada. El sistema presentado se encuentra aún en el estado de desarrollo y debe ser optimizado.

Agradecimientos

Agradecemos al señor Uwe Maschmann por su acertada y permanente ayuda en el asesoramiento de los biorreactores y por su realización del test de Ames. Vayan también nuestros agradecimientos a la empresa UMWELTSCHUTZ NORD GmbH & Co. por la ejecución de los análisis de los hidrocarburos en el medio nutritivo y en los barros.

Bibliografía

- AMES, B. N., MCCANN, J., YAMASKI, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.* 31, 347-364.
- BARTHA, R. (1986): Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* 12, 155-172.
- CHANG, H.-L., ALVAREZ-COHEN, L. (1995): Transformation capacities of chlorinated organics by mixed cultures enriched on methane, propane, toluene, or phenol. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 440-449.
- DOBBS, R. A. 1990: Effecting emissions of volatiles from waste water treatment plants. Workshop report and Proceedings air toxic emissions and POTWs, Appendix J, Cincinnati, Ohio.
- MARON, D. M., AMES, B. N. (1983): Revised method for the Salmonella mutagenicity testing. *Mut. Res.* 113, 173-215.
- MELCER, H., THOMPSON, D., BELL, J., MONTHEIT, H. 1989: Stripping of volatile organic compounds at municipal wastewater treatment plants. *Internat. Symposium on hazardous waste treatment: Biosystems for pollution control*, Cincinnati, Ohio.
- NARAYANAN, B., SUIDAN, M. T., GELDERLOOS, A. B., BRENNER, R. C. (1995): Anaerobic treatment of volatile and semivolatile organic compounds in municipal wastewater. *Water Environ. Res.* 67, 46-56.
- PAYNE, J. R., PHILLIPS, Ch. R. (1985): Photochemistry of petroleum in water. *Environ. Sci. Technol.* 19, 569-579.
- SONG, H-G., XIAOPING, W., BARTHA, R., (1990): Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 652-656.

Biorremediación de suelos contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos

G. I. VECCHIOLI, O. R. COSTANZA, I. S. MORELLI, M. T. DEL PANNO, M. GARRÉ, M. T. PAINCEIRA

Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

1. Introducción

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es un proceso dinámico en el que contaminante, suelo, clima y actividad biológica interactúan para degradar, transformar e inmovilizar los constituyentes del contaminante. En la naturaleza, los hidrocarburos se eliminan del suelo por cualquiera de los siguientes procesos: biodegradación, emisión, percolación y drenaje superficial. No hay metodologías estandarizadas para la evaluación y seguimiento de procesos de biorremediación de mezclas de hidrocarburos en una matriz sumamente compleja como el suelo. Se establecieron distintos sistemas experimentales con la finalidad de describir los procesos involucrados en la biorremediación de suelos contaminados: terrarios, sistemas cerrados para el seguimiento de CO₂, sistemas envenenados con 1% de Cl₂Hg para evaluar pérdidas abióticas. Para monitorear los sistemas se implementaron determinaciones microbiológicas, analíticas y toxicológicas que se desarrollaran en el presente y los siguientes tres trabajos para mayor claridad.

En este trabajo se muestra la implementación y evolución de metodologías utilizadas para el seguimiento de los procesos biológicos.

2. Materiales y métodos

Tierra: franco limosa, la relación C : P : N es 100 : 12 : 8

Mezcla compleja de hidrocarburos: Residuo de industria petroquímica con alto contenido de hidrocarburos aromáticos polinucleares.

Preparación de sistemas: Se incorpora 5% de residuo a suelo según las recomendaciones de PRAMER y BARTHA (1972). Los sistemas contaminados y sin contaminar, se mantienen a temperatura ambiente y con una humedad de 21%.

Recuentos microbianos: Los microorganismos se extraen de las muestras según DECHEMA (1992). Se preparan diluciones seriadas en solución 0,85% NaCl. Recuento de heterótrofos viables cultivables en PC agar o R2A agar (REASONER y GELDREICH 1985). Recuento de hongos en Cooke Rose Bengal agar con 25 mg % de estreptomicina (MARTIN 1950). Recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos en medio mineral solidificado con agar y el residuo colocado sobre la tapa de la placa de Petri (VECCHIOLI et al. 1990) o en medio mineral (MORELLI et al. 1995) con extracto del residuo en n-hexano, por técnica del número más probable (MILLS 1978). Recuento de degradadores de fenantreno en medio sólido según técnica descrita por BOGARDT (1992) y de una mezcla de PAHs por técnica de NMP en microplaca (WRENN y VENOSA 1996).

Determinaciones de actividad biológica: Producción de CO₂, según el método descrito por PRAMER y BARTHA (1965). Actividad hidrolasa mediante la hidrólisis del diacetato de

fluoresceína (FDA) (SCHNÜRER y ROSWALL 1982) y actividad deshidrogenasa medida por reducción del cloruro de trifenil tetrazolium (TTC) (THALMANN 1968).

3. Resultados y discusión

El aumento de las poblaciones bacterianas viables detectadas en distintos medios de cultivo (fig. 1) esta relacionada con el aumento en la producción de CO_2 y actividad deshidrogenasa (fig. 2). Esta relación se cumple sólo durante las primeras etapas del proceso de biorremediación, luego los recuentos se estabilizan y la actividad biológica decrece. No existe correlación con la actividad hidrolasa que se mantuvo siempre en el nivel del suelo sin contaminar.

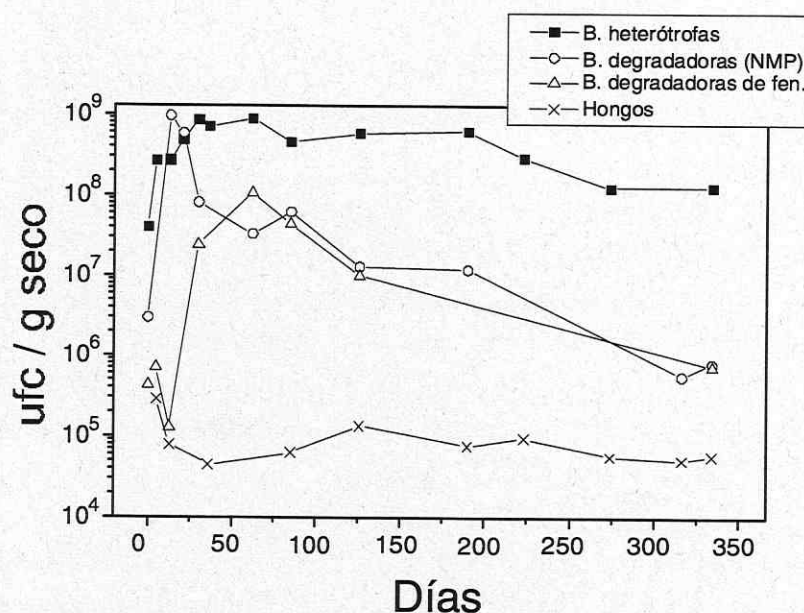


Fig. 1: Desarrollo de las bacterias viables y de los hongos en distintos medios en el tiempo

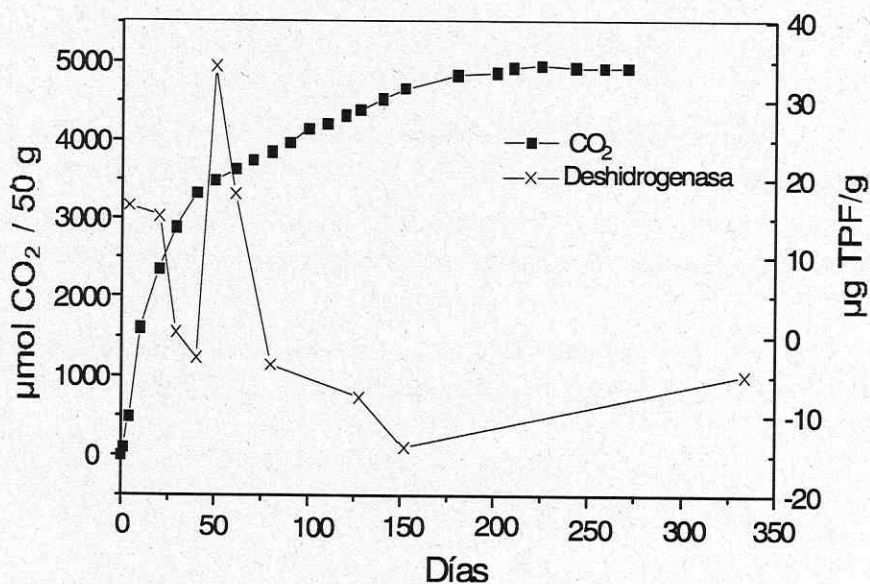


Fig. 2: Actividad de la deshidrogenasa y evolución de CO_2 en el tiempo

Los recuentos bacterianos permiten detectar solamente el efecto temprano de la contaminación (incremento inicial detectado con cualquier medio de cultivo).

A largo plazo los recuentos bacterianos en sistemas contaminados mantienen niveles significativamente superiores a los de suelo sin contaminar, a pesar que no se detecta actividad biológica. Por este motivo los recuentos bacterianos pueden usarse como criterio para establecer existencia de contaminación de suelos con PAHs.

Para el seguimiento del proceso biológico brinda mayor información la determinación de actividad biológica, medida como producción de CO₂ o como actividad deshidrogenasa.

Bibliografía

- DECHEMA, Germany. 1992: Soil decontamination using biological processes. International Symposium.
- MARTIN, J. P. (1950): Use of acid rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci. Plant. Anal.* 7, 31–37.
- MILLS, A. (1978): Enumeration of petroleum degrading marine and estuarine microorganisms by the most-probable-number method. *Can. J. Microbiol.* 24, 552–557.
- MORELLI, I. S., VECCHIOLI, G. I., DEL PANNO, M. T., GARRÉ, M. I., COSTANZA, O. R., PAINCEIRA, M. T. (1995): Assessment of the toxic potential of hydrocarbon containing sludges. *Environ. Pollution* 89, 131–135.
- PRAMER, D., BARTHA, R. (1965): Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soils. *Soil Science* 100, 68–70.
- PRAMER, D., BARTHA, R. (1972): Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environ. Letters* 2, 217–224.
- REASONER, D., GELDREICH, E. (1985): A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 1–7.
- SCHNÜRER, J., ROSSWALL, T. (1982): Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256–1261.
- THALMANN, A. (1968): Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21, 249–258.
- VECCHIOLI, G., DEL PANNO, M. T., PAINCEIRA, M. T. (1990): Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environ. Pollution* 67, 249–258.
- WRENN, B. A., VENOSA, A. D. (1996): Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252–258.

Métodos analíticos para el análisis de mezclas complejas de hidrocarburos

O. R. COSTANZA, G. I. VECCHIOLI, S. A. GIORGIERI, M. T. PAINCEIRA

Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

1. Introducción

El mayor problema en el análisis de hidrocarburos en residuos y suelos contaminados es la presencia simultánea de cientos de compuestos diferentes, tanto alifáticos como aromáticos. Generalmente, es necesaria la preseparación de los constituyentes en clases de estructura similar antes de su identificación. Muchos esquemas de fraccionamiento involucran una combinación de procedimientos de separación, requieren grandes volúmenes de solventes y tiempos de proceso largos que no se ajustan a la rapidez requerida para el análisis de rutina (BUNDT et al. 1991). En este trabajo se describen distintos ensayos en los que se muestra la implementación de técnicas y procedimientos cromatográficos para la caracterización de mezclas complejas de hidrocarburos. Los resultados se comparan con los obtenidos con técnicas más sofisticadas y con técnicas gravimétricas.

2. Materiales y métodos

2.1 Orígenes de mezclas complejas de hidrocarburos

Residuos industriales y tierras contaminadas.

2.2 Procesamiento de muestras

2.2.1 Determinaciones cualitativas

Extracción de residuos: Una porción de la muestra (50 mg), parcialmente deshidratada sobre toallas de papel, se coloca en un frasco con el solvente de extracción (2 ml). La extracción se efectúa por agitación manual a temperatura ambiente (10 minutos). El extracto obtenido se filtra por papel antes de realizar el análisis cromatográfico.

Extracción de tierra: La muestra de suelo contaminado (25 g) se mezcla con Na_2SO_4 anhidro (25 g) y la mezcla se extrae en Soxhlet durante 6 h, usando n-hexano como solvente de extracción. Luego, se efectúa una concentración hasta un volumen de 5 ml. Este concentrado es sometido a cromatografía gaseosa (CG).

La caracterización de los hidrocarburos presentes en las muestras se efectúa por comparación con los tiempos de retención de una mezcla estándar (44 hidrocarburos).

2.2.2 Determinaciones cuantitativas

Gravimétricas: La cuantificación de residuos y tierras contaminadas se efectúa mediante la metodología y técnicas descriptas por DIBBLE y BARTHA (1979).

Cromatográficas:

Extracción de residuos: La forma de extracción es la descrita en la determinación cualitativa, pero agregando estándar interno. Para poder expresar el contenido de hidrocarburos en peso seco de residuo, una porción del residuo parcialmente deshidratado se coloca en un desecador con Cl_2Ca durante 12 h.

Extracción de tierra: La muestra se procesa de la misma forma que la indicada en determinaciones cualitativas, adicionando estándar interno antes de la extracción.

Método cromatográfico: Se utiliza un cromatógrafo Perkin-Elmer autosystem con columna capilar (50 m - 0.25 mm ID) no polar (95% metilo, 5% fenilo) con sistema detector FID carrier gas nitrógeno, programa de temperatura:

$T_1 = 50^\circ\text{C}$	$t_1 = 4 \text{ min}$	$r_1 = 4 \text{ K/min}$
$T_2 = 150^\circ\text{C}$	$t_2 = 0 \text{ min}$	$r_2 = 10 \text{ K/min}$
$T_3 = 300^\circ\text{C}$	$t_3 = 15 \text{ min}$	
$T_{\text{inyector}} = 280^\circ\text{C}$	$T_{\text{detector}} = 300^\circ\text{C}$	

3. Resultados

3.1 Análisis cualitativo de mezclas complejas de hidrocarburos

Se trabaja con dos residuos de distinto origen y composición. Uno de ellos proviene del sistema de tratamiento primario de efluentes petroquímicos (API-2) y tiene un alto contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). El otro tiene su origen en la extracción de crudo de petróleo (RCP) y su composición es mayoritariamente alifática.

Selección del solvente de extracción: Para determinar eficacia cualitativa de extracción se realizan, sobre ambos residuos, extracciones con n-hexano, cloroformo y acetona/benceno (1:1 v/v). Los extractos obtenidos de ambos residuos presentan una composición muy compleja, cualquiera sea el solvente de extracción usado.

Los hidrocarburos presentes en el residuo API-2 fueron más eficientemente extraídos con la mezcla acetona/benceno, tanto por el número de picos obtenidos como por las intensidades de las áreas de hidrocarburos individuales, que con cloroformo y n-hexano. (GIORGIERI et al. 1996). Los resultados de la extracción con acetona/benceno son coincidentes con los 114 picos obtenidos cuando la extracción fue realizada con sonicación y reflujo (REMMLER et al. 1995). En todos los casos los extractos mostraron una composición mayoritaria en HPAs.

En el residuo RCP la extracción fue satisfactoria con cloroformo, sin embargo fue más eficiente con acetona/benceno, teniendo en cuenta la zona de hidrocarburos livianos (BTEX), mientras que con n-hexano no se logró la extracción de los constituyentes del residuo (GIORGIERI et al. 1996). En este caso los extractos mostraron una composición mayoritariamente alifática.

Los resultados obtenidos del análisis de ambos residuos indican que la extracción con acetona/benceno ha sido la más eficiente, a pesar de tratarse de residuos de diferente origen y con una composición en hidrocarburos marcadamente distinta.

3.2 Análisis cuantitativo de mezclas complejas de hidrocarburos

En este ensayo se trabaja con el residuo API-2 y tierra contaminada con 10% (p/p) del mismo residuo. Se determina el contenido de hidrocarburos de ambas muestras por técnicas gravimétricas y cromatográficas. En la determinación cromatográfica se utiliza n-hexadecano como estándar interno. Se determina el grado de recuperación de las técnicas utilizadas por comparación de los resultados con los obtenidos por REMMLER et al. (1995).

Residuo: Los resultados cromatográficos, 91 g/Kg, son coincidentes con los 93 g/Kg obtenidos usando métodos termoanalíticos (Py-GC/MS y TG-MS) en combinación con extracción convencional y fluída supercrítica (REMMLER et al. 1995), teniendo en cuenta la heterogeneidad del residuo. Los valores obtenidos por la técnica gravimétrica, 116 g/Kg, también son similares si se tiene en cuenta que estos valores incluyen la fracción asfáltica que no es posible detectar por CG. Mediante la técnica gravimétrica se determinó como fracción mayoritaria a la aromática (tab. 1), con valores similares a los encontrados por Remmler et al. (62%). También se obtienen resultados comparables al cuantificar doce HPAs seleccionados por ser mayoritarios en los residuos. Las concordancias con los resultados de REMMLER et. al., verifican que las metodologías empleadas fueron capaces de reproducir resultados obtenidos con equipamiento más sofisticado.

Tab. 1: Fraccionamiento en columna de la FEE correspondiente al residuo API-2

Fraccion	g de fracción / 100 g de FEE
Alifáticos	17,7
Aromáticos	55,7
Asfálticos	26,6

Tierra: Se determina el grado de recuperación de la técnica utilizada en la extracción de tierra respecto a los resultados obtenidos en la caracterización del residuo por CG.

Todos los hidrocarburos detectados en el residuo API-2 luego de la extracción con acetona/benceno (excepto xilenos, n-C26 y n-C27) fueron recuperados de la mezcla tierra-residuo luego de la extracción en Soxhlet con n-hexano.

La concentración de hidrocarburos en suelo al que se adicionó 10% de residuo fue de 8 g/kg de sistema seco, resultado concordante con la concentración de 91 g/kg de residuo determinada en éste. La distribución porcentual individual de los compuestos seleccionados detectados en la mezcla tierra-residuo también se correlaciona ($r^2 = 0,9931$) con la encontrada en el residuo (tab. 2). La buena correlación de estos resultados confirma la eficiencia del n-hexano en la recuperación de los constituyentes del residuo del suelo cuando las muestras son extraídas en Soxhlet.

3.3 Seguimiento de la eliminación de hidrocarburos en procesos de biorremediación

En este ensayo se utilizó el mismo sistema preparado en el ensayo anterior (tierra adicionada de residuo API-2 al 10% (p/p)). Se efectuaron determinaciones de hidrocarburos mediante las técnicas gravimétrica y cromatográfica al inicio de la experiencia y luego de 365 días de un proceso de biorremediación.

Los resultados cromatográficos iniciales (día 0) son los mostrados en el ensayo anterior. Los resultados gravimétricos muestran un valor de FEE de 10,4 g/kg de sistema seco.

Tab. 2: Concentración relativa de HPAs seleccionados en el residuo API-2A y en el sistema tierra-residuo

COMPUESTO	RESIDUO (g de HPA/100 g de HPAs seleccionados)	TIERRA-RESIDUO (g de HPA/100 g de HPAs seleccionados)
Naftaleno	35,02	29,71
Metilnaftaleno	16,10	14,90
Bifenilo	4,83	4,85
Acenaftileno	11,25	10,59
Acenafteno	3,63	2,54
Fluoreno	6,75	7,08
Fenantreno	15,46	14,68
Antraceno	4,70	4,92
Fluoranteno	2,35	3,17
Pireno	5,18	5,38
Benzo(a)antraceno	1,52	1,49
Criseno	1,09	0,68

Luego de 365 días los resultados fueron de 0,4 g/kg de sistema seco por la técnica cromatográfica y 5,7 g/kg de sistema seco por la técnica gravimétrica.

Estos resultados indican que las dos metodologías muestran valores de hidrocarburos totales similares para las determinaciones del día cero, ya que si a la FEE le sustraemos el contenido de asfálticos obtenemos un valor de hidrocarburos totales de 6,4 g valor del mismo orden que los 8 g obtenidos por CG. Sin embargo esto no sucede en la determinación realizada a los 365 días, donde la FEE es un orden de magnitud superior al valor obtenido por CG. Esta diferencia puede ser atribuida a compuestos asfálticos y productos de degradación que no son detectados por CG.

La diferencia entre las metodologías utilizadas influyen severamente en la evaluación de la eliminación de hidrocarburos del sistema, ya que por la técnica gravimétrica se determina una eliminación del 45% de la FEE, mientras que por la técnica cromatográfica la eliminación alcanza el 94%. Como consecuencia, la utilización de la técnica gravimétrica conduce a una subestimación en lo que hace a la eficiencia del proceso de biodegradación.

4. Conclusiones

Se ha desarrollado un método simple, rápido y económico, para la caracterización cualitativa y cuantitativa de los hidrocarburos contenidos en residuos de diferentes orígenes y en suelos contaminados. Los resultados muestran que la selectividad y eficiencia de las técnicas aquí empleadas son comparables a los obtenidos en trabajos previos utilizando equipamiento más sofisticado. Usando esta metodología ha sido posible extraer, separar e identificar por CG compuestos alifáticos, monoaromáticos, diaromáticos y poliaromáticos tanto en residuos como en suelos contaminados.

La comparación de los resultados obtenidos por las técnicas cromatográficas con los obtenidos por técnicas gravimétricas, muestran que ésta última es efectiva y comparable con CG en la caracterización de residuos y en la evaluación de suelos recientemente contaminados.

Bibliografía

- BUNDT, J., HERBEL, W., STEINHART, H., FRANKE, S., FRANKE, W. (1991): Structure-type separation of diesel fuels by solid phase extraction and identification of two- and three-ring aromatics by capillary GC-Mass spectrometry. *J. of High Resolution Chromatography* 14, 91-98.
- DIBBLE, J., BARTHA, R. (1979): Effect of environmental parameters on biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 729-739.
- GIOGIERI, S., COSTANZA, O., VECCHIOLI, G., DELLA VEDOVA, C., PAINCEIRA, M. T. 1996: Seguimiento cromatográfico de hidrocarburos durante la biorremediación de suelos. VI Congreso Latinoamericano de Cromatografía, Enero 23 -25, Caracas, Venezuela.
- GIOGIERI, S., COSTANZA, O., VECCHIOLI, G., DELLA VEDOVA, C., PAINCEIRA, M. T., REMMLER, M. 1996: Análisis cromatográfico de residuo de piletas de extracción de crudo de petróleo y de tierra contaminada con dicho residuo. VI Congreso Latinoamericano de Cromatografía, Enero 23 -25, Caracas, Venezuela.
- REMMLER, M., KOPINKE, F. D., STOTTMEISTER, U. (1995): Termoanalytical methods for characterizing hydrocarbon - sludge - soil mixtures. *Termochimica Acta* 263, 101-112.

Caracterización de la toxicidad de mezclas complejas de hidrocarburos

I. S. Morelli¹, G. I. Vecchioli¹, O. R. Costanza¹, M. T. Del Panno¹, M. I. Garré¹, L. Berthe-Corti², M. T. Paineira¹

¹Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

²Universität Oldenburg, FB Biologie, AG Mikrobiologie/Biotechnologie, Postf. 2503, 26111 Oldenburg, Alemania

1. Introducción

La determinación de la toxicidad de una mezcla compleja de hidrocarburos se debe basar en el conocimiento de los procesos que llevaron a su producción y en la caracterización biológica y química de la misma (BROWN et al. 1983).

No existe una especie biológica o ensayo que pueda indicar los efectos tóxicos de todos los compuestos químicos o mezclas, por lo tanto se debe utilizar una batería de bioensayos. Muchos aspectos de la toxicidad de mezclas han sido evaluados usando test bacterianos, debido a que su aplicación resulta práctica (ya que los microorganismos tienen un ciclo de vida corto, son estables y fáciles de mantener); y por otra parte la actividad bacteriana es esencial en los procesos de biodegradación.

En este trabajo se presenta una batería de ensayos cortos que permitiría evaluar distintos aspectos de la toxicidad de dichas mezclas.

2. Materiales y métodos

2.1 Residuos

Se estudiaron 4 residuos con hidrocarburos (API-1, API-2, API-2N y RBT) de distintos orígenes. Los residuos API-1 y API-2 fueron tomados de piletas de almacenamiento en cambio los residuos API-2N y RBT no habían sufrido almacenamiento.

a) Se determinó el potencial tóxico sobre la flora del suelo con el test de inhibición de la flora bacteriana del suelo cultivable en Plate Count Agar (Difco) (USEPA 1986), el test de inhibición de la germinación y elongación de raíces de *L. sativa* (KWAN 1991).

b) Se caracterizó la toxicidad con el test de inhibición del crecimiento de *B. cereus* en medio sólido (LIU et al. 1989), el test de inhibición de la reducción de la resazurina (THOMSOM et al. 1986), y el test de toxicidad por metales pesados MetPlate™ (Group 206 Technologies, Gainesville, Fl.).

c) Se determinó la genotoxicidad con el test de mutagenicidad de Ames (MARON y AMES 1983). Se utilizó la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* con o sin el agregado de la fracción microsomal S9 obtenida a partir del hígado de hamster previamente inducido con 20-metilcolantreno (PHILLIPSON y IOANNIDES 1989). Los residuos fueron sometidos a una extracción con ciclohexano y luego fueron redissueltos en DMSO (BLACKBURN et al. 1986).

2.2 Fracción extractable en éter (FEE) de los residuos

Se determinó la inhibición del crecimiento de *B.cereus* en medio sólido, la inhibición del crecimiento en medio líquido (MORELLI et al. 1995), la inhibición de la reducción de la resazurina, y la genotoxicidad en el test de Ames.

2.3 Tierra contaminada con residuo API-2

Se agregaron 2,50 g de residuo por cada 100 g de tierra seca. Se mantuvo el sistema a 21°C, regado y aireado periódicamente. Se determinó toxicidad luego de 0, 45, 90, 180 y 373 días. Para la determinación de toxicidad se realizaron dos extracciones (acuosa y orgánica) de cada sistema (MARK et al. 1987).

a) Fracción acuosa: test de inhibición de la germinación y elongación de raíces, test de toxicidad por metales pesados MetPlate™.

b) Fracción acetónitrilo: test de inhibición del crecimiento de *B.cereus* en medio sólido, test de inhibición del crecimiento en medio líquido, test de inhibición de la reducción de la resazurina, test de mutagenicidad de Ames.

3. Resultados

3.1 Residuos

Con la batería propuesta se pudo demostrar que los residuos no son tóxicos para las bacterias: No se observó efecto tóxico sobre la flora bacteriana del suelo (fig. 1a), en ningún caso se observó halo de inhibición del crecimiento de *B. cereus* en medio sólido ni inhibición de la reducción de la resazurina. La única evidencia de toxicidad sobre bacterias se observó con el test de toxicidad por metales pesados MetPlate™ en el cual el residuo API-2 mostró toxicidad cuando se ensayó puro y diluído 1:2.

Por el contrario, todos los residuos demostraron tener un fuerte efecto inhibitorio sobre la germinación de semillas de *L. sativa* (fig. 1b) y la elongación de las raíces.

El residuo API-2 demostró efecto mutagénico directo e indirecto (con activación metabólica S9) sobre la cepa *S. typhimurium* TA 98, los residuos API-2N y RBT no mostraron evidencias de mutagenicidad (fig. 1c y d). El residuo API-1 resultó incompatible con el sistema de extracción.

3.2 Fracción extractable en éter (FEE) de los residuos

Las fracciones extractables en éter de estos residuos demostraron toxicidad sobre bacterias. Todos los residuos (FEE) mostraron inhibir la reducción de la resazurina (fig. 2a). Sin embargo se encontró que la FEE de API-2N y RBT tiene mayor efecto inhibitorio que la FEE de los residuos almacenados.

Se demostró que el ensayo de inhibición del crecimiento de *B. cereus* en medio sólido descrito por LIU et al. (1989) es incompatible con este tipo de muestras e incluso con soluciones saturadas de naftaleno y benzo(a)pireno. Sin embargo, utilizando un cultivo de *B.*

cereus en fase exponencial temprana, se logró poner en evidencia la toxicidad del naftaleno y de la FEE del residuo API-2 rediseñando el ensayo en medio líquido (fig. 2b).

Sólo se observó efecto mutagénico indirecto de la FEE de los residuos API-1 y API-2 (fig. 2b y c).

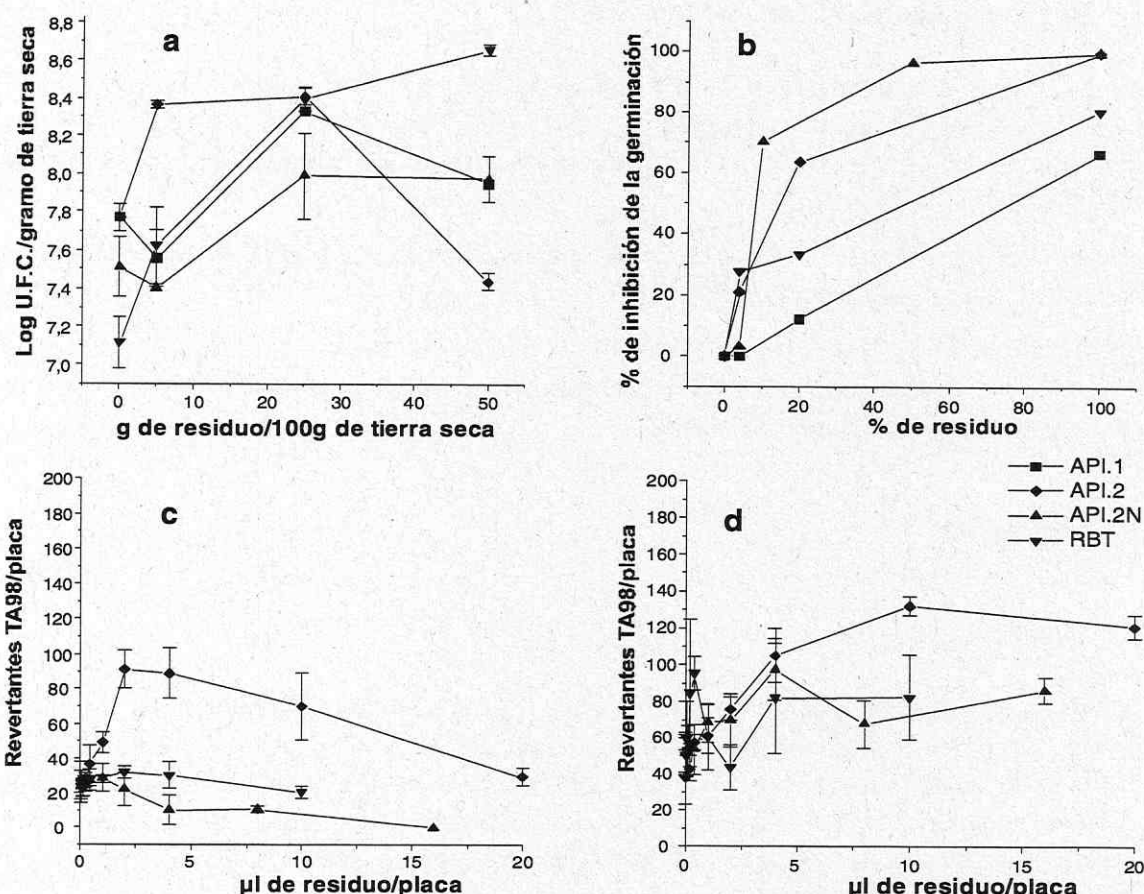


Fig. 1: Caracterización de la toxicidad de los residuos:
 a) Test de inhibición de la flora bacteriana del suelo cultivable en Plate Count Agar.
 b) Test de inhibición de la germinación de semillas de *L. Sativa*.
 c) Test de mutagenicidad de Ames, *S. typhimurium* TA98.
 d) Test de mutagenicidad de Ames, *S. typhimurium* TA98 en presencia de activación microsomal S9

3.3 Tierras contaminadas

El extracto acuoso no demostró efecto tóxico con el test MetPlate™. En cambio se observó inhibición de la germinación de las semillas de *L. sativa* el día 0. A los 45 días el efecto inhibitorio es mayor y se mantiene constante hasta los 180 días. Al año de tratamiento alcanza los niveles de la tierra limpia (fig. 3a). No se observan cambios apreciables del efecto inhibitorio sobre la elongación de las raíces.

El extracto acetónitrilo no demostró inhibir el crecimiento de *B. cereus* (fig. 3b), tampoco se observó efecto inhibitorio sobre la reducción de la resazurina.

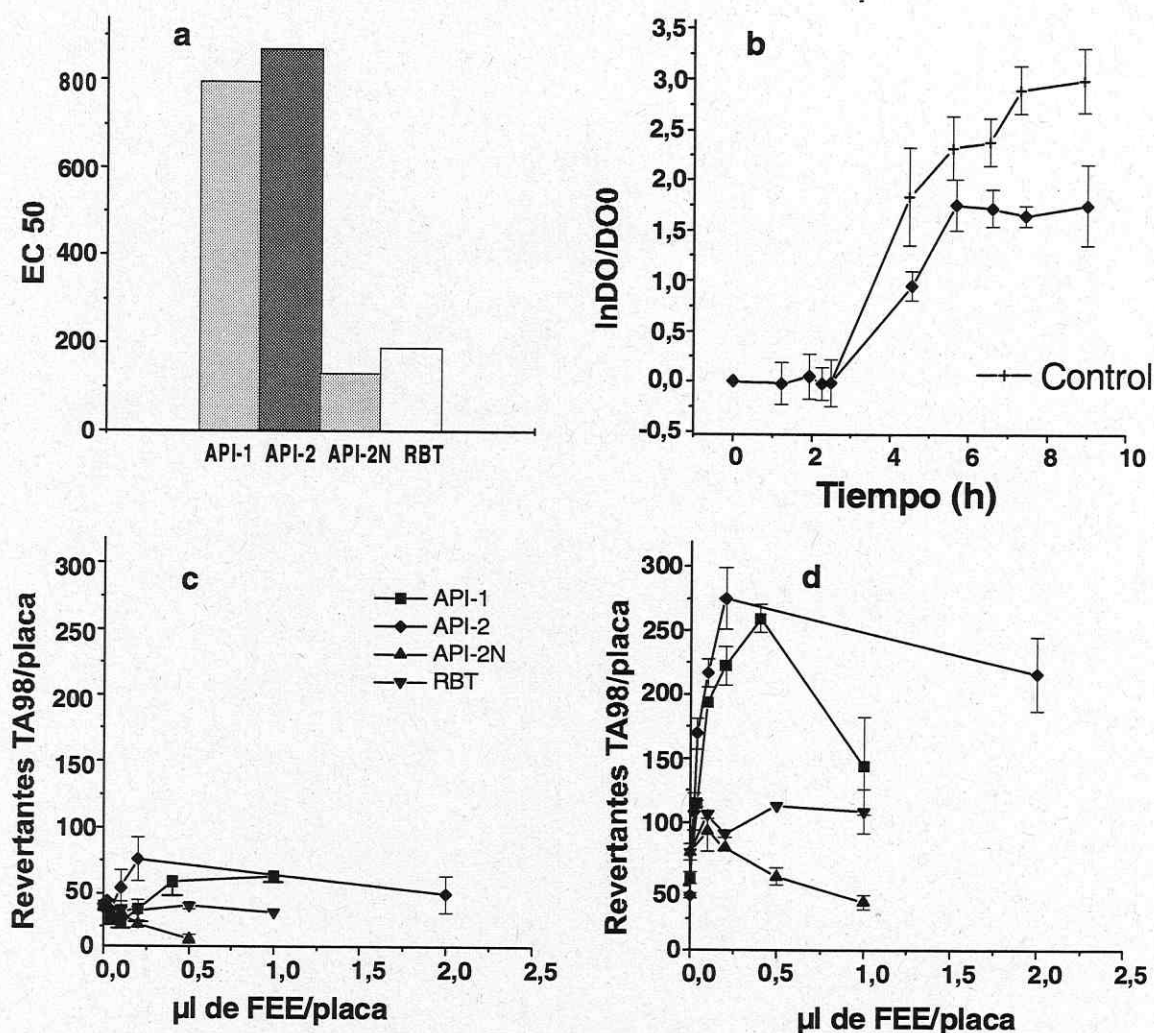


Fig. 2: Caracterización de la toxicidad de la FEE de los residuos:
 a) Test de inhibición de la reducción de la resazurina.
 b) Test de inhibición del crecimiento de *B. cereus* en medio líquido.
 c) Test de mutagenicidad de Ames. *S. typhimurium* TA98.
 d) Test de mutagenicidad de Ames. *S. typhimurium* TA98 en presencia de activación microsomal S9

Se observó efecto mutagénico directo e indirecto. El efecto directo disminuyó, pero en un año no alcanzó los valores de la tierra testigo se mantuvo o aumentó y nunca se logró alcanzar los valores de la tierra testigo (fig. 3c). El indirecto aumenta luego de la contaminación (fig. 3d).

4. Conclusiones

Fue necesario modificar algunos ensayos para que fueran compatibles con los sistemas estudiados. Ninguno de los residuos mostró toxicidad sobre bacterias, indicando que los mismos podrían ser tratables métodos biológicos. En cambio todos inhibieron la germinación de las semillas y algunos mostraron ser mutagénicos. La FEE de todos los residuos mostró toxicidad sobre bacterias.

La batería de ensayos permitió caracterizar la toxicidad de tierras contaminadas y monitorear los cambios de toxicidad en el tiempo.

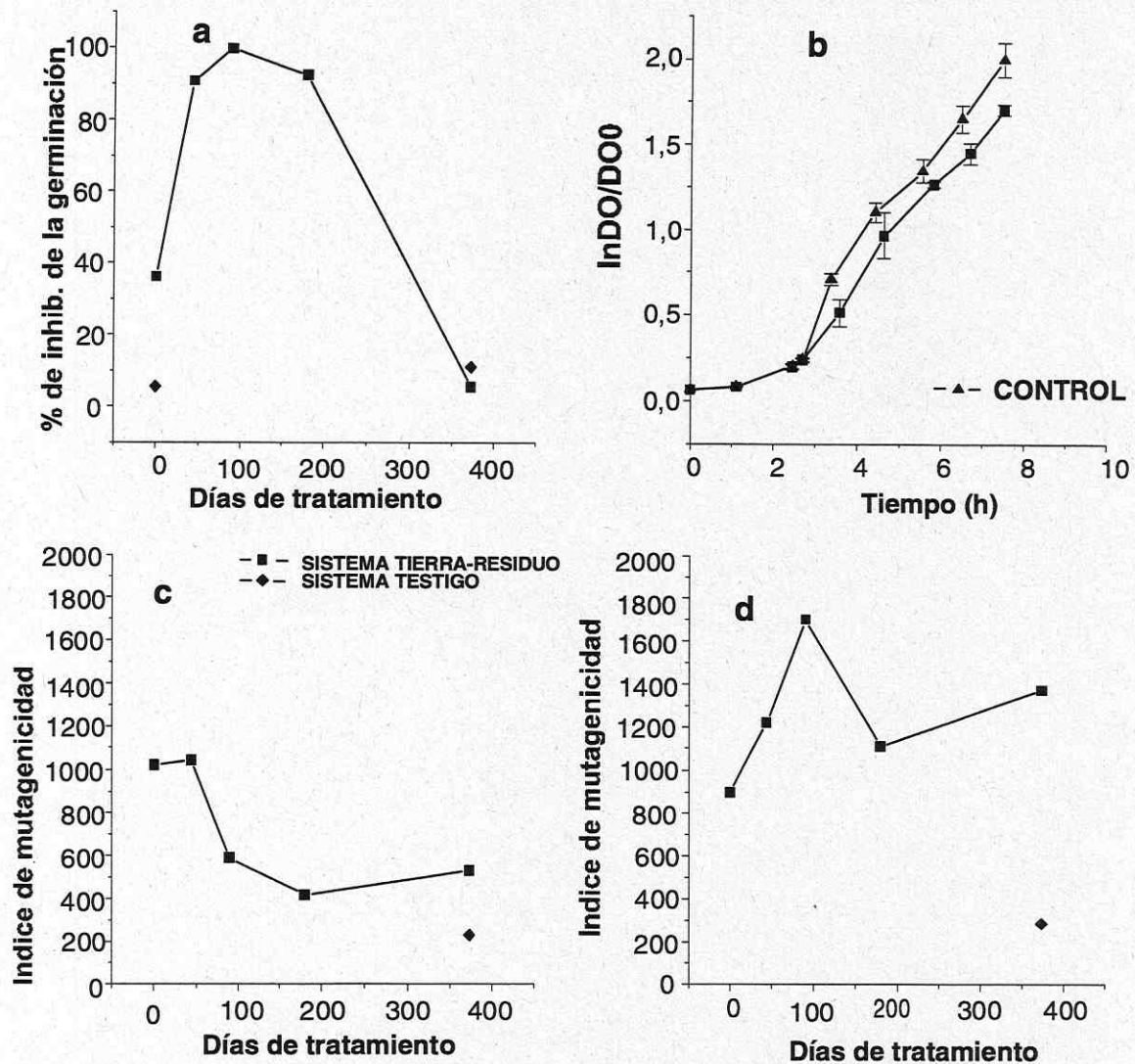


Fig. 3: Caracterización de la toxicidad de tierra contaminada con residuo API-2. Monitoreo de los cambios en el tiempo:

- a) Test de inhibición de la germinación de semillas de *L. Sativa*.
- b) Test de inhibición del crecimiento de *B. cereus* en medio líquido.
- c) Test de mutagenicidad de Ames *S. typhimurium* TA98.
- d) Test de mutagenicidad de Ames *S. typhimurium* TA98 en presencia de activación microsomal S9

Bibliografía

BLACKBURN, G. R., Deutch, R. A., Schreiner, C. A., Mackerer, C. R. (1986): Predicting carcinogenicity of petroleum distillation fractions using a modified *Salmonella* mutagenicity Assay. Cell. Biol. Toxicol. 2, 63-84.

BROWN, K. W. and Associates, Inc. 1983: Hazardous waste land treatment. Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Washington, USA.

- KWAN, K. K. 1991: Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. Workshop.
- LIU, D. L., CHAU, Y. K., DUTKA, B. J. (1989): Rapid toxicity assessment of water soluble and water insoluble chemical using a modified agar plate method. *Wat. Res.* 23, 333-339.
- MARK, G., KUIZE, B., TAKEMOTO, E., PAT, K., LAMES, S. (1987): The characterization of the mutagenic activity of soil. *Mutation Res.* 192, 23-30.
- MARON, D. M., AMES, B. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.* 113, 173-215.
- MORELLI, I. S., GARRÉ, M. I., GARROTE, G., LOPEZ GARCÍA, S., PRADO, A., VECCHIOLI, G. I., PAINCEIRA, M. T. 1995: Estudio comparativo de bioensayos microbiológicos para determinar toxicidad de compuestos químicos insolubles en agua. C 14 en Actas del VII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires. 8 al 11 de mayo de 1995.
- PHILLIPSON, C. E., IOANNIDES, C. (1989): Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutagens in the Ames test by various animal specie including man. *Mutation Res.* 211, 147-151.
- THOMSOM, K., LIU, D., KAISER, K. L. E. (1986): A direct resazurin test for measuring chemical toxicity. *Toxicity Assessment, An Internat. Quart.* 1, 407-418.
- USEPA, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory. 1986: Office of research and development. U.S. Enviromental Protection Agency. Waste/Soil treatability studies for four complex industrial waste: Methodologies and results.

Ecología microbiana de ambientes contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos

M. T. DEL PANNO, O. R. COSTANZA, I. S. MORELLI, M. GARRÉ, G. I. VECCHIOLI, M.T. PAINCEIRA

Laboratorio de Biodegradación Microbiológica de Hidrocarburos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

1. Introducción

El conocimiento de los aspectos cualitativos y cuantitativos de la microbiología de un ecosistema proporciona una información valiosa respecto al potencial de ese ecosistema en el ciclo biogeoquímico. Las condiciones ambientales de un ecosistema determina la composición cuali-cuantitativa de su población bacteriana. Cualquier cambio que involucre procesos degradativos como los provocados por la contaminación con hidrocarburos producirá cambios en la biocenosis bacteriana autóctona. (VESTAL et al. 1984)

En el presente trabajo se estudia la población bacteriana predominante en dos ambientes altamente contaminados con hidrocarburos, residuos petroquímicos almacenados en piletas y suelos contaminados con dichos residuos. Además se evalúan los cambios producidos sobre la biocenosis bacteriana del suelo limpio como consecuencia de la contaminación con residuos petroquímicos.

2. Materiales y métodos

Residuo: Son barros residuales del sistema primario de tratamiento de efluentes de industrias petroquímicas, contaminados con hidrocarburos (91 g/Kg) mayoritariamente aromáticos (VECCHIOLI et al. 1997). Su composición es comparable a la de la creosota, sustancia utilizada para inhibir el desarrollo de microorganismos en la madera (RITTER y SCARBOROUGH 1995)

Suelo: Las muestras corresponden al horizonte A de un suelo franco-limoso. Composición: carbono orgánico: 2,9%; materia orgánica: 5%; Nitrógeno total: 0,27% y fósforo disponible: 0,0034%; pH: 5,5 – 5,7.

Suelos contaminados: Muestras de suelo se contaminan con concentraciones crecientes de residuo: 2,5%, 5% y 10% p/p, equivalente a 1405 ppm, 2196 ppm y 7290 ppm de hidrocarburos cromatografiables.

Monitoreo de suelo: Mediante el recuento de bacterias heterótrofas, el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y la actividad biológica mediante la actividad deshidrogenasa con Cloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC). Los sistemas son incubados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y la humedad es mantenida en 20%.

Métodos de recuento: Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A agar y NMP de bacterias degradadoras de la fracción hidrocarburo del residuo. Técnicas descriptas en "Biorremediación de suelos contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos".

Aislamiento y caracterización de cepas: A partir de los recuentos de bacterias heterótrofas de los residuos, de suelo limpio y suelo contaminado son repicadas entre 20 y 30 colonias de una misma dilución en R3A-Agar. A partir de los tubos positivos, correspondientes a las mayores

diluciones del NMP, son aisladas las cepas degradadoras de hidrocarburos de suelo limpio y suelos contaminados.

Las cepas aisladas del residuo son caracterizadas por la coloración de Gram, capacidad de desarrollo sobre agar cetrimide, capacidad de desarrollo con la fracción de hidrocarburos del residuo, utilización de fenantreno y de n-hexadecano como única fuente de energía y producción de surfactantes (ZAJIC y MAHOMEDY 1984).

Las cepas predominantes de los sistemas de suelos contaminados se aíslan a los 35 días de la incorporación del residuo (período de máximo recuento de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos y próximo al de mayor actividad biológica) y al año de la contaminación. Dichas cepas se clasifican por la coloración de Gram, movilidad, morfología bacteriana, pigmentación de la colonia, utilización oxidativa-fermentativa de la glucosa, actividad catalasa y oxidasa.

Las cepas Gram negativas y no fermentadoras de glucosa se analizan mediante el sistema de identificación de API-20 NE de bioMerieux y las restantes se clasifican en tipos fisiológicos y luego a nivel familia o género mediante manuales de identificación (TAKATA et al. 1992).

Análisis de los datos: Los perfiles de pruebas bioquímicas y utilización de sustratos de las cepas Gram negativas no fermentadoras de glucosa son analizados comparativamente con los perfiles de las cepas de referencia del sistema API-20 NE mediante técnicas de agrupamiento del tipo jerárquico (ligamiento promedio -UPGMA-). En base a los dendogramas resultantes se clasifican las cepas a nivel de género con un porcentaje de similitud entre el 61 y 100% con las cepas de referencia.

Se realiza un análisis comparativo de los perfiles correspondientes al conjunto de cepas predominantes aisladas del suelo limpio y de los contaminados a los 35 días y al año mediante el análisis de los componentes principales, PCA.

3. Resultados y Discusión

Residuos: Los residuos presentan niveles de microorganismos heterótrofos de $1,8 \cdot 10^8$ ufc/g y un NMP de microorganismos degradadores de hidrocarburos de $3,3 \cdot 10^8$.

Las cepas aisladas son en su mayoría bacilos Gram negativos, capaces de desarrollar con los hidrocarburos del residuo, un 84% crece en agar cetrimide, un 45% produce surfactantes, un 30% crece con fenantreno (uno de los hidrocarburos mayoritarios del residuo) y no se detectan cultivos capaces de desarrollar con n-hexadecano (ausente en los residuos). La población de bacterias viables detectada podría considerarse exógena sin embargo las propiedades bioquímicas observadas podrían ser consideradas un indicio de que se ha producido una selección de los microorganismos provocada por las condiciones extremas que presentan los residuos.

Suelo: El contenido de bacterias heterótrofas es de $5 \cdot 10^7$ ufc/g de tierra seca y el NMP de bacterias degradadoras de $1 \cdot 10^6$ cél./g de tierra seca.

La composición taxonómica de la comunidad bacteriana muestra un predominio del grupo *Coryneforms* (35%), seguido por el género *Pseudomonas* (20%) y *Acinetobacter* (11%). La relación de cepas Gram positivas / Gram negativas es de 57% : 43%.

Suelos contaminados: Las tablas 1 y 2 presentan las características de los sistemas en el momento de la selección de las cepas predominantes.

Todas las concentraciones de residuo incorporado al suelo producen un aumento en la población heterótrofa y en la población degradadora de hidrocarburos, con un máximo a los 35 días. Este comportamiento puede ser atribuido a la variedad de hidrocarburos fácilmente metabolizables en las tierras contaminadas recientemente (35 días) que son degradados por la población bacteriana en el transcurso del año.

El suelo contaminado con 10% de residuo muestra un significativo cambio en la relación de Gram positivos / Gram negativos : 33% / 67% a los 35 días de la contaminación. Al finalizar la experiencia dicha relación se restablece.

Tab. 1: Características de los sistemas tierra-residuo a los 35 días de la contaminación

Residuo en tierra (%)	Hidrocarburos cromatografiables (mg/Kg)	B. heterótrofas (ufc/g · s)	B.degradadoras (NMP/g · s)	Actividad deshidrogenasa (μg/TPF · g · s)
2,5	1405	$7,5 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	20
5,0	2196	$7,0 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^7$	19,5
10,0	7290	$8,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$	13,5
Suelo limpio	32	$5,0 \cdot 10^7$	$1,11 \cdot 10^6$	20

Tab. 2: Características de los sistemas tierra-residuo al año de la contaminación

Residuo en tierra (%)	Hidrocarburos cromatografiables (mg/Kg)	B. heterótrofas (ufc/g · s)	B.degradadoras (NMP/g · s)	Actividad deshidrogenasa (μg/TPF · g · s)
2,5	292	$1,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^6$	19
5,0	239	$1,5 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	28
10,0	487	$4,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^6$	65

La tabla 3 presenta los géneros predominantes obtenidos a los 35 días y al año de la contaminación. A los 35 días se observa que el aumento en la concentración de residuo produce un incremento en el género *Pseudomonas*. Asimismo, el sistema con menor concentración de residuo presenta la mayor diversidad de géneros. A los 360 días predomina el género *Bacillus*, en los sistemas con 5% y 10% de residuo. El género *Pseudomonas* disminuye en todos los sistemas al año de la contaminación..

Los valores de actividad deshidrogenasa de las tierras contaminadas a los 35 días no refleja el notable aumento en la población heterótrofa y degradadora. Sin embargo dicha actividad alcanza valores máximos 10 días después de alcanzarse el máximo de recuentos bacterianos.

Tab. 3: Géneros predominantes aislados de los sistemas contaminados

Suelo limpio	35 días		360 días		
	5%	10%	2,5%	5%	10%
<i>Coryneforms</i> (35%)	<i>Coryneforms</i> (50%)	<i>Coryneforms</i> (15%)	<i>Coryneforms</i> (40%)	<i>Bacillus</i> (40%)	<i>Bacillus</i> (60%)
<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> (30%)	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> (40%)	<i>Pseudomonas</i> (60%)	<i>Agrobacterium</i> <i>Alcaligenes</i> (30%)	<i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i> (24%)	<i>Pseudomonas</i> <i>Agrobacterium</i> <i>Xantomonas</i> (32%)

Las subpoblaciones bacterianas Gram negativas no fermentadoras, predominantes en los sistemas, son analizadas comparativamente mediante PCA. En un primer análisis se incluyen las cepas predominantes de los sistemas contaminados a los 35 días más las del suelo limpio. La representación en tres dimensiones corresponde a los tres primeros componentes principales. La figura 1 indica que los perfiles de las cepas predominantes recuperadas de los sistemas contaminados serían semejantes a los de suelo limpio. Este comportamiento puede asociarse a la selección del género *Pseudomonas* en forma proporcional con el aumento del contaminante (tab. 3).

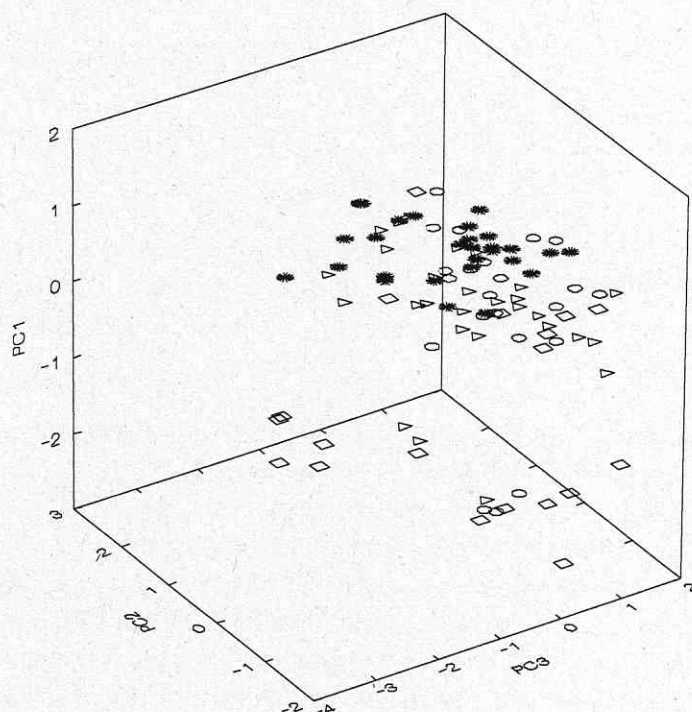


Fig. 1: Distribución de la población bacteriana Gram negativa predominante en suelos contaminados y suelo limpio. Tiempo de contaminación: 35 días. Símbolos: * = Suelo limpio, □ = Suelo con 2,5% de residuo, O = Suelo con 5% de residuo y, Δ = Suelo con 10% de residuo

Solamente en el sistema contaminado al 2,5% se observa un conjunto de cepas que se separa del grupo mayoritario sobre el PC 1. La baja concentración de hidrocarburos no sería suficiente para seleccionar predominantemente *Pseudomonas*. No obstante produce un

importante aumento en la población heterótrofa y degradadora y una mayor diversidad de géneros que se manifiesta en los diferentes perfiles, posiblemente a expensas de compuestos distintos de hidrocarburos.

En un segundo análisis se incluyen las cepas Gram negativas predominantes de los sistemas contaminados al año y las cepas de suelo limpio (fig. 2). En este momento todos los sistemas han disminuído sus niveles de población heterótrofa y degradadora, así también el predominio de *Pseudomonas* y aparece una mayor diversidad de géneros degradadores de hidrocarburos.

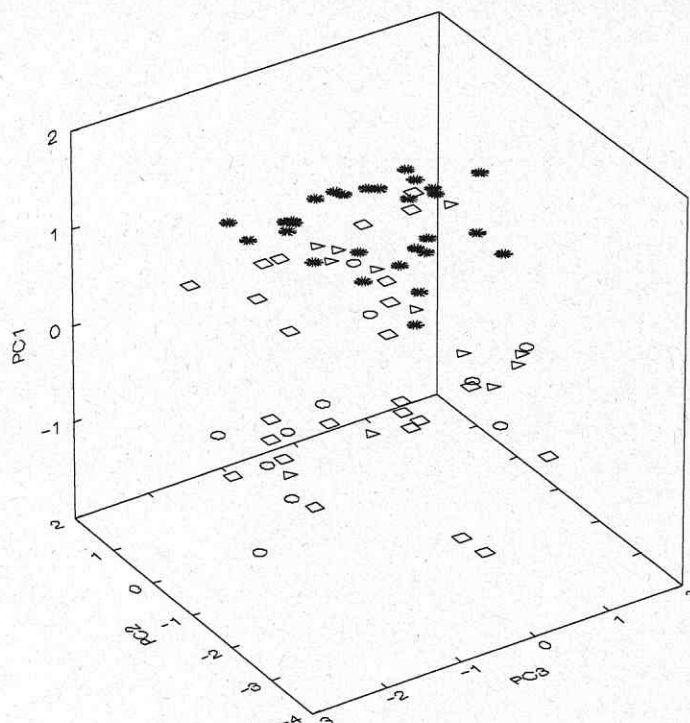


Fig. 2: Distribución de la población bacteriana Gram negativa predominante en suelos contaminados y suelo limpio. Tiempo de contaminación: 1 año. Símbolos: * = Suelo limpio, □ = Suelo con 2,5% de residuo, O = Suelo con 5% de residuo y, Δ = Suelo con 10% de residuo

El PCA de la figura 2 indica que un grupo de cepas del suelo contaminado al 5% forman un conjunto claramente separado del suelo limpio, sobre el PC1 y que el sistema al 2,5% mantienen una distribución de cepas semejante a la observada a los 35 días de la contaminación. Dichos sistemas dan valores de actividad deshidrogenasa semejantes a suelo limpio. En el sistema con 10% de residuo aún se detectan cepas con perfiles próximos a los de suelo limpio y valores altos de actividad deshidrogenasa. Esta tierra contaminada tuvo los mayores valores de actividad desde los 45 días hasta el año de la contaminación. Sin embargo manifestó un importante descenso en la población degradadora de hidrocarburos. Debe tenerse en cuenta que las cepas estudiadas representan sólo una fracción del total de los microorganismos del suelo: bacterias viables cultivables.

El comportamiento observado al año de la contaminación podría asociarse a la disminución de sustratos fácilmente metabolizables y a la aparición de productos del metabolismo de la población bacteriana temprana. A partir de ellos se seleccionaría una población bacteriana tardía con propiedades metabólicas aptas para la degradación de estos productos.

Cabe aclarar que los bajos porcentajes de variación aportado por los tres primeros PC, 44% en la figura 1 y 52% en la figura 2 no son adecuados para lograr una interpretación más clara del

comportamiento de las cepas. Sin embargo son suficientes para observar la selección de poblaciones bacterianas con perfiles muy diferentes a partir del suelo limpio por la incorporación del residuo petroquímico. La selección es más evidente luego de un año de la contaminación, cuando predominan en el sistema hidrocarburos difícilmente degradables.

Bibliografía

- RITTER, W., SCARBOROUGH, R. (1995): A review of bioremediation of contaminated soil and groundwater. *J. Environ. Sci. Health*, A30, 2, 333-357.
- TAKATA, S., OGO, A., OISHI, O., TOKUNAGA, T. (1992): Correlations between heterotrophic bacterial populations and water quality variables in stream waters. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 38, 28-37.
- VECCHIOLI, G. I., COSTANZA, O., GIORGIERI, S., REMMLER, M. (1997): Extent of cleaning achievable by bioremediation of soil contaminated with petrochemical sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 70, 331-336.
- VESTAL, J. R., COONEY, J. J., CROW, S., BERGER, J. 1984: The effects of hydrocarbons on microorganisms. *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas (Ed.), Macmillan Publ. Comp., New York, 475-505.
- ZAJIC, J., MAHOMEDY, A. 1984: Biosynthesis of surface active agents. *Petroleum Microbiology*, R. M. Atlas (Ed.), Macmillan Publ. Comp., New York, 221-297.

Bioremediation of polluted areas

Tagungsbericht und wissenschaftliche Beiträge des Deutsch-Argentinischen Workshops
La Plata, Argentinien, am 6. und 7. November 1997

Dr. Luise Berthe-Corti (Hrsg.)
Fachbereich 7
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Postfach 2503
D-26111 Oldenburg

in Zusammenarbeit mit:
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig

Redaktion:
Dr. Luise Berthe-Corti

Übersetzung:
Dr. Luise Berthe-Corti
Mirna Larraguibel

