

UFZ-Bericht

UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
Zentralbibliothek
Permoserstraße 15
04018 Leipzig

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

orschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 24/1996

Dissertation

**Geschwindigkeitslimitierende
Einflußgrößen beim mikrobiellen
Schadstoffabbau
in phenolischen Deponiewässern**

Frank Eismann

ISSN 0948-9452

Geschwindigkeitslimitierende Einflußgrößen beim mikrobiellen Schadstoffabbau in phenolischen Deponiewässern

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Frank Eismann

Vom Fachbereich Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und
Werkstoffwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Stottmeister
Prof. Dr.-Ing. Udo Wiesmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Juli 1996

Berlin 1996

D 83

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	7
1. EINLEITUNG	9
2. KENNTNISSTAND ZUR GESCHWINDIGKEITSLIMITATION MIKROBIELLER ABBAUPROZESSE	12
2.1. Biochemie des aeroben Aromatenabbaus	12
2.2. Biochemie des anaeroben Aromatenabbaus	14
2.3. Geschwindigkeitslimitierende Einflüsse beim mikrobiellen Abbau von Schadstoffen	18
2.3.1. Die Konzentration inhibierender Verbindungen	18
2.3.1.1. Allgemeines	18
2.3.1.2. Monomere phenolische Verbindungen	24
2.3.1.3. Autoxidationsprodukte phenolischer Verbindungen	25
2.3.2. Temperatur	27
2.3.2.1. Temperatureinfluß auf biochemische Reaktionen	27
2.3.2.2. Die metabolische Geschwindigkeitskompensation als Mechanismus zur Adaptation an die Umgebungstemperatur	29
2.3.2.3. Temperatureinfluß auf die inhibitorische Wirkung toxischer Substanzen	33
2.4. Ableitung der Zielstellung	34

3. MATERIAL UND METHODEN	38
3.1. Präparation und Molekülgrößenfraktionierung von phenolischen Autoxidationsprodukten	38
3.1.1. Präparation	38
3.1.2. Fraktionierung phenolischer Autoxidationsprodukte mittels Ultrafiltration und Dialyse	38
3.2. Gewinnung von Anreicherungskulturen	39
3.2.1. Gewinnung von phenol- und acetatabbauenden Kulturen unter methanogenen Bedingungen	39
3.2.1.1. Inoculum	39
3.2.1.2. Nährmedium	40
3.2.1.3. Kultivierungsbedingungen	40
3.2.2. Gewinnung von Kulturen zum Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte	41
3.2.2.1. Inoculum	41
3.2.2.2. Nährmedium	42
3.2.2.3. Kultivierungsbedingungen	42
3.2.3. Gewinnung von Kulturen zur anaeroben Behandlung von Schwelvollertwasser	43
3.2.3.1. Inoculum	43
3.2.3.2. Nährmedium	43
3.2.3.3. Kultivierungsbedingungen	44
3.2.4. Gewinnung von Kulturen für Untersuchungen zum Zusammenwirken hoher Konzentrationen toxischer Verbindungen und niedriger Temperaturen	44
3.2.4.1. Inocula	44
3.2.4.2. Nährmedien	44

3.2.4.3. Kultivierungsbedingungen	45
3.3. Beschreibung der experimentellen Arbeiten	45
3.3.1. Untersuchungen zur inhibierenden Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte gegenüber dem Phenol- und Acetatabbau unter methanogenen Bedingungen	45
3.3.2. Experimente zum Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte	47
3.3.3. Untersuchung zur anaeroben Behandlung von Wasserproben der Schwelwasserdeponie Schwelvollert	48
3.3.3.1. Bestimmung biologischer Aktivitäten in Wasser- und Sedimentproben des Schwelvollertsees	48
3.3.3.2. Biologisch anaerobe Behandlung von Schwelvollertwasser unter Zugabe verschiedener Elektronenakzeptoren	49
3.3.3.3. Methanogene Fermentierbarkeit und Toxizität von Schwelvollerttiefenwasser nach physiko-chemischer Vorbehandlung	49
3.3.4. Untersuchungen zum Zusammenwirken hoher Konzentrationen toxischer Verbindungen und niedriger Temperaturen (Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen) beim mikrobiellen Phenolabbau	51
3.3.4.1. Phenolabbaukinetik bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Temperaturen	51
3.3.4.2. Beeinflussung der Phenolabbaukinetik durch Nickel bei verschiedenen Temperaturen	52
3.4. Analytische Methoden	53
3.4.1. Methoden der Biomassebestimmung	53
3.4.1.1. Trübungsmessung	53
3.4.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.4.1.3. Bestimmung der Biologischen Trockensubstanz	54
3.4.2. Aufnahme von UV-/VIS-Spektren	54
3.4.3. Bestimmung der Farbintensität phenolischer Autoxidationsprodukte	55

3.4.4. Kolorimetrische Bestimmung von Phenol	55
3.4.5. Bestimmung des DOC und des DIC	56
3.4.6. Bestimmung des Biogasvolumens	56
3.4.7. Gaschromatographische Bestimmung des Methananteils im Biogas	57
3.4.8. HPLC-Analyse von Phenol, Kresolen und Xylenolen im Schwefvollertwasser	57
3.4.9. HPLC-Analyse von Phenol in phenolischen Autoxidationslösungen	58
3.4.10. Bestimmung der Nitrat- und Sulfationen mittels Ionenchromatographie	59
3.4.11. Bestimmung von Acetat in phenolischen Autoxidationslösungen	59
4. ERGEBNISSE	60
4.1. Das inhibitorische Potential phenolischer Autoxidationsprodukte auf den Acetat- und Phenolabbau unter methanogenen Bedingungen	60
4.1.1. Autoxidation phenolischer Verbindungen	60
4.1.2. Wiederfindung der Referenzsubstrate Acetat und Phenol in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte	64
4.1.3. Inhibierung des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch phenolische Autoxidationsprodukte aus singulären Ausgangsstoffen	69
4.1.4. Inhibierung des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch Autoxidationsprodukte eines äquimolaren Brenzkatechin-/Resorcin-Gemisches	77
4.1.5. Reversibilität der Inhibierung	80
4.1.6. Die Rolle der Molekülgröße für das inhibitorische Potential phenolischer Autoxidationsprodukte	82
4.1.7. Inhibierung einzelner Stoffwechselschritte beim anaeroben Phenolmetabolismus durch phenolische Autoxidationsprodukte	85
4.2. Mikrobielle Abbaubarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte	89
4.3. Untersuchungen zur anaeroben Behandlung von Schwefvollertwasser	98
4.3.1. Aktivitäten anaerober Mikroorganismen in der Schwefwasserdeponie Vollert-Süd	98

4.3.2.	Anaerobe Semi-batch-Behandlung von Schwelvollert-Tiefenwasser in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren	103
4.3.3.	Toxizität und Fermentierbarkeit von Schwelvollertwasser unter methanogenen Bedingungen nach physiko-chemischer Vorbehandlung	109
4.4.	Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen	112
4.4.1.	Die Inhibierung des Phenolabbaus durch Nickel in Abhängigkeit von der Temperatur	113
4.4.2.	Substrathemmung beim Phenolabbau in Abhängigkeit von der Temperatur	117
4.4.3.	Temperatursensitivität des Abbaus von Phenol bei Nickelinhibierung bzw. Substrathemmung	125
5.	DISKUSSION	131
5.1.	Wirkung und Verhalten phenolischer Autoxidationsprodukte in mikrobiellen Systemen	131
5.1.1.	Das inhibitorische Potential phenolischer Autoxidationsprodukte	131
5.1.2.	Die Persistenz phenolischer Autoxidationsprodukte	134
5.1.3.	Die Problematik der analytischen Erfassung von Transformationsreaktionen an phenolischen Autoxidationsprodukten	137
5.2.	Praktische Konsequenzen der Temperaturabhängigkeit von Inhibierungsprozessen	139
5.2.1.	Bedeutung der positiven Temperatur-Inhibierungs-Korrelation bei der Substrathemmung des Schadstoffabbaus für Selbstreinigungsprozesse in kontaminierten Habitaten	139
5.2.2.	Die Gültigkeit der ARRHENIUS-Beziehung für biochemische Reaktionen	140
5.2.3.	Konsequenzen der Temperatur-Inhibierungs-Zusammenhänge für die Bewertung mikrobieller Aktivitätsdaten	141
5.2.4.	Die Doppelrolle des Einflußfaktors Temperatur in biologischen Abwasserreinigungsanlagen	142

5.2.5. Aspekte bei der mathematischen Beschreibung von Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen	144
5.3. Konsequenzen und Ausblick	145
6. ZUSAMMENFASSUNG	148
LITERATURVERZEICHNIS	150
DANKSAGUNG	169
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	170
LEBENS LAUF	171

Verzeichnis der Größen und Abkürzungen und Indizes

Größen:

A	ARRHENIUS-Konstante
d	Durchmesser
DIC	dissolved inorganic carbon (Konzentration an gelöstem anorganischen Kohlenstoff)
DOC	dissolved organic carbon (Konzentration angelöstem organischen Kohlenstoff)
E_A	Aktivierungsenergie
I	Inhibitorkonzentration
KBE	koloniebildende Einheiten
K_i	Inhibierungskonstante
K_s	Halbsättigungskonstante
n	Inhibierungsgrad
R	ideale Gaskonstante
S	Substratkonzentration
S_0	Substratanfangskonzentration
T	Temperatur
t	Zeit
U	Umsatz
v	Reaktionsgeschwindigkeit
$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X	Biomassekonzentration

Abkürzungen:

BTS	Biologische Trockensubstanz
E	Extinktion
m-	meta
o-	ortho
p-	para
p.A.	pro Analyse
Vol-%	Volumenprozent
W	Wiederfindungsrate

Indizes:

exp	experimentell
sim	simuliert
0d	Meßwert am Tag des Versuchsbeginns

1. Einleitung

Phenolische Verbindungen stellen Hauptkontaminanten in einem breiten Spektrum industrieller Abwässer dar, wie sie beispielsweise bei der Kohleveredlung, der Erdölverarbeitung, in der Papierindustrie und bei der Gewinnung pflanzlicher Rohstoffe entstehen. Im ostdeutschen Raum sowie in einigen Ländern Osteuropas führte vor allem die jahrzehntelange Nutzung der Braunkohle als fossiler Energieträger und Ausgangsstoff für chemische Synthesen bei ihrer Veredlung durch Vergasungs-, Verkokungs-, Schwelungs- und Verflüssigungsprozesse zum Anfall großer Mengen hochbelasteter phenolischer Abwässer. Wichtige Inhaltsstoffe dieser Abwässer sind neben phenolischen Komponenten auch Fettsäuren und Ammoniumstickstoff. Während in Steinkohlepyrolyseabwässern Phenol als Hauptkontaminant dominiert, sind in Braunkohlepyrolyseabwässern auch hohe Konzentrationen mehrfach hydroxylierter Phenole wie Brenzkatechin und Resorcin zu finden.

In der Vergangenheit wurden diese Abwässer häufig unbehandelt in Vorfluter oder Tagebaurestlöcher eingeleitet oder in unterirdische Gesteinsschichten verpreßt, stellen heute ein beträchtliches Altlastenpotential besonders in den Regionen mit ehemaliger braunkohleverarbeitender Industrie dar (BERGMANN, 1993; KUSCHK et al., 1994) und haben häufig zu beträchtlichen Verunreinigungen von Böden und Grundwasserleitern geführt.

Zur Reinigung von phenolischen Abwässern stehen physikalisch-chemische und biologische Methoden zur Verfügung. Besondere Beachtung finden in letzter Zeit die mikrobiell anaeroben Methoden (KUSCHK, 1991). Von den typischen Inhaltsstoffen von Kohlepyrolyseabwässern gelten besonders die als anaerob relativ leicht abbaubar, die den Hauptanteil der organischen Belastung ausmachen wie Phenol und mehrfach hydroxylierte Phenole sowie Kresole (BLUM et al., 1986). Dabei wird eine Kombination aus Aktivkohleeinsatz und biologischem Prozeß als besonders vielversprechend diskutiert (FEDORAK et al., 1985; FEDORAK und HRUDEY, 1986; FOX et al., 1988; KINDZIERSKI et al., 1992). Die Realisierung dieser Verfahren, die bisher zumindest im Labor- und Technikumsmaßstab belegt ist, erfolgt meist in anaeroben Aktivkohlefestbett- oder -wirbelbettreaktoren (FOX et al., 1990; NAKHLA et al., 1990; NAKHLA und SUIDAN, 1992; FOX und SUIDAN, 1993).

Anaerobprozesse weisen gegenüber aeroben Abwasserreinigungsmethoden einige Vorzüge auf, die unter bestimmten Bedingungen ihre Nachteile (lange Generationszeiten, unter Umständen auftretende Prozeßinstabilitäten) ausgleichen können. Bei anaeroben Abbauprozessen werden im Durchschnitt über 90 % des organischen Kohlenstoffs der Kontaminanten zu Kohlendioxid und Methan metabolisiert; weniger als 10 % werden in die bakterielle Biomasse eingebaut. Dies führt im Vergleich zu den Aerobprozessen zu einer deutlich verminderten Schlammproduktion. Besonders beim anaeroben Abbau stark belasteter Abwässer fallen

große Mengen Methan an, das zumindest lokal begrenzt zur Abdeckung des Energiebedarfes beitragen kann. Der zur Realisierung von Anaerobprozessen erforderliche Energieeintrag beschränkt sich im wesentlichen auf Aufwendungen zur Förderung und gegebenenfalls Aufheizung der Medien. Im Hinblick auf die Behandlung von phenolischen Wässern weisen Anaerobprozesse weiterhin den Vorteil auf, daß eine Autoxidation phenolischer Inhaltsstoffe vermieden wird. Dies ist von besonderer Bedeutung, da gerade mehrfach hydroxylierte Phenole leicht zur Autoxidation und zur Bildung hochmolekularer persistenter Strukturen neigen.

Bedingt durch den Rückgang der Industrieproduktion im ostdeutschen Raum während der letzten Jahre spielt gegenwärtig die Behandlung frisch anfallender phenolischer Abwässer in diesen Regionen keine Rolle. Demgegenüber ist hier besonders die Altlastenproblematik von Relevanz. Unter diesem Gesichtspunkt ist auch aus ökologischer Sicht das Leistungspotential anaerober Mikroorganismenpopulationen beim Abbau von Verbindungen, die durch industrielle Prozesse entstanden sind und bereits in die Umwelt gelangten, von besonderem Interesse. Häufig reichern sich solche Verbindungen in Bereichen an, die von Natur aus sauerstofffrei sind wie Flußsedimente oder Grundwasserleiter. Hinzu kommt die stark sauerstoffzehrende Wirkung einer Reihe von phenolischen Verbindungen, so daß selbst in offenen Tagebaurestlöchern, in denen phenolische Wässer gelagert werden, sich nach kurzer Zeit anaerobe Verhältnisse auch in den oberflächennahen Bereichen einstellen. In diesen Fällen sind die Voraussetzungen für biologisch aerobe Abbauprozesse nicht vorhanden, so daß das Selbstreinigungspotential solcher Habitats ausschließlich von der Leistungsfähigkeit der standorteigenen anaeroben Mikroorganismen abhängt.

Ein Beispiel für einen solchen Fall bildet die Schwelwasserdeponie Vollert-Süd im Landkreis Weißenfels (Sachsen-Anhalt). Über Jahrzehnte hinweg wurden die Abwässer der Schwelerei Deuben hier in ein Tagebaurestloch eingeleitet. Der so entstandene See umfaßt auf einer Oberfläche von 9 Hektar ein Abwasservolumen von 2 Mio. m³. Das Wasser ("Schwelvollertwasser") ist von dunkelbrauner Färbung (Sichttiefe ca. 3 cm) und zeigt eine stabile Schichtung (Tabelle 1). Ein bis zwei Drittel der organischen Belastung resultieren aus höhermolekularen Verbindungen, wobei Ultrafiltrationsuntersuchungen zeigten, daß es sich hierbei um ein sehr breites Molekülgrößenspektrum von einigen hundert Dalton bis hin zu Strukturen im kolloidal gelösten und partikulären Bereich (>0,3 µm) handelt. Hinsichtlich der Entstehung dieser Verbindungen wird angenommen, daß niedermolekulare phenolische Verbindungen durch Luftkontakt zu makromolekularen huminartigen Strukturen polymerisierten. Im Leuchtbakterientest wurde eine starke Beeinträchtigung der biologischen Aktivität der Testorganismen durch Schwelvollertwasser nachgewiesen, die eine Abhängigkeit von der Seetiefe erkennen läßt. Die toxische Wirkung war im Tiefenwasser mehr als doppelt so hoch wie im Oberflächenwasser. Die Toxizität von Tiefenwasser gegenüber *Photobakterium phos-*

phoreum wurde mit einem EC 50-Wert von 13,5 ml/l angegeben (WIESSNER et al., 1993; BECKER et al., 1994).

Tabelle 1. Ausgewählte Analysendaten des Schwelvollertwassers in Abhängigkeit von der Probenahmetiefe (WIESSNER et al., 1993).

Tiefe (m)	wasserdampf- flüchtige Phenole (mg/l)	NH ₄ -N (mg/l)	CSB (mg/l)
0	7	79	964
5	23	85	980
10	86	134	350
15	202	221	2200
20	228	239	2290
24	219	250	2245

Diese Ergebnisse können im Zusammenhang gesehen werden mit stark abnehmenden Lebendzellzahlen bei zunehmender Seetiefe, wobei jedoch auch andere Einflüsse wie niedrige Temperatur, mangelnde Sauerstoffversorgung und ungenügende Zirkulation in der Tiefe eine Rolle spielen. Im Oberflächenwasser wurden 10⁶ KBE/ml ermittelt, im Tiefenwasser nur 10⁴ KBE/ml (BECKER et al., 1995).

Im Falle der Schwelwasserdeponie Vollert-Süd wird exemplarisch deutlich, daß die stofflichen Eigenschaften phenolischer Deponiewässer offenbar nicht nur für eine Aktivitätsminderung bei allochthonen Organismen verantwortlich sind, sondern im Zusammenwirken mit bestimmten physikalischen Randbedingungen (z.B. niedrige Temperatur) auch die Ausprägung leistungsfähiger autochthoner Mikroorganismenpopulationen limitieren.

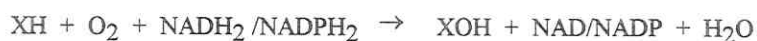
Aus diesen Tatsachen resultiert das Ziel dieser Arbeit, die geschwindigkeitslimitierenden Einflußgrößen beim mikrobiellen Abbau von Schadstoffen in phenolischen Deponiewässern zu untersuchen. Dabei sollen die Hauptschwerpunkte der Arbeit auf der Ermittlung des inhibitorischen Potentials phenolischer Autoxidationsprodukte, der näheren Betrachtung der Rolle verschiedener Elektronenakzeptoren bei der biologischen Reinigung solcher Wässer und der Untersuchung der Beziehungen zwischen der Intensität einer Inhibierung und dem Vorherrschen niedriger Temperaturen (Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen) liegen.

2. Kenntnisstand zur Geschwindigkeitslimitation mikrobieller Abbauprozesse

2.1. Biochemie des aeroben Aromatenabbaus

Aromatische Verbindungen sind auf Grund ihres delokalisierten π -Elektronensystems besonders stabil. Der mikrobielle Abbau solcher Verbindungen wird in der Regel durch Reaktionen mit molekularem Sauerstoff eingeleitet. Nur in heterocyclischen Verbindungen verläuft die Initialreaktion über eine Hydroxylierung durch Wasser mit gleichzeitiger Reduktion des Wasserstoffdonators (BERRY et al., 1987; KOENIG und ANDREESEN, 1992). Bei sehr elektrophilen Verbindungen wie 2,4,6-Trinitrotoluol und einigen partiell reduzierten Nitrotoluolen oder auch mehrfach halogenierten, -O-Aryl-, -O-Alkyl- sowie -SO₃H-substituierten Aromaten ist jedoch der Angriff durch Oxygenasereaktionen häufig erschwert oder unmöglich (KNACKMUSS, 1994), so daß auch hier zunächst alternative Wege beschritten werden müssen.

Nach eventuell erforderlicher Modifikation vorhandener Seitenketten werden durch oxydative Hydroxylierung des aromatischen Ringes die Substrate für die Ringspaltung gebildet. Diese Reaktionen führen zur Bildung phenolischer Schlüsselintermediate und verlaufen nach folgendem generalisierten Schema:



wobei XH den zu hydroxylierenden Ausgangsstoff darstellt und NADH₂ bzw. NADPH₂ den Wasserstoffdonator. Die Konvergenz des aeroben Abbaus sowohl einiger natürlicher aromatischer Verbindungen (z.B. Tryptophan) als auch relevanter Umweltschadstoffe zum Ringspaltungssubstrat Brenzkatechin ist in Bild 1 dargestellt.

Die Ringspaltung wird erreicht, indem beide Atome des Sauerstoffmoleküls in das Molekül des Ringspaltungssubstrates eingebaut werden. Die Reaktion wird durch Dioxygenasen katalysiert. Alle Ringspaltungssubstrate tragen ortho- oder para-ständige Hydroxylgruppen. Die Spaltung des Ringes kann bei den ortho-hydroxylierten Phenolen entweder in ortho- oder in meta-Stellung erfolgen (Bild 2), wobei die verantwortlichen Enzyme in der Regel eine starke, aber nicht generell absolute Substratspezifität zeigen (GIBSON, 1968; FEWSON, 1981).

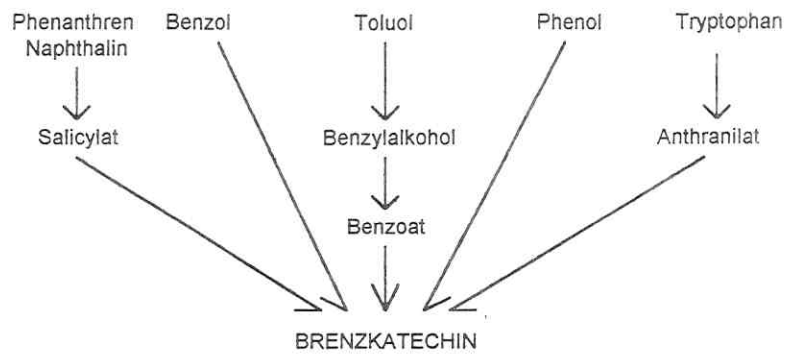


Bild 1. Konvergente Stoffwechselwege für die Bildung von Brenzkatechin (nach FEWSON, 1981).

Die Produkte der o-Spaltung werden zu Succinat und Acetyl-CoA, die der m-Spaltung zu Pyruvat, Fumarat oder verwandten Verbindungen umgewandelt und letztlich in den Tricarbonsäurezyklus eingeschleust.

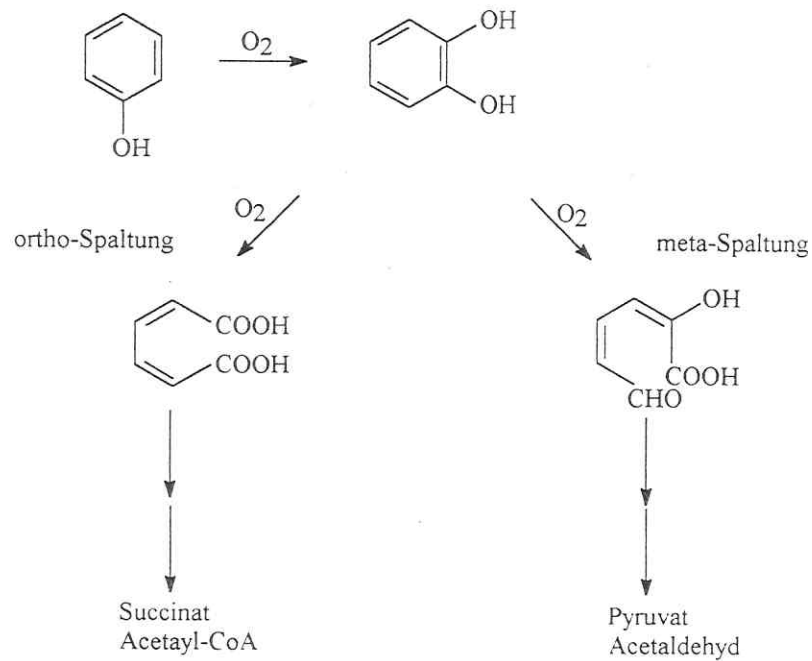


Bild 2. O- und m-Spaltung beim aeroben Abbau aromatischer Verbindungen.

Alternative Mechanismen, den aromatischen Ring oxydativ zu modifizieren, stellen unspezifische Phenoloxidasereaktionen dar, die in einigen Pilzen und Pflanzen vorkommen und beispielsweise am Ligninabbau beteiligt sind (CRAWFORD und CRAWFORD, 1980), sowie Reaktionen des Cytochrom P 450 Monooxygenase-Systems in einigen Bakterien, Hefen und filamentösen Pilzen. Hierbei entstehen jedoch keine cis-Dihydrodiole, sondern trans-Dihydrodiole, die in der Regel nicht weiter gespalten oder assimiliert werden, aber häufig eine Entgiftung von Xenobiotika bewirken (DAGLEY, 1981; CERNIGLIA, 1981).

2.2. Biochemie des anaeroben Aromatenabbaus

Das Fehlen molekularen Sauerstoffs schließt die unter aeroben Bedingungen ablaufenden Oxygenasereaktionen zum Angriff des aromatischen Ringes aus. Gerade dadurch werden aber reduktive Mechanismen realisiert, die in Gegenwart reaktiver Sauerstoffradikale nicht möglich wären. Auf diese Weise können unter anaeroben Bedingungen auch allgemein als relativ persistent geltende Verbindungen angegriffen werden. Im Vergleich zu aeroben Stoffumsetzungen sind jedoch Reaktionen im sauerstofffreien Milieu häufig mit geringem Energiegewinn für die Mikroorganismen verbunden, was zu kinetischen und qualitativen Nachteilen bezüglich der Breite des verwerteten Substratspektrums gegenüber den aeroben Abbauprozessen führen kann. Sind für die anaerobe Mineralisierung organischer Verbindungen syntrophe Gemeinschaften erforderlich (Methanogenese, dissimilatorische Sulfatreduktion), so muß die beim Substratabbau freiwerdende Energie noch auf die beteiligten Organismengruppen aufgeteilt werden.

Analog zu den Mechanismen des aeroben Aromatenabbaus führt auch der anaerobe Aromatenmetabolismus über eine Reihe von kanalisierenden Reaktionen zu einigen wenigen Schlüsselintermediaten. Diese Transformationsreaktionen umfassen die o-Demethylierung von Methylarylethern, die Decarboxylierung von Hydroxybenzoaten, reduktive Eliminationsreaktionen von Hydroxyl-, Halogen- oder Aminosubstituenten, Oxidationsreaktionen bei nicht hydroxylierten Aromaten, die Carboxylierung des aromatischen Ringes und die Transhydroxylierung von Pyrogallol zu Phloroglucin (TSCHECH, 1989). Im Ergebnis dieser Transformationen entstehen die drei Schlüsselintermediate des anaeroben Aromatenabbaus Resorcin, Phloroglucin und Benzoat. Die meta-ständigen Hydroxylgruppen von Resorcin und Phloroglucin destabilisieren das delokalisierte π -Elektronensystem, so daß die Aromatizität durch Anlagerung zweier Reduktionsäquivalente aufgehoben werden kann. In diese Wege mündet auch der Abbau von Gallat, Pyrogallol und Hydroxyhydrochinon (SAMAIN et al., 1986; BRUNE und SCHINK, 1990; SCHNELL et al., 1991; BRUNE und SCHINK, 1992) sowie der Abbau der Resorcylate (TSCHECH und SCHINK, 1985; KLUGE et al., 1990). Der Metabolismus der anderen zweifach hydroxylierten Phenole Brenzkatechin und Hydro-

chinon ist nicht genau geklärt. Diskutiert werden ein Weg über Phenol nach reduktiver Dehydroxylierung (SZEWZYK et al., 1985) und die Carboxylierung/Aktivierung zu Gentisyl-CoA mit nachfolgender reduktiver Dehydroxylierung zu Benzoyl-CoA und Abbau über den Benzoatweg (SZEWZYK und SCHINK, 1989; GORNY und SCHINK, 1994).

Der Abbau des nicht funktionalisierten Benzols wurde unter anaeroben Bedingungen erstmals bei einer denitrifizierenden Kultur gefunden (BATTERMANN und WERNER, 1984). Spätere Arbeiten bestätigten jedoch auch einen Benzolabbau unter methanogenen Bedingungen mit Phenol als Zwischenprodukt (GRBIC-GALIC und VOGEL, 1986; EDWARDS und GRBIC-GALIC, 1992). Generell erweist sich der Abbau von Benzol im sauerstofffreien Milieu jedoch als ein langsamer Prozeß und findet insbesondere bei Mischkontaminationen häufig nicht statt (BERRY-SPARK und BARKER, 1987; HUTCHINS et al., 1991). Ähnliches gilt auch für die Benzolderivate mit mehreren Methylgruppen oder mit längeren Alkylseitenketten, wobei aber der Abbau von Ethylbenzol und der Xylol-Isomere unter denitrifizierenden Bedingungen in einigen Arbeiten dokumentiert ist (KUHN et al., 1985, 1988; MAJOR et al., 1988; GERSBERG et al., 1991; ACTON und BARKER, 1992). Auch ist beschrieben worden, daß der Angriff von o-Xylol nur in Gegenwart von Toluol erfolgte (HUTCHINS, 1991). Wesentlich unproblematischer gestaltet sich die anaerobe Degradation von Toluol, die bisher auch unter sulfatreduzierenden, Eisen(III)-reduzierenden und methanogenen Bedingungen belegt ist (BELLER et al., 1991; HAAG et al., 1991; LOVLEY und LONERGAN, 1990). Für den anaeroben Toluolmetabolismus wird in erster Linie die Oxidation der Methylgruppe diskutiert, wobei möglicherweise zuerst das Molekül zu p-Kresol hydroxyliert wird (KUHN et al., 1988). Weitere Arbeiten zum anaeroben Abbau von Alkylbenzolen wurden von MORGAN et al., 1993 zusammengefaßt. Ähnlich wie in diesen Fällen hängt auch die Abbaubarkeit von alkylierten Phenolen unter anaeroben Bedingungen von der Anzahl und Länge der Alkylgruppen ab. In der Gruppe der Xylenole konnte unter denitrifizierenden Bedingungen ein Angriff jener Isomere beobachtet werden, welche die Hydroxylgruppe in p-Stellung zu einer der Methylgruppen aufweisen (FLYVBJERG et al., 1993), wobei 3,4-Xylenol zu 4-Hydroxy-2-Methylbenzoat oxidiert wurde und keine vollständige Mineralisation erfolgte (RUDOLPHI und TSCHACH, 1991). Der Abbau aller drei Kresolisomere konnte unter denitrifizierenden (BAKKER, 1977), desulfurizierenden (SMOLENSKI und SUFLITA, 1987; RAMANAND und SUFLITA, 1991) und methanogenen Bedingungen (KAMINSKI et al., 1990; ROBERTS et al., 1987, 1990) gezeigt werden, wobei Unterschiede im metabolischen Pfad in Abhängigkeit von der Stellung der Methylgruppe im Molekül zu existieren scheinen. Für p-Kresol wird die Oxidation der Methylgruppe und nachfolgende Bildung von p-Hydroxybenzoat mit weiterer Decarboxylierung zu Phenol angenommen (ROBERTS et al., 1987). Das Auftreten von p-Hydroxybenzoat als Zwischenprodukt wurde auch durch weitere Arbeiten bestätigt (BOSSERT et al., 1987; SMOLENSKI und SUFLITA, 1987). Demgegenüber wurde für m-Kresol zunächst eine Carboxylierung in p-Stellung mit

nachfolgender Dehydroxylierung gefunden (RAMANAND und SUFLITA, 1991). Bei o-Kresol läuft der Abbau jedoch offenbar nach Oxidation der Methylgruppe über nachfolgende Dehydroxylierung unter Bildung von Benzoat als Zwischenprodukt (SUFLITA et al., 1989). Für die anaerobe Degradation von Phenol werden zwei Wege diskutiert. Der reduktive Weg über Cyclohexanol (BAKKER, 1977) konnte in der jüngeren Vergangenheit jedoch nicht reproduziert werden, so daß als der dominierende Weg heute die Carboxylierung und nachfolgende Dehydroxylierung zu Benzoat (TSCHECH und FUCHS, 1987) angesehen wird, für den sich wiederholt Bestätigung fand (z.B. KNOLL und WINTER, 1987; KOBAYASHI et al., 1989; GENTHNER et al., 1989). Wie neuere Untersuchungen zeigten, sind derartige Carboxylierungsreaktionen beim Angriff phenolischer Verbindungen unter methanogenen Bedingungen weit verbreitet (BISAILLON et al., 1993). So wurden o-substituierte Chlor-, Fluor-, Brom- und Aminophenole sowie o-Hydroxybenzoat und Brenzkatechin in m-Stellung zu den entsprechenden Benzoaten carboxyliert. Das läßt vermuten, daß dem Abbauweg über Benzoat generell eine besondere Bedeutung bei der Degradation phenolischer Verbindungen zukommt, was auch für den Abbau halogener (LONDROY und FEDORAK, 1993) und aminierter Aromaten (TSCHECH und SCHINK, 1988) bestätigt wurde. Unter Berücksichtigung der Reduktion von Nitroaromaten zu Aminoaromaten (GORONTZY et al., 1993) scheint der Benzoatabbauweg prinzipiell bei der Degradation stickstoffs substituierter Aromaten dominierend zu sein. In Bild 3 ist die Konvergenz zahlreicher strukturell unterschiedlicher aromatischer Verbindungen zusammengefaßt.

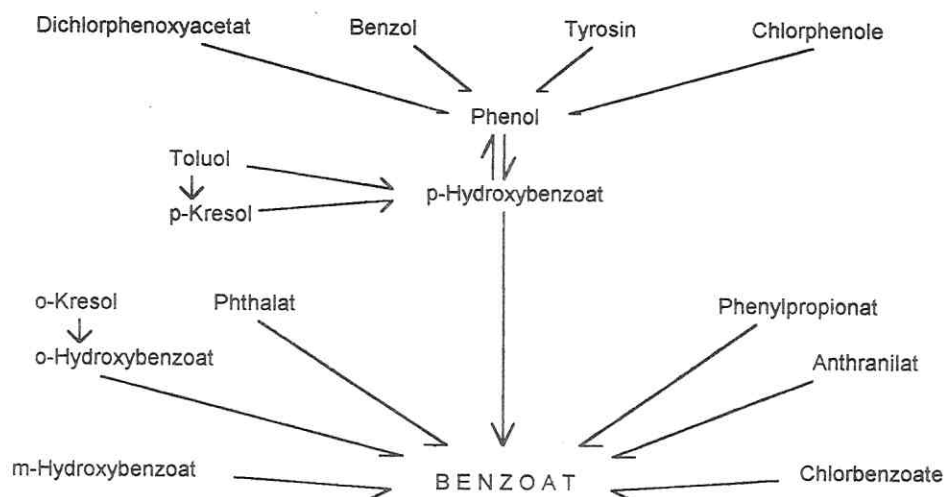


Bild 3. Konvergenz von anaeroben Transformationsreaktionen aromatischer Verbindungen zum Benzoat.

Für den anaeroben Abbau von Benzoat wurde neben einem oxydativen Mechanismus in *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans* (TAYLOR et al., 1970; BLAKE und HEGEMANN, 1987) vor allem der reduktive Weg über Aktivierung mit Coenzym A, Reduktion des aromatischen Ringes und β -Oxidation vielfach bestätigt. Die dabei identifizierten Metabolite sind von EVANS und FUCHS, 1988 zusammengestellt worden.

Die Abbaubarkeit von Makromolekülen, deren Grundkörper aromatischer Natur sind, ist unter methanogenen Bedingungen stark limitiert. Die unter aeroben Bedingungen realisierten Radikalreaktionen durch Weißfäulepilze (ZIECHMANN, 1982) sind im sauerstofffreien Milieu nicht möglich. Dementsprechend erweisen sich die verknüpfenden Bindungen zwischen den aromatischen Grundkörpern unter diesen Bedingungen als sehr stabil. Auch beim natürlichen Ligninpolymer trifft dies zu (ZEIKUS et al., 1982). Dennoch wurde eine Spaltung der β -Aryl-Etherbindungen des Ligninmoleküls unter methanogenen Bedingungen beschrieben, wobei die Degradierbarkeit von Ligninbruchstücken entscheidend von deren Molekulargewicht abhing (COLBERG und YOUNG, 1985a, b) und die Mineralisation generell langsam und offenbar nicht vollständig verlief (BENNER et al., 1984). Auf eine Abhängigkeit der methanogenen Abbaubarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte von deren Molekulargewicht deuten auch Arbeiten hin, die im Zusammenhang mit der Tanninproblematik durchgeführt wurden (FIELD und LETTINGA, 1987, 1989).

Das Fehlen molekularen Sauerstoffs bei Abbauprozessen im anaeroben Milieu beschränkt den Energiegewinn, den die Veratmung einer organischen Substanz bei Sauerstoffgegenwart liefern könnte. Unter Sauerstoffausschluß erfolgt der Energiegewinn in der Regel durch Gärungsprozesse. Jedoch ermöglichen die alternativen Atmungsprozesse wie die Denitrifikation, die dissimilatorische Sulfatreduktion und die Eisen(III)-reduktion eine vollständige Oxidation organischer Verbindungen. Bei methanogenen Prozessen wird zum einen das intermediär beim Abbau aromatischer Verbindungen gebildete Acetat zu Methan und Kohlendioxid disproportioniert und zum anderen aus intermediärem Wasserstoff und Kohlendioxid Methan unter Bildung von Wasser als Endprodukt erzeugt. Beim Abbau zahlreicher aromatischer Verbindungen besitzen diese wasserstoffverbrauchenden Reaktionen methanogener und sulfatreduzierender Bakterien aus thermodynamischer Sicht entscheidende Bedeutung für den Ablauf des Gesamtprozesses. Erst durch die syntrophe Gemeinschaft von wasserstoffbildenden Gärorganismen und wasserstoffverwertenden Bakterien wird der Wasserstoffpartialdruck im System auf einem so niedrigen Niveau gehalten, daß die Vergärung vieler Aromaten bis zum Stadium des Acetats verlaufen kann, das wiederum Substrat für methanogene und sulfatreduzierende Bakterien ist (GOTTSCHALK, 1985; ZEHNDER, 1988).

Vielfach wird das Potential anaerober Abbauprozesse für praktische *in situ* Sanierungsmaßnahmen diskutiert und teilweise erfolgreich genutzt. Zahlreiche aerobe Mikroorganismen sind in der Lage, im anaeroben Milieu Nitrat als alternativen

Elektronenakzeptor zu nutzen. In Zonen, die frei von molekularem Sauerstoff sind, hat sich die Infiltration von beispielsweise Nitrat als Elektronenakzeptor zur Oxidation organischer Schadstoffe oder auch von Sulfid bewährt. Nitrat weist gegenüber Sauerstoff eine bessere Migrationsfähigkeit im Habitat auf, was eine vollständigere Versorgung der autochthonen Mikroorganismen mit einem geeigneten Elektronenakzeptor gewährleistet, als dies durch Belüftungsmaßnahmen bei vergleichbar niedrigem Energieeintrag zu erreichen wäre. Praktisch erprobt wurde eine solche Nitratinfiltration vor allem zur Sanierung von Grundwasser- und Sedimentkontaminationen durch Benzol und seine alkylierten Derivate (BERRY-SPARK und BARKER, 1987; HARRISON und BARKER, 1987; ACTON und BARKER, 1992; MURPHY et al., 1993). Auch zur Dekontamination von mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen verunreinigten Böden erscheint diese Methode erfolgversprechend zu sein (LEDUC et al., 1992).

Ausgehend von diesen Ansätzen ergibt sich die Frage, ob die Methode der Infiltration alternativer Elektronenakzeptoren auch zur Sanierung von phenolischen Deponiewässern, wie sie beispielsweise aus der pyrolytischen Kohleverarbeitung resultieren, anwendbar ist. Während die mikrobielle Abbaubarkeit phenolischer monomerer Verbindungen im anaeroben Milieu ausführlich untersucht ist, bleiben Fragen nach der Transformierbarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte in Abhängigkeit vom zur Verfügung stehenden Elektronenakzeptor weitgehend offen.

2.3. Geschwindigkeitslimitierende Einflüsse beim mikrobiellen Abbau von Schadstoffen

2.3.1. Die Konzentration inhibierender Substanzen

2.3.1.1. Allgemeines

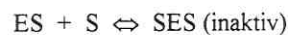
Die Hemmung eines einzelnen Enzyms innerhalb einer metabolischen Kette beeinflusst in jedem Falle den metabolischen Prozeß in seiner Gesamtheit (DIXON und WEBB, 1964). In einigen Fällen läßt sich einem Inhibitor eine spezifische Wirkung zuschreiben und sein Wirkungsort dementsprechend genau definieren. Eine Vielzahl chemischer Verbindungen weist jedoch solche strukturellen Merkmale auf, daß eine funktionsbeeinträchtigende Wechselwirkung mit einer Vielzahl von Enzymen stattfindet und sich kein exakter Wirkungsort des Inhibitors formulieren läßt. Die Vielfalt möglicher Einwirkungen von Inhibitoren auf die Zelle läßt sich in folgenden Punkten zusammenfassen (EDWARDS, 1970):

- Modifizierung des chemischen Potentials von Substraten, Zwischenprodukten und Produkten
- Veränderung der Zellpermeabilität
- Aktivitätsänderung eines oder mehrerer Enzyme
- Dissoziation eines oder mehrerer Enzyme oder Metabolitenaggregate
- Beeinflussung der Enzymsynthese durch Wechselwirkungen mit dem Genom oder dem Transkriptionsprozeß

Aus diesen Punkten ergibt sich ein Einfluß auf die funktionale Aktivität der Zelle.

Je nach Beständigkeit einer Inhibierung lassen sich reversible und irreversible Mechanismen, und je nach dem Charakter der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung kompetitive, nichtkompetitive und unkompetitive Mechanismen unterscheiden. Bei Inhibitoren, die sehr vielschichtige Wirkungen in der Zelle hervorrufen können, ist es jedoch kompliziert und oft nicht sinnvoll, aus dem Typ einer einzelnen Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung auf seine Bedeutung für die Hemmung metabolischer Sequenzen oder gar des Abbaus von Schadstoffen zu schließen. In solchen Fällen sind mit ganzen Zellen ermittelte kinetische Parameter zur Beschreibung von enzymatischen Aktivitäten immer als Summenparameter zur Beschreibung der Kinetik der jeweiligen metabolischen Sequenz zu verstehen.

Trotz der Mannigfaltigkeit von Wirkungsmöglichkeiten von Inhibitoren hebt sich von den bisher genannten Varianten ein weiterer Fall qualitativ ab, der dadurch gekennzeichnet ist, daß der Inhibitor selbst das Substrat für ein Enzym darstellt (Substrathemmung). Dieser Fall ist von besonderer praktischer Bedeutung, wenn die Degradation dieses Inhibitors im Mittelpunkt des Interesses steht. Dem Mechanismus der Substrathemmung liegt die Vorstellung zugrunde, daß sich bei hohen Substratkonzentrationen Substratmoleküle nicht nur mit dem freien Enzym, sondern auch mit dem aktivierten Enzym-Substrat-Komplex verbinden, was zur Bildung inaktiver Substrat-Enzym-Substrat-Komplexe führt.



Die Folge ist ein Abweichen der Kinetik der Reaktion von der MICHAELIS-MENTEN-Gleichung,

$$v = v_{\max} / (1 + K_s/S)$$

da die Reaktionsgeschwindigkeit oberhalb einer bestimmten Substratkonzentration wieder sinkt. Zur Beschreibung dieses Falles wurde von HALDANE, 1930 folgende aus den Geschwindigkeitskonstanten der Teilreaktionen resultierende Gleichung entwickelt:

$$v = v_{\max} / (1 + K_s/S + S/K_i)$$

Eine Diskussion verschiedener Modifikationen dieser Gleichung hat ergeben, daß die HALDANE-Gleichung die meisten Fälle einer Substrathemmung gut beschreiben kann, wenn auch für einige spezielle Fälle modifizierte Ausdrücke noch geeigneter erscheinen (EDWARDS, 1970). Einer dieser Ausdrücke führt in Anlehnung an WEBB, 1963 den Begriff des Inhibierungsgrades als Exponent des Inhibierungsgliedes in der HALDANE-Gleichung ein und fand besonders bei der Beschreibung des mikrobiellen Abbaus von Phenol Anwendung (z.B. NEUFELD et al., 1980; DWYER et al., 1986):

$$v = v_{\max} / (1 + K_s/S + (S/K_i)^n)$$

Derartige Modifikationen stellen eine Abweichung von der Theorie der Enzymkinetik dar und verwandeln die mathematisch begründete HALDANE-Gleichung in ein empirisches Modell, das jedoch die tatsächlichen Sachverhalte praktisch besser beschreibt. Als Ursache für derartige Abweichungen kommt der Umstand in Frage, daß die klassische HALDANE-Gleichung für Reaktionen auf der enzymatischen Ebene abgeleitet wurde. In die Beschreibung der Kinetik des Abbaus von Schadstoffen wie Phenol gehen aber zahlreiche zelluläre Prozesse ein, die durch das inhibierende Substrat gestört werden, aber nicht alle unmittelbar mit den katalytisch aktiven Enzym-Substrat-Komplexen des Phenolmetabolismus verbunden sind. Für den anaeroben Abbau von Phenol wurden Werte von $n=4$ ermittelt, also das Vierfache des in der HALDANE-Gleichung vorausgesetzten Wertes von $n=1$ (NEUFELD et al., 1980).

Mathematisch bewirkt ein höherer Wert des Inhibierungsgrades n einen steileren Abfall der EDWARDS-Kurve auf der rechten Seite. Damit läßt sich der Parameter n als ein Maß für die Empfindlichkeit eines Organismus gegenüber veränderlichen Substratkonzentrationen im inhibierenden Konzentrationsbereich interpretieren und erbringt eine Aussage über die Intensität, mit der sich die Geschwindigkeit der biochemischen Reaktion bei einer bestimmten Konzentrationsdifferenz ändert (Bild 4).

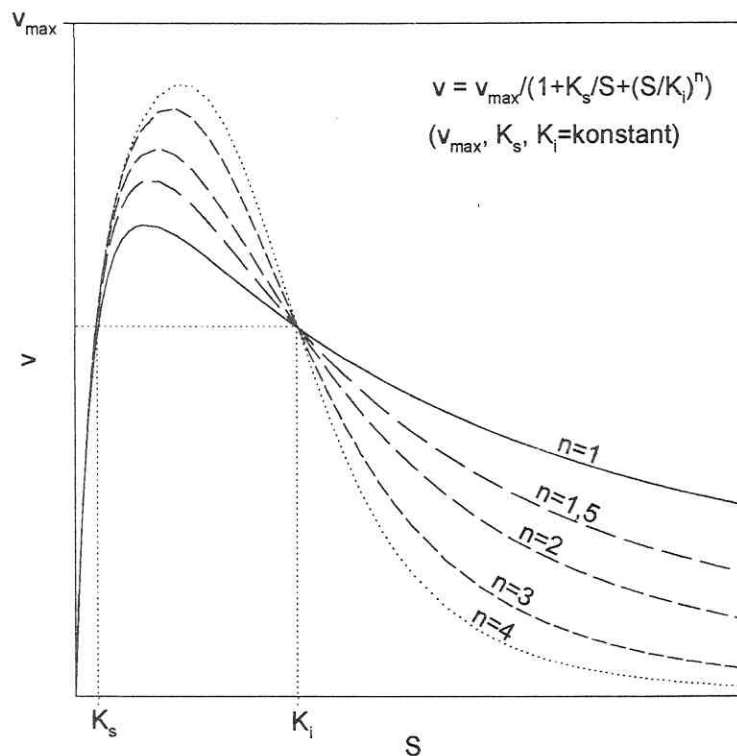


Bild 4. Bedeutung des Parameters n im EDWARDS-Modell.

Zur Beschreibung von Hemmwirkungen, die von Inhibitoren ausgehen, welche keine katalytisch aktiven Komplexe mit den Enzymen des betrachteten metabolischen Prozesses bilden und nicht durch diese transformiert werden, gibt es zwei Strategien. Die erste Strategie ist biochemisch ausgerichtet. Sie besteht in der Untersuchung der Prozesse auf der enzymatischen Ebene und versucht, den Charakter der Wechselwirkung des Inhibitors mit dem gehemmten Enzym zu bestimmen. Dabei werden kompetitive, nicht kompetitive und unkompetitive Mechanismen unterschieden. Der in den mathematischen Modellen zur Beschreibung dieser Sachverhalte auftauchende K_i -Wert entspricht der Inhibitorkonzentration, die zu einer Geschwindigkeitsreduktion der Enzymreaktion um 50 % führt und ist damit dem K_i -Wert in den Gleichungen zur Substrathemmung vergleichbar, bei welcher Inhibitor und Substrat identisch sind. Die zweite Strategie ist toxikologisch ausgerichtet und untersucht die komplexen Wirkungen des Inhibitors auf Einzeller oder höhere Organismen (z.B. Leuchtbakterien-, Daphni-

en-, Fisch-, Algen-, Kresstest). Die Parameter zur Beschreibung der Intensität der Inhibition sind hier die minimale lethale Konzentration, die Überlebensdauer und der LC-50-Wert, wobei letzterer die Inhibitorkonzentration darstellt, die zum Absterben von 50 % der Testorganismen führt oder, wenn dies wie bei Mikroorganismen schwer feststellbar ist, die Intensität bestimmter Indikatoraktivitäten (z.B. Leuchtstärke bei *Photobacterium phosphoreum*) um die Hälfte reduziert (dann IC 50 genannt). Dieser Wert entspricht praktisch dem K_i -Wert auf der Ebene des Organismus.

Im Hinblick auf die Degradation von Schadstoffen ist besonders die Beeinflussung dieser mikrobiellen Abbauprozesse durch inhibierende Wirkungen von Interesse. Das unter diesem Gesichtspunkt von PEARSON et al., 1980 angewandte Modell

$$v = v_{\max} / (1 + (I/K_i)^n)$$

ist formal der EDWARDS-Gleichung ähnlich, gilt aber nicht für Fälle von Substrathemmung und enthält nicht den K_s/S -Term. Bedingung für die Substratkonzentration S ist also, daß sie in einem Bereich liegt, in dem vom Substrat selbst keine inhibierenden Wirkungen ausgehen. Der Quotient $v/v_{\max}$ entspricht damit der in den Toxizitätstests angegebenen Aktivität und wird bei fehlender Inhibition gleich eins. Der Exponent n kann analog zur EDWARDS-Gleichung als Inhibierungsgrad verstanden werden und drückt die Empfindlichkeit des Organismus gegenüber Differenzen der Inhibitorkonzentration aus. Bild 5 verdeutlicht, daß bei steigendem n der Abfall der Kurven im Bereich um K_i immer steiler wird. Zwar können die n -Werte beider Modelle nicht quantitativ vergleichbar sein, jedoch sollten sie tendenzielle Aussagen in Bezug auf synergistische oder antagonistische Wirkungen äußerer Einflüsse (z.B. Temperatur) ermöglichen. PEARSON et al., 1980 hatten das Modell benutzt, um zwischen derartigen Wirkungen durch Gemische toxischer Verbindungen auf den anaeroben Phenolabbau unterscheiden zu können.

Im Hinblick auf die Prozesse in biologischen Abwasserreinigungsanlagen ist das Auftreten inhibierender Erscheinungen von Praxisrelevanz. In jedem Falle können solche Effekte die Durchflußrate im System und damit die Effizienz der Anlage limitieren. Die Konsequenzen, die sich für den Betrieb biologischer Abwasserreinigungsanlagen beim Abbau inhibierender Substrate ergeben, sind ausführlich von SUIDAN et al., 1988 diskutiert worden. Vielfältig sind die Bemühungen, inhibierende Effekte während der Abwasserreinigung zu minimieren bzw. auszuschließen.

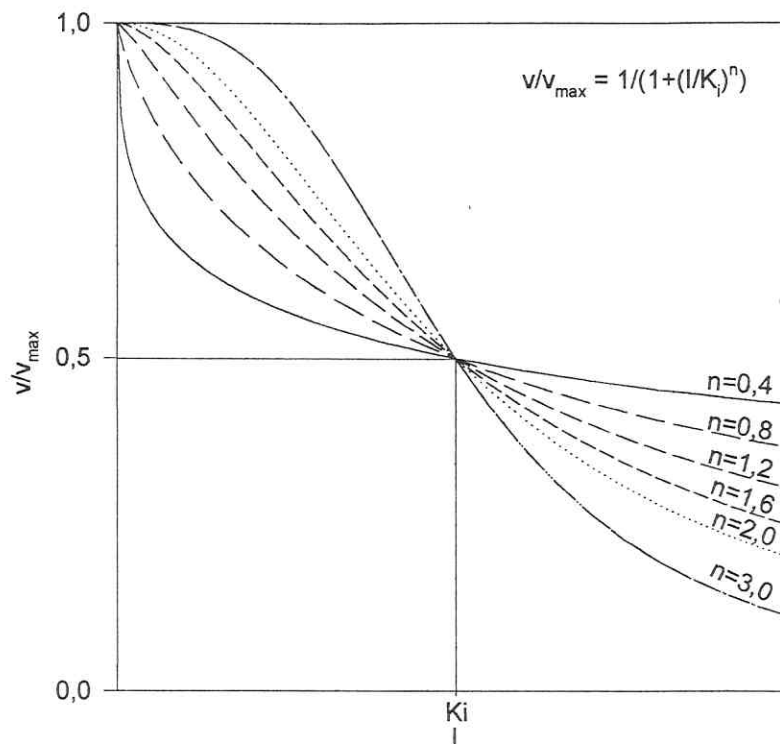


Bild 5. Bedeutung des Parameters n im PEARSON-Modell.

Im einzelnen sind hier besonders die Anwendung physiko-chemischer Vorbehandlungsmethoden (oxidative Beseitigung oder Transformation toxischer Abwasserinhaltsstoffe durch UV-Licht, Ozonierung oder andere chemische Oxidationsmittel, Fällungsmethoden, Strippen leicht flüchtiger toxischer Verbindungen, Extraktions- und Sorptionsmethoden) sowie die Anwendung spezieller Reaktortypen zu nennen. Bei der Behandlung phenolischer Abwässer haben sich vor allem Reaktorkonzepte mit Biomasseretention bewährt, die eine hohe Biomassekonzentration im System garantieren und dadurch hohe Stoffumsätze gewährleisten. Exemplarisch seien hierfür Festbett- und Wirbelbettreaktoren genannt, die mit granulärer Aktivkohle als Immobilisationsfläche für die Mikroorganismen arbeiten und die Sorptionskapazität der Aktivkohle gleichzeitig zum Abpuffern toxischer Schockbelastungen nutzen. Alternativ zur Aktivkohle ist auch der Einsatz synthetischer Resine als Immobilisationsfläche beschrieben worden (KINDZIERSKI et al., 1992).

2.3.1.2. Monomere phenolische Verbindungen

Auf Grund seiner Rolle in zahlreichen industriellen Prozessen kommt dem Phenol eine zentrale ökotoxikologische Bedeutung zu.

Der Mechanismus der Phenoltoxizität ist nicht vollständig aufgeklärt. Beschrieben wurde beispielsweise eine zur NAD/NADH-Bindung kompetitive Bindung des Phenols an eine Malatdehydrogenase (WEDDING et al., 1967). Mehrfach wurde über eine rasche Zell-Lyse von *Streptococcus faecalis* und den Austritt akkumulierter Aminosäuren unter Einwirkung von Phenol berichtet (GALE und TAYLOR, 1947; HUGO, 1976). Eine Beschleunigung der Sauerstoffzehrung beim Mannitol- und Glucoseabbau durch *Escherichia coli* wurde in Gegenwart von 1 g/l Phenol beobachtet, während dieselbe Konzentration den Sauerstoffverbrauch beim Glycerol-, Lactat- und Succinatabbau verlangsamte (HUGO, 1956). Mit Zellwandpolysacchariden bildete Phenol unlösliche Komplexe (CHANG, 1973). In der jüngeren Vergangenheit wurde über reduzierte Lipid-Protein-Verhältnisse in Membranen von *Escherichia coli* nach Einwirkung von Phenol berichtet (KEWELOH et al., 1990). Zellen von *Pseudomonas putida* P8 reagierten auf Phenolkontakt mit einer Veränderung der Fettsäurespektren der Lipide. Der Sättigungsgrad der Lipide nahm zu und das Verhältnis der trans- zu cis-ungesättigten Fettsäuren erhöhte sich. Es wurde vermutet, daß es sich hierbei um einen Mechanismus zur Kompensation der durch phenolische Substanzen erhöhten Membranpermeabilität handelt (KEWELOH et al., 1992).

Die toxische Wirkung des Phenols geht also offenbar auf unspezifisch wirkende Mechanismen zurück, die die Zellmembran als Wirkungsort einschließen und dadurch zum Verlust der osmotischen Integrität der Zelle führen (ALLSOP, 1989). Dementsprechend konnte durch Immobilisierungstechniken ein Membranschutz und im Zusammenhang damit eine höhere Phenoltoleranz erreicht werden (KEWELOH et al., 1989; HEIPIEPER et al., 1991). Beim Abbau von Phenol unter methanogenen Bedingungen konnte durch Immobilisierung der Zellen ein Anstieg des K_i -Wertes von 900 mg/l auf 1725 mg/l erreicht werden (DWYER et al., 1986). Die K_i -Werte des anaeroben Phenolabbaus liegen mit 363 mg/l (SUIDAN et al., 1988), 600 mg/l (WANG, 1989) oder 966 mg/l (NEUFELD et al., 1980) in der Tendenz höher als die für den aeroben Phenolabbau ermittelten K_i -Werte. Im letzteren Fall wurden Werte zwischen 53 mg/l und 455 mg/l bestimmt (OKAYGUN et al., 1992).

Unter dem Gesichtspunkt einer anaeroben Behandlung von phenolischen Deponiewässern ist weiterhin die Beeinflussung der syntrophen mikrobiellen Gemeinschaft durch hohe Phenolkonzentrationen von Interesse. Für die Hemmung der Methanogenese durch Phenol gibt es zahlreiche Belege (PEARSON et al., 1980; FEDORAK und HRUDEY, 1984; WANG et al., 1989; PATEL et al., 1991). Die Konzentrationen, die die Methanbildungsrate um die Hälfte reduzierten, lagen dabei im Bereich von 500 bis 2600 mg/l Phenol, wobei gefunden wurde, daß der Phenolabbau, für den Eubakterien verantwortlich sind, selbst empfindlicher beeinflusst

wird als die Methanogenese, die von Archaeobakterien als dem letzten Glied einer syntrophen Gemeinschaft realisiert wird. Stärker inhibierend als Phenol wirkten Kresole und Xylenole. Zusätzliche Hydroxylgruppen am Phenolmolekül reduzierten die toxische Wirkung, während Chlor- und vor allem Nitrosubstituenten die Toxizität erheblich erhöhten (WANG et al., 1991).

1.3.1.3. Autoxidationsprodukte phenolischer Verbindungen

Besonders im Hinblick auf das Altlastenproblem sind vor allem solche inhibitorischen Wirkungen interessant, die aus Autoxidationsprozessen langzeitgelagerter phenolischer Wässer resultieren. Unter Luftereinwirkung unterliegen Phenole Reaktionen, die über die Ausprägung chinoider und radikalischer Zwischenstufen zur Verknüpfung der aromatischen Ringe über C-C- oder C-O-Bindungen führen und so den Aufbau makromolekularer Strukturen bewirken. Eine Zusammenstellung der dabei ablaufenden chemischen Prozesse ist bei TAYLOR und BATTERSBY, 1967 zu finden.

Die toxikologischen Eigenschaften phenolischer Autoxidationsprodukte hinsichtlich der Beeinflussung anaerober Abbauprozesse sind in Ansätzen bereits unter dem Blickpunkt der Tanninproblematik untersucht worden. Lösungen autoxidierter Phenole hemmten die Methanogenese stärker als die monomeren Ausgangsstoffe (FIELD und LETTINGA, 1987). Untersuchungen zum Einfluß des Molekulargewichtes der Polymere ergaben, daß die oligomeren Produkte die stärkste inhibierende Wirkung hervorriefen, während Makromoleküle (Molekulargewicht > 3000 g/mol) die Methanbildung nicht negativ beeinflussten. Als Ursache für das Ausbleiben der Inhibition durch hochmolekulare Strukturen kommt in Frage, daß die Zellmembran den Eintritt solcher Verbindungen in die Zelle und so Wechselwirkungen mit bakteriellen Proteinen verhindert (FIELD und LETTINGA, 1989; FIELD et al., 1989, 1990a; BECKER, 1993). Darüber hinaus hemmten Tannine Wachstum und Proteaseaktivität in Species von *Butyrivibrio* und *Streptococcus*, wobei eine Bindung der Tannine an Zellwandpolymere beobachtet und die Zellwand demzufolge als Hauptangriffsort der Tannintoxizität vermutet wurde (JONES et al., 1994).

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zu den physiologischen Ursachen der Toxizität polyphenolischer Verbindungen steht deren Komplexierungsvermögen mit Proteinen, Polysacchariden und anderen Zellbestandteilen (HASLAM et al., 1992). Diese Komplexierungsreaktionen können entweder durch lockere Wechselwirkungskräfte (Wasserstoffbrückenbindungen, Hydrophobieeffekte) getrieben werden - dann sind sie in der Regel reversibel - oder können durch kovalente Bindungen mit den nukleophilen SH- oder NH₂-Gruppen der Proteine zustande kommen. Letztere gelten als irreversibel. Auf Grund der Reaktivität der Chinone, die beim Oxidationsprozeß entstehen, werden diese kovalenten Bindungen meist unspezifisch ge-

knüpft, führen aber stets zu einer Veränderung der physikalischen, chemischen und biologischen Charakteristika des Proteins. Der Inhibierungsmechanismus scheint dabei daraus zu resultieren, daß die im natürlichen Zellstoffwechsel vorkommenden chinoiden Substrate kompetitiv durch die Chinone ersetzt werden (HOFFMANN-OSTENHOF, 1963). Die Komplezierungsreaktionen sind nach BEART et al., 1985 schematisch in Bild 6 dargestellt. Diese Prozesse spielen auch bei natürlich ablaufenden Prozessen eine Rolle wie bei der enzymatischen und nichtenzymatischen Bräunung von Obstsäften oder bei der Ausprägung des harten Exoskelettes von Insekten sowie bei der Humusbildung im Boden (HASLAM et al., 1992). Daneben beruht auf diesen Mechanismen auch eine antivirale Wirkung (TAKECHI et al., 1985) und die Fällbarkeit von Hämoglobin durch pflanzliche Tannine (PORTER und WOODRUFFE, 1984).

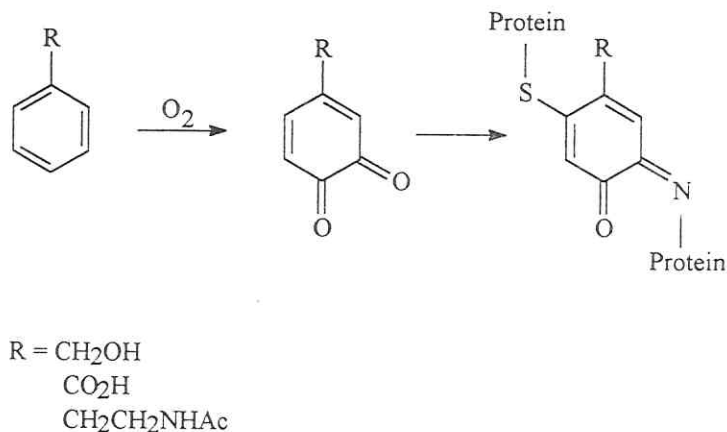


Bild 6. Kovalente Bindung chinoider Strukturen an Proteine.

Die Stabilität nichtkovalenter Polyphenol-Protein-Bindungen wird mit der hohen Anzahl von möglichen Wasserstoffbrückenbindungen über die phenolischen Gruppen erklärt. Dabei spielen bestimmte strukturelle Merkmale beider Bindungspartner eine entscheidende Rolle. So neigen besonders Prolin-reiche Proteine sehr stark zur Komplexierung. Prolin verhindert die Ausprägung einer α -Helix-Sekundärstruktur; die resultierenden Strukturen besitzen ein Peptid-Rückgrat, das gut über Wasserstoffbrückenbindungen an Polyphenole assoziierbar ist. Demgegenüber haben Peptide mit kompakter Globulärstruktur (z.B. Ribonucleasen, Lysozym, Cytochrom c) auf Grund ihrer geringen Flexibilität nur eine geringe Komplexierungsneigung. Auf der Seite der Polyphenole begünstigen vor allem eine hohe Anzahl phenolischer OH-Gruppen und ein hoher Polymerisationsgrad die Bindung mit Proteinen (HAGERMAN, 1992). Die freien Transportenergien für den Transport von Rinderserumalbumin aus einer

wäßrigen Lösung in eine einen phenolischen Liganden enthaltende Lösung waren, wie Tabelle 2 zeigt, bei physiologisch relevantem pH-Wert beträchtlich von der Anzahl der phenolischen OH-Gruppen abhängig (McMANUS et al., 1985).

Tabelle 2. Freie Energie beim Transport von Rinderserumalbumin aus einer wäßrigen Lösung in Lösungen mit phenolischen Liganden bei 25°C (McMANUS et al., 1985).

phenolische Verbindung	freie Transportenergie (kJ/mol)	
	pH 2,2	pH 6,0
Brenzkatechin	3,21	15,63
Resorcin	3,15	10,88
Pyrogallol	2,08	85,46

Demzufolge geht das dreifach hydroxylierte Pyrogallol eine stärkere Wechselwirkung mit zellulären Proteinen ein als die zweifach hydroxylierten Phenolderivate. Dies läßt auch eine deutliche Abhängigkeit der inhibierenden Wirkungen phenolischer Autoxidationsprodukte von der Struktur der phenolischen Ausgangsstoffe erwarten.

Die Hemmung anaerober Abbauprozesse bei der mikrobiellen Behandlung phenolischer Deponiewässer ist bisher nicht eingehend untersucht worden. Es kann erwartet werden, daß neben der unterschiedlichen Anzahl und Stellung von OH-Gruppen auch das Vorhandensein anderer Substituenten am aromatischen Ring die Toxizität der Autoxidationsprodukte beeinflußt. Von praktischem Interesse wären hier vor allem Amino- und Methylsubstituenten.

2.3.2. Temperatur

2.3.2.1. Temperatureinfluß auf biochemische Reaktionen

Die Temperatur als Maß für die kinetische Energie der Teilchen beeinflußt in mehrfacher Hinsicht die Kinetik der chemischen Reaktionen, die in ihrer Gesamtheit Leben ermöglichen. Gemessen an der absoluten Temperaturskala finden biochemische Reaktionen bei relativ

niedrigen Absoluttemperaturen statt, bei denen sie unter rein chemischen Bedingungen vielfach kaum ablaufen würden, da ihre Aktivierungsenergie sehr hoch liegt. Andererseits ist die Temperaturtoleranz der Strukturen des Lebens so gering, daß die Temperaturen, die unter rein chemischen Bedingungen diese Reaktionen ermöglichen würden, den Verlust der Funktionsfähigkeit dieser Strukturen zur Folge hätten. Die Zelle löst diesen Widerspruch durch den Einsatz von Enzymen, die durch ihre katalytische Aktivität die Aktivierungsenergie für die biochemischen Reaktionen so weit herabsetzen, daß Leben bei den niedrigen Absoluttemperaturen stattfinden kann, die aus der Sicht lebender Organismen als "normal" empfunden werden. Da die Zelle im Bereich zwischen der tolerierten Minimumtemperatur und der tolerierten Maximumtemperatur bekanntermaßen ein sehr breites Geschwindigkeitsspektrum für metabolische Prozesse realisiert, müssen offensichtlich in Anbetracht des an der absoluten Temperaturskala gemessenen sehr engen Toleranzbereiches bereits geringe Temperaturunterschiede verhältnismäßig große Aktivitätsunterschiede hervorrufen. Dieser Umstand entspricht der exponentiellen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur, die in der allgemein für chemische Reaktionen gültigen ARRHENIUS-Beziehung

$$v = A * \exp(-E_A/(R*T))$$

zum Ausdruck kommt. Demzufolge gibt es einen Temperaturbereich, in dem die Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen nach dieser Gleichung steigt, während oberhalb einer Optimumtemperatur zunehmend der Einfluß der Proteindenaturierung bestimmend wird und letztlich zum Funktionsverlust der Strukturen der Zelle führt.

Neben der Reaktionsgeschwindigkeit werden durch die Temperatur außerdem die Bindungskräfte beeinflusst, die den katalytisch aktiven Enzym-Substrat-Komplex realisieren. Dieser Komplex wird je nach Struktur von Enzym und Substrat über lockere Wechselwirkungskräfte realisiert, deren Bindungsenergien nicht mehr als eine Größenordnung höher liegen als die thermische Energie des Organismus selbst (WATSON, 1970). In Tabelle 3 sind die Bindungsenthalpien solcher Verknüpfungen dargestellt.

Die durchschnittliche thermische Energie der Moleküle wird bei Raumtemperatur mit 0,6 kcal/mol angegeben (HOCHACHKA und SOMERO, 1973). Demzufolge haben bereits geringe Temperaturunterschiede das Vermögen, solche lockeren Bindungen zu schaffen oder zu spalten und damit die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes zu beeinflussen. Darüber hinaus können sie Änderungen in der Geometrie des aktiven Zentrums selbst bzw. in höheren Ordnungen der Enzymstruktur bewirken, da auch diese über lockere Wechselwirkungskräfte stabilisiert werden.

Tabelle 3. Bindungsenthalpien lockerer Wechselwirkungskräfte (nach WATSON, 1970).

Bindungstyp	Bindungsenthalpie (kcal/mol)
van-der-Waals-Kräfte	-1
Wasserstoffbrückenbindungen	-(3...7)
ionische Wechselwirkungen	-5
hydrophobe Wechselwirkungen	1...3

Zur mathematischen Erfassung und praktischen Handhabung des Temperatureinflusses auf biologische Prozesse existiert neben der ARRHENIUS-Beziehung eine ganze Reihe von Modellen, die häufig empirischer Natur sind (z.B. RATKOWSKI et al., 1983; GIBSON et al., 1987; ZWIETERING et al., 1991; ROSSO et al., 1993, 1995).

Auch der Temperatureinfluß auf mikrobiell anaerobe Prozesse ist in natürlichen (z.B. ZEIKUS und WINFREY, 1976; KELLY und CHYNOWETH, 1981; CONRAD et al., 1987; SINKE et al., 1992) und technischen Systemen (z.B. CHEN et al., 1980; PUHAKKA et al., 1988; VIRARAGHAVAN und KIKKERI, 1990) ausführlich untersucht worden.

Gelegentlich wurde auch über eine Variation von metabolischen Sequenzen bei veränderlichen Temperaturen berichtet (WIEGEL et al., 1992; PERSSON und HAHN-HÄGERDAL, 1992).

2.3.2.2. Die metabolische Geschwindigkeitskompensation als Mechanismus zur Adaptation an die Umgebungstemperatur

Im Gegensatz zu vielen höheren Organismen (z.B. Säugetiere, Vögel) verfügen Mikroorganismen nicht über Mechanismen, die eine stabile Temperatur in der Zelle unabhängig von der Umgebungstemperatur gewährleisten. Diesbezüglich sind sie deshalb analog zu den ectothermen oder auch poikilothermen Organismen zu betrachten, zu denen auch die niederen Wirbeltiere und Wirbellosen zählen. Da bei sinkenden Temperaturen, wie sie sich beispielsweise aus den jahreszeitlichen Schwankungen ergeben, die Raten metabolischer Prozesse schnell unter die zur Lebenserhaltung notwendigen Werte fallen würden, haben diese Organismen im Laufe der Evolution Kompensationsmechanismen entwickelt, die den geschwindigkeitslimitierenden Einfluß niedriger Temperaturen mehr oder weniger stark ausgleichen können (metabolische Geschwindigkeitskompensation oder Temperaturkompensation). Für deren Realisierung kommen zwei wesentliche Prinzipien in Frage:

1. Erhöhung der Enzymkonzentration in der Zelle (quantitative Strategie)
2. Erhöhung der katalytischen Effizienz der Enzyme (qualitative Strategie)

Während der quantitativen Strategie ein bedeutendes Potential zugeschrieben wird, besitzt sie jedoch auch offensichtliche Grenzen. Erstens ist auf Grund der Temperaturempfindlichkeit der Enzymstruktur nicht anzunehmen, daß alle Enzyme bei der veränderten Temperatur unvermindert aktiv sind, zweitens erfordert die Enzymproduktion Energie, die die Zelle nicht unbeschränkt bereitstellen kann und drittens sind die Lösungsmittelkapazität der Zelle und die Anzahl der Bindungsstellen für membrangebundene Enzyme begrenzt.

Zum Verständnis der qualitativen Strategie ist die Betrachtung der Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes entscheidend. Frühere Vorstellungen beschreiben das Ausprägen dieser Komplexe nach dem "Schlüssel-Schloß"-Prinzip, welches das Enzym als starres Gebilde betrachtet und das Substrat als genau passendes Gegenstück. Der Temperatureinfluß auf die lockeren Wechselwirkungskräfte jedoch, die den Enzym-Substrat-Komplex und die höheren Ordnungen der Enzymstruktur selbst stabilisieren, führt dazu, daß bei verschiedenen Temperaturen unterschiedliche Konformationen ein und desselben Enzyms bzw. Enzym-Substrat-Komplexes existieren. Deshalb betrachtet man solche Bindungen besser als "Hand-Handschuh"-Effekte, wobei die endgültige und dennoch flexible Gestalt des "Handschuhs" (Enzym) sich erst nach der Einführung der "Hand" (Substrat) ergibt (HOCHACHKA und SOMERO, 1984). Die beibehaltene Flexibilität der Enzymstruktur wird als obligatorisch für alle Ereignisse bei der katalytischen Reaktion (Bindung des Substrates, Aktivierung des Enzym-Substrat-Komplexes, chemische Reaktion und Freigabe von Produkt und Enzym) angesehen. Dieser Flexibilität steht das Erfordernis nach struktureller Stabilität gegenüber. Unter der Annahme, daß eine höhere Temperatur festere oder eine höhere Anzahl lockerer Bindungen zur Stabilisierung der Struktur verlangt, läßt sich schlußfolgern, daß bei niedrigen Temperaturen die Flexibilität des Enzym-Substrat-Komplexes größer ist und weniger Energie zum Aufheben einmal geschaffener Bindungen notwendig ist. Die Bindung eines Substrates an ein Enzym ist auf Grund der besonderen Rolle von ionischen und Wasserstoffbrückenbindungen dabei in der Regel ein energetisch bevorzugter Prozeß (Tab. 3). Je mehr lockere Wechselwirkungskräfte am Zustandekommen des Komplexes beteiligt sind und je größer demzufolge seine Stabilität ist, desto mehr Energie ist erforderlich, um den Komplex in den aktivierten Zustand zu überführen. Die Aktivierungsenergie für ein und dieselbe biochemische Reaktion ist deshalb oft bei warm-adaptierten Organismen höher als bei kalt-adaptierten (HOCHACHKA und SOMERO, 1984).

Auf die Rolle der Enzymaffinität zu einem Substrat als regulierendem Parameter für die Aktivität eines Enzyms wurde bereits in den sechziger Jahren hingewiesen (CHANGEAUX, 1964; ATKINSON, 1966). Frühe Arbeiten zur Temperaturadaptation in poikilothermen Organismen ließen jedoch die Rolle der Substratkonzentration weitgehend unberücksichtigt

(LICHT, 1967; MUTCHMOR, 1967; READ, 1967; RASMUSSEN und RASMUSSEN, 1967), obwohl die Substratkonzentrationen *in vivo* meist weit unterhalb der Sättigung liegen und damit die Reaktionsgeschwindigkeit signifikant von der Affinität des Substrates zum Enzym beeinflusst werden.

Mit höherer Flexibilität des Enzym-Substrat-Komplexes bei niedrigen Temperaturen ist das Vermögen des Enzyms, Substrat und eventuell Cofaktoren zu binden sowie die Produkte der Reaktionen freizugeben, beschleunigt. Das findet seinen Ausdruck in einer erhöhten Affinität des Substrates zum Enzym. Für zahlreiche Enzyme ist tatsächlich ein Anstieg der K_S -Werte mit der Temperatur festgestellt worden. Viele Enzyme zeigten einen minimalen K_S -Wert im Bereich der Adaptationstemperatur der Zelle (HOCHACHKA und SOMERO, 1968). Bei Substratkonzentrationen unterhalb der Sättigung, also im normalerweise physiologisch relevanten Konzentrationsbereich, werden daher die Geschwindigkeitsunterschiede bei verschiedenen Temperaturen reduziert und sind kleiner, als man nach der ARRHENIUS-Beziehung erwarten müßte, wenn man die Abhängigkeit $v_{\max}(T)$ zugrunde legt (Bild 7). Je geringer die Substratkonzentration, desto stärker ist der ausgleichende Effekt und desto geringer wird der Q_{10} -Wert (HAZEL und PROSSER, 1974). Da bei Erreichen der Sättigungskonzentration das freie Enzym nicht mehr Substrat aufnehmen kann, ist hier der Effekt gleich Null, d.h. der Mechanismus der Temperaturkompensation durch Modifikation der Substrat-Enzym-Affinität kommt bei Substratsättigung nicht zum Tragen.

Dennoch wird diesem Mechanismus ein beträchtliches kompensatorisches Potential zugeschrieben. Einige Organismen sind in der Lage, zur Anpassung an unterschiedliche Temperaturen mehrere Isozyme zu synthetisieren, für die unterschiedliche genetische Informationen existieren. Jedoch realisiert die Mehrzahl der Organismen die Temperaturkompensation nicht über die Modifikation ihres genetischen Materials, zumal diese Prozesse sehr lange Zeiträume erfordern, sondern im wesentlichen über die Synthese von generell solchen Enzymen, deren strukturelle Konformation des Enzym-Substrat-Komplexes in hinsichtlich der Affinität vorteilhafter Weise durch Temperaturänderungen beeinflusst werden kann. Dies erlaubt ein flexibleres Reagieren auf Temperaturschwankungen, als das durch die Festlegung im genetischen Material möglich wäre und ist daneben wesentlich schneller als die Prozesse, auf denen die quantitative Strategie der Temperaturkompensation (Erhöhung der Konzentration von Enzymen) beruht (HOCHACHKA und SOMERO, 1973). Einen umfangreichen Literaturüberblick über kompensierende Enzyme gaben bereits HAZEL und PROSSER, 1974.

In Auswertung dieser und weiterer Daten wurde festgestellt, daß in komplexen Organismen nicht alle Enzyme gleichermaßen kompensierend auf niedrige Temperaturen reagieren, sondern daß es auch nicht- und negativ-kompensierende Enzyme gibt (PROSSER, 1986). Letztere sind meist mit Abbau- oder Lyseprozessen in der Zelle verbunden. Ein Beispiel ist Lysozym.

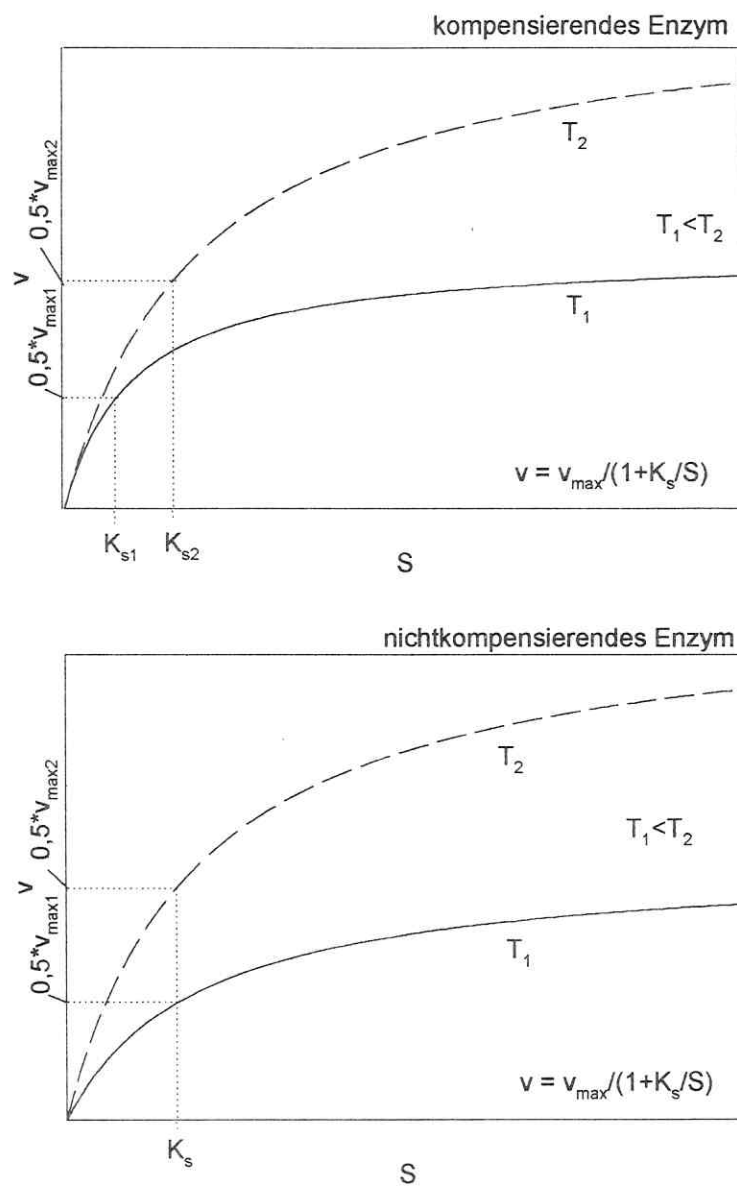


Bild 7. Einfluß des K_s -Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratkonzentrationen unterhalb der Sättigung mit und ohne Temperaturkompensation.

Die positiv kompensierenden Enzyme kommen meist in den Prozessen des Zellaufbaus und der Energiegewinnung vor (z.B. Enzyme der Glykolyse und Glukoneogenese, des Citratzyklus, des Elektronentransports und der Proteinsynthese).

Auch in Mikroorganismen ist das Prinzip der Temperaturkompensation weitverbreitet, wie vielfach belegt ist (z.B. LAUDELOUT und TICHELEN, 1960; KNOWLES et al., 1965; KRAUS, 1971; PAULE, 1971; NOVAK, 1974; HUG und HUNTER, 1974a). Durch weitere Untersuchungen wurde dabei speziell auf die Bedeutung niedriger Substratkonzentrationen hingewiesen (HUG und HUNTER, 1974b; WESTERMANN et al., 1989).

Mechanismen der Temperaturkompensation sind jedoch nicht ausschließlich auf das Niveau der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen beschränkt, sondern umfassen auch Membranprozesse. Die Beibehaltung eines speziellen Status der Membranviskosität und Fluidität bei Temperaturdifferenzen kann kritisch sein. Deshalb existiert ein ausgleichender Mechanismus, der durch den Einbau erhöhter Konzentrationen ungesättigter Lipide in Membranstrukturen eine konstante Viskosität ermöglicht. Dabei erfolgt eine Herabsetzung der Übergangstemperatur der Membran durch eine Fluid-Gel-Transformation. Dieser Mechanismus der "homeoviskosen Adaptation" ist sowohl bei Tieren, Pflanzen als auch bei Mikroorganismen gefunden worden (HOCHACHKA und SOMERO, 1984) und hat nachweislich metabolische Konsequenzen (CARPENTER et al., 1995).

2.3.2.3. Temperatureinfluß auf die inhibitorische Wirkung toxischer Substanzen

Allgemeingültige Temperatur-Inhibierungsbeziehungen zu definieren, ist kompliziert, da die Einflüsse sehr vielfältig sind. Einerseits beeinflusst die Temperatur nicht nur die Geschwindigkeit von Enzymreaktionen, sondern auch die Geschwindigkeit von Aufnahme und Ausstoß inhibierender Verbindungen (ABEL, 1989), andererseits können toxische Stoffe die Temperaturentoleranzgrenzen von Organismen verschieben (duPREEZ et al., 1987). SPARGUE, 1970 postulierte, daß die Temperatur die Geschwindigkeit des Reagierens eines Organismus auf ein Gift beeinflusst, aber nicht die akute lethale Konzentration, was jedoch durch die Mehrzahl der Untersuchungen nicht bestätigt wurde. Eine umfangreiche Literaturübersicht zu Temperatur-Toxizitätsdaten veröffentlichten CAIRNS et al., 1975. Diese enthält Angaben zur Toxizität von Ammonium, Cyanid, Schwermetallen, Pestiziden, Herbiziden, chlorierten Kohlenwasserstoffen, organischen Phosphorverbindungen, Chlor und Detergenzien auf Fische sowie zum Einfluß von pH-Unterschieden, Chlor, Metallen und Antibiotika auf Mikroorganismen bei unterschiedlichen Temperaturen. Obwohl die Autoren vor einer Verallgemeinerung warnen, läßt die überwiegende Mehrzahl der dargestellten Ergebnisse bei steigender Temperatur ein Sinken der LC-50-Werte, also eine steigende Toxizität erkennen. Die Autoren führen diese Tendenz auf eine beschleunigte Aufnahme des Inhibitors in die Zelle bei höheren Temperatu-

ren zurück, da die Permeabilität der Zellmembran mit der Temperatur steigt. Daher sollte in der Mehrzahl der Fälle eine positive Temperatur-Toxizitäts-Korrelation zu erwarten sein. Auch spätere Untersuchungen bestätigten diese Tendenz (z.B. DUANGSAWADSI und KLAVERKAMP, 1979; SMITH und HEATH, 1979; FELTS und HEATH, 1984; KHANGAROT und RAY, 1987).

Alle bisher unter diesem Aspekt diskutierten Untersuchungen lassen den Fall der Hemmung durch ein Überschußsubstrat unberücksichtigt. In den klassischen Toxizitätstests ist die Meßgröße immer ein leicht zugänglicher Summenparameter, der Auskunft über das Allgemeinbefinden des Testorganismus gibt, ohne daß die Hemmung bestimmter Stoffwechselprozesse im einzelnen untersucht werden kann. Weiterhin wird im Rahmen dieser Tests hauptsächlich die Toxizität solcher Verbindungen untersucht, die den Lebensprozeß der jeweiligen Organismen in ihrer natürlichen Umgebung zwar beeinträchtigen können, ohne daß diese Substanzen aber für den Organismus selbst von essentieller Bedeutung sind. Wenn vom abwassertechnischen Standpunkt jedoch die Elimination von Schadstoffen in einem mikrobiellen Abbauprozess angestrebt wird, so steht oft gerade die Degradation der Substanzen im Mittelpunkt, die von den Mikroorganismen gleichzeitig zur Regeneration ihrer Zellsubstanz benötigt werden. Handelt es sich dabei um inhibierende Substrate, so beruht der Erfolg des Abbauprozesses auf der Ausprägung eines katalytisch aktiven Komplexes zwischen Enzym und Inhibitor. In der Literatur existieren jedoch keine Angaben zum Einfluß der Temperatur auf den K_t -Wert beim mikrobiellen Abbau von Phenol.

2.4. Ableitung der Zielstellung

Zusammenfassend lassen sich aus den bisher dargestellten inhaltlichen Schwerpunkten folgende Aussagen zur Rolle geschwindigkeitslimitierender Einflußgrößen beim Schadstoffabbau in phenolischen Deponiewässern treffen:

In vielen Fällen sind natürliche Selbstreinigungsprozesse kontaminierter Habitate durch das Zusammenwirken mehrerer geschwindigkeitslimitierender Einflüsse beeinträchtigt. Phenolische Wässer unterliegen im Laufe ihrer Langzeitlagerung stofflichen Veränderungen, die zur Bildung hochmolekularer Autoxidationsprodukte führen. Von diesen Verbindungen sowie von den phenolischen Monomeren kann eine inhibierende Wirkung ausgehen. Oft besteht eine Sauerstofflimitation, so daß für biologische Abbauprozesse ausschließlich das Potential anaerober Mikroorganismen zur Verfügung steht. Schließlich werden metabolische Prozesse in vielen Fällen durch das Vorherrschen niedriger Temperaturen in ihrer Geschwindigkeit begrenzt.

Die sich beim Autoxidationsprozeß phenolischer Verbindungen bildenden huminartigen Strukturen gelten unter methanogenen Bedingungen als schwer abbaubar und begrenzen

somit den Selbstreinigungsprozeß solcher Wässer. Die von extrazellulären Phenoloxidasen der Weißfäulepilze und einiger Pflanzen genutzten Radikalreaktionen erfordern molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid und laufen im anaeroben Milieu nicht ab. Im einzelnen ist jedoch die Bedeutung des zur Verfügung stehenden Elektronenakzeptors für die Abbaubarkeit solcher Verbindungen nicht untersucht worden.

Die inhibierenden Wirkungen phenolischer Autoxidationsprodukte sind ansatzweise im Rahmen der Tanninproblematik betrachtet worden. Generell wurde eine starke Hemmung methanogener Abbauprozesse durch oligomere Autoxidationsprodukte phenolischer Verbindungen beobachtet, während hochmolekulare polymere Strukturen die Methanogenese nicht beeinflussten. Als Grenze des toxischen Bereiches wurde ein Molekulargewicht von ca. 3000 g/mol angegeben. Aussagen zum Einfluß der Struktur des Ausgangsstoffes der Autoxidation sowie zum Einfluß der Autoxidationsdauer fehlen weitgehend.

Der Temperatureinfluß und der Einfluß inhibierender Substanzen wie z.B. Phenol auf die Geschwindigkeit des mikrobiellen Schadstoffabbaus sind getrennt voneinander ausführlich untersucht worden (vgl. Abschnitt 2.3.1. und 2.3.2.). Jedoch ergibt sich im Hinblick auf das gemeinsame Vorliegen inhibierender Effekte und niedriger Temperaturen in kontaminierten Ökosystemen die Frage, inwiefern aus der Kenntnis der Einzelabhängigkeiten auf die Verhältnisse in kontaminierten Habitaten geschlossen werden kann bzw. ob der Umweltfaktor Temperatur die Toxizitätsgrenzen eines Schadstoffes beeinflusst. Das Zusammenwirken beider Einflüsse wurde im wesentlichen nur für Inhibitoren untersucht, deren Degradation oder Transformation selbst nicht das Ziel und das Ergebnis des betrachteten Prozesses war und keine katalytisch aktiven Enzym-Inhibitor-Komplexe im Prozeß eine Rolle spielten. Diese Arbeiten widerspiegeln in der Regel eine positive Temperatur-Inhibierungs-Korrelation, d.h. ein Ansteigen der Toxizität mit der Temperatur. Der Effekt der Temperatur auf die Intensität einer Substrathemmung, wurde bislang bei mikrobiellen Abbauprozessen nicht untersucht, spielt aber in Bezug auf die Degradation toxischer Verbindungen eine entscheidende Rolle.

Aus diesen Betrachtungen leiteten sich für die vorliegende Arbeit folgende Ziele ab:

Vor dem Hintergrund einer möglichen Hemmung mikrobieller Selbstreinigungsprozesse in anaeroben phenolischen Deponiewässern soll die inhibitorische Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte auf den methanogenen Abbau von Phenol und Acetat näher betrachtet werden. Die Beeinflussung der Methanbildungsraten beim Abbau dieser beiden Substrate soll Aussagen zur Empfindlichkeit verschiedener an der Methanbildung beteiligter Mikroorganismengruppen und einzelner Stoffwechselschritte des anaeroben Phenolabbaus gegenüber phenolischen Autoxidationsprodukten ermöglichen. Die Wahl von Phenol als Modellsubstrat entspricht dabei seiner Rolle als Hauptkontaminant in phenolischen Deponiewässern. Acetat fällt

intermediär beim Phenolabbau an und fungiert als Substrat für die methanogenen Mikroorganismen, die für das Funktionieren des Abbauprozesses in seiner Gesamtheit bedeutsam sind. Als Modellschubstanzen für Autoxidationsprodukte in phenolischen Deponiewässern werden phenolische Autoxidate synthetisch erzeugt. Ausgangsstoffe für die Autoxidation sind mehrfach hydroxylierte Phenole, methylierte und aminierte Phenole sowie definierte Gemische. Dabei sind besonders Abhängigkeiten der Toxizität von der Struktur des Ausgangsstoffes und von der Dauer der Autoxidation von Interesse. Daneben sind Aussagen zur Reversibilität der Inhibierung und zum Einfluß der Molekülgröße auf die Intensität der Inhibierung anzustreben. Über die Einschätzung der Beeinträchtigung von Selbstreinigungsprozessen hinaus könnten die Untersuchungen zum inhibitorischen Potential phenolischer Autoxidationsprodukte auch für die technische Behandlung von Phenolabwässern, in denen sich bereits solche Verbindungen gebildet haben, interessant sein.

Im Hinblick auf die Intensivierung des natürlichen Selbstreinigungspotentials in phenolisch kontaminierten Habitaten ist zu untersuchen, welche Bedeutung der zur Verfügung stehende Elektronenakzeptor für die mikrobielle Abbaubarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte hat und ob z.B. in der Methode der Nitratdosierung in Sedimente oder offene Deponieseen ein geeignetes Verfahren zur *in situ* Sanierung von mit phenolischen Autoxidationsprodukten verunreinigten Wässern gesehen werden kann. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollen zur Diskussion dieser Methode bezüglich ihrer Anwendbarkeit in technischen Abwasserreinigungsanlagen herangezogen werden. Die verstärkte Berücksichtigung anaerober Prozesse ergibt sich dabei aus ökonomischen Überlegungen und aus der Möglichkeit der parallel ablaufenden Autoxidation von Phenolen in einem aeroben Abbauprozess. Diese Fragestellung soll anhand von Modellschubstanzen sowie mit dem komplexen huminstoffreichen Schwelwasser der Deponie Schwelvollert bearbeitet werden. Die Beeinflussung der Intensität inhibierender Wirkungen von Schadstoffen auf den Abbau von Phenol durch den Umweltfaktor Temperatur soll anhand mikrobieller Mischpopulationen (anaerob, aerob) untersucht werden. Als Inhibitoren werden zum einen Nickel und zum anderen das Substrat Phenol im Überschuß gewählt. Dabei entspricht Nickel einem Inhibitor, der nicht durch die Bildung katalytisch aktiver Enzym-Inhibitor-Komplexe hinsichtlich des Phenolabbaus charakterisiert ist. Für diesen Fall lassen sich die zu findenden Temperatur-Inhibierungstendenzen mit Literaturangaben vergleichen. Phenol repräsentiert dagegen einen Inhibitor, der gleichzeitig als Substrat fungiert, was die Ausprägung eines katalytisch aktiven Enzym-Inhibitor-Komplexes erfordert, wobei über Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen in diesem Fall keine Literaturangaben verfügbar sind. Die Auswirkungen der gefundenen Beziehungen insbesondere auf Selbstreinigungsprozesse in kontaminierten Habitaten bei niedrigen Temperaturen sind zu diskutieren.

Die experimentelle Bearbeitung dieser Zielstellung soll in vier Abschnitten erfolgen:

1. Untersuchung des inhibitorischen Potentials phenolischer Autoxidationsprodukte auf methanogene Abbauprozesse
2. Bedeutung unterschiedlicher Elektronenakzeptoren für die Abbaubarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte
3. Mikrobiell anaerobe Behandlung von Schwelvollertwasser im Labormaßstab
4. Untersuchung von Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen beim mikrobiellen Phenolabbau

Abschließend werden die Ergebnisse der Modellexperimente sowie die mit Proben des Schwelvollertsees erhaltenen Erkenntnisse in ihrer übergreifenden Bedeutung diskutiert.

3. Material und Methoden

3.1. Präparation und Molekülgrößenfraktionierung von phenolischen Autoxidationsprodukten

3.1.1. Präparation

Als Ausgangsstoffe für die Gewinnung phenolischer Autoxidationsprodukte wurden Chemikalien der Fa. Merck (p.A.) verwendet. Autoxidationslösungen wurden von Phenol, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol, Phloroglucin, 4-Methylbrenzkatechin, 3-Aminophenol und 2,4-Diaminophenol hergestellt. Zur Autoxidation wurden 400 ml einer 0,3 molaren wäßrigen Lösung der Substanz (Phloroglucin nur 0,1 M) in unverschlossenen 500 ml-Erlenmeyerkolben bei ca. 100 min^{-1} mittels Magnetrührern gerührt. Zur Beschleunigung der Autoxidationsreaktion wurde der pH-Wert mit konzentrierter Natronlauge auf 12,0 eingestellt und während der Reaktion einmal täglich kontrolliert sowie bei Bedarf nachgestellt. Einige der phenolischen Verbindungen zeigten bereits unmittelbar bei pH-Werteinstellung eine Braunfärbung, die sich mit zunehmender Reaktionszeit vertiefte. Aus den Reaktionsansätzen wurden nach 1, 3, 7, 21, 42 und 90 Tagen (für einige Experimente nach 10 Tagen) Proben entnommen und in 100-ml-Blutkonservenflaschen aufbewahrt. Der pH-Wert dieser Proben wurde mit Phosphorsäure auf 7,0 eingestellt. Um eine weitere Autoxidation auszuschließen, wurden die Proben ca. 3 min mit Stickstoff (Reinheit 5.0, Fa. Linde) begast und in der gasdicht verschlossenen Blutkonservenflasche bei 4-8°C im Dunkeln gelagert.

3.1.2. Fraktionierung phenolischer Autoxidationsprodukte mittels Ultrafiltration und Dialyse

Bei der Autoxidation der phenolischen Verbindungen entstehen aufgrund des ungeordneten Charakters der Reaktion Gemische von Substanzen, die sich in ihrer Struktur und Molekülgröße in der Weise unterscheiden, daß eine genaue Aufklärung der gebildeten Strukturen nicht möglich ist. Eine Variante der Klassifizierung von Substanzen, die bei der Autoxidation gebildet werden, besteht in der Unterteilung nach ihrer Molekülgröße.

Um Präparate mit definierten Molekülgrößenbereichen zu erhalten, wurden die Reaktionsgemische für die Untersuchungen zur Degradation von phenolischen Autoxidationsprodukten mittels Ultrafiltration fraktioniert. Die Trennschnitte lagen bei 0,3 μm , 10 kD, 3 kD, 1 kD und bei einigen Untersuchungen auch bei 0,5 kD. Es fanden Ultrafiltrationseinheiten (300 bzw.

400 ml Inhalt) sowie Filtermaterial (d=76 mm) der Fa. Amicon Verwendung. Gewöhnlich wurden die Reaktionsgemische vor der Filtration im Verhältnis 1:10 mit dest. Wasser verdünnt, da dies die Lebensdauer der Filter erhöhte. Der zur Filtration erforderliche Druck (1-3 bar) wurde mit Stickstoff (Reinheit 5.0, Fa. Linde) erzeugt.

Zur Definierung einer unteren Molekülgrößengrenze wurde versucht, die Ultrafiltrationsmethode einer Dialysestufe nachzuschalten. Dabei wurden Dialyseschläuche der Fa. Spectrum mit Porenweiten von 1 bzw. 10 kD verwendet. Die Dialyse der 1:10 verdünnten Autoxidationslösungen erfolgte bis zum vollständigen Herauslösen der niedermolekularen Verbindungen im Wasserbad. Das Wasser wurde mehrmals täglich gewechselt. Die Vollständigkeit des Stoffübergangs wurde anhand von nicht mehr veränderlichen UV-VIS-Spektren (Abschnitt 3.4.2.) bestimmt. Jedoch erwies sich die Anwendung der Dialysetechnik zur Fraktionierung von Autoxidationslösungen phenolischer Verbindungen insofern als problematisch, da eine Sorption von Verbindungen an den Dialyseschlauch beobachtet wurde, die durch Waschen mit Wasser nicht aufzuheben war. Nach der Benutzung blieb das Schlauchmaterial irreversibel braun gefärbt. Um zu gewährleisten, daß nicht durch die vorbereitende Aufarbeitung des Autoxidationsgemisches schon repräsentative Bestandteile aus dem Reaktionsgemisch entfernt wurden, wurde für alle praktischen Untersuchungen daher die Molekulargewichtsfractionierung nur mittels Ultrafiltration bei bekannten oberen Trenngrenzen durchgeführt.

3.2. Gewinnung von Anreicherungskulturen

3.2.1. Gewinnung von methanogenen phenol- und acetatabbauenden Kulturen

3.2.1.1. Inoculum

Phenol- und acetatabbauende Mischpopulationen wurden für Untersuchungen zur Toxizität von phenolischen Autoxidationsprodukten bei der anaeroben Behandlung von phenolischen Deponiewässern benötigt. Als Animpfmaterial zur Anreicherung dieser Populationen diente Flußsediment der Weißen Elster bei Kleindalzig (ca. 20 km südlich von Leipzig). Auf Grund der Kontamination des Flusses mit Abwässern angrenzender Industriebetriebe war bereits eine Adaptation der Sedimentpopulation an phenolische Verbindungen zu vermuten. Nach der Entnahme wurde das Sediment in einem luftdicht abgeschlossenen Faß bei 4-8°C aufbewahrt.

3.2.1.2. Nährmedium

Zur Anreicherung phenol- und acetatabbauender methanogener Mischkulturen wurde folgendes Mineralsalzmedium verwendet:

NaCl	900 mg/l
NH ₄ Cl	1000 mg/l
MgCl ₂ *6H ₂ O	200 mg/l
CaCl ₂ *6H ₂ O	100 mg/l
Spurensalzlösung	10 ml/l
KH ₂ PO ₄	325 mg/l
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	725 mg/l
NaHCO ₃	600 mg/l

Die Spurensalzlösung hatte folgende Zusammensetzung:

EDTA-Na	100 mg/l
FeSO ₄ *7H ₂ O	100 mg/l
MnCl ₂ *7H ₂ O	100 mg/l
CoCl ₂ *6H ₂ O	170 mg/l
ZnCl ₂	100 mg/l
CuCl ₂ *5H ₂ O	20 mg/l
NiCl ₂ *6H ₂ O	30 mg/l
H ₃ BO ₃	10 mg/l
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	10 mg/l
Na ₂ SeO ₃	1 mg/l
konzentrierte HCl	3 ml/l

Als alleinige Kohlenstoffquelle für die acetoclastische Anreicherungskultur diente Natriumacetat (p.A., Fa. Riedel-de Haen) in einer Konzentration von 20 mmol/l; als einzige Kohlenstoffquelle für die phenolabbauende Anreicherungskultur diente Phenol (p.A., VEB Berlin-Chemie) in einer Konzentration von 1 mmol/l.

3.2.1.3. Kultivierungsbedingungen

Die Anreicherung der methanogenen Populationen erfolgte in 5-Liter-Weithalsflaschen, die mit Gummistopfen verschlossen wurden. Die das jeweilige Kohlenstoffsubstrat enthaltende

Mineralsalzlösung wurde mit 10 Vol-% Elstersediment als Inoculum angeimpft. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und die Flaschen in Magnetrühr-Wasserbädern "Rototherm 5" (Fa. Dinkelberg Labortechnik) bei einer Rührerdrehzahl von ca. 50 min^{-1} auf 30°C temperiert. Um Lichteinfall zu vermeiden, wurden die Wasserbäder mit Platten abgedeckt.

Die Kultivierung erfolgte unter sauerstofffreier Stickstoffatmosphäre (Stickstoff der Reinheit 5.0, Fa. Linde) unter anfänglichem Zusatz von ca. $0,2 \text{ g/l}$ Natriumsulfid-Hydrat (reinst, 35% Na_2S , Fa. MERCK) als reduzierender Substanz (nach OWEN et al., 1979). Auf die Anwendung eines Redoxindikators (Resazurin) nach SHELTON und TIEDJE, 1984 wurde verzichtet. Generell wurde eine stetige Methanbildung bei der Anreicherung als Beleg für ein ausreichend niedriges Redoxpotential im System angesehen.

Das entstehende Biogas wurde über eine Schlauchverbindung in eine Waschflasche mit Wasser eingeleitet. Eine zweite Schlauchverbindung ermöglichte zeitlich begrenzt das Auffangen des Biogases in einer 50-ml-Spritze mit Glaskolben, so daß sowohl die Gasbildungsrate als auch der Methananteil des Biogases bestimmt werden konnte. Das Umschalten zwischen beiden Schlauchanschlüssen wurde über einen Dreiwegehahn realisiert. Anhand des in einem bestimmten Zeitraum gebildeten Biogasvolumens wurde der Zeitpunkt für die Substratnachdosierung festgelegt. Im Zweifelsfall wurden zusätzliche Phenol- oder DOC-Analysen zur Entscheidung herangezogen, wobei die Proben vor der Analyse ca. 10 min bei 10000 min^{-1} zentrifugiert wurden.

Substratmangel von bis zu zwei Wochen, dessen Ausnutzung sogar für die Durchführung anaerober Abbautests vorgeschlagen wurde (BIRCH et al., 1989), wurde von den Organismen problemlos toleriert. Da jedoch für Toxizitätsuntersuchungen ein physiologisch optimaler Zustand der Testorganismen anzustreben ist, wurden für diese Zwecke generell Organismen zu einem Zeitpunkt verwendet, zu dem das Kohlenstoffsubstrat noch nicht vollständig verbraucht war.

3.2.2. Gewinnung von Kulturen zum Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte

3.2.2.1. Inocula

Als Inoculum für die Untersuchungen zum anaeroben Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte wurde eine Anaerobkultur aus einem Bioreaktor für phenolische Abwässer benutzt (Universität Waterloo, Ontario, Canada). Diese Kultur wurde unter Stickstoff im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Parallel zu den Anaerobexperimenten wurde die Elimination phenolischer Autoxidationsprodukte auch unter aeroben Bedingungen untersucht. Als Animpfmateriale für diese Versuche diente Belebtschlamm aus der kommunalen Kläranlage Waterloo.

Die Anaerobkultur war lagerfähig, wohingegen der Belebtschlamm frisch verwendet werden mußte.

3.2.2.2. Nährmedium

Das in diesen Experimenten eingesetzte Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl	2000 mg/l
NH ₄ Cl	500 mg/l
CaCl ₂ *6H ₂ O	300 mg/l
MgCl ₂ *6H ₂ O	800 mg/l
KH ₂ PO ₄	700 mg/l
KCl	600 mg/l
MgSO ₄	50 mg/l
NaHCO ₃	4000 mg/l
Spurensalzlösung	10 ml/l

Die Spurensalzlösung hatte die Zusammensetzung nach Abschnitt 3.2.1.2.

Die Anaerobkultivierung wurde in verschiedenen Varianten derart durchgeführt, daß den Organismen unterschiedliche Elektronenakzeptoren für die Atmungskette angeboten wurden. Auf diese Weise sollte das selektive Wachstum von nitratreduzierenden, sulfatreduzierenden und methanogenen Mikroorganismen gefördert werden. Die Versuchsansätze unter nitratreduzierenden Bedingungen enthielten dementsprechend 1g/l KNO₃, die Ansätze unter sulfatreduzierenden Bedingungen 1 g/l Na₂SO₄ und die methanogenen Ansätze keine weiteren Zugaben.

Als Kohlenstoffquellen wurden dem Mineralsalzmedium Autoxidationslösungen von Brenzkatechin (125 mg/l DOC) und Resorcin (145 mg/l DOC) zugesetzt (Herstellung der Lösungen nach Abschnitt 3.1.1. bei einer Autoxidationszeit von 10 Tagen).

3.2.2.3. Kultivierungsbedingungen

Die Anreicherung der jeweiligen Mikroorganismenpopulation erfolgte durch Semi-batch-Kultivierung mit teilweisem und häufigem Austausch des Kulturmediums gegen frische

Nährlösung, in der das Kohlenstoffsubstrat in der entsprechenden Konzentration gelöst war. Die Anaerobkultivierung wurde mit 400-ml-Kulturvolumen in 500-ml-WHEATON-Flaschen durchgeführt, die mit Gummistopfen und Schraubverschlüssen gasdicht verschlossen wurden. Der Volumenanteil des Anaerobschlammes betrug 10 % des Kulturvolumens. Zur Realisierung anaerober Bedingungen erfolgte die Kultivierung unter Stickstoffatmosphäre sowie unter Zusatz von ca. 0,2 g/l Natriumsulfid.

Die Aerobkulturen wurden mit 200 ml Kulturvolumen und einem Volumenanteil des Belebtschlammes von 5 % in 500-ml-Erlenmeyerkolben angesetzt und mit 100 min^{-1} geschüttelt.

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert. Der Modus der Probenahme und Nachdosierung realisierte eine durchschnittliche hydraulische Verweilzeit von 10 Tagen, wobei die Probenahme aus dem klaren Überstand der Kulturen erfolgte, so daß die Biomasse nicht aus dem System ausgetragen wurde. Dieses Vorgehen war auf Grund des langsamen Wachstums der Organismen auf den angebotenen Substraten erforderlich. Nach ca. 6 bis 8 Wochen hatten sich pseudostationäre Bedingungen eingestellt, was dadurch angezeigt wurde, daß sich die Ablauf-DOC-Werte, die nach Zentrifugation der Proben erhalten wurden, über die Zeit nicht mehr wesentlich änderten (Schwankungen <10 %).

3.2.3. Gewinnung von Kulturen zur anaeroben Behandlung von Schwelvollertwasser

3.2.3.1. Inoculum

Als Animpfmateriel für die Untersuchungen zur anaeroben Behandlung von Schwelvollertwasser wurde das bereits im Abschnitt 3.2.1.1. beschriebene Flußsediment der Weißen Elster benutzt.

3.2.3.2. Nährmedium

Das in diesen Versuchen zum Einsatz gekommene Mineralsalzmedium wurde bereits im Abschnitt 3.2.2.2. aufgeführt. Hier wurde das Medium jedoch im Verhältnis 1:1 mit Schwelvollertwasser (Wasser aus 20 m Tiefe) versetzt, dessen organische Inhaltsstoffe auf ihre Abbaubarkeit unter den jeweiligen Testbedingungen untersucht werden sollten. Auch hier wurden die Versuche in drei Varianten durchgeführt und der Einfluß alternativer Elektronenakzeptoren für die Atmungskette näher betrachtet. Dementsprechend enthielt die nitratreduzierende Kultur 1 g/l KNO_3 , die sulfatreduzierende Kultur 1 g/l Na_2SO_4 und die methanogene Kultur keine weiteren Zusätze.

3.2.3.3. Kultivierungsbedingungen

Die Untersuchungen zur anaeroben Fermentierbarkeit von Schwelvollertwasser wurden in 2-l-Blutkonservenflaschen bei einem Reaktionsvolumen von 1,5 Litern unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Der Ansatz der Kulturen erfolgte mit 10 Vol-% Animpfsediment. Auf eine Zudosierung von Natriumsulfid als reduzierender Substanz wurde in diesem Falle verzichtet, da das Schwelvollertwasser selbst reduzierende Eigenschaften besaß. Der angewandte Semi-batch-Modus realisierte eine durchschnittliche hydraulische Verweilzeit von 30 Tagen bei wöchentlichem anteiligem Austausch der Kulturflüssigkeit gegen frische Nährlösung mit 50 % Schwelvollertwasser. Die Inkubation erfolgte bei pH 7,0 und 30 °C.

Bis zum Erreichen pseudostationärer Zustände im System (angezeigt durch zeitlich stabile DOC-Ablaufwerte, Gasbildungsvolumina und Nitrat-/Sulfatkonzentrationen; Schwankung <12 %) vergingen bis zu 20 Wochen.

3.2.4. Gewinnung von Kulturen für Untersuchungen zum Zusammenwirken hoher Konzentrationen toxischer Verbindungen und niedriger Temperaturen

3.2.4.1. Inocula

Untersuchungen zum Zusammenwirken hoher Konzentrationen toxischer Verbindungen und niedriger Temperaturen wurden sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben (methanogenen) Bedingungen durchgeführt. Für die Versuche unter aeroben Bedingungen wurde Boden von einem Leipziger Gartengrundstück als Inoculum benutzt. Für die Anaerobversuche sollte auf Sedimente aus der Schwelwasserdeponie Schwelvollert zurückgegriffen werden. Mit einem Schlammgreifer wurde Sediment aus 27 m Tiefe sowie ein Sediment aus der Uferzone des Sees geborgen. Diese Sedimente wurden in luftdicht verschlossenen Kanistern im Dunkeln bei 4-8°C gelagert und vor Verwendung zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen, wobei durch ständiges Spühlen mit Stickstoff versucht wurde, möglichst den Luftkontakt gering zu halten.

3.2.4.2. Nährmedien

In den Untersuchungen zu Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen im aeroben Milieu kam das Mineralsalzmedium nach Abschnitt 3.2.2.2. zur Anwendung, während unter anaeroben Bedingungen auf das Medium nach Abschnitt 3.2.1.2. unter Zusatz von 0,2 g/l Natriumsulfid

zurückgegriffen wurde. Als einzige Kohlenstoffquelle wurde in beiden Fällen Phenol in einer Konzentration von 20 mg/l zugesetzt.

3.2.4.3. Kultivierungsbedingungen

Die Anreicherung der Aerobkultur erfolgte in 500-ml-Erlenmeyerkolben zunächst bei Raumtemperatur unter Rühren bei 100 min^{-1} . Nach dem Verbrauch des Phenols wurde das Substrat mehrfach in der entsprechenden Konzentration nachdosiert und die Kultur im Verhältnis 1:10 in frisches Medium überimpft.

Versuche, aus dem Tiefensediment (27 m Tiefe) des Schwelvollertsees eine anaerob Phenol abbauende Kultur anzureichern, schlugen fehl. Jedoch gelang eine Anreicherung aus dem Uferzonensediment. Zur Erlangung einer hohen Biomassekonzentration wurde nach dem Verbrauch des Substrates die entsprechende Konzentration (20 mg/l) neu eingestellt. Mehrere Überimpfungen in frisches Nährmedium erfolgten hier nach jeweils 5 bis 10 Nachdosierungen im Verhältnis 1:5. Die Anreicherung der Anaerobkultur erfolgte in 1-l-Blutkonservenflaschen. Nach mehreren Passagen wurden sowohl die Aerob- als auch die Anaerobkultur auf kleinere Ansätze verteilt (200 ml) und bei den jeweiligen späteren Versuchstemperaturen, die im Bereich zwischen 12 und 35°C lagen, bis zum Versuchsbeginn vorinkubiert.

Die Phenolkonzentration wurde während der Anreicherungsperiode photometrisch im Wellenlängenbereich zwischen 240 und 300 nm (Abschnitt 3.4.2.) bestimmt. Die Proben wurden vor der Messung bei 10000 min^{-1} 10 min lang zentrifugiert. Der pH-Wert betrug in allen Ansätzen 7,0.

3.3. Beschreibung der experimentellen Arbeiten

3.3.1. Untersuchungen zur inhibierenden Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte auf den Abbau von Acetat und Phenol unter methanogenen Bedingungen

In der Regel untersuchen Toxizitätstests, die unter methanogenen Bedingungen erfolgen, die Hemmung des allgemeinen Faulprozesses oder des Fettsäureabbaus. Beim häufig angewandten Anaerobic Toxicity Assay (ATA) werden im allgemeinen Gemische aus Acetat und Propionat als Referenzsubstrat eingesetzt, wobei verschiedene Modifikationen existieren (z.B. FIELD und LETTINGA, 1987; WU et al., 1990; KENNEDY et al., 1992). In vielen Arbeiten wird auch der Einfluß des Inhibitors auf den Acetatabbau ermittelt, wobei selektiv die Wir-

kung auf methanogene Bakterien erfaßt wird (z.B. YANG und SPEECE, 1985, 1986; WANG et al., 1991). Die analytische Meßgröße all dieser Tests ist die Verringerung der Biogas- oder Methanbildungsrate in Gegenwart des Inhibitors. Relativ wenige Arbeiten befassen sich jedoch mit der Beeinflussung einzelner am methanogenen Abbau organischer Verbindungen beteiligter Bakteriengruppen oder mit der Hemmung des Abbaus spezifischer Substrate (COLLERAN et al., 1992; SOTO et al., 1993; FEDORAK und HRUDEY, 1984). Neuere Methoden erfassen dabei Methan- und Wasserstoffkonzentrationen in der wäßrigen und nicht mehr in der Gasphase (BENSTEAD et al., 1993).

Die Untersuchungen zum inhibierenden Einfluß phenolischer Autoxidationsprodukte richteten sich auf den Abbau von Acetat bzw. Phenol unter methanogenen Bedingungen und erfaßten damit unterschiedliche beteiligte Mikroorganismengruppen. Als analytische Meßgröße wurde die Hemmung der Methanbildungsrate bei Gegenwart des Inhibitors im Vergleich zum ungehemmten Ansatz herangezogen.

Die Experimente wurden in Blutkonservenflaschen mit Kulturvolumina von 50 ml beim Acetatabbau und 100 ml beim Phenolabbau durchgeführt. Als Inocula dienten 10 ml der acetatabbauenden bzw. 20 ml der phenolabbauenden Kultur (Abschnitt 3.2.1.). Die Substratkonzentrationen betrugen 20 mmol/l Natriumacetat bzw. 1 mmol/l Phenol. Die auf ihre inhibitorische Wirkung zu testenden phenolischen Autoxidationsprodukte (Abschnitt 3.1.1.) wurden in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 mg/l DOC eingesetzt. Zur Verdünnung bzw. Auffüllung des Kulturvolumens wurde physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) unter Zusatz von 1 ml/l konzentrierter Phosphorsäure zur Erhöhung der Pufferkapazität benutzt. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit Natronlauge auf 7,0 eingestellt. Vor dem Verschließen der Blutkonservenflaschen mit gasdichten Stopfen und Schraubkappen wurde das Kulturmedium mit Stickstoff (Reinheit 5.0, Fa. Linde) gespült und als reduzierendes Agens Natriumsulfid (ca. 0,2 g/l) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Die Bestimmung des entstandenen Biogasvolumens wurde bei den acetatabbauenden Ansätzen in der Regel zweimal täglich, bei den phenolabbauenden Ansätzen im Abstand von ein bis zwei Tagen, wie im Abschnitt 3.4.6. beschrieben, durchgeführt. Der Methananteil im Biogas wurde gaschromatographisch bestimmt (Abschnitt 3.4.7.). Verschiedene Blindproben mit Substrat und ohne Inhibitor, ohne Substrat und ohne Inhibitor, ohne Substrat und mit Inhibitor (in jeder getesteten Inhibitorkonzentration) sowie mit Substrat und Inhibitor, aber ohne Inoculum wurden mitgeführt. Letztere Ansätze dienten zur Erfassung einer möglichen abiotischen Komplexbildung des Substrates durch die phenolischen Autoxidationsprodukte. In diesen Fällen wurde die Wiederfindung von Acetat und Phenol chromatographisch nach Abschnitt 3.4.11. bzw. Abschnitt 3.4.9. bestimmt. Die biologischen Testansätze mit Substrat wurden in zwei parallelen betrieben. Für die Auswertung der Daten wurde der Geschwindigkeitseinfluß der veränderlichen Acetat- bzw. Phenolkonzentration vernachlässigt. In allen Ansätzen, bei denen

die Abweichung der Methanbildungsraten in den Parallelproben $< 10 \%$ war, wurde die mittlere Methanbildungsrate bestimmt.

3.3.2. Experimente zum Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte

Die Experimente zum Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte wurden in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren durchgeführt (molekularer Sauerstoff, Nitrat, Sulfat, Carbonat). Dabei erfolgte die Versuchsdurchführung in denselben Kulturgefäßen und unter denselben Bedingungen wie die Anreicherung (Semi-batch-modus mit mittlerer Verweilzeit von 10 Tagen). Die Kultivierungsbedingungen sind im Abschnitt 3.2.2.3. eingehend beschrieben worden. Nach Erreichen pseudostationärer Zustände (erkennbar an stabilen DOC-Ablaufwerten über die Zeit) wurde mit der Aufnahme von experimentellen Daten begonnen.

Zur Ermittlung abiotischer Veränderungen wurden nichtangeimpfte Kontrollansätze mit Substraten, Elektronenakzeptoren und Nährsalzen analog zu den Kulturansätzen mitgeführt. Diese Kontrollansätze enthielten zur Unterdrückung biologischer Prozesse $0,2 \text{ g/l}$ Natriumazid und wurden analog zu den Kulturansätzen behandelt und beprobt.

Von den entnommenen Proben wurden nach Abzentrifugieren der Biomasse (10 min bei 10000 min^{-1}) mittels Ultrafiltration Molekülgrößenfraktionen hergestellt (Abschnitt 3.1.2), deren DOC anschließend bestimmt wurde. Die Trennschnitte lagen bei 1, 3 und 10 kD. Aus den DOC-Werten dreier zu einer Fraktion gehörender Filtrate wurde der Mittelwert bestimmt. Durch Subtraktion der DOC-Mittelwerte verschiedener Fraktionen voneinander war die Berechnung von DOC-Konzentrationen auch in Fraktionsgrenzen möglich, die sich mittels Ultrafiltration nicht in dieser Weise herstellen lassen (z.B. Fraktion von 1-3 kD), da bei der Präparation die untere Fraktionsgrenze immer 0 kD ist. Zur Bestimmung spezifischer Abbauraten wurde als Maß für die Biomassekonzentration die Proteinbestimmung nach BRADFORD, 1976 durchgeführt (Abschnitt 3.4.1.2.). Die zu verschiedenen Zeitpunkten realisierten Beprobungen ergaben Abbauraten für die einzelnen Molekülgrößenfraktionen, deren Mittelwerte graphisch dargestellt wurden.

3.3.3. Untersuchungen zur anaeroben Behandlung von Wasserproben der Schwelwasserdeponie Schwelvollert

3.3.3.1. Bestimmung biologischer Aktivitäten in Wasser- und Sedimentproben des Schwelvollertsees

Die im Abschnitt 1. angeführten gemessenen Lebendzellzahlen im Schwelvollertwasser ließen zumindest in den oberflächennahen Bereichen des Sees eine hohe biologische Aktivität vermuten. Auch deuteten die dort gemessenen Schadstoffkonzentrationen im Vergleich zu den Belastungen des Tiefenwassers bereits auf Abbauprozesse hin.

Da das Schwelvollertwasser ein hohes abiotisches sauerstoffzehrendes Potential aufwies und praktisch kein gelöster Sauerstoff im See nachzuweisen war, sollten ausschließlich anaerobe biologische Aktivitäten bestimmt werden. Dies erfolgte durch Tests auf die Reduktion von Nitrat und Sulfat sowie auf Methanbildung aus verschiedenen Wasser- und Sedimentproben. Die Experimente wurden in gasdicht verschlossenen 270-ml-Blutkonservenflaschen durchgeführt, wobei Schwelvollertsediment aus 27 m Tiefe bzw. Sediment aus der Uferzone in verschiedenen Anteilen mit einem Sediment der Weißen Elster gemischt wurde und mit insgesamt 10 Vol.-% in Mineralsalzmedium nach Abschnitt 3.2.1.2. bei 35°C und pH 7,0 inkubiert wurde. Die Ansätze zum Test auf Nitratreduktion enthielten 1 g/l KNO_3 , die Ansätze zum Test auf Sulfatreduktion 1 g/l Na_2SO_4 . Die Versuchsansätze zum Test auf Methanbildung enthielten keine weiteren Zusätze. Eine zusätzliche Kohlenstoffquelle wurde generell nicht zugegeben. Die Beprobung der Flaschen mit Nitrat- und Sulfatzusatz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten über ca. 3 Monate durchgeführt und erfolgte mit 5-ml-Spritzen und 0,9-mm-Kanülen (Durchmesser). Die Proben wurden bei 10000 min^{-1} 10 min lang zentrifugiert und anschließend mittels Ionenchromatographie auf ihre Nitrat- und Sulfatkonzentrationen hin untersucht (Abschnitt 3.4.10.). In den Ansätzen zum Test auf Methanbildung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten das entstandene Biogasvolumen ermittelt (Abschnitt 3.4.6.) und dessen Methangehalt gaschromatographisch bestimmt (Abschnitt 3.4.7.).

Der Test auf Methanbildung erfolgte ebenso in Proben mit unverdünntem Schwelvollertwasser aus 20 m Tiefe sowie von der Seeoberfläche (0 m). Da eine mögliche Phosphatlimitation erwogen worden war, wurde einigen Ansätzen 1 g/l KH_2PO_4 zugesetzt. Weiterhin enthielten einige Ansätze 20 mmol/l Natriumacetat als leicht verwertbare Kohlenstoffquelle.

Ein weiterer Schnelltest autochthoner Aktivität von Schwelvollertwasser (20 m und 0 m) bestand in der Untersuchung auf Befähigung der Proben zum Phenolabbau unter anaeroben Bedingungen. Phenol wurde in Konzentrationen von 20 und 100 mg/l zugegeben. Auf weitere Zugaben wurde verzichtet. Die Inkubation der Blutkonservenflaschen erfolgte zum einen bei

Seetemperatur (6 °C) und zum anderen im Brutschrank bei 35 °C. Die Phenolkonzentration wurde zu Versuchsbeginn und vor Abbruch der Versuche nach 3 Monaten gemessen, so daß nur qualitative Aussagen und keine Angaben zur Kinetik des Prozesses möglich waren. Die Bestimmung der Phenolkonzentration wurde photometrisch mit dem 4-Aminoantipyrinrest nach Abschnitt 3.4.4. durchgeführt. Zur Analyse war es auf Grund der starken Eigenfärbung des Schwelvollertwassers erforderlich, die Proben hinreichend zu verdünnen und die Eigenfärbung mittels separater Blindproben ohne Nachweisreagenz zu erfassen.

3.3.3.2. Biologisch anaerobe Behandlung von Schwelvollertwasser unter Zugabe verschiedener Elektronenakzeptoren

Behandlung und Beprobung der nitratreduzierenden, sulfatreduzierenden und methanogenen Ansätze zur Reinigung von Schwelvollerttiefenwasser (20 m) erfolgten analog zur Anreicherung, wie im Abschnitt 3.2.3.3. beschrieben wurde. Der Semi-batch-Modus mit einer durchschnittlichen hydraulischen Verweilzeit von 30 Tagen wurde auch in der experimentellen Phase beibehalten. Pseudostationäre Zustände stellten sich erst nach einigen Monaten ein. Danach wurde mit der analytischen Charakterisierung der Abbauprozesse begonnen. Vor dem Öffnen der Flaschen zur Probenahme wurde jeweils das innerhalb einer Woche entstandene Gasvolumen gemessen (Abschnitt 3.4.6.). Da auch die Schwankungen dieser Werte gering waren, deutete dies auf stabile Prozesse hin. Die Proben, die wöchentlich unter Stickstoff aus den Versuchsansätzen entnommen wurden, wurden zunächst bei 10000 min^{-1} 10 min lang zentrifugiert. Analytisch bestimmt wurden die Konzentrationen an Phenol, Kresolen und Xylenolen (mittels HPLC nach Abschnitt 3.4.8.), die Konzentrationen der Elektronenakzeptoren Nitrat und Sulfat (mittels Ionenchromatographie nach Abschnitt 3.4.10.) sowie der Gesamt-DOC der Probe als auch der ihrer Molekülgrößenfraktionen. Die Molekülgrößenfraktionen wurden wie im Abschnitt 3.1.2. beschrieben hergestellt. Die Trennschnitte lagen dabei bei 0,5, 3, 10 kD und 0,3 μm .

3.3.3.3. Methanogene Fermentierbarkeit und Toxizität von Schwelvollerttiefenwasser nach physiko-chemischer Vorbehandlung

Als Alternative zu einem rein biologischen Reinigungsprozeß sollte orientierend die Option überprüft werden, die biologisch anaerobe Behandlung einer physiko-chemischen Vorbehandlung nachzuschalten. Getestet wurde diese Option in einfachen statischen Experimenten. Als Vorbehandlungsmethoden wurden die Ultrafiltration über 3-kD- bzw. 0,5-kD-Filter, die Oxi-

dation mit Wasserstoffperoxid und ein Flockungs-/Fällungsprozeß mit Aluminiumchlorid angewendet.

Die Ultrafiltration erfolgte gemäß Abschnitt 3.1.2., wobei in mehreren Etappen filtriert wurde, bis die erforderliche Menge Filtrat für die Fermentations- und Toxizitätstests zur Verfügung stand. Das Filtrat wurde unter Stickstoff aufgefangen, um eine Autoxidation von Inhaltsstoffen zu vermeiden.

Die Oxidation mit Wasserstoffperoxid wurde durch Zugabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 (als 30 %-ige Lösung, Fa. MERCK) eingeleitet, das unter Rühren bei ca. 200 min^{-1} zugegeben wurde. Als Reaktionsgefäß diente eine 1-l-Blutkonservenflasche. Der vollständige Verbrauch des Wasserstoffperoxids wurde mittels MERCK-Teststäbchen nachgewiesen. Dies war erforderlich, da Restkonzentrationen an H_2O_2 die methanogenen Bakterien schädigten.

Die Flockung/Fällung wurde mit 6 mmol/l $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1-l-Blutkonservenflaschen durchgeführt. Unmittelbar nach Zugabe des Flockungsmittels, die unter Rühren bei ca. 200 min^{-1} erfolgte, setzte eine Fällung der huminartigen makromolekularen Verbindungen ein, was zu einer Aufhellung des Wassers führte. Nach Beendigung des Fällungsprozesses wurde der wäßrige Überstand mit einer Schlauchpumpe unter Stickstoffatmosphäre in ein weiteres Gefäß überführt, in dem die Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 mit Natronlauge erfolgte.

Von allen physiko-chemisch vorbehandelten Proben sowie von der unvorbehandelten Probe wurden der DOC (Abschnitt 3.4.5.) und als Maß für die Färbung die Extinktion bei 436 nm (Abschnitt 3.4.3.) bestimmt und die prozentuale Reduktion dieser Größen infolge der entsprechenden Behandlung ermittelt.

Weiterhin wurden die Proben auf ihre Fermentierbarkeit und Toxizität unter methanogenen Bedingungen getestet. Die Bestimmung der Toxizität erfolgte analog zum Abschnitt 3.3.1., wobei verschiedene Verdünnungen der Proben mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl), welche 1 ml/l konzentrierte Phosphorsäure enthielt und mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt worden war, angewendet wurden. Als Inoculum diente die unter Abschnitt 3.2.1. beschriebene methanogene acetatabbauende Anreicherungskultur mit 20 mmol/l Natriumacetat als Referenzsubstrat.

Für die Fermentationsversuche wurde auf aus der Literatur verfügbare Vorschläge zur Methodik zurückgegriffen (OWEN et al., 1979; BIRCH et al., 1989; STROTMANN et al., 1993). Die Animpfkultur für diese Experimente stammte aus Flußsediment der Weißen Elster bei Leipzig. Vor Beginn der Fermentationsversuche wurde das Sediment entsprechend vorbehandelt, um die Biogasbildung in den Blindproben, welche kein Abwasser enthielten, im Interesse einer hohen analytischen Genauigkeit gering zu halten. Das Sediment wurde unter Stickstoff (Reinheit 5.0, Fa. Linde) in Mineralsalzmedium nach Abschnitt 3.2.1.2. mit 10 Vol-% aufgeschlämmt und eine Woche lang bei 35 °C vorinkubiert. Dies hatte die Auszehrung im Sediment befindlicher leicht abbaubarer Substrate zur Folge und führte somit zu einer Reduktion der Hintergrundbiogasbildung. Nach einer Woche wurde unter Stickstoffatmosphäre der

wäßrige Überstand über der sedimentierten Biomasse mittels einer Schlauchpumpe entfernt und durch die Abwasserprobe ersetzt. Die Inkubation der Fermentationsansätze erfolgte über einen Zeitraum von 90 Tagen bei 35 °C. Als Kriterium für die Mineralisierung der Abwasserinhaltsstoffe wurde die quantitative Bildung von Biogas (Abschnitt 3.4.6.) im Vergleich zu Ansätzen ohne Abwasser herangezogen. Der prozentuale Abbau errechnete sich aus dem Verhältnis von Kohlenstoff im Biogas unter Hinzunahme des im Medium gelösten biologisch erzeugten Kohlendioxids (gemessen als anorganischer Kohlenstoff nach Abschnitt 3.4.5.) zum eingesetzten Abwasser-DOC. Der Kohlenstoffanteil des Biogases wurde unter der Annahme erhalten, daß Biogas im wesentlichen ein Gemisch aus Methan und Kohlendioxid darstellt und demzufolge ein Mol Biogas 12 g/mol Kohlenstoff enthalten muß, wobei ein Mol des Gases unter Normbedingungen ein Volumen von 22,4 Litern einnimmt. Parallel zu dieser Methode wurde der Abbau der Abwasserinhaltsstoffe nach der DOC-Elimination (Abschnitt 3.4.5.) nach Ablauf des Versuches (Dauer von 90 Tagen) quantifiziert.

3.3.4. Untersuchungen zum Zusammenwirken hoher Konzentrationen toxischer Verbindungen und niedriger Temperaturen (Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen) beim mikrobiellen Phenolabbau

3.3.4.1. Phenolabbaukinetik bei verschiedenen Substratkonzentrationen und Temperaturen

Unter aeroben Bedingungen wurden die Experimente zur Kinetik des Phenolabbaus in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 20 ml durchgeführt. Aus den Anreicherungskulturen (Abschnitt 3.2.4.) wurde das Inoculum für die Kinetikexperimente gewonnen. Hierbei wurde das Mineralsalzmedium nach Abschnitt 3.2.2.2. im Verhältnis 1:1 angeimpft und verschiedene Phenolkonzentrationen im Bereich zwischen 2 und 100 mg/l eingestellt. Die Ansätze wurden unter Rühren bei ca. 100 min^{-1} bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Die Experimente unter anaeroben Bedingungen wurden in 20-ml-HUNGATE-Röhrchen durchgeführt. Das Mineralsalzmedium nach Abschnitt 3.2.1.2. wurde im Verhältnis 1:1 mit der anaeroben Anreicherungskultur (Abschnitt 3.2.4.) angeimpft. Vor Verschuß der Röhrchen mit Septa und Aluminiumkappen wurde das Medium kurz mit Stickstoff gespült, um Sauerstoff auszutreiben. Die HUNGATE-Röhrchen mußten liegend bei der jeweiligen Inkubationstemperatur gelagert werden, so daß die rasch sedimentierende anaerobe Biomasse gleichmäßig über das Kulturvolumen verteilt war, da im anderen Fall vermutlich auf Grund langer Diffusionswege im Röhrchen keine reproduzierbaren Meßwerte erhalten werden konnten.

Die Temperierung erfolgte in Kühlschränken bzw. in Räumen, die über den Versuchszeitraum stabile Temperaturen ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) garantierten. In Abhängigkeit von der Phenolabbaurate wurden alle Ansätze in Zeitabständen von einmal täglich bis mehrmals stündlich beprobt. Die Probenahme aus den anaeroben Versuchsansätzen wurde mit 5-ml-Spritzen und 0,9-mm-Kanülen (Durchmesser) durchgeführt. Unter aeroben Bedingungen erfolgte die Probenahme mittels Pipetten aus den Erlenmeyerkolben. Die Phenolkonzentration wurde photometrisch nach der Methode mit 4-Aminoantipyrin (Abschnitt 3.4.4.) bestimmt. Zur Bestimmung der Biomasseanfangskonzentration wurden Trübungsmessungen (Abschnitt 3.4.1.1.), deren Ergebnisse über eine Eichkurve in Biologische Trockensubstanz umgerechnet wurden, bzw. direkt die Bestimmung der Biologischen Trockensubstanz (Abschnitt 3.4.1.3.) herangezogen. Durch vielfaches Nachdosieren von Phenol in den Anreicherungskulturen wurde dort eine solch hohe Biomassekonzentration erzielt, daß nach Animpfung der experimentellen Ansätze (im Verhältnis 1:1) die Biomassekonzentration groß gegen die Substratkonzentration war, so daß das Biomassewachstum vernachlässigt werden konnte. Die spezifische Phenolabbaurate wurde nach Überwindung gelegentlich bei hohen Substratkonzentrationen aufgetretener lag-Phasen nach folgender Gleichung graphisch ermittelt:

$$v = \Delta S / (\Delta t * X) = (S_0 - S) / [(t - t_0) * X].$$

Die so in einem repräsentativen Konzentrationsbereich bestimmten mittleren Geschwindigkeiten wurden in der graphischen Auswertung $v = f(S)$ den eingesetzten Anfangskonzentrationen S_0 zugeordnet.

Zur Auswertung der Versuche wurde das EDWARDS-Modell (EDWARDS, 1970)

$$v = v_{\max} / (1 + K_s/S + (S/K_i)^n)$$

herangezogen, das eine bereits mehrfach für den Abbau von Phenol erprobte Modifizierung des Substrathemmungsmodells von HALDANE, 1930 darstellt. Die Bestimmung der Parameter des Modells wurde nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (SigmaPlot-Software) durchgeführt.

3.3.4.2. Beeinflussung der Phenolabbaukinetik durch Nickel bei verschiedenen Temperaturen

Der Einfluß von Nickel auf den aeroben und den anaeroben Abbau von 10 mg/l Phenol (Anfangskonzentration) bei verschiedenen Temperaturen wurde in Konzentrationen von 0 bis 100 mg/l Nickel (zugegeben als $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) untersucht. Die Kultivierung, Probenahme

sowie Berechnung der Phenolabbauraten erfolgte analog zu der in Abschnitt 3.3.4.1. dargestellten Verfahrensweise. Jedoch wurden für die Experimente unter anaeroben Bedingungen in diesem Falle nicht die HUNGATE-Röhrchen, sondern 120-ml-Blutkonservenflaschen genutzt, da diese leichter zu handhaben waren. Das Kulturvolumen betrug in diesem Fall 50 ml. Die Auswertung der Meßergebnisse wurde nach dem PEARSON-Modell

$$v = v_{\max} / (1 + (I/K_i)^n)$$

durchgeführt. Der Quotient $v/v_{\max}$ stellt hierbei die normierte spezifische Phenolabbaurate dar und ist gleich eins bei einer Inhibitorkonzentration (Nickel) von Null. Unter Vorgabe der experimentellen Wertepaare $v = f(I)$ und $v_{\max} = v(I=0)$ wurden die Parameter K_i und n wiederum mit SigmaPlot-Software nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt.

3.4. Analytische Methoden

3.4.1. Methoden der Biomassebestimmung

3.4.1.1. Trübungsmessung

Die Trübung diente als Maß für die Biomassekonzentration in den aeroben phenolabbauenden Anreicherungskulturen. Gemessen wurde die Trübung als Extinktion bei 600 nm am Spektralphotometer SPECORD M 40 (Carl Zeiss Jena) in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gegen Wasser als Blindprobe. Über eine Eichkurve wurde die Trübung mit der Biologischen Trockensubstanz (Abschnitt 3.4.5.) korreliert.

Die Trübungsmessung konnte zur Biomassebestimmung nicht herangezogen werden, wenn die Mikroorganismen sichtbar zur Koagulation neigten, wie dies in allen verwendeten Anaerobkulturen der Fall war.

3.4.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde als Maß für die Biomassekonzentration in den Experimenten zur Degradation phenolischer Autoxidationsprodukte herangezogen. Die Grundlage der Proteinanalytik bildete die Methode nach BRADFORD, 1976. Aus durch Schütteln gleichmäßig durchmischten Kultivierungsgefäßen wurden 2 ml Probe entnommen. Die Probe wurde bei

12000 min⁻¹ 30 min lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml 1M Natronlauge suspendiert und 30 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Nach Abkühlung der Probe wurden 0,5 ml Probe mit 2,5 ml Coomassie Blue Reagenz (Fa. Pierce) versetzt und nach 90 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur photometrisch bei 595 nm vermessen. Die Reaktion basierte dabei auf der chemischen Bindung des Farbstoffes mit den Proteinen.

Auf Grund der relativ hohen Meßwertschwankungen wurden jeweils drei Parallelproben zur Proteinbestimmung herangezogen, aus deren Meßwerten eine Mittelwertbildung erfolgte. Wichen einzelne Werte um mehr als 10 % vom Mittelwert ab, so wurden diese Werte verworfen bzw. die gesamte Analyse wiederholt. Es kann eingeschätzt werden, daß wahrscheinlich nicht die Farbreaktion und die photometrische Auswertung, sondern bereits die Homogenität der Ausgangsprobe bzw. der Zellaufschluß bestimmend für die Genauigkeit der Analyse sind. Die Kalibrierung der Methode erfolgte mit Rinderserumalbuminlösung (Fa. Pierce), von der eine Verdünnungsreihe angefertigt wurde.

3.4.1.3. Bestimmung der Biologischen Trockensubstanz

In der Mehrzahl der Experimente wurde zur Quantifizierung der Mikroorganismenkonzentration die Biologische Trockensubstanz herangezogen. Diese Methode erwies sich gegenüber der Proteinbestimmung als wesentlich genauer, benötigte jedoch einen relativ großen Zeitaufwand. Deshalb wurde in den Experimenten zum aeroben Phenolabbau bei verschiedenen Temperaturen (Abschnitt 3.3.4.), bei denen innerhalb kurzer Zeit Meßwerte zur Biomassekonzentration verfügbar sein mußten, Trübungsmessungen durchgeführt (Abschnitt 3.4.3.1.), die über eine Eichkurve mit der Biologischen Trockensubstanz korreliert wurden.

Die Bestimmung der Biologischen Trockensubstanz erfolgte jeweils in zwei Parallelen, die zur Mittelwertbildung benutzt wurden. Definierte Volumina der Kultur (gewöhnlich 20 ml) wurden 15 min lang bei 10000 min⁻¹ zentrifugiert, der Überstand gegen destilliertes Wasser ersetzt und das Pellet resuspendiert. Die Suspension wurde in vorgetrocknete Kristallisationschalen, deren Masse zuvor bestimmt worden war, gegeben und im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus der nachfolgenden Wägung der Schalen wurde auf die Trockensubstanz der Probe geschlossen. Die Biologische Trockensubstanz wurde auf das Volumen von einem Liter bezogen und in mg/l oder g/l angegeben.

3.4.2. Aufnahme von UV-/VIS-Spektren

Die Aufnahme von Spektren im UV- und/oder VIS-Bereich des Lichtes wurde einerseits zur halbquantitativen Konzentrationsbestimmung aromatischer Verbindungen (z.B. während der Anreicherung phenolabbauender Mikroorganismenpopulationen) und andererseits zur Verfolgung von Autoxidationsprozessen phenolischer Verbindungen durchgeführt. Dabei kam das Spektralphotometer SPECORD M 40 (Carl Zeiss Jena) zur Anwendung. Das Gerät ermöglichte die Aufnahme und Darstellung von Signalen im Wellenlängenbereich von 200 bis 900 nm. Es wurden Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm benutzt. Die Messungen erfolgten in der Regel gegen Wasser als Referenz.

3.4.3. Bestimmung der Farbintensität phenolischer Autoxidationsprodukte

Phenolische Verbindungen zeigen während ihrer Autoxidation eine Braunfärbung, die sich mit dem Fortschreiten der Reaktion zunehmend vertieft. Diese Färbung war auch bei dem langzeitgelagerten Kohlepyrolyseabwasser der Schwelwasserdeponie Schwelvollert zu beobachten.

Zur Beurteilung eines Reinigungserfolges bei der physiko-chemischen Behandlung dieses Wassers (Abschnitt 3.3.3.3.) als auch bei mikrobiellen Degradationsversuchen mit phenolischen Autoxidationsprodukten (Abschnitt 3.3.2.) wurde die Extinktion bei 436 nm herangezogen und als Farbintensität interpretiert. Im Bedarfsfall (bei sehr intensiv gefärbten Proben) war vor der Messung eine Verdünnung erforderlich. Die Messung erfolgte am Spektralphotometer SPECORD M 40 (Carl Zeiss Jena) in Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke gegen Wasser.

3.4.4. Kolorimetrische Bestimmung von Phenol

Für die Konzentrationsbestimmung von Phenol in den Untersuchungen zu den Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen (Abschnitt 3.3.4.) sowie zur qualitativen Aktivitätsbestimmung in Wasserproben des Schwelvollertsees (Abschnitt 3.3.3.1.) wurde die kolorimetrische Methode mit 4-Aminoantipyrin genutzt. Die Grundlage der Nachweisreaktion bildet die Emerson-Reaktion, bei der 4-Aminoantipyrin mit aromatischen Aminen und Phenol unter Reduktion von Eisen(III)-Ionen farbige Imin-Derivate bildet (EMERSON, 1943). Ein schneller und empfindlicher Test, der diese Reaktion ausnutzt, wurde von PFEIFFER und MANNS, 1957 beschrieben und hier für die Bestimmung von Phenolkonzentrationen genutzt.

Zu 1 ml Probe wurden 0,8 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (8,464 g/l) als Puffer sowie 0,4 ml $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -Lösung (10 g/l) und 0,04 ml 4-Aminoantipyrinlösung (20 mg/ml H_2O) gegeben. Der Ansatz wurde nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur photometrisch bei 500 nm am Spektralphotometer SPECORD M 40 (Carl Zeiss Jena) vermessen. Die Eichkurve verzeichnete einen linearen Konzentrationsbereich bis ca. 30 mg/l Phenol. Bei höheren Konzentrationen wurde die Probe entsprechend verdünnt. Die untere Nachweisgrenze lag unter 1 mg/l. Damit stand eine Methode zum Phenolnachweis mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit zur Verfügung, die darüber hinaus mit geringen Probevolumina auskam, so daß sie zur Bestimmung kinetischer Parameter des Phenolabbaus bei den Experimenten zu Temperatur-Inhibierungsbeziehungen eingesetzt werden konnte. Die geringe Selektivität der Methode machte sich hierbei nicht negativ bemerkbar, da Phenol als einzige Kohlenstoffquelle vorlag und die beim anaeroben und aeroben Abbau von Phenol in Frage kommenden aromatischen Zwischenprodukte wie Benzoat bzw. Brenzkatechin im Falle ihrer Akkumulation kein oder ein sehr geringes Signal mit dieser Methode liefern (KOTTE et al., 1995).

3.4.5. Bestimmung des DOC und des DIC

Die DOC-Analysen wurden mit dem Total Carbon Analyser TOC 5000 der Fa. Shimadzu durchgeführt. Der DIC fiel bei diesen Analysen stets als Randinformation mit an, da die Ermittlung des DOC bei diesem Gerät über die Subtraktion des DIC vom TC (total carbon) erfolgte. Zur Analyse wurden 5 ml Probe benötigt. Falls die Proben Feststoffanteile enthielten, wurden sie durch Zentrifugation vorbehandelt.

3.4.6. Bestimmung des Biogasvolumens

Die volumetrische Erfassung des in methanogenen Versuchsansätzen entstandenen Biogases bildete gemeinsam mit der Analyse des Methangehaltes (Abschnitt 3.4.7.) die meßtechnische Grundlage für die Experimente zur inhibierenden Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte auf methanogene Abbauprozesse (Abschnitt 3.3.1.) und wurde auch in Versuchen zur Charakterisierung methanogener Aktivitäten im Schwefelvollertwasser (Abschnitt 3.3.3.1.) sowie in den Batchversuchen zu dessen anaerober Fermentation (Abschnitt 3.3.3.3.) angewendet.

Die Bestimmung des Gasvolumens wurde mit Hilfe einer einfachen Apparatur realisiert, die aus einer Kolbenpipette, einem Dreiwegehahn und einer Kanüle (Durchmesser 0,9 mm) bestand. Der Dreiwegehahn verband die Kolbenpipette mit der Kanüle, die zur Messung durch den Gummistopfen der Blutkonservenflasche gestochen wurde, und ermöglichte den Druck-

ausgleich zwischen Flasche und Pipette. Dabei strömte das entstandene Biogas in die Pipette ein und verdrängte den Kolben. Eine am Pipettenzylinder angebrachte Skalierung ermöglichte das direkte Ablesen des Gasvolumens. Je nach Bedarf wurden 5-ml-, 10-ml- oder 25-ml-Kolbenpipetten an den Dreiwegehahn angeschlossen.

Diese einfache Apparatur ermöglichte eine große Zahl von Messungen in kürzester Zeit, machte den apparativen Aufwand bei der Gasvolumenmessung durch Flüssigkeitsverdrängung (z.B. PARKIN et al., 1983) überflüssig und kann damit als gleichberechtigt zu den Methoden angesehen werden, die das entstandene Gas über eine Druckmessung quantifizieren (SHELTON und TIEDJE, 1984; STROTMANN et al., 1993).

3.4.7. Gaschromatographische Bestimmung des Methananteils im Biogas

Für die Analyse des Methangehaltes des Biogases wurde mittels einer 5-ml-Spritze eine Probe aus der Gasphase der jeweiligen Blutkonservenflasche entnommen. Die Spritze wurde bis zur gaschromatographischen Analyse mit einem Dreiwegehahn verschlossen. Die Gasprobe konnte in der Spritze einige Stunden aufbewahrt werden, ohne daß sich ihre Zusammensetzung dabei veränderte.

Die Analysen wurden mit einem Gaschromatograph GACH 21.3 (Betriebskontrollgerätewerk KG Berlin-Oberschöneweide) durchgeführt. Mit einer gasdichten Mikroliterspritze (Fa. Hamilton) wurden 500 µl des Gasgemisches auf eine PPN-Säule gespritzt (Länge 2 m, Innendurchmesser 4 mm, Porenweite 100...120 µm). Als Trägergas diente Wasserstoff (Fa. Linde) mit einem Volumenstrom von 50 ml/min. Die Detektion erfolgte mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor und die Auswertung der Peakflächen mit einem Integrator der Fa. Hewlett-Packard.

3.4.8. HPLC-Analyse von Phenol, Kresolen und Xylenolen im Schwelvollertwasser

Im Rahmen der Semi-batch-Versuche zur anaeroben Behandlung von Schwelvollerttiefenwasser unter Einsatz verschiedener Elektronenakzeptoren (Abschnitt 3.3.3.2.) wurden die Konzentrationen von Phenol sowie der Kresol- und Xylenolisomere mittels HPLC bestimmt. Dazu wurden die Proben wie folgt vorbehandelt:

Nach Abzentrifugieren der Feststoffe wurden mittels Ultrafiltration durch ein Filter mit der Trenngrenze 0,5 kD hochmolekulare Verbindungen abgetrennt. Das Filtrat wurde unter Stickstoff aufgefangen, um eine Autoxidation der niedermolekularen Inhaltsstoffe zu vermeiden. Zur Bestimmung der Konzentrationen an Xylenolen war eine Aufkonzentrierung erforderlich, die mittels Festphasenextraktion erfolgte. In der wäßrigen Probe wurde NaCl in einer

Konzentration von 200 g/l gelöst und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 2,0 eingestellt. Anschließend wurde die Probe mittels Vakuum bei einem Volumenstrom von ca. 5 ml/min über eine Festphasenextraktionskartusche LiChrolut RP 18 (Fa. Merck) gesaugt. Die Kartusche war zuvor mit 800 µl Methanol und 800 µl 0,01 M HCl konditioniert worden. Nach dem Extraktionsschritt folgte ein zweimaliges Waschen der Festphase mit jeweils 500 µl 0,01 M HCl und ein ca. 15-minütiger Trocknungsprozeß unter Vakuum. Die Elution der phenolischen Verbindungen von der Festphase erfolgte mit dreimal 500 µl Methanol.

Die Analyse der Proben wurde an einer HPLC-Apparatur der Fa. Beckman durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine pH-stabile 25-cm-PRP-1-Säule (Fa. Hamilton) verwendet. Als Eluent diente ein 0,1 M Natriumacetat-Puffer mit Acetonitril im Verhältnis 83:17 (v/v) bei einem pH-Wert von 11,6. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor bei 280 nm. Zur Identifizierung der Inhaltsstoffe wurden ihre Retentionszeiten und UV-Spektren herangezogen. Zur quantitativen Analyse wurden Eichlösungen mit den Reinsubstanzen sowie einem Gemisch verwendet, wobei die Vorbehandlung analog den Proben durchgeführt wurde.

3.4.9. HPLC-Analyse von Phenol in phenolischen Autoxidationslösungen

Die Konzentration von Phenol in phenolischen Autoxidationslösungen wurde bestimmt, um Aussagen über das Komplexierungsvermögen der autoxydierten Verbindungen gegenüber Phenol zu erlangen, was erforderlich war, um die Bioverfügbarkeit des Referenzsubstrates Phenol in den Experimenten zur inhibierenden Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte (Abschnitt 3.3.1.) einschätzen zu können. Die hierzu untersuchten Proben wurden analog zu den biologischen Ansätzen wie unter Abschnitt 3.3.1. beschrieben angesetzt, enthielten jedoch keine Animpfbiomasse und wurden zur Unterbindung biologischer Prozesse mit 0,2 g/l Natriumazid konserviert. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurden die Proben mit einem 0,5 kD-Filter filtriert, das Filtrat unter Stickstoff aufgefangen und ohne weitere Vorbehandlung mittels HPLC auf seine Phenolkonzentration hin untersucht. Die Analysen wurden an einem Gerät der Firma Beckman durchgeführt. Zur Trennung wurde eine 15-cm-Ultrasphere-ODS-Trennsäule (RP-18) der Fa. Merck verwendet. Als Eluent diente ein Wasser-Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v) bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor bei 220 nm.

Mit dieser Methode wurden gleichzeitig die meisten der phenolischen Ausgangsstoffe, die zur Autoxidation gebracht worden waren, miterfaßt. Mit zunehmender Autoxidationszeit wurde die Konzentration dieser Verbindungen erwartungsgemäß geringer. Im Mittelpunkt des Interesses stand jedoch die Wiederfindung des Referenzsubstrates Phenol in der Lösung nach der Abtrennung der hochmolekularen Bestandteile.

3.4.10. Bestimmung der Nitrat- und Sulfationen mittels Ionenchromatographie

Konzentrationsbestimmungen von Nitrat und Sulfat wurden im Rahmen der Semi-batch-Versuche zur anaeroben Behandlung von Schwelvollertiefenwasser bei Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren (Abschnitt 3.3.3.2.) benötigt. Um Feststoffanteile abzutrennen, wurden die Proben zunächst 10 min bei 10000 min^{-1} zentrifugiert. Zur Elimination organischer Inhaltsstoffe wurde nachfolgend eine Festphasenextraktion an On-Guard-Kartuschen (Fa. Dionex) durchgeführt. Die Analysen erfolgten an einem Ionenchromatograph DX 100 (Fa. Dionex). Zur Trennung wurde eine Trennsäule IonPac AS4A-SC (4 mm) mit einer Vorsäule IonPac AG4A-SC (4 mm) der Fa. Dionex benutzt. Als Eluenten dienten 1,8 mmol/l Natriumcarbonat und 1,7 mmol/l Natriumhydrogencarbonat im Gemisch bei einer Flußrate von 2 ml/min. Der Anionenmikromembransuppressor AMMS-II (Fa. Dionex) fungierte als Leitfähigkeitsunterdrücker des Eluenten. Die Detektion erfolgte über eine Leitfähigkeitsmessung.

3.4.11. Bestimmung von Acetat in phenolischen Autoxidationslösungen

Zur Einschätzung der Bioverfügbarkeit des in den Versuchen zur inhibierenden Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte eingesetzten Acetats als Referenzsubstrat (Abschnitt 3.3.1.) wurde dessen Wiederfindung nach Abtrennung der hochmolekularen Autoxidationsprodukte untersucht. Dazu wurden die Proben, die zu diesem Zweck nicht angeimpft und mit 0,2 g/l Natriumazid konserviert worden waren, zunächst über ein 0,5 kD-Filter filtriert, das Filtrat unter Stickstoff aufgefangen und an Festphasenextraktionskartuschen (On-Guard, Fa. Dionex) vorgereinigt. Das Filtrat wurde am Ionenchromatograph DX 100 (Fa. Dionex) auf seine Acetatkonzentration hin untersucht. Als Trennsäule fungierte eine 4-mm-IonPac-AS4A-SC-Säule mit 4-mm-IonPac-AG4A-SC-Vorsäule (Fa. Dionex). Eluiert wurde mit einem 5M Natriumtetraborat-Puffer bei einer Flußrate von 2 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels Leitfähigkeitsdetektor nach Zwischenschaltung des selbstregenerierenden Suppressors SRS (Fa. Dionex).

4. Ergebnisse

4.1. Das inhibitorische Potential phenolischer Autoxidationsprodukte gegenüber dem Acetat- und Phenolabbau unter methanogenen Bedingungen

Wenn in diesem Abschnitt die inhibierenden Wirkungen, die von phenolischen Autoxidationsprodukten ausgehen, an Modellsystemen untersucht werden sollen, so geschieht dies unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Beeinträchtigung mikrobieller Selbstreinigungsprozesse in mit phenolischen Deponiewässern kontaminierten Habitaten sowie im Hinblick auf die Geschwindigkeitslimitation von methanogenen Abwasserreinigungsprozessen im technischen Maßstab. In Abhängigkeit von der Struktur der monomeren phenolischen Ausgangsstoffe wird zunächst auf deren Autoxidationsgeschwindigkeit eingegangen (Abschnitt 4.1.1.) und die Wiederfindung von Acetat und Phenol unter den Bedingungen der Inhibierungsexperimente dargestellt (Abschnitt 4.1.2.). Nachfolgend wird das inhibitorische Potential von Autoxidaten aus singulären Ausgangsstoffen hinsichtlich des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen beschrieben (Abschnitt 4.1.3.), woran sich Inhibierungsuntersuchungen mit einem definierten Gemisch von Ausgangsstoffen für die Autoxidation anschließen (Abschnitt 4.1.4.). Auf die Reversibilität einer solchen Inhibierung wird im Abschnitt 4.1.5. eingegangen. Neben dem Oxidationszustand eines autoxidativ entstandenen Gemisches wird im Abschnitt 4.1.6. mit der Molekülgröße ein weiterer möglicher Einfluß hinsichtlich seiner Bedeutung für die inhibierende Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte untersucht. Abschließend wird auf die Hemmung einzelner Stoffwechselschritte des Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch ein ausgewähltes Autoxidat eingegangen (Abschnitt 4.1.7.). Die Bedeutung der im Abschnitt 4.1. vorgestellten Ergebnisse wird im Abschnitt 5.1.1. diskutiert.

4.1.1. Autoxidation phenolischer Verbindungen

Mit der im Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Methode wurden die folgenden neun phenolischen Verbindungen zur Autoxidation gebracht: Phenol, Brenzkatechin, Resorcin, Hydrochinon, Pyrogallol, Phloroglucin, 3-Aminophenol, 2,4-Diaminophenol, 4-Methylbrenzkatechin. Zusätzlich zu den reinen Ausgangsstoffen wurde ein äquimolares Gemisch aus Brenzkatechin und Resorcin eingesetzt. Mit Phenol als einziger Ausnahme zeigten alle gelösten Substanzen unmittelbar nach der pH-Wert-Einstellung eine Verfärbung, die sich mit zunehmender Reaktionszeit vertiefte. Der Verlauf des Autoxidationsprozesses wurde UV-/VIS-spektroskopisch verfolgt. Die Anwendung des in der Literatur erwähnten E_4/E_6 -Verhältnisses, welches den

Quotient der Extinktionen der Lösung bei 465 und 665 nm ausdrückt, führte jedoch zu keiner auswertbaren Aussage. Das E_4/E_6 -Verhältnis wird häufig zur Beschreibung des Polymerisationszustandes von Huminstoffen benutzt, wobei eine Korrelation mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht des Präparates existiert (CHEN et al., 1977; VARSHOVI und SARTAIN, 1993). Die Anwendung dieses Wertes erfolgte jedoch stets bei Huminstoffpräparaten, deren Entstehungsprozeß als abgeschlossen angesehen werden kann. Für den Autoxidationsprozeß phenolischer Verbindungen ergaben sich im Anfangsstadium der Reaktion keine meßbaren oder sehr geringe Extinktionswerte bei den entsprechenden Wellenlängen, da hier zunächst noch die monomeren Ausgangsstoffe im Gemisch dominierten und diese kein Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbieren. Die UV-/VIS-Spektren der Autoxidate zeigten zu Beginn der Reaktion ein ausgeprägtes Signal im UV-Bereich, das dem jeweiligen monomeren Ausgangsstoff zuzuschreiben ist, während die Lichtabsorption im VIS-Bereich verhältnismäßig gering war. Mit fortlaufender Reaktion flachte das Monomer-Signal immer mehr ab und das Spektrum nahm die Gestalt eines typischen monoton verlaufenden Huminstoffspektrums an. Auf Grund dieser Tendenz sollte der Polymerisationszustand phenolischer Autoxidationsprodukte durch einen Quotienten der Extinktionswerte im UV-Bereich und im VIS-Bereich auszudrücken sein, der das Verhältnis des aromatischen Charakters des Moleküls zu dessen Färbung darstellt. Zur Verfolgung des Autoxidationsprozesses der hier verwendeten phenolischen Verbindungen wurde der Quotient der Extinktionen bei 270 und 436 nm herangezogen, der mittels Division durch den entsprechenden Quotienten unmittelbar nach Start der Reaktion (0d) normiert wurde. Unter dem Zeitpunkt unmittelbar nach Start der Reaktion ist dabei zu verstehen, daß nach der pH-Wert-Einstellung der Lösungen auf pH 12 der pH-Wert im Anschluß daran wieder auf 7,0 gebracht wurde, wonach die photometrische Messung erfolgte. Die Normierung der Extinktionsquotienten macht die Autoxidationsgeschwindigkeiten der einzelnen phenolischen Verbindungen untereinander vergleichbar. Im anderen Fall wäre ein solcher Vergleich nicht möglich, da sich die absoluten E_{270}/E_{436} -Verhältnisse infolge der ungleichen Lichtabsorption bei 270 nm durch die Monomere zu stark unterscheiden.

In Bild 8 sind die normierten E_{270}/E_{436} -Verhältnisse der Autoxidate in Abhängigkeit von der Reaktionszeit dargestellt. Die Reaktion von Phenol führte nicht zur Bildung gefärbter Produkte, so daß die absoluten Extinktionsquotienten nicht bestimmbar waren. Da jedoch mit fortschreitender Reaktionszeit diesbezüglich keine Veränderung auftrat, wurde der normierte Extinktionsquotient als konstant gleich eins angenommen. Offenbar verläuft die Autoxidation des einfach hydroxylierten Aromaten Phenol mit so geringer Geschwindigkeit, daß dies unter den gewählten Bedingungen UV-/VIS-spektroskopisch nicht erfaßbar ist.

Alle anderen phenolischen Ausgangsstoffe verfügen über mindestens zwei polare Substituenten und zeigten eine Farbbildung und -vertiefung während der Reaktion. Diese Verbindungen lassen sich hinsichtlich der Geschwindigkeit ihrer Autoxidationsprozesse in Gruppen einteilen.

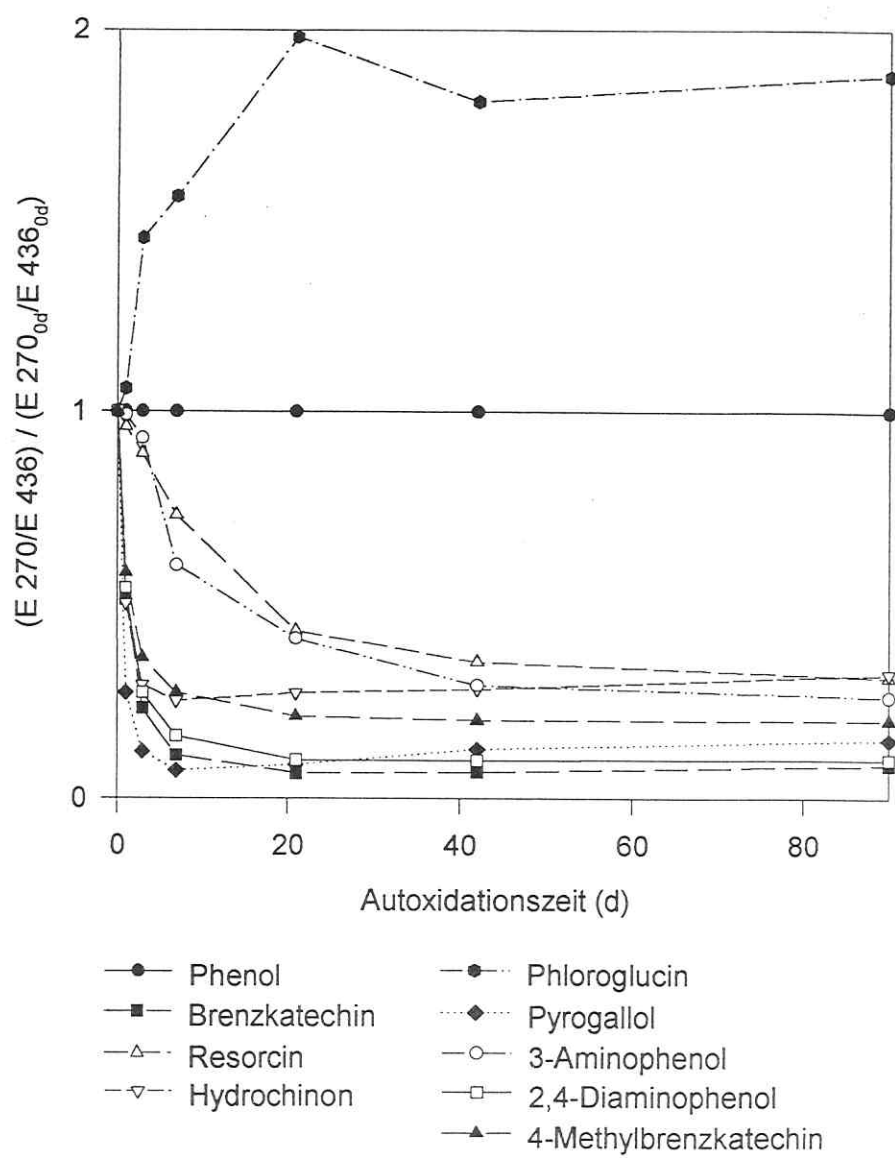


Bild 8. UV-/VIS-spektroskopische Charakterisierung der Autoxidation phenolischer Verbindungen.

Die erste Gruppe umfaßt die Verbindungen mit ortho- oder para-ständigen Hydroxyl- bzw. Aminogruppen Brenzkatechin, Pyrogallol, 2,4-Diaminophenol, 4-Methylbrenzkatechin und Hydrochinon, die sich durch einen sehr schnellen Verlauf der Reaktion auszeichnen, wobei das dreifach hydroxylierte Pyrogallol die höchste Autoxidationsgeschwindigkeit aufweist. Nach spätestens 21 Tagen kann der Autoxidationsprozeß unter den gewählten Bedingungen bei den Vertretern dieser Gruppe als abgeschlossen angesehen werden. Die zweite Gruppe wird durch die in meta-Stellung substituierten Phenole Resorcin und 3-Aminophenol repräsentiert, deren Autoxidation wesentlich langsamer verläuft als die der Vertreter der ersten Gruppe. Die geringere Autoxidationsgeschwindigkeit des Resorcins gegenüber der der anderen doppelt hydroxylierten Phenole wurde damit begründet, daß Resorcin im ersten Oxidationsschritt nicht die reaktiven o- oder p-Chinone bilden kann, über welche die Reaktion bei Brenzkatechin bzw. Hydrochinon verläuft (MUSSO, 1963; HAWORTH, 1971). Offenbar ist es hierbei unerheblich für die Kinetik der Reaktion, ob der polare Substituent eine Hydroxyl- oder eine Aminogruppe ist, was in annähernd gleichen Autoxidationsgeschwindigkeiten des Resorcins und des 3-Aminophenols (Bild 8) zum Ausdruck kommt.

Das dreifach hydroxylierte Phloroglucin nimmt eine Sonderstellung ein. Obwohl auch hier die Bildung gefärbter Autoxidationsprodukte auf die Entstehung makromolekularer Verbindungen hindeutet, entsteht bei der Reaktion auch ein UV-aktives Produkt oder Produktgemisch, das akkumuliert wird. Dies führt zu normierten Extinktionsquotienten größer als Eins.

Die Abhängigkeit der Autoxidationsgeschwindigkeit der jeweiligen phenolischen Verbindung von Anzahl und Stellung ihrer polaren Substituenten steht tendenziell in guter Übereinstimmung mit der von MOUSSAVI, 1979 aufgestellten These, daß die Reaktionsgeschwindigkeit in der Reihenfolge para > ortho > meta abnimmt, wobei die Autoxidation jeder OH-Gruppe eine Reaktion erster Ordnung darstellt. Nach Darstellung des Autors beschleunigen Substituenten, die als Elektronenakzeptor fungieren können, die Autoxidation, während diese durch elektronenliefernde Substituenten gebremst wird. Darin kann die Ursache gesehen werden für die geringfügig langsamere Autoxidation des 4-Methylbrenzkatechins gegenüber der Reaktion des Brenzkatechins (Bild 8).

Aus praktischen Erwägungen scheint es sinnvoll, die Autoxidation phenolischer Verbindungen auch im Gemisch zu untersuchen, da phenolische Deponiewässer in der Regel Mischkontaminationen phenolischer Inhaltsstoffe darstellen. Dabei kann nicht angenommen werden, daß beim Autoxidationsprozeß Komplexe entstehen, die aus singulären Ausgangsstoffen hervorgegangen sind; vielmehr ist eine gleichzeitige autoxidative Einbindung zahlreicher unterschiedlicher Monomere in höhermolekulare Strukturen zu erwarten. Als einfacher Modellfall ist hier die Autoxidation eines äquimolaren Brenzkatechin-/Resorcin-Gemisches untersucht worden. In Bild 9 ist der Autoxidationsprozeß des Gemisches im Vergleich zu den Reaktionen der reinen Ausgangsstoffe dargestellt. Die DOC-Konzentrationen waren dabei in allen drei Fällen gleich. Die Autoxidationsgeschwindigkeit des Gemisches wird in der ersten Phase

der Reaktion durch die Geschwindigkeit der Autoxidation des Brenzkatechins bestimmt, während im weiteren Verlauf eine deutliche Verlangsamung des Prozesses auftritt. Im ersten Abschnitt dominieren demnach möglicherweise die Reaktionen über o-Chinon, die mit hoher Rate ablaufen, wobei jedoch Resorcin oder erste Zwischenprodukte der Resorcinoxidation mit in den Komplex eingebunden werden könnten. Der Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit des Gemisches ist möglicherweise auf weitgehenden Verbrauch des Brenzkatechins oder des o-Chinons zurückzuführen, so daß nun die Autoxidationsprozesse des Resorcins bestimmend werden. Die durchschnittliche Rate der Autoxidation des Gemisches liegt demnach zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit der Einzelkomponenten.

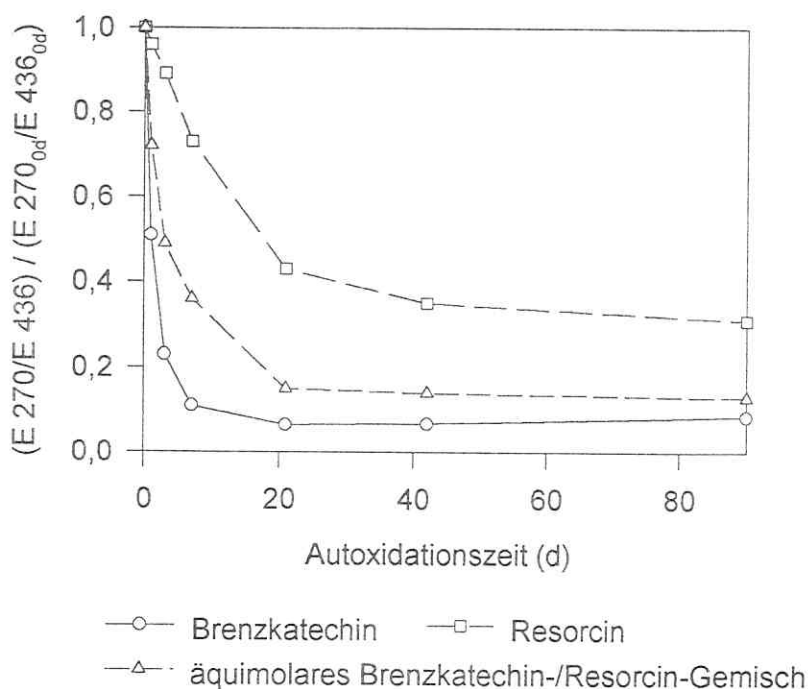


Bild 9. UV-/VIS-spektroskopische Charakterisierung der Autoxidation von Brenzkatechin und Resorcin separat sowie im Gemisch.

4.1.2. Wiederfindung der Referenzsubstrate Acetat und Phenol in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte

Die Untersuchungen zur inhibierenden Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte auf den Abbau von Acetat und Phenol unter methanogenen Bedingungen erforderten die Gewähr-

leistung der Bioverfügbarkeit der Referenzsubstrate. Diesem Aspekt kommt besonders deshalb Bedeutung zu, da eine Bindung organischer Substanzen an Huminstoffe häufig diskutiert wird, diese aber die Referenzsubstrate aus der Kulturlösung entfernen und dadurch den biologischen Abbauprozess von vornherein unterbinden oder limitieren würde. Neben zahlreichen Arbeiten, in denen eine sorptive oder gar kovalente Bindung von umweltrelevanten Schadstoffen an Huminstoffe dargestellt worden ist (z. B. WERSHAW et al., 1969; TELL und UCHRIN, 1991; ANDREUX et al., 1992; RAV-ACHA und REBHUN, 1992; KOPINKE et al., 1995), hat sich MÜLLER-WEGENER, 1976 speziell mit der Wechselwirkung von Phenolen mit Huminstoffen beschäftigt und beschrieb sowohl die kovalente Einbindung bestimmter phenolischer Verbindungen in sich bildende Huminstoffe als auch - jedoch wesentlich geringfügigere - Wechselwirkungen der Phenole mit "fertigen" Huminstoffen.

Die Wiederfindung von Acetat und Phenol in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte wurde im Rahmen der Inhibierungsexperimente in separaten vergifteten Kontrollansätzen untersucht. Dazu wurde jeweils die höchste in den biologischen Ansätzen getestete Autoxidationskonzentration (1000 mg/l DOC) ausgewählt. Vor der analytischen Bestimmung der Referenzsubstrate, die nach einer den Inhibierungsexperimenten entsprechenden Zeitdauer erfolgte, wurden mittels Filtration der Lösung durch ein 0,5 kD-Filter höhermolekulare Inhaltsstoffe abgetrennt. Die nach diesem Schritt in der Lösung frei vorliegende Konzentration der Substrate wurde als die bioverfügbare Konzentration interpretiert und mit der Anfangskonzentration korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Neben den Wiederfindungsraten der Referenzsubstrate in den Kontrollansätzen wurden die in den biologischen Ansätzen gemessenen prozentualen Umsätze von Acetat bzw. Phenol zu Biogas anhand der nach der BUSWELL-Gleichung



möglichen Methanbildung dargestellt.

Die Wiederfindung der Referenzsubstrate in Gegenwart der Autoxidate lag in allen Fällen zwischen 93 und 105 %. Diese Werte verdeutlichen, daß weder Acetat noch Phenol sorptiv oder kovalent in signifikanten Mengen an die phenolischen Autoxidationsprodukte gebunden wurden, so daß eine in den Inhibierungsexperimenten auftretende Reduktion der Methanbildungsrate oder ein vollständiges Ausbleiben der Methanogenese in Gegenwart der Autoxidate tatsächlich auf deren inhibierende Wirkung zurückgeführt werden kann. Auch der prozentuale Umsatz der Referenzsubstrate zu Biogas (gemessen an der nach der BUSWELL-Gleichung maximal möglichen Methanbildung) bestätigt diese Aussage. Entweder wurde der maximal mögliche Substratumsatz zu Methan zu 75-100 % erreicht, oder er lag im Bereich bis 10 %.

Tabelle 4. Wiederfindung von Acetat und Phenol in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte und Umsetzung der Substrate zu Methan (nach der BUSWELL-Gleichung).

Autoxidations- zeit (d)	Autoxidat- DOC (mg/l)	Phenol- autoxidat		Brenzcatechin- autoxidat				Resorcin- autoxidat				Hydrochinon- autoxidat			
		Acetat		Acetat		Phenol		Acetat		Phenol		Acetat		Phenol	
		%W	%U	%W	%U	%W	%U	%W	%U	%W	%U	%W	%U	%W	%U
0	100		86		90		84		95		92		91		82
	500		80		90		89		90		3		93		91
	1000	101	91	96	3	102	0	94	89	96	4	100	84	105	6
1	100		93		88		91		83		88		98		85
	500		92		5		3		89		2		94		7
	1000	97	87	98	0	103	2	97	90	96	5	104	5	98	1
3	100		85		90		88		93		78		83		92
	500		84		2		5		85		0		92		0
	1000	96	89	99	0	100	0	102	94	99	0	97	3	102	5
7	100		90		94		90		85		86		88		97
	500		91		4		1		4		2		89		84
	1000	102	94	103	6	97	7	98	2	104	0	98	2	103	0
21	100		83		83		75		86		99		90		92
	500		86		87		89		6		3		94		82
	1000	101	90	104	90	100	0	97	1	97	4	102	85	99	4
42	100		92		92		90		78		89		86		79
	500		97		82		90		88		5		86		91
	1000	99	83	96	79	98	3	100	91	100	2	95	85	100	0
90	100		88		83		82		95		87		96		89
	500		88		94		91		94		92		94		94
	1000	102	81	98	92	95	4	97	89	96	92	103	89	104	82

Tabelle 4. (Fortsetzung)

Autoxidations- zeit (d)	Autoxidat- DOC (mg/l)	Pyrogallol- autoxidat						Phloroglucin- autoxidat						3-Aminophenol- autoxidat						2,4-Diaminophenol- autoxidat					
		Acetat			Phenol			Acetat			Phenol			Acetat			Phenol			Acetat			Phenol		
		%W	%U		%W	%U		%W	%U		%W	%U		%W	%U		%W	%U		%W	%U		%W	%U	
0	100		87				89		100				86			95		85			93			82	
	500		92				90		87				89			82		96			95			89	
	1000	96	90	93	86		86	96	92	105	5		94	94	100	2		94	91	97	5				
1	100		5				0		95				90			86		84			7			0	
	500		0				2		91			8				95		78			0			0	
	1000	98	0	98	0		98	100	3	103	0		97	94	102	0		102	0	96	0			0	
3	100		92				84		83				85			86		85			84			85	
	500		83				3		90			5				92		96			92			4	
	1000	99	95	104	0		104	105	2	103	6		6	99	6	102	3		103	0	99	3	103	0	
7	100		84				87		98				79			92		92			84			87	
	500		93				3		92				93			4		4			86			96	
	1000	95	92	102	4		102	97	80	99	3		3	97	1	95	0		90	90	96	2			
21	100		86				91		79				95			88		79			93			79	
	500		89				3		90				85			93		94			90			94	
	1000	94	93	99	0		99	96	91	100	91		91	96	6	96	6		96	92	94	5			
42	100		85				82		93				86			88		97			86			90	
	500		85				4		97				97			89		82			89			90	
	1000	98	93	95	1		95	104	89	102	90		90	96	94	100	81		101	87	95	78			
90	100		98				93		90				96			93		83			86			82	
	500		90				2		94				83			96		97			95			94	
	1000	96	98	98	2		98	99	92	104	88		88	103	87	95	94		95	87	101	91			

Tabelle 4. (Fortsetzung)

Autoxidations- zeit (d)	Autoxidat- DOC (mg/l)	4-Methylbrenzkatechin- autoxidat				Brenzkatechin-/Resorcin- autoxidat			
		Acetat		Phenol		Acetat		Phenol	
		%W	%U	%W	%U	%W	%U	%W	%U
0	100		89		91		95		92
	500		2		79		99		7
	1000	103	3	96	0	94	86	98	0
1	100		83		8		88		85
	500		7		0		87		4
	1000	96	0	94	0	97	0	95	5
3	100		89		4		85		90
	500		8		6		92		6
	1000	96	1	99	1	98	4	100	0
7	100		94		5		90		78
	500		0		2		94		7
	1000	98	2	101	0	100	8	96	4
21	100		93		83		82		79
	500		96		80		89		89
	1000	99	91	100	4	96	91	94	90
42	100		92		96		90		94
	500		100		82		100		81
	1000	105	98	93	98	102	91	104	86
90	100		99		94		92		90
	500		93		80		93		79
	1000	95	89	102	82	101	90	96	94

Im letzteren Fall deuten aber die ermittelten Wiederfindungsraten auf volle Bioverfügbarkeit der Substrate hin, so daß das Ausbleiben einer signifikanten Methanbildung als eine vollständige Hemmung des Prozesses interpretiert werden muß. Geringe Methanmengen entstanden in diesen Fällen gelegentlich in der Anfangsphase des Experimentes; offenbar verging ein gewisser Zeitraum bis zur vollen Ausprägung der inhibierenden Wirkung der Autoxidate. In den Ansätzen mit weitgehendem Substratumsatz lassen sich die aufgetretenen Differenzen bis zur 100%-Marke mit der Substratassimilation durch die Mikroorganismen und der Summation einzelner analytischer Fehler bei den Gasvolumenmessungen erklären. Hinzu kommt, daß die maximal mögliche Methanmenge auf Grundlage der BUSWELL-Gleichung berechnet wurde, wobei BIRCH et al., 1989 mit Radiotracermethoden gezeigt hatten, daß die real entstehende Methanmenge von der mit der BUSWELL-Gleichung berechneten abweichen kann. Weiterhin haben SHELTON und TIEDJE, 1984 Korrekturfaktoren zur Berücksichtigung der Wasserlöslichkeit des Methans bei anaeroben Abbauteests vorgeschlagen, die hier unberücksichtigt blieben. Die Auswirkung all dieser Fehlerquellen auf das Gesamtergebn ist jedoch so gering, daß die Interpretation der im folgenden dargestellten Ergebnisse nicht dadurch beeinflusst wird.

4.1.3. Inhibierung des Acetat- bzw. Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch phenolische Autoxidationsprodukte aus singulären Ausgangsstoffen

Die Methanbildung aus Acetat bzw. Phenol in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte ist beispielhaft anhand der Methanbildung aus Acetat in Gegenwart von Phenol-Autoxidat (Autoxidationszeit 0 d) in Bild 10 dargestellt. Konzentrationen von 500 und 1000 mg/l Autoxidat-DOC führten zu einer deutlichen Verminderung der Methanbildungsgeschwindigkeit. Die Methanbildungsraten wurden graphisch aus den Anstiegen linearer Kurvenabschnitte ermittelt und auf die Rate der Variante ohne Phenol-Autoxidat bezogen (100%). Die sich daraus ergebenden Dosis-Wirkungs-Kurven sind für die Beispiele von Phenol-Autoxidat und Brenzkatechin-Autoxidat in den Bildern 11 und 12 dargestellt. Eine Zusammenfassung aller Experimente geben die Bilder 13 und 14 als Abhängigkeit eines charakteristischen Inhibierungsparameters (IC 50-Wert) von der Autoxidationszeit der einzelnen Autoxidate.

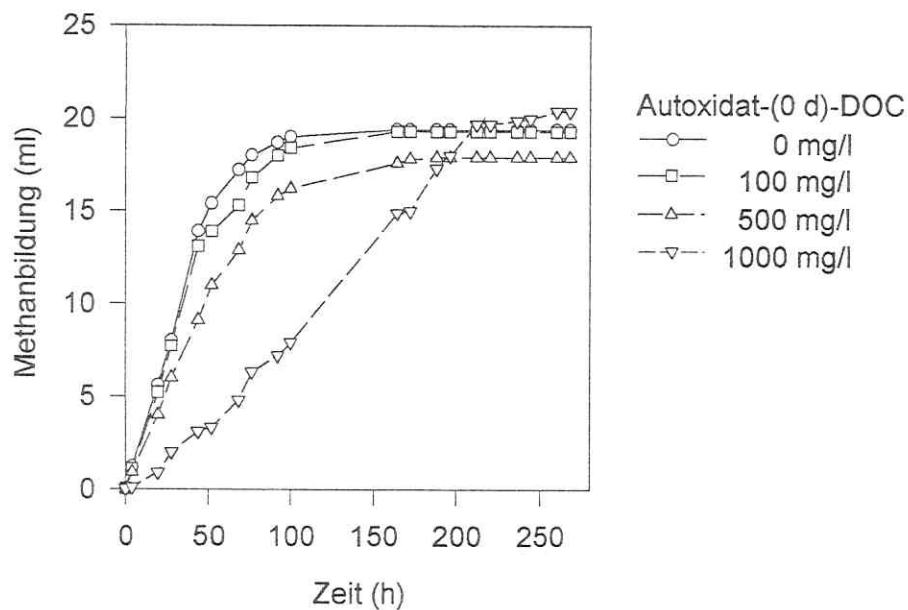


Bild 10. Methanbildung aus Acetat in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Phenol-Autoxidat (Autoxidationszeit 0 d) durch eine methanogene acetoclastische Anreicherungskultur
(Biomassekonzentration ca. 0,4 g/l BTS, Acetatanfangskonzentration 20 mMol/l).

Die Wirkung von Phenol nach dem Autoxidationsversuch wurde lediglich hinsichtlich des Acetatabbaus untersucht. In Bild 11 ist keine signifikante Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von der Autoxidationszeit zu erkennen. Alle Proben verursachten jedoch erwartungsgemäß eine stärkere Inhibierung mit steigender Konzentration. Bei 1000 mg/l Autoxidat-DOC wurde die Methanbildung zu ca. 70 % gehemmt. Unter Berücksichtigung der im Abschnitt 4.1.1. dargestellten relativen Stabilität des Phenols gegenüber Autoxidationsprozessen repräsentieren die in Bild 11 dargestellten Sachverhalte offensichtlich im wesentlichen die Wirkung des Monomers Phenol, das im untersuchten Zeitraum kaum autoxidative Verknüpfungsreaktionen einging.

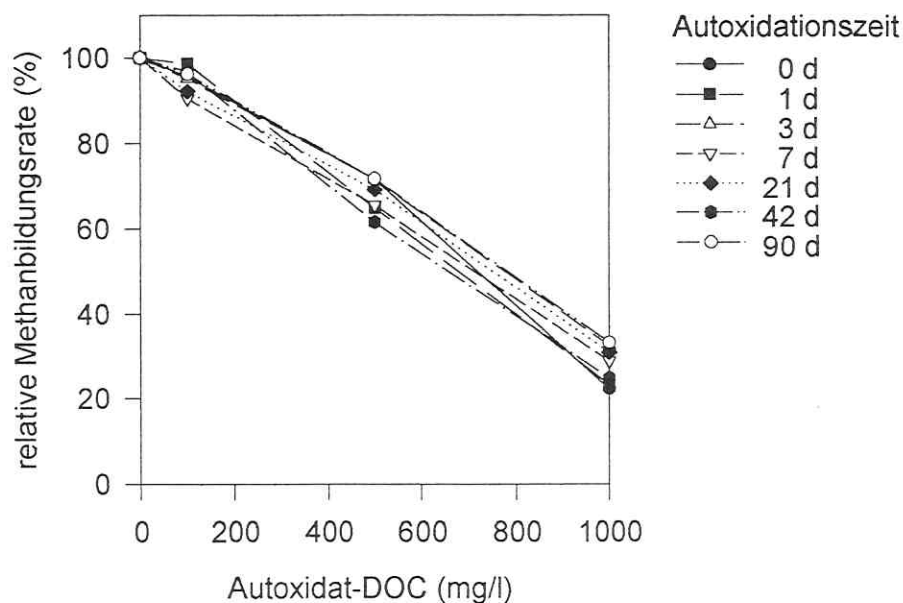


Bild 11. Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Acetat durch Phenol-Autoxidat.
(Anfangs-Acetatkonzentration = 20 mMol/l)

Ausgehend davon zeigt der ermittelte IC-50-Wert (zwischen 600 und 800 mg/l DOC) gute Übereinstimmung mit den aus der Literatur verfügbaren IC-50-Werten für die Hemmung des methanogenen Acetatabbaus durch Phenol (vgl. Abschnitt 2.3.1.2.). Unter der Annahme, daß beim Autoxidationsversuch von Phenol tatsächlich keine Unterschiede hinsichtlich der Toxizität auftraten, repräsentiert Bild 11 die Darstellung von sieben Parallelversuchen und

vermittelt damit einen Eindruck von der Genauigkeit der Methode. Die maximale Schwankung der relativen Methanbildungsraten der Einzelversuche lag bei 12 %.

Bei allen Autoxidaten, deren monomere phenolische Ausgangsstoffe mindestens zwei polare Gruppen enthalten, kam es zu deutlichen Unterschieden der inhibierenden Wirkung in Abhängigkeit von der Autoxidationszeit. Dabei wurde im Verlaufe des Autoxidationsprozesses zunächst ein starker Anstieg und nachfolgend ein langsamer verlaufender Rückgang der hemmenden Effekte beobachtet. Als graphische Veranschaulichung dessen wurden im Bild 12 beispielhaft die Dosis-Wirkungs-Kurven für die Inhibierung des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch Brenzkatechin-Autoxidat dargestellt. Sowohl hinsichtlich des Acetat- als auch des Phenolabbaus ließen 500 mg/l DOC des monomeren Brenzkatechins noch ca. 35-40 % Methanbildungsaktivität zu, während bei den Autoxidaten nach 1, 3 und 7 Tagen diese Konzentration bereits zur vollständigen Hemmung führte. Der mit zunehmender Autoxidationszeit einsetzende Entgiftungsprozeß ermöglichte beim Acetatabbau nach 42 und 90 Tagen Autoxidation eine vollkommen ungehemmte Methanbildung, während ein inhibitorisches Potential dieser Autoxidate auf den Phenolabbau verblieb, welches quantitativ mit dem des monomeren Brenzkatechins vergleichbar ist.

Wenngleich dasselbe qualitative Verhalten der unterschiedlichen phenolischen Monomere hinsichtlich der Entwicklung des inhibitorischen Potentials während ihrer Autoxidation gefunden wurde, so unterschied sich doch die quantitative Ausprägung der beobachteten Effekte bei den einzelnen Autoxidaten beträchtlich voneinander. Die maximale während der Autoxidation erreichte Inhibierung, die Vollständigkeit des nachfolgenden Entgiftungsprozesses sowie die Geschwindigkeiten von Inhibierungszu- und abnahme waren deutlich von der Struktur des monomeren phenolischen Ausgangsstoffes abhängig.

Eine direkte Gegenüberstellung der Entwicklung der inhibierenden Wirkungen einzelner phenolischer Autoxidationslösungen wird durch Darstellung eines charakteristischen Inhibierungsparameters über der Autoxidationszeit ermöglicht. Ein solcher charakteristischer Inhibierungsparameter könnte der K_i -Wert des PEARSON-Modells

$$v/v_{\max} = 1/(1 + (I/K_i)^n)$$

sein.

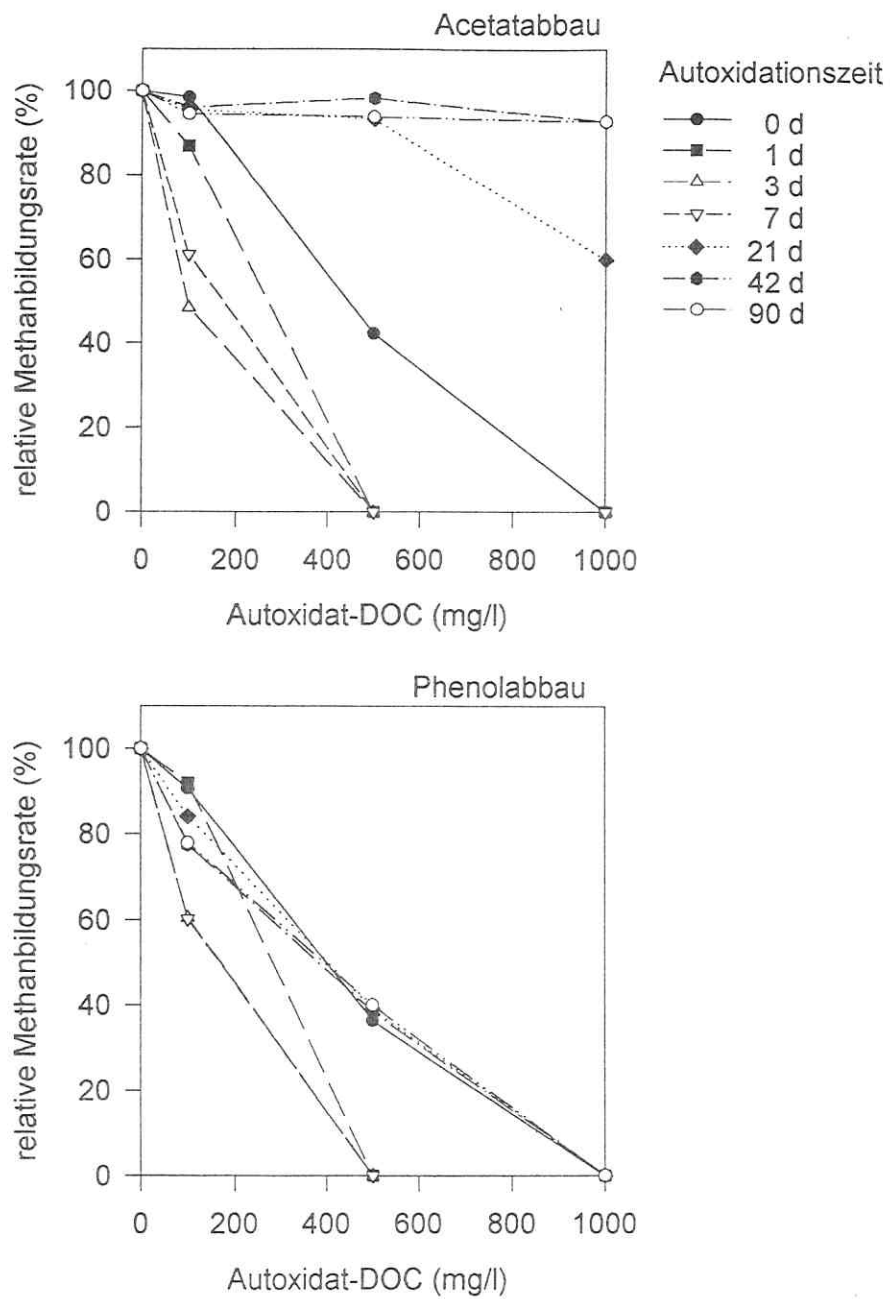


Bild 12. Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Acetat und Phenol durch Brenzkatechin-Autoxidat.

Dabei entspräche der Quotient $v/v_{\max}$ der relativen Methanbildungsrate von 100 %, I der DOC-Konzentration der Autoxidate, K_i der Autoxidatkonzentration bei halbmaximaler Inhibition ($v/v_{\max} = 0,5$) und n einem empirischen Parameter, der die Empfindlichkeit der Methanogenese gegenüber Unterschieden in der Autoxidatkonzentration zum Ausdruck brächte. In Auswertung der Daten wurde jedoch festgestellt, daß die inhibierende Wirkung phenolischer Autoxidationsprodukte nur unzureichend mit dem PEARSON-Modell beschreibbar war, da sich in vielen Fällen die Korrelation der experimentellen Daten mit dem Modell als unbefriedigend erwies. Als charakteristischer Inhibierungsparameter wurde daher der IC-50-Wert benutzt, der formal dieselbe Bedeutung wie der K_i -Wert des PEARSON-Modells besitzt und in diesem Fall der Autoxidatkonzentration entspricht, die eine relative Methanbildungsrate von 50 % bedingt. Da sich kein allgemeingültiger mathematischer Zusammenhang zur Beschreibung der inhibitorischen Wirkungen phenolischer Autoxidationsprodukte finden ließ, wurden die IC-50-Werte graphisch anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven bestimmt. Die Abhängigkeiten der IC-50-Werte für den Abbau von Acetat bzw. Phenol in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte wurde in den Bildern 13 und 14 dargestellt. Trat in einzelnen Fällen keine Hemmung der Methanogenese um mindestens 50 % ein, so wurde der IC-50-Wert mit 1000 mg/l angenommen. Diese Abweichung von den realen Ergebnissen erweist sich als unproblematisch, wenn Verbindungen, die bei einer DOC-Konzentration von 1000 mg/l (höchste getestete Konzentration) eine relative Methanbildungsrate von mehr als 50 % ermöglichten, als nicht toxisch interpretiert werden.

Die Abhängigkeit der IC-50-Werte für den methanogenen Acetat- und Phenolabbau von der Autoxidationszeit der getesteten monomeren Phenole (Bild 13 und 14) läßt folgende grundsätzliche Aussagen zu:

Die autoxidative Behandlung von Phenol führte unter den gewählten Bedingungen zu keiner Veränderung der inhibierenden Wirkung der Lösung gegenüber der Wirkung des Monomers.

Während der Autoxidation aller anderen getesteten Verbindungen kam es zunächst zu einem deutlichen Anstieg der inhibierenden Wirkung, wonach ein Entgiftungsprozeß einsetzte, der in vielen Fällen so weit führte, daß die sehr weitgehend oxidierten Verbindungen weniger inhibierend wirkten als die monomeren Ausgangsstoffe.

Der Anstieg der inhibierenden Wirkung in der Anfangsphase der Autoxidation verlief bei den Phenolen mit drei polaren Substituenten (Pyrogallol, Phloroglucin, 2,4-Diaminophenol) mit hoher Geschwindigkeit und erzeugte nach einem Tag der Reaktion stark inhibierende Produkte (IC-50-Werte für Pyrogallol- und 2,4-Diaminophenol-Autoxidat lagen nach einem Tag Autoxidation unter 100 mg/l Autoxidat-DOC).

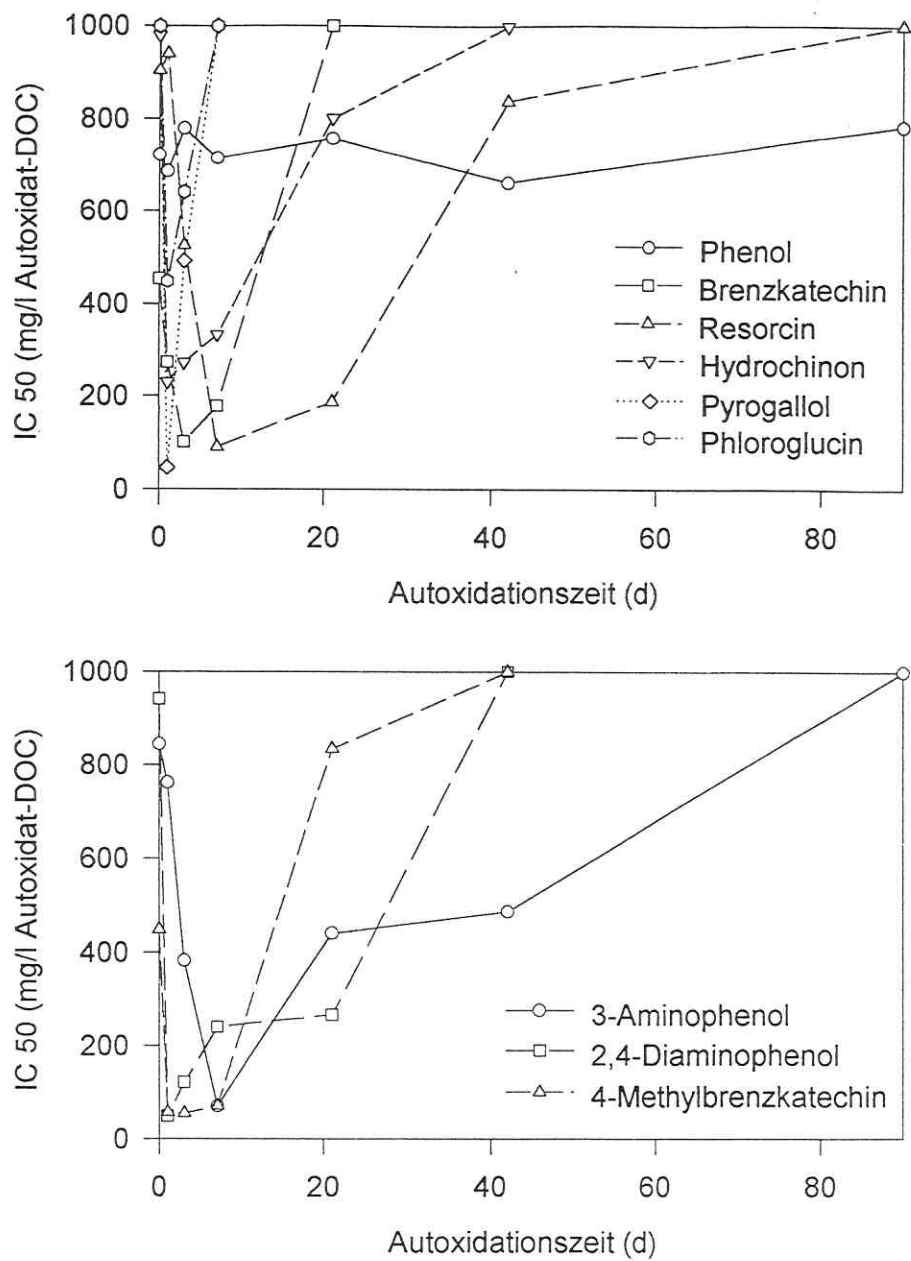


Bild 13. Halbmaximale Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Acetat durch phenolische Autoxidationsprodukte in Abhängigkeit von der Autoxidationszeit.

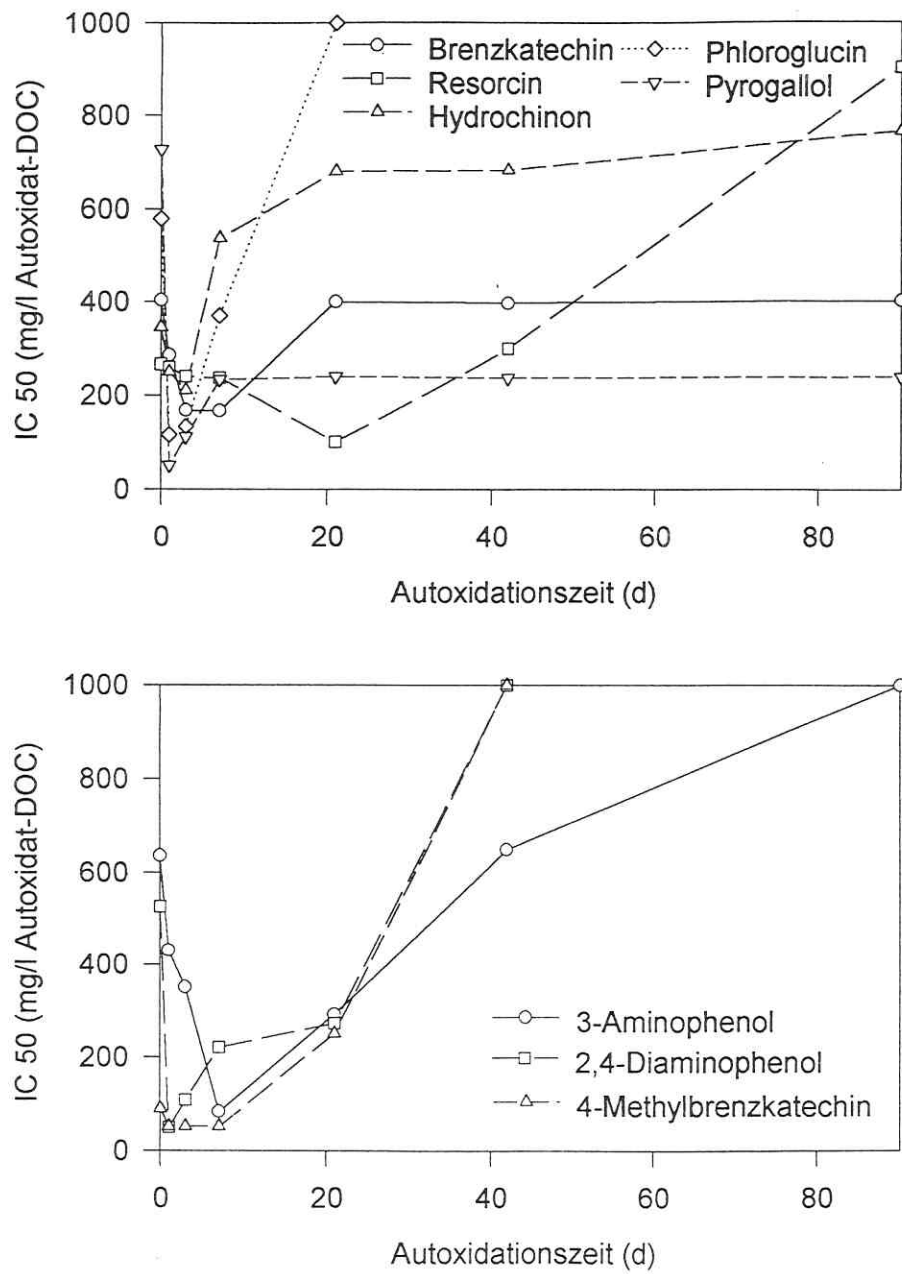


Bild 14. Halbmaximale Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Phenol durch phenolische Autoxidationsprodukte in Abhängigkeit von der Autoxidationszeit.

Ähnlich verhielten sich auch die Phenole mit zwei polaren Gruppen in o- oder p-Stellung (Brenzkatechin, Hydrochinon, 4-Methylbrenzkatechin), wobei der Vergiftungsprozeß jedoch tendenziell etwas langsamer verlief und die maximal erreichte inhibierende Wirkung im Falle der unmethylierten Vertreter etwas geringer ausfiel.

Die Methylgruppe des 4-Methylbrenzkatechins erhöhte die maximal erreichte Inhibierung gegenüber dem nichtmethylierten Brenzkatechin auf das Level der bei den dreifach polar substituierten Phenolen Pyrogallol und 2,4-Diaminophenol gefundenen Werte.

Die maximal erreichte inhibierende Wirkung von Phloroglucin-Autoxidat auf den Acetatabbau (nach einem Tag Autoxidation) entsprach einem IC-50-Wert von ca. 450 mg/l Autoxidat-DOC und verkörpert damit die geringste maximale Hemmung unter allen zur Autoxidation gebrachten Verbindungen (das nicht zur Autoxidation neigende Phenol ausgenommen). Die Ursache dafür kann vermutlich in der Bildung UV-aktiver, wahrscheinlich niedermolekularer stabiler Produkte während der Autoxidation gesehen werden (vgl. Abschnitt 4.1.1.), die den Acetatabbau nicht oder geringfügig hemmten.

Der auf den Zustand maximaler Toxizität folgende Entgiftungsprozeß wies bei den Autoxidaten der dreifach hydroxylierten Phenole Pyrogallol und Phloroglucin die höchste Geschwindigkeit auf. Etwas langsamer verlief die Entgiftung bei Brenzkatechin-, Hydrochinon-, 4-Methylbrenzkatechin- und 2,4-Diaminophenol-Autoxidat.

Im Unterschied zu Brenzkatechin, Hydrochinon und 4-Methylbrenzkatechin verlief der Anstieg des inhibitorischen Potentials mit der Autoxidationszeit bei den zweifach polar substituierten Phenolen mit den Substituenten in m-Stellung (Resorcin, 3-Aminophenol) relativ langsam. Die Zustände maximaler Inhibierung wurden hier erst am 7. bzw. 21. Tag der Autoxidation erreicht. Dementsprechend langsam war auch der Entgiftungsprozeß. Dieser war möglicherweise bis zum 90. Tag der Autoxidation teilweise noch nicht abgeschlossen (Hemmung des Phenolabbaus durch Resorcin-Autoxidat).

Hinsichtlich der beiden Referenzsubstrate Acetat bzw. Phenol ergaben sich ähnliche Werte bezüglich der maximal erreichten Inhibierung (die IC-50-Werte lagen hierbei für den Abbau beider Substrate bei den meisten Autoxidaten um oder unter 200 mg/l Autoxidat-DOC). Bei längeren Autoxidationszeiten traten jedoch deutliche Unterschiede zwischen dem Verhalten der acetatabbauenden und der phenolabbauenden Kultur bei einer Reihe von Autoxidaten auf. Während der Entgiftungsprozeß aller Autoxidate bezogen auf den Acetatabbau nahezu umfassend verlief, wiesen die Autoxidate der o-hydroxylierten Phenole Brenzkatechin und Pyrogallol auch bei hohen Autoxidationszeiten noch eine relativ hohe Resttoxizität auf den Phe-

nolabbau auf. Dies trifft für das dreifach hydroxylierte Pyrogallol (IC 50 ca. 240 mg/l Autoxidat-DOC) in noch stärkerem Maße als für das zweifach hydroxylierte Brenzkatechin (IC 50 ca. 400 mg/l Autoxidat-DOC) zu. Eine gewisse Resttoxizität verblieb auch beim p-hydroxylierten Hydrochinon. Weiterhin interessant ist dabei, daß der Entgiftungsvorgang nicht behindert wurde, wenn die Monomere nicht ausschließlich Hydroxylgruppen aufwiesen, bei denen die Autoxidation über o- oder p-Chinone verlaufen kann, sondern teilweise Aminogruppen enthielten (2,4-Diaminophenol) bzw. über zusätzliche unpolare Gruppen verfügten (4-Methylbrenzkatechin). Keine Behinderung des Entgiftungsprozesses bezüglich des methanogenen Phenolabbaus war auch bei den Autoxidaten der in m-Stellung hydroxylierten Phenole Resorcin und Phloroglucin zu beobachten, bei welchen zunächst keine o- oder p-Chinone gebildet werden können.

4.1.4. Inhibierung des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch Autoxidationsprodukte eines äquimolaren Brenzkatechin-/Resorcin-Gemisches

Unter Berücksichtigung der relevanten Substanzvielfalt autoxidierbarer Verbindungen in phenolischen Deponiewässern ist ein äquimolares Brenzkatechin-/Resorcin-Gemisch zur Autoxidation gebracht und auf seine inhibitorische Wirkung hinsichtlich des anaeroben Acetat- und Phenolabbaus in Abhängigkeit von der Autoxidationszeit untersucht worden. Die dabei erzielten Daten wurden den aus Experimenten mit singulären Ausgangsstoffen gewonnenen Ergebnissen gegenübergestellt (Bild 15). Die Graphiken dokumentieren sowohl beim Acetat- als auch beim Phenolabbau eine gegenüber dem monomeren Gemisch gestiegene inhibierende Wirkung der Autoxidate bis zum 7. Tag der Autoxidation. Der danach einsetzende Entgiftungsprozeß führte beim Abbau beider Substrate zu einer deutlichen Reduktion der inhibierenden Wirkung, wobei die Unterschiede in der Beeinflussung des Acetat- und des Phenolabbaus gering waren. Folglich wurde für das Gemisch-Autoxidat dieselbe qualitative Tendenz beobachtet wie bei Autoxidation singulärer phenolischer Verbindungen.

Im Vergleich zu Brenzkatechin-Autoxidat wurden beim Gemisch mit ähnlicher Geschwindigkeit stark inhibierende Produkte gebildet. Die IC-50-Werte für den maximal erreichten inhibierenden Zustand liegen wie bei den Autoxidaten der singulären Ausgangsstoffe im Bereich unter 200 mg/l Autoxidat-DOC. Demnach wurden bei geringen Autoxidationszeiten durch das Gemisch-Autoxidat inhibierende Effekte hervorgerufen, die sich in ihrer quantitativen Ausprägung nicht wesentlich von den durch die Autoxidate der singulären Ausgangsstoffe verursachten Wirkungen unterschieden.

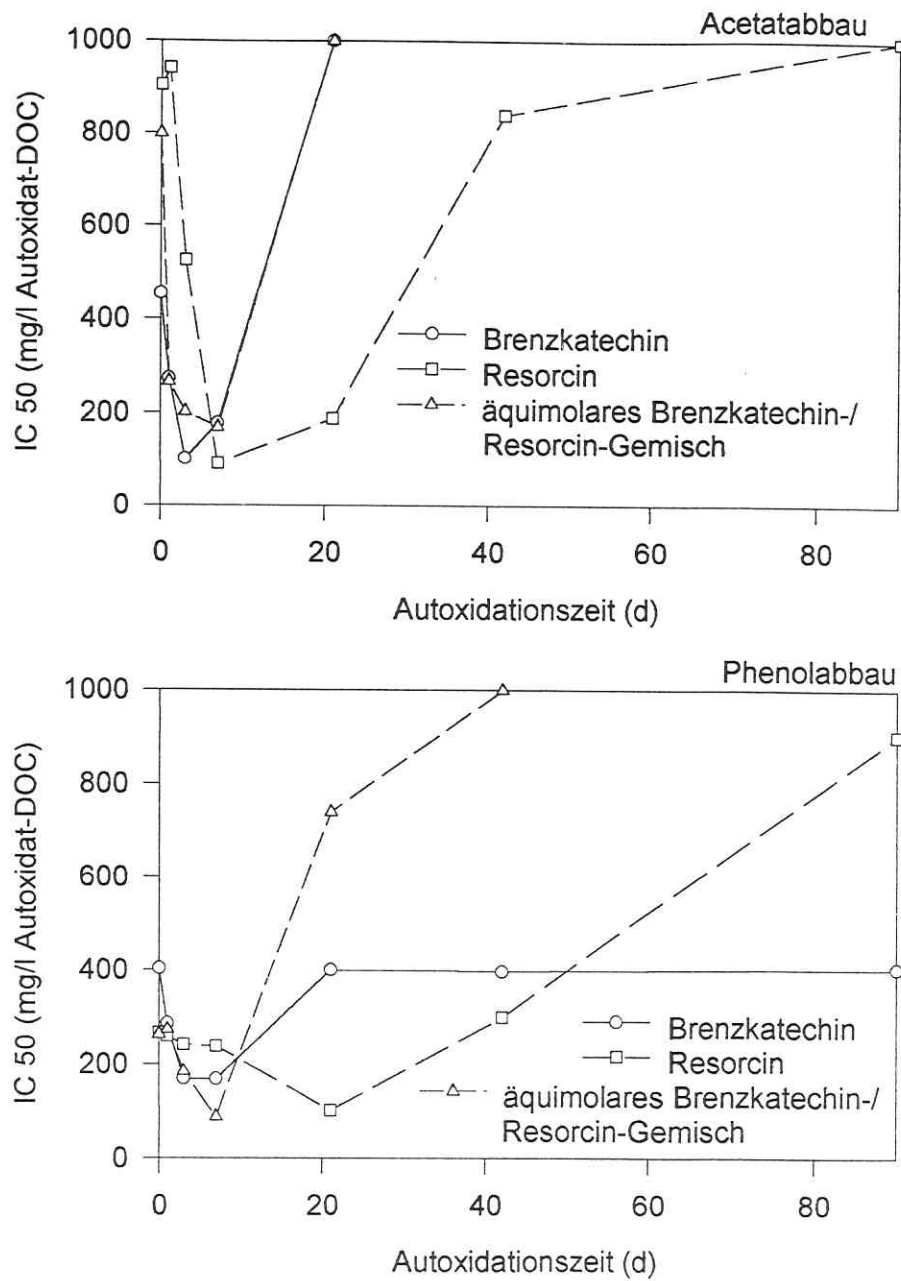


Bild 15. Halbmaximale Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Acetat und Phenol durch Brenzkatechin-/Resorcin-Autoxidat separat sowie im Gemisch.

Der Entgiftungsprozeß des Gemisch-Autoxidats hinsichtlich des Acetatabbaus vollzog sich annähernd mit der Geschwindigkeit der Entgiftung beim Brenzkatechin-Autoxidat. Auch in bezug auf den Phenolabbau erfolgte eine rasche Entgiftung beim Autoxidat des Gemisches, obwohl hier im Falle des Brenzkatechin-Autoxidats eine Limitierung der Entgiftung zu verzeichnen war.

Für Autoxidationszeiten ab 21 Tage ergab sich für das Gemisch-Autoxidat kein nennenswertes inhibitorisches Potential mehr, während bei den Autoxidaten aus singulären Ausgangsstoffen teilweise inhibierende Eigenschaften über lange Autoxidationszeiten fortbestanden.

Offenbar führte die gleichzeitige Gegenwart von Brenzkatechin und Resorcin während des Autoxidationsprozesses nicht zu Strukturen, die für die Hemmung des Phenolabbaus bei hohen Autoxidationszuständen des Brenzkatechins charakteristisch waren. Möglicherweise behinderte die Einbindung von Resorcin oder von Oxidationsprodukten des Resorcins in die Strukturen des Brenzkatechin-Autoxidats die Verknüpfung der aromatischen Ringe über die Zwischenstufen des o-Chinons. Unter Berücksichtigung der Reaktivität der o-Chinone sollte aber die Verknüpfung einzelner o-Chinonmoleküle mit wesentlich größerer Geschwindigkeit verlaufen als die Einbindung von relativ reaktionsträgem Resorcin. Demzufolge scheint als Ursache der ausbleibenden Entgiftungslimitierung durch hochoxidiertes Gemisch-Autoxidat beim methanogenen Phenolabbau ein anderer Effekt wahrscheinlicher zu sein: Ausgehend von der Annahme, daß trotz des ungeordneten Charakters von Autoxidationsreaktionen bestimmte Charakteristika der entstehenden Strukturen in Abhängigkeit vom monomeren Ausgangsstoff existieren, ist auch vorstellbar, daß bei gleichzeitigem Vorliegen von Brenzkatechin und Resorcin während der Autoxidation sich zunächst bevorzugt Brenzkatechin-Autoxidate über die Zwischenstufen des o-Chinons bilden. Mit fortschreitender Reaktion würden sich an der Peripherie der gebildeten Produkte Strukturen anreichern, die aus den Oxidationsprozessen des langsamer reagierenden Resorcins resultieren. Dies hätte strukturelle Inhomogenitäten des gebildeten Gemisch-Autoxidats in der Weise zur Folge, daß die für die Hemmung des Phenolabbaus verantwortlichen durch die Brenzkatechin-Autoxidation dominierten Strukturen im Kern der makromolekularen Komplexe eingeschlossen würden. Nach außen trügen diese Komplexe den Charakter von Resorcin-Autoxidat, bei welchem keine Limitierung der Entgiftung hinsichtlich des Phenolabbaus beobachtet worden war (Abschnitt 4.1.3.). Daß dabei jedoch die Entgiftung von Gemisch-Autoxidat zeitlich nicht mit der Entgiftung von Resorcin-Autoxidat einhergeht, sondern schneller verläuft (Bild 15), läßt sich vermutlich mit der hohen Anzahl reaktiver Bindungsstellen des den Kern der Komplexe dominierenden Brenzkatechin-Autoxidats erklären, durch die offenbar eine schnellere Anbindung von Resorcin-Autoxidat ermöglicht wird.

4.1.5. Reversibilität der Inhibierung

Die Reversibilität der Inhibierung des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen durch phenolische Autoxidationsprodukte wurde anhand des autoxydierten äquimolaren Brenzkatechin-/Resorcin-Gemisches untersucht. Das Gemisch-Autoxidat hatte die unter Abschnitt 4.1.4. in Bild 15 dargestellten Wirkungen gezeigt. Im Anschluß an diese Experimente wurde die Kulturflüssigkeit mittels einer Schlauchpumpe aus den Blutkonservenglasflaschen entfernt, wobei die sedimentierte Biomasse in den Gefäßen verblieb. Die Biomasse wurde nachfolgend mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gewaschen und nach erneuter Sedimentation der Biomasse der Überstand wiederum abgepumpt. Das Kulturvolumen wurde nachfolgend mit frischer Nährsalzlösung nach Abschnitt 3.2.1.2. unter Zugabe der Referenzsubstrate Acetat bzw. Phenol in der jeweiligen Konzentration zu 50 bzw. 100 ml ergänzt. Analog wurden die nichtinhibierten Referenzansätze behandelt. Durch Arbeiten unter Stickstoffatmosphäre wurde versucht, den Luftkontakt der Kulturen weitgehend auszuschließen. Die Kinetik der Methanbildung wurde in der üblichen Weise wie bei den Inhibierungsexperimenten bestimmt. In Bild 16 sind die relativen Methanbildungsraten beim Acetat- und Phenolabbau mit den Kulturen dargestellt, die zuvor für die Dauer von ca. zwei Wochen dem Gemisch-Autoxidat mit verschiedenen Autoxidationszeiten ausgesetzt gewesen waren. Auch im Reversibilitätsversuch zeigten die Kulturen, die vorher im Kontakt mit 500 mg/l Autoxidat-DOC der Autoxidate nach 1, 3 und 7 Tagen Autoxidation gestanden hatten, eine vollständige Inhibierung sowohl des Acetat- als auch des Phenolabbaus. Die Kulturen, die zuvor in Gegenwart der höher oxidierten Gemische inkubiert worden waren, zeigten nur noch eine geringe bzw. keine signifikante Hemmung des Acetat- und Phenolabbaus, wobei aber auch im Inhibierungstest diese Hemmung bei 1000 mg/l Autoxidat-DOC noch nicht vollständig war.

Die Ergebnisse belegen, daß bei den Autoxidaten nach 1, 3 und 7 Tagen der Autoxidation keine deutliche Reaktivierung der Kulturen stattgefunden hat. Demzufolge muß die durch diese Autoxidate erzeugte Inhibierung als eindeutig irreversibel betrachtet werden. Ein gewisses Reaktivierungsvermögen schien aber im Falle der Autoxidate nach 42 und 90 Tagen der Autoxidation zu bestehen, da die relativen Methanbildungsraten nach Entfernung der Autoxidate hier etwas höher lagen und in den ungehemmten Bereich eintraten.

Es kann erwartet werden, daß in den Anfangsstadien der Autoxidation von Brenzkatechin schnell o-Chinon als Zwischenprodukt gebildet wird, so daß bei diesen Autoxidaten nicht nur Wasserstoffbrückenbindungen zwischen phenolischen OH-Gruppen und bakteriellen Proteinen in Frage kommen, sondern kovalente Bindungen der Chinone an die Proteine z.B. über die -SH-Gruppen bedeutsam sein können. Lockere Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen sollten reversibel sein, während kovalente Bindungen nicht durch Austausch der wäßrigen Phase zu spalten sind (HOFFMANN-OSTENHOF, 1963; McMANUS et al., 1985; BEART et al., 1985) und demzufolge zu einer irreversiblen Hemmung führen.

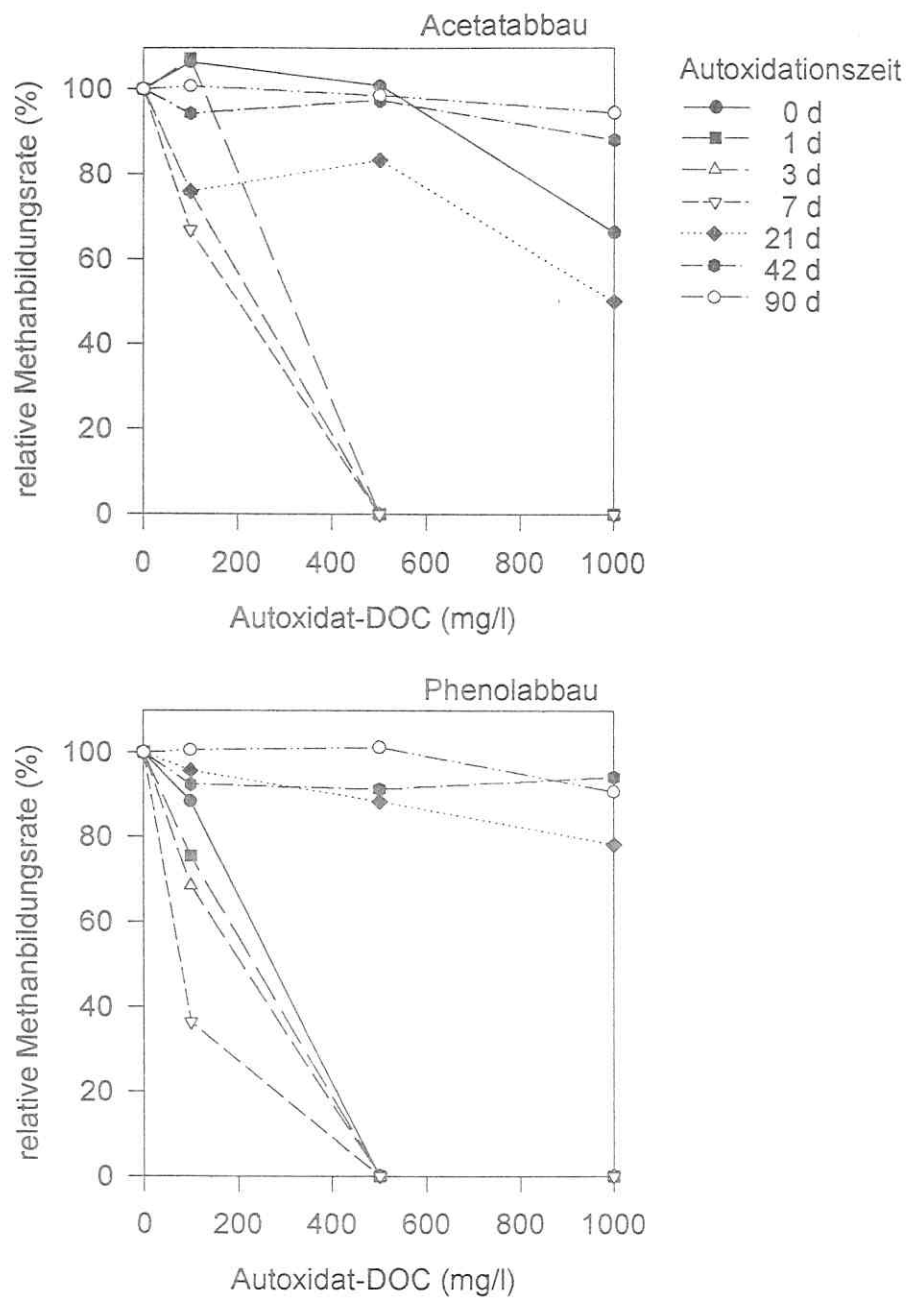


Bild 16. Irreversible Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Acetat bzw. Phenol durch ein äquimolares autoxidiertes Brenzkatechin-/Resorcin-Gemisch.

Die Stärke der verbleibenden Inhibierung nach Entfernung der Autoxidate verdeutlicht, daß die Chinon-Protein-Bindung offenbar nicht nur einen Teilaspekt unter den möglichen Inhibierungsmechanismen einnimmt, sondern als die dominierende Ursache für die Inhibierung angesehen werden kann. Mit fortschreitender Autoxidationszeit läßt nicht nur die Inhibierung selbst nach, sondern auch die Reversibilität der Hemmung durch die höher oxidierten Produkte nimmt zu. Das kann mit dem Verbrauch der chinoiden Strukturen während der Autoxidation, der mit dem Aufbau makromolekularer Komplexe einhergeht, erklärt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Inhibierung durch Autoxidate mit langer Autoxidationsdauer nicht mehr in erster Linie um kovalente Bindungsmechanismen mit bakteriellen Proteinen, sondern um relativ leicht lösbare Verknüpfungen.

4.1.6. Die Rolle der Molekülgröße für das inhibitorische Potential phenolischer Autoxidationsprodukte

Die Molekülgröße, für die bei oligomeren und polymeren Verbindungen eine direkte Korrelation mit dem Molekulargewicht besteht, wird in der Regel als das bestimmende Merkmal für die Toxizität phenolischer Autoxidationsprodukte und anderer Makromoleküle mit aromatischer Grundstruktur (z.B. Lignin) angenommen. Die drastische inhibierende Wirkung von oligomeren Tanninen und Ligninbruchstücken auf methanogene Abbauprozesse geht in der Regel zurück, wenn die Oligomere durch Autoxidationsreaktionen zu makromolekularen Komplexen aufgebaut werden (FIELD und LETTINGA, 1989; FIELD et al., 1989, 1990a,b; SIERRA-ALVAREZ und LETTINGA, 1991). Als Ursache für diesen Effekt wird angegeben, daß Autoxidationsprodukte mit einem Molekulargewicht ab ca. 3000 nicht mehr in die Zelle eindringen können und demzufolge dort keine toxischen Wirkungen hervorrufen können. Als Barrieren der Zelle fungieren dabei vermutlich die äußere Cytoplasmamembran gramnegativer Zellen und eventuell extrazelluläre Polysaccharide, die eine Schutzschicht um die Bakterien bilden. Auch aus Arbeiten zur anaeroben Degradation von Lignin und Ligninbruchstücken ergaben sich Hinweise auf wachsende Bioverfügbarkeitsprobleme mit steigendem Molekulargewicht (COLBERG und YOUNG, 1985b).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Molekülgrößenfraktionen von Brenzkatechin-Autoxidat nach Autoxidationszeiten von 1 und 90 Tagen auf ihre inhibierenden Wirkungen hinsichtlich des Acetat- und Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen untersucht worden. Bild 17 zeigt für den Acetatabbau einen nahezu deckungsgleichen Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven des unfractionierten Autoxidats und dessen Molekülgrößenfraktion < 3 kD bei einer Autoxidationszeit von einem Tag. Ähnliches trifft für den Phenolabbau zu.

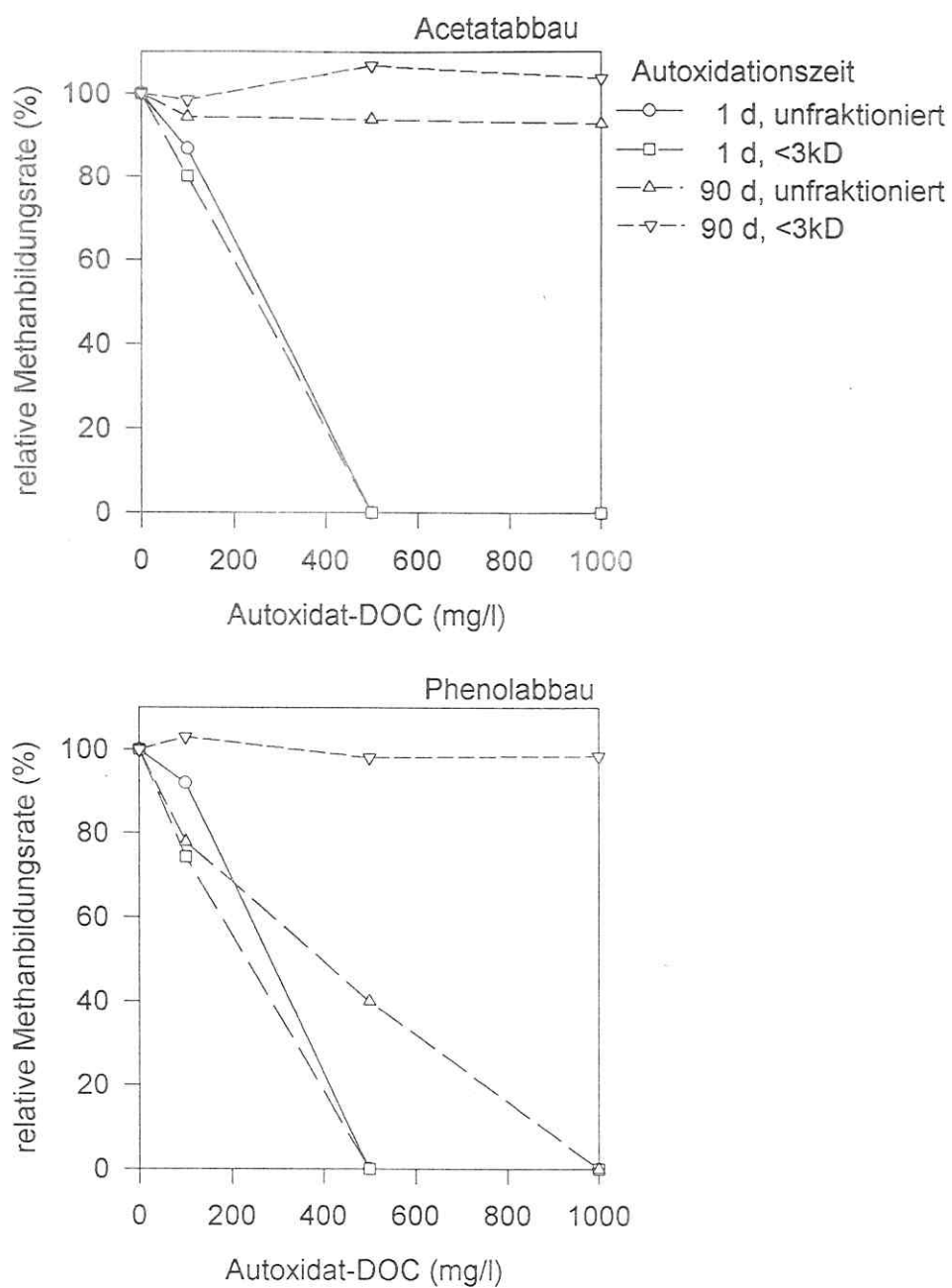


Bild 17. Hemmung der Methanbildung beim Abbau von Acetat bzw. Phenol durch fraktioniertes Brenzkatechin-Autoxidat.

Dies bestätigt, daß die inhibierende Wirkung dieser Autoxidate durch Substanzen im oligomeren Molekülgrößenbereich hervorgerufen wurde, die sich im Anfangsstadium des Autoxidationsprozesses bildeten, während von höhermolekularen Verbindungen hier keine signifikante Hemmung ausging, obwohl Verbindungen > 3 kD bereits zu etwa einem Drittel zum DOC des Gesamtgemisches beitrugen.

Bei Brenzkatechin-Autoxidat mit einer Autoxidationszeit von 90 Tagen zeigte sich ein etwas anderes Bild. Obwohl hier ein sehr weitgehend oxidiertes Produkt vorlag, fanden sich im Gemisch dennoch Verbindungen mit Molekülgrößen unter 3 kD, die etwa einem Viertel des Gesamt-DOC entsprachen. Die niedermolekulare Fraktion hatte ebenso wie das unfractionierte Autoxidat keinen inhibierenden Einfluß auf den methanogenen Acetatabbau. Hinsichtlich des Phenolabbaus zeigte sich aber der bereits im Abschnitt 4.1.3. beschriebene inhibierende Einfluß des 90-d-Autoxidats. Demgegenüber wies jedoch die Molekülgrößenfraktion < 3 kD dieses Autoxidats keinerlei inhibierende Wirkung im untersuchten Konzentrationsbereich auf. Folgerichtig muß die Hemmung des Phenolabbaus durch das unfractionierte Autoxidat, die auch im Falle von Pyrogallol- und in geringerem Maße auch bei Hydrochinon-Autoxidat gefunden worden war, durch Verbindungen mit Molekülgrößen größer als 3 kD hervorgerufen worden sein. Geht man von 3 kD als Penetrationsgrenze in mikrobielle Zellen aus, so kommen als Wirkungsort für die erwähnte Inhibierung nur die äußere Cytoplasmamembran oder die Zellwand in Frage. Möglich ist hier eine über lockere Wechselwirkungskräfte inaktivierende Bindung der Makromoleküle an membrangebundene oder Transportproteine oder eine Abschirmung der Zelle gegen den Zutritt des Substrates Phenol, wobei auch beide Varianten im Zusammenhang miteinander stehen können. Die Bindung von Tanninen an Zellwandpolymere ist bei Species von *Butyrivibrio* und *Streptococcus* bereits beschrieben worden (JONES et al., 1994).

Die dargestellten Sachverhalte verdeutlichen, daß das Kriterium Molekülgröße allein nicht aussagekräftig ist für die Einschätzung oder Vorhersage des inhibitorischen Potentials phenolischer Autoxidationsprodukte. Die Fraktionen < 3 kD von 1-d- und 90-d-Brenzkatechin-Autoxidat unterscheiden sich beträchtlich in ihrer inhibierenden Wirkung gegenüber anaeroben Abbauprozessen. Möglicherweise hängt das inhibitorische Potential viel stärker vom Oxidationszustand des Gemisches ab. Die < 3 kD-Fraktion des 1-d-Autoxidats enthält wie bereits erläutert hochreaktive Verbindungen, die Bindungen mit bakteriellen Proteinen eingehen, während auch beim 90-d-Autoxidat noch Verbindungen mit Molekülgrößen < 3 kD existieren, die hier jedoch reaktionsträge sind und kein Bestreben hinsichtlich einer Bindung an biologische Strukturen aufweisen.

4.1.7. Inhibierung einzelner Stoffwechselschritte beim anaeroben Phenolmetabolismus durch phenolische Autoxidationsprodukte

Die Beeinflussung des methanogenen Abbaus spezifischer Substrate durch phenolische Autoxidationsprodukte ist bisher in der Literatur nicht näher beschrieben worden. Die Arbeiten, die aus praktischen Gesichtspunkten der mikrobiellen Behandlung von Gerbereiabwässern im Rahmen der Tanninproblematik entstanden, legten als Referenzsubstrat ein Gemisch aus niederen Fettsäuren zugrunde.

Anhand der in den vorangegangenen Abschnitten dargelegten experimentellen Ergebnisse wird deutlich, daß die Degradation von Acetat in vielen Fällen weniger empfindlich durch die Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte beeinflusst wird als der Abbau von Phenol. Für den anaeroben Phenolabbau wurden in der Vergangenheit zwei metabolische Wege diskutiert: ein Weg über die Reduktion des Phenols zu Cyclohexanol und ein Wege über die Carboxylierung und Dehydroxylierung des Phenols zu Benzoat. Beide Wege führen über die intermediären Stufen niederer Fettsäuren letztlich zu Kohlendioxid und unter methanogenen Bedingungen zusätzlich zu Methan (vgl. Abschnitt 2.2.2.).

Anhand einfacher kinetischer Versuche wurde untersucht, über welchen der beiden Wege die hier verwendete phenolabbauende Anreicherungskultur Phenol degradierte. Bild 18 zeigt einen anhand der Umsetzung zu Methan nach der BUSWELL-Gleichung quantifizierten Abbau von Phenol (1mM) und Benzoat (1mM) durch die Anreicherungskultur. Innerhalb von 11 Tagen erfolgte eine Umsetzung des Substratkohlenstoffs zu Methan von über 80 % des theoretisch möglichen Umsatzes. Die Rate des Benzoatabbaus lag dabei etwas höher als die Phenolabbaugeschwindigkeit. Mögliche Ursachen für die Differenz bis 100 % wurden im Abschnitt 4.1.2. diskutiert. Eine lag-Phase wurde im Falle der Anreicherungskultur weder beim Phenol- noch beim Benzoatabbau beobachtet. Eine Umsetzung von Cyclohexanol (1 mmol/l) zu Biogas durch die Anreicherungskultur wurde innerhalb von 39 Tagen nicht beobachtet. Parallelexperimente mit Sediment der Weißen Elster (10 Vol-% im Testansatz), aus welchem die Anreicherungskultur gewonnen worden war, zeigten, daß die Fähigkeiten zum Phenol- und Benzoatabbau dort zunächst nicht induziert waren, jedoch gleichzeitig nach einer lag-Phase von 11 Tagen induziert wurden (Bild 18). Eine Bildung von Biogas aus Cyclohexanol wurde auch in diesem Fall nicht beobachtet. Diese Resultate lassen den Schluß zu, daß der Abbau von Phenol unter methanogenen Bedingungen durch die Anreicherungskultur nicht über Cyclohexanol, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit über Benzoat erfolgte. Dieser Weg scheint generell der in der Natur dominierende zu sein (vgl. Abschnitt 2.2.2.).

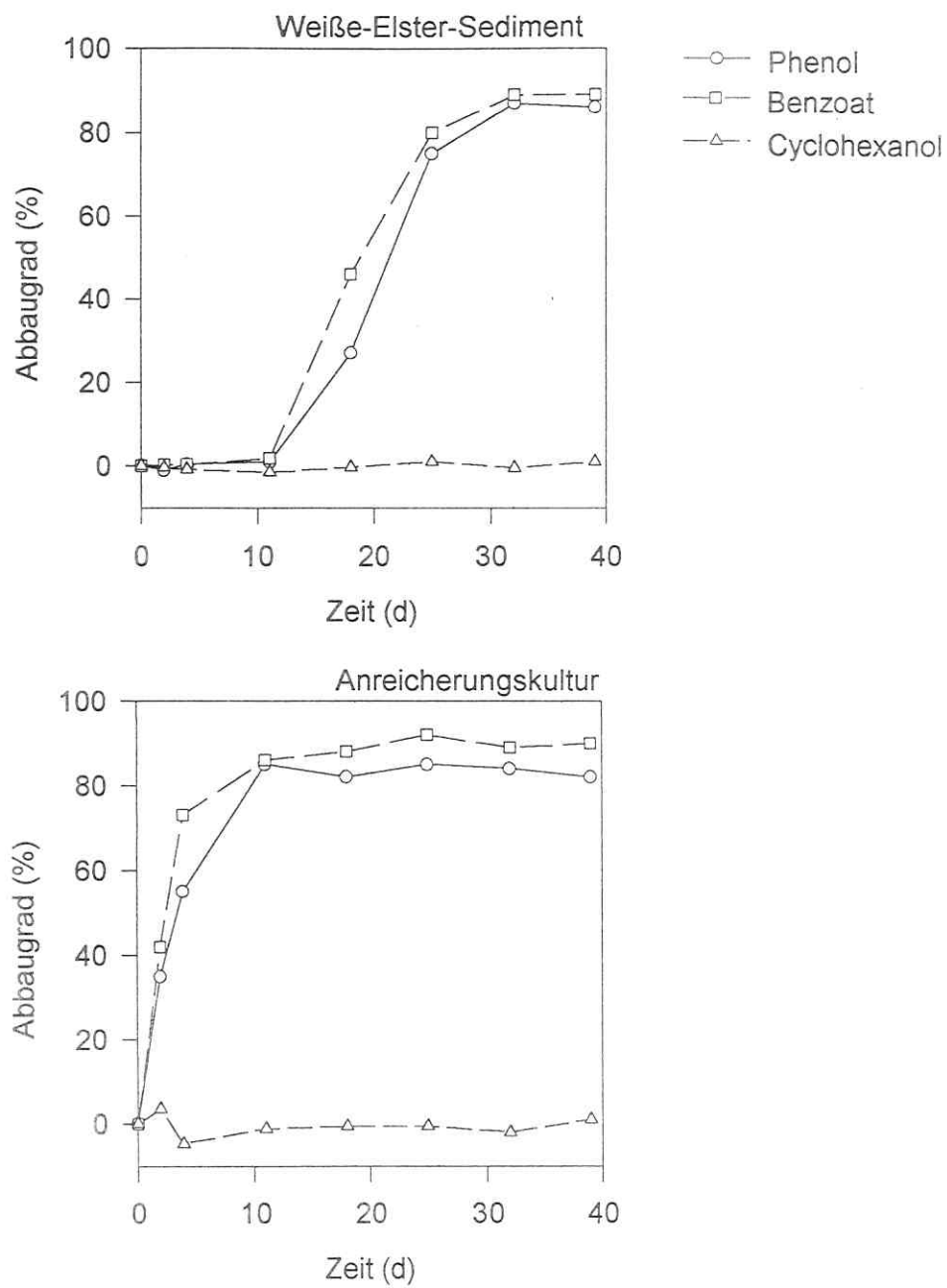


Bild 18. Abbau von Phenol und möglicher Metabolite unter methanogenen Bedingungen durch Weiße-Elster-Sediment bzw. eine daraus angereicherte Mischkultur.

Die Beeinflussung einzelner metabolischer Schritte des Phenolabbaus wurde anhand der relevanten Referenzsubstrate Phenol, Benzoat und Acetat in Gegenwart von Brenzkatechin-Autoxidat nach einer Autoxidationszeit von einem Tag vergleichend untersucht. Es sei besonders darauf hingewiesen, daß in diesem Fall die Abbauraten von Phenol und Acetat bei einem einzigen mikrobiellen Konsortium (methanbildende phenolabbauende Anreicherungskultur) verglichen wurden, während bei allen vorangegangenen Experimenten separate Kulturen für den Acetat- und Phenolabbau benutzt worden waren. Acetat wurde in diesem Fall in einer Konzentration von 3 mmol/l eingesetzt, da stöchiometrisch aus einem Mol Phenol 3 mol Acetat entstehen können. Phenol und Benzoat wurden in einer Konzentration von 1 mmol/l zugegeben. Bild 19 dokumentiert eine unterschiedlich starke Beeinflussung des Abbaus aller drei getesteter Substrate durch 1-d-Brenzkatechin-Autoxidat. Eine Konzentration von 1000 mg/l Autoxidat-DOC führte zu einer vollständigen Inhibierung des Phenolabbaus, gestattete aber noch relative Methanbildungsraten aus Benzoat bzw. Acetat von ca. 20 % bzw. nahe 40 %.

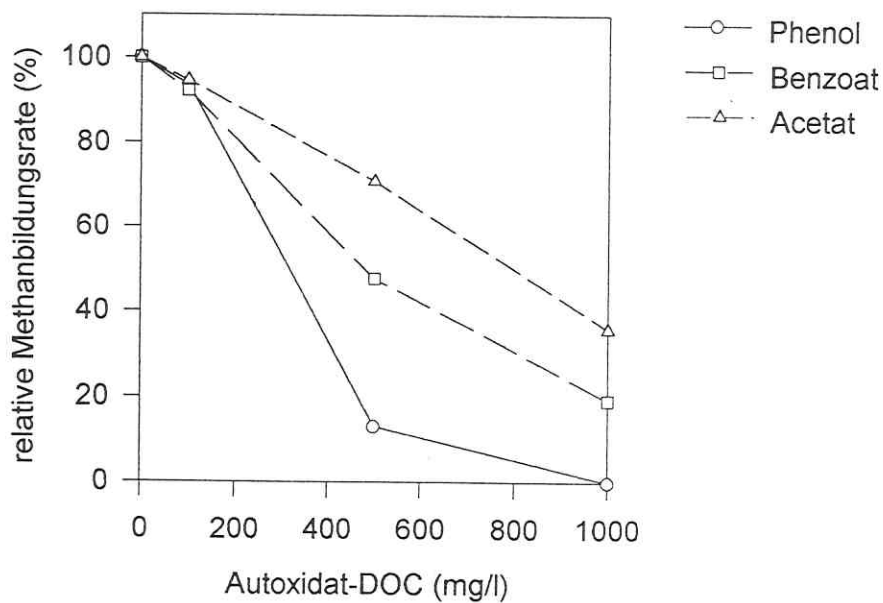


Bild 19. Hemmung der Methanbildung bei einzelnen Reaktionsschritten des Phenolabbaus durch Brenzkatechin-Autoxidat (Autoxidationszeit ein Tag).

Diese Resultate lassen die Schlußfolgerung zu, daß die unterschiedlich starke Inhibierung des anaeroben Phenol- und Acetatabbaus zum Teil zwar auf die morphologischen und physiologischen Unterschiede der am methanogenen Phenolabbau beteiligten Eubakterien und Archaeobakterien zurückzuführen sein kann, daß es jedoch auch andere Ursachen geben muß. Die signifikanten Unterschiede in der Beeinflussung des Phenol- und Benzoatmetabolismus lassen sich nicht mit der Zugehörigkeit einzelner am Abbauprozess beteiligter Species zu unterschiedlichen morphologischen Gattungen erklären. Vielmehr kommen hier wahrscheinlich Faktoren zum Tragen, die auf der enzymatischen Ebene angesiedelt sind. Offenbar reagieren die Enzyme für die Initialreaktionen des anaeroben Phenolabbaus (Carboxylierung des Phenols oder Dehydroxylierung des entstandenen Hydroxybenzoatisomers) empfindlicher gegenüber dem Brenzkatechin-Autoxidat als die Enzyme, die an der Mineralisierung von Benzoat beteiligt sind. Dennoch liegt offensichtlich auch eine geringere Empfindlichkeit des durch Archaeobakterien realisierten Acetatabbaus im Vergleich zu den durch Eubakterien katalysierten Reaktionen vor. Mögliche Ursachen können andere Strukturen im Zellwandaufbau oder andere Lipidbestandteile der Membranen in methanogenen Bakterien sein.

4.2. Mikrobielle Abbaubarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte

Durch Autoxidationsreaktionen niedermolekularer phenolischer Verbindungen erzeugte makromolekulare Strukturen gelten allgemein als biologisch schwer abbaubar. Während Weißfäule- und andere Pilze, die auch in hohem Maße für den Abbau von Lignin in der Natur verantwortlich sind, ein recht hohes Potential zur Degradation huminartiger Makromoleküle aufweisen (z.B. KHANDELWAL und GAUR, 1980; LIVERNOCHE et al., 1981; GLENN und GOLD, 1983; HAIDER und MARTIN, 1988), zeigen Bakterien solche Fähigkeiten nur in sehr geringem Maße, vor allem, wenn molekularer Sauerstoff nicht als Reaktionspartner und Elektronenakzeptor in der Atmungskette zur Verfügung steht. Neben zahlreichen Arbeiten auf dem Gebiet der Huminstoff-Forschung wurde dies durch Degradationsuntersuchungen mit Lignin-Spaltprodukten (COLBERG und YOUNG, 1985b) und autoxydierten Lösungen definierter phenolischer Ausgangsstoffe (z.B. FIELD und LETTINGA, 1989) bestätigt. Konkrete Aussagen zu den prinzipiellen Möglichkeiten und Grenzen solcher Abbauprozesse fehlen jedoch bislang.

Auf Grund der sauerstoffzehrenden Wirkung autoxydativ entstehender Verbindungen ist ihre natürliche Umgebung häufig durch ein sauerstofffreies Milieu gekennzeichnet. Unter diesen Umständen können Degradationsprozesse nur unter anaeroben Bedingungen ablaufen, so daß vom Standpunkt des Selbstreinigungspotentials von Habitaten, die eine Kontamination durch phenolische Autoxidationsprodukte aufweisen, diesbezüglich vor allem das Abbaupotential anaerober Mikroorganismen von Interesse ist. Nicht zuletzt sind anaerobe Methoden aber auch bei der Reinigung von phenolischen Wässern intensiv untersucht worden, so daß die hier besprochene Problematik auch unter diesem Gesichtspunkt bedeutsam ist.

In vielen Fällen hängt die Leistungsfähigkeit mikrobieller Abbauprozesse von energetischen Aspekten ab. Vor allem methanogene Transformationen liefern im Vergleich zu den entsprechenden Reaktionen im aeroben Milieu sehr geringe Energieausbeuten für die beteiligten Mikroorganismen. Darüber hinaus erfordern gerade methanogene Abbauprozesse aromatischer Verbindungen das syntrophe Zusammenwirken unterschiedlicher bakterieller Gattungen, so daß die geringen Energiegewinne noch zwischen den am Abbauprozess beteiligten Organismen aufgeteilt werden müssen. Obwohl umfangreich untersucht und angewandt, sind aus diesen Gründen gerade methanbildende Prozesse relativ unvorteilhaft. Durch Zugabe von Elektronenakzeptoren wie Sulfat oder Nitrat lassen sich aus Umweltproben Mikroorganismenpopulationen anreichern, die im sauerstofffreien Milieu im Vergleich zur Methanogenese mehr Energie aus der Degradation einer organischen Verbindung gewinnen können. Während die dissimilatorische Sulfatreduktion dabei nur geringfügig mehr Energie liefert als die Methanogenese, ist die Oxidation einer organischen Verbindung unter nitratreduzierenden Bedingungen mit etwa sechsfach höherem Energiegewinn gegenüber der methanogenen Degradation verbunden (ZEHNDER, 1988).

Ausgehend von diesen Überlegungen ist daher das degradative Potential verschiedener Anreicherungskulturen in Bezug auf phenolische Autoxidationsprodukte in Gegenwart unterschiedlicher Elektronenakzeptoren (molekularer Sauerstoff, Nitrat, Sulfat, Carbonat) untersucht worden. Als Modellsubstrate wurden mit Brenzkatechin- und Resorcin-Autoxidat zwei Gemische herangezogen, die nach einer Autoxidationszeit von 10 Tagen sehr unterschiedliche Zustände hinsichtlich ihrer Sauerstoffsättigung und damit ihres Potentials zur weiteren Aufnahme von Sauerstoff aufwiesen. Die Geschwindigkeit der einzelnen Autoxidationsprozesse wurde bereits im Abschnitt 4.1.1. näher betrachtet. Die im Bild 20 dargestellte Molekülgrößenverteilung von Brenzkatechin- und Resorcin-Autoxidat nach 10 Tagen der Autoxidation bestätigt die zuvor gefundenen Tendenzen. In beiden Fällen erzeugte die 10-tägige Autoxidation Verbindungen in einem weiten Molekülgrößenbereich bis über 10 kD. Bei Brenzkatechin-Autoxidat betrug der DOC-Anteil in der Fraktion > 10 kD über 50 %, während er bei Resorcin-Autoxidat erst zu etwa 10 % in dieser Fraktion lag.

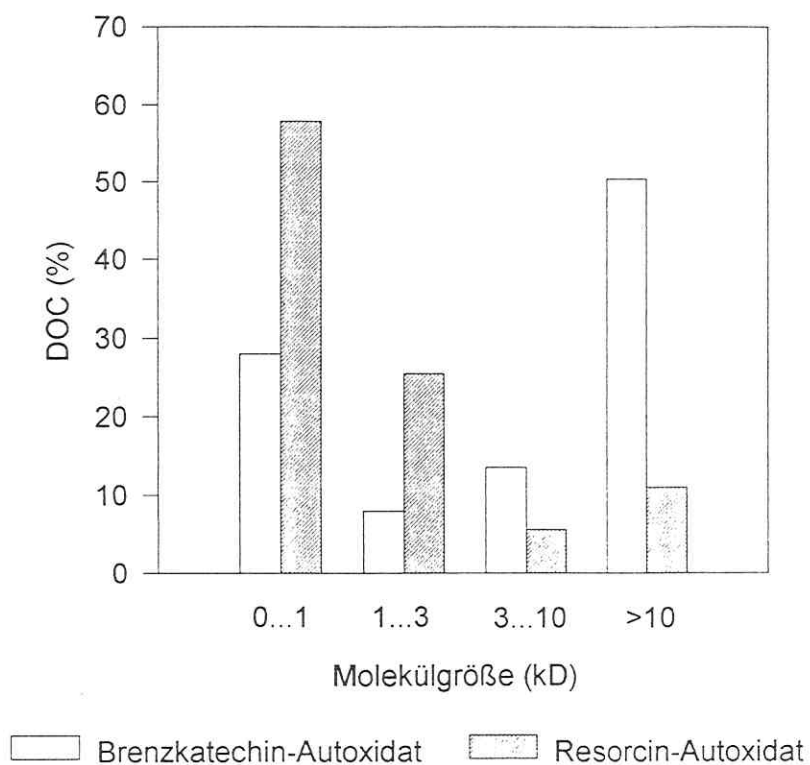


Bild 20. DOC-Verteilung in Molekülgrößenfraktionen von Brenzkatechin-/ und Resorcin-Autoxidat nach 10 Tagen Autoxidation.

In den mikrobiellen Semi-batch-Experimenten zur Degradation der eingesetzten Substrate wurde die DOC-Elimination in vier Molekülgrößenbereichen ermittelt und ist in Bild 21 als Durchschnitt drei paralleler Versuche dargestellt. Überraschenderweise wurde im Falle des Brenzkatechin-Autoxidats in den höheren Molekülgrößenfraktionen höhere DOC-Eliminationsraten ermittelt als bei niedrigen Molekülgrößen. In der Fraktion von 3 bis 10 kD wurde eine Elimination zwischen 50 und 70 % erreicht, während in der Fraktion bis 1 kD weniger als 20 % des DOC entfernt wurden. Die prozentuale DOC-Elimination bei Resorcin-Autoxidat unter aeroben Bedingungen zeigte dagegen in der Fraktion von 3 bis 10 kD einen sehr niedrigen Wert (unter 10 %) und war in der Fraktion > 10 kD sogar deutlich kleiner als Null. Unter anaeroben Bedingungen wurde der DOC in allen Molekülgrößenfraktionen des Resorcin-Autoxidats zu maximal 43 % eliminiert. Auf die Unterschiede in der Eliminationsleistung der einzelnen Anreicherungskulturen wird an späterer Stelle innerhalb dieses Abschnittes noch detailliert eingegangen. Generell bestätigen die bei einer durchschnittlichen hydraulischen Verweilzeit von 10 Tagen ermittelten DOC-Eliminationsraten, daß es sich bei phenolischen Autoxidationsprodukten um schwer abbaubare Verbindungen handelt.

Kontrollexperimente, die keine Biomasse enthielten und zudem zur Erfassung abiotischer Veränderungen im System mit Natriumazid konserviert worden waren, zeigten signifikante Verschiebungen der Molekülgrößenverteilung innerhalb von 10 Tagen unter den physikochemischen Bedingungen, die analog zu den Degradationsexperimenten eingestellt worden waren (Bild 22). Dabei wurde deutlich, daß zwei gegenläufige Tendenzen für derartige abiotische Veränderungen existieren. Erstens zeigte sich beim relativ hochoxidierten Brenzkatechin-Autoxidat sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen eine DOC-Abnahme vor allem im Molekülgrößenbereich über 10 kD, während der DOC besonders in der Fraktion unter 1 kD deutlich zunahm. Dies deutet auf Spaltungsvorgänge im makromolekularen Bereich oder auf die Auflösung nichtkovalent verknüpfter Assoziate hin. Wahrscheinlich sind es kleinere strukturelle Verbände, die hier abgespalten wurden, da sich der DOC vor allem in der niedrigsten Molekülgrößenfraktion um etwa dasselbe Maß erhöhte, um welches er in der größten Fraktion verringert wurde. Solche Spaltungs- oder Rücklösungsprozesse wurden bei Resorcin-Autoxidat, welches einen niedrigeren Oxidationszustand als das Brenzkatechin-Autoxidat aufwies, nicht beobachtet. Die abiotischen Änderungen unter anaeroben Bedingungen sind hier als nicht signifikant zu bewerten. Jedoch deuten die im aeroben Milieu beobachteten Veränderungen auf einen zweiten abiotischen Mechanismus hin. Hier kam es infolge des Sauerstoffeinflusses zur weiteren Autoxidation des Gemisches, die durch eine DOC-Abnahme im niedermolekularen Bereich und eine DOC-Zunahme in der Molekülgrößenfraktion über 10 kD offenkundig wurde. Weitergehende Autoxidationsprozesse fanden beim Brenzkatechin-Autoxidat nicht in dem Maße statt, daß sie mittels der Molekülgrößenfraktionierung hätten eindeutig erkenntlich gemacht werden können.

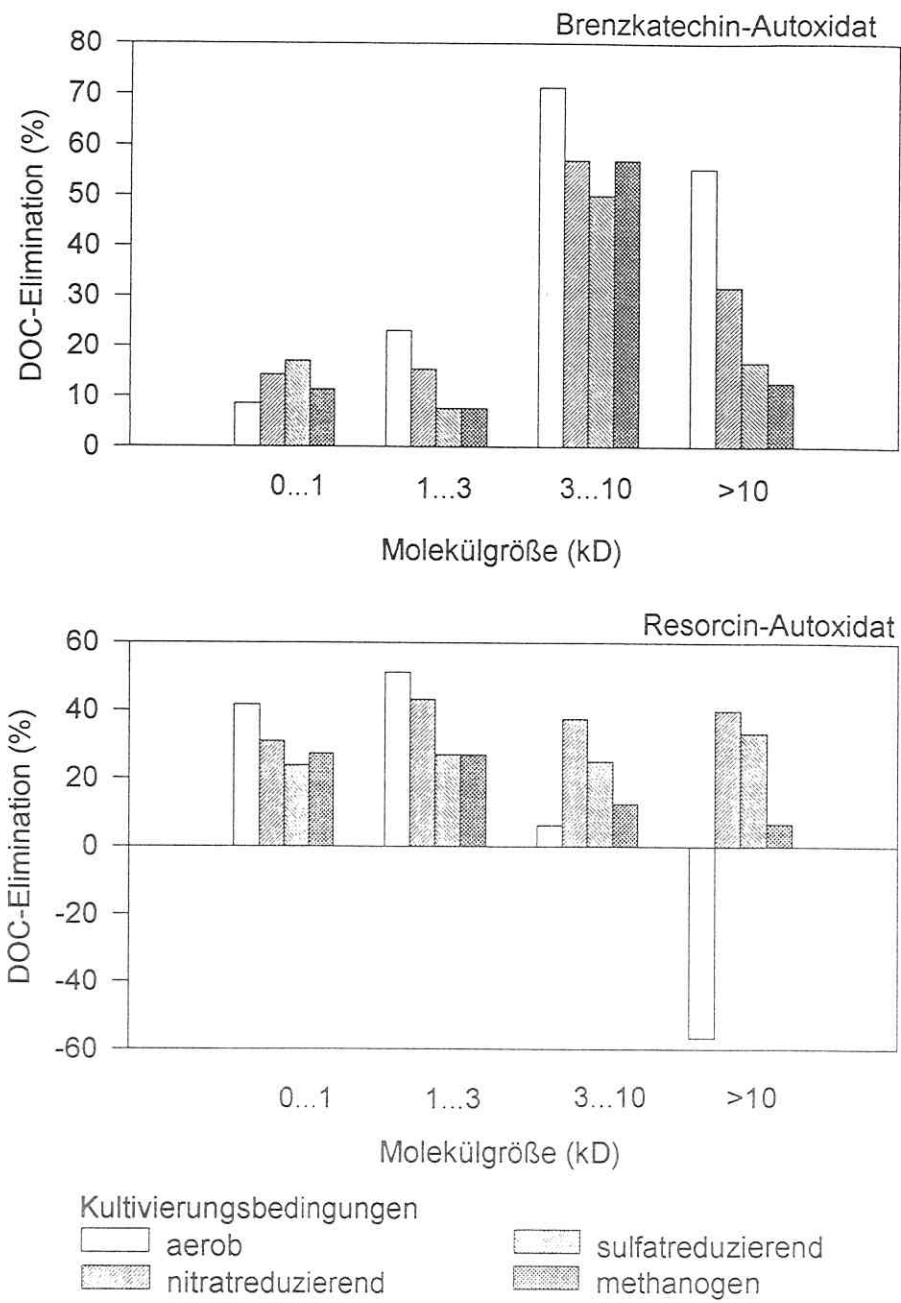


Bild 21. DOC-Elimination in biologischen Degradationsexperimenten mit Brenzkatechin-/ und Resorcin-Autoxidat.

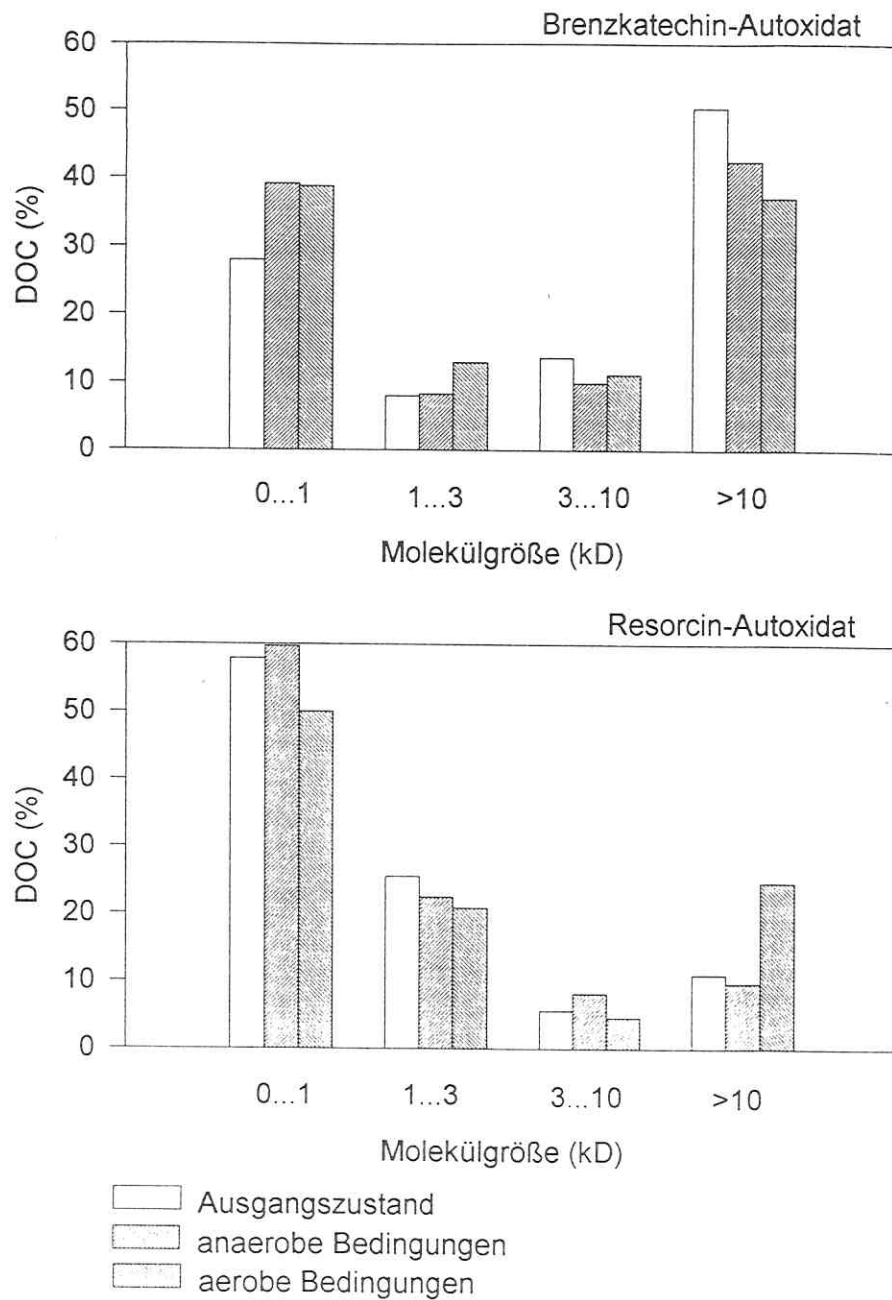


Bild 22. Abiotische Verschiebung der Molekülgrößenverteilung von Brenzkatechin-/ und Resorcin-Autoxidat unter aeroben und anaeroben Bedingungen in einem Zeitraum von 10 Tagen.

Möglich ist aber auch eine Überlagerung von Spaltungs-/Rücklösungs- und Autoxidationsvorgängen, die zu den in Bild 22 dargestellten Erscheinungen geführt haben könnte. Zumindest kann als sicher angenommen werden, daß Brenzkatechin nach 10 Tagen seiner Autoxidation ein Gemisch erzeugte, das nur noch ein geringes Bestreben hatte, weiterhin Sauerstoff aufzunehmen.

In Anbetracht der Signifikanz der beobachteten abiotischen Veränderungen in der Molekülgrößenverteilung der Autoxidate müssen die in Bild 21 dargestellten DOC-Eliminationsergebnisse als das Resultat von überlagerten abiotischen und mikrobiellen Veränderungen aufgefaßt werden. Die hohen Eliminationsraten in den hochmolekularen Bereichen des Brenzkatechin-Autoxidats und die hierbei sehr niedrigen Eliminationsraten im Molekülgrößenbereich unter 1 kD sind also zumindest anteilig das Ergebnis abiotischer Spaltungs- oder Rücklösungsprozesse und nicht ausschließlich mikrobieller Aktivität zuzuschreiben. Ebenso müssen die in den Fraktionen höherer Molekülgrößen unter aeroben Bedingungen gefundenen sehr kleinen bzw. sogar negativen Eliminationsraten beim Resorcin-Autoxidat als das Ergebnis von Autoxidationsprozessen interpretiert werden. Dabei wurde deutlich, daß der durch Autoxidation bedingte Aufbau von Makromolekülen mit weitaus größerer Geschwindigkeit verlief als die mikrobielle Spaltung dieser Verbindungen, da sonst das Zustandekommen eines negativen Eliminationswertes nicht erklärbar wäre. Welcher der beiden abiotischen Mechanismen zur Verschiebung der Molekülgrößenverteilung dominiert, ist demnach entscheidend vom Oxidationszustand des autoxydierten Gemisches im Zusammenhang mit den umgebenden Redoxbedingungen abhängig.

Unter Berücksichtigung der abiotischen Molekülgrößenverschiebung wurden ausgehend von den in Bild 21 dargestellten Ergebnissen mikrobielle Abbauraten für jede Anreicherungskultur in jeder Molekülgrößenfraktion ermittelt (Bild 23 und 24). Die dargestellten Meßpunkte repräsentieren die Mittelwerte dreier Versuche mit den aufgetretenen Schwankungen. Generell wurde dabei beobachtet, daß die Raten der aeroben Prozesse größer waren als die der anaeroben. Im anaeroben Milieu lagen die Abbauraten unter nitratreduzierenden Bedingungen tendenziell höher als unter sulfatreduzierenden und methanogenen Bedingungen. Die sulfatreduzierenden Prozesse erbrachten in Einzelfällen höhere Abbauraten als die methanogenen, wobei die Unterschiede im Gesamtpotential jedoch gering bzw. nicht signifikant waren. Bei Brenzkatechin-Autoxidat (Bild 23), bei dem über 50 % des DOC im Molekülgrößenbereich über 10 kD lagen, war unter aeroben Bedingungen die Abbaurate in dieser Fraktion am größten und nahm mit der Molekülgröße ab. Auffällig ist, daß das Potential der Mikroorganismen, aus hochmolekularen Verbindungen niedermolekulare Verbände herauszulösen, mit der Energie, die die Organismen aus ihrem jeweiligen Stoffwechsel gewinnen können (aerobe Bedingungen - nitratreduzierende Bedingungen - sulfatreduzierende Bedingungen - methanogene Bedingungen) abnahm.

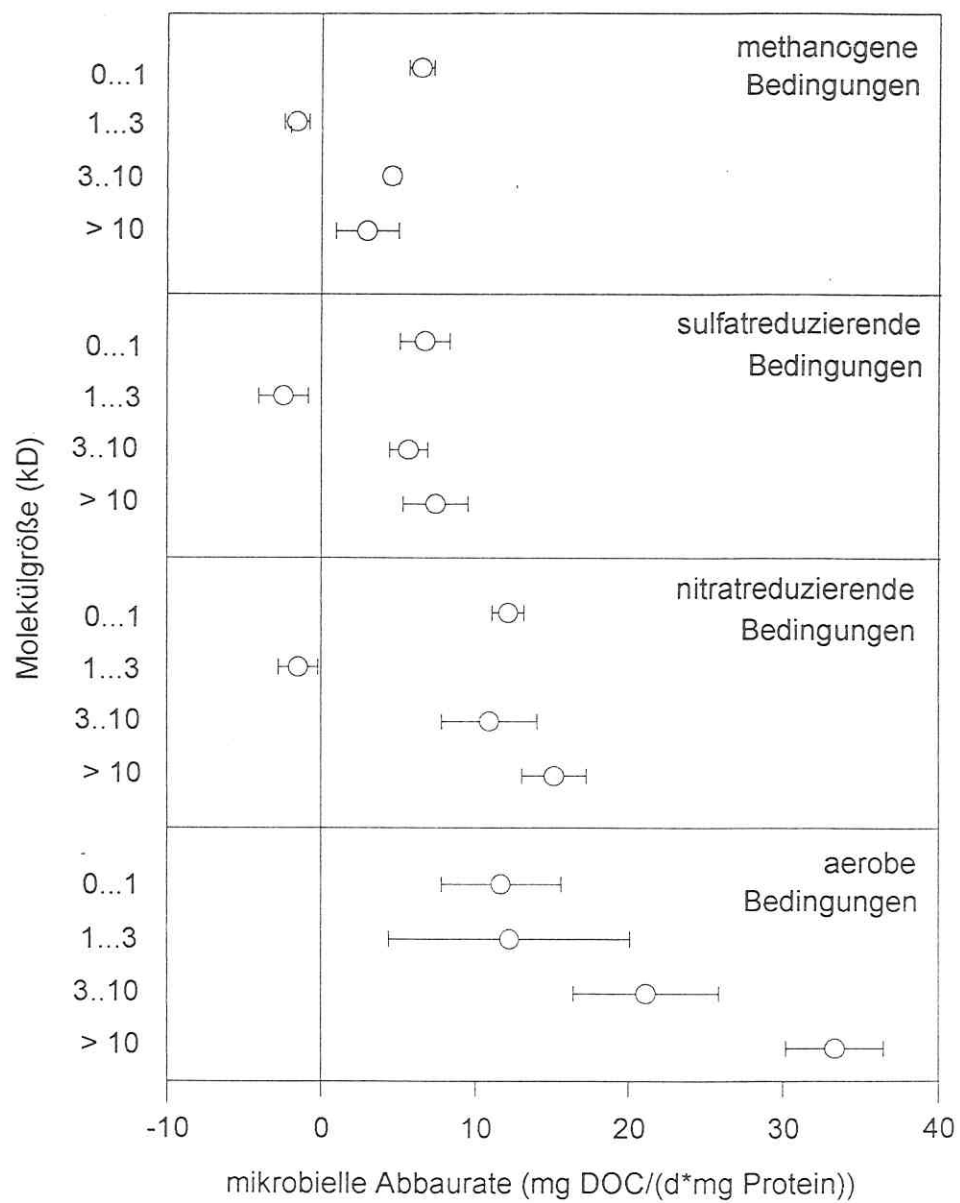


Bild 23. Mikrobieller Abbau verschiedener Molekülgrößenfraktionen von Brenzkatechin-Autoxidat in Gegenwart unterschiedlicher Elektronenakzeptoren.

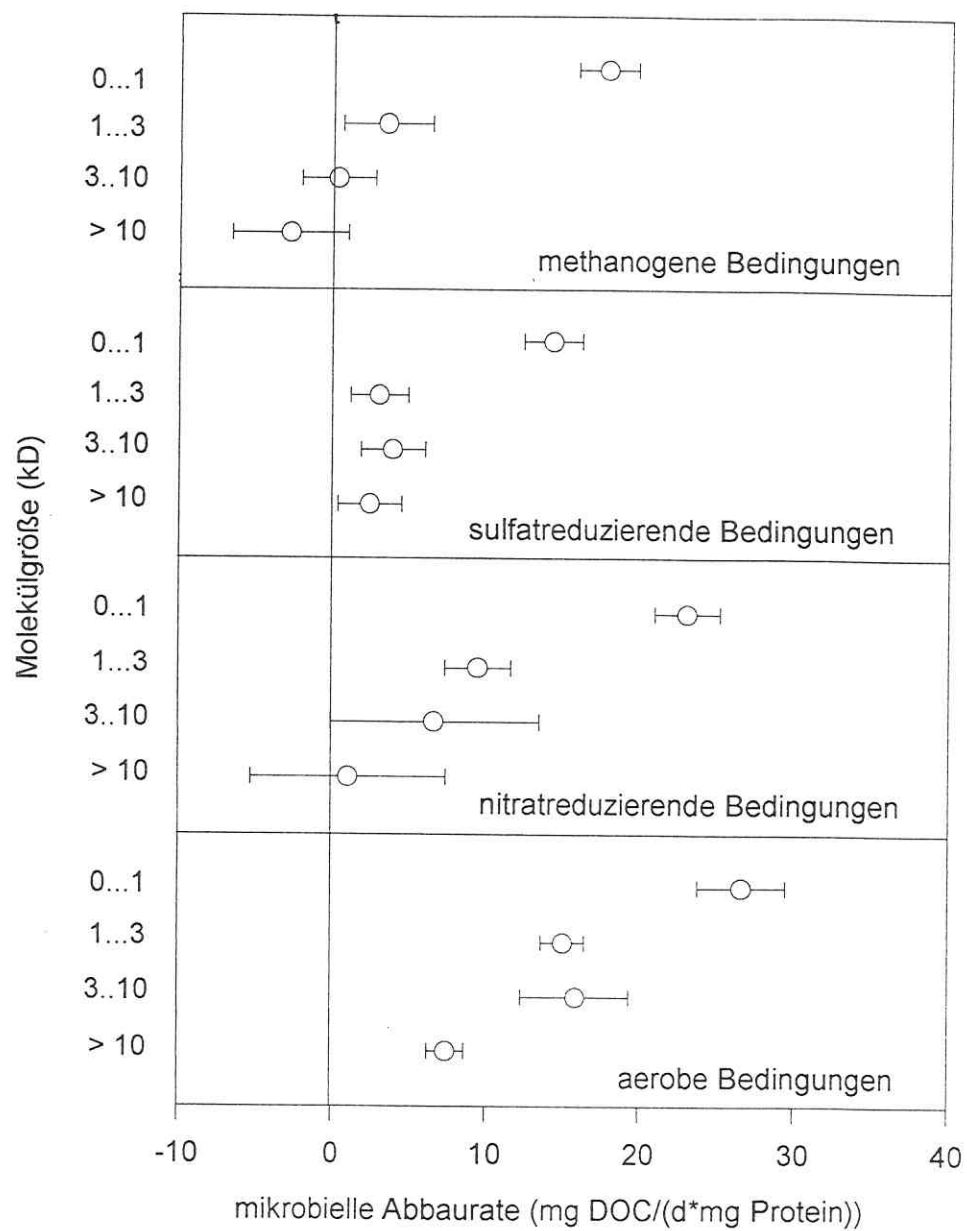


Bild 24. Mikrobieller Abbau verschiedener Molekülgrößenfraktionen von Resorcin-Autoxidat in Gegenwart unterschiedlicher Elektronenakzeptoren.

Unter anaeroben Bedingungen waren die Abbauraten in der Fraktion von 1 bis 3 kD negativ. Offenbar wurden hier Verbindungen dieser Größe aus hochmolekularen Verbindungen mit höherer Geschwindigkeit abgespalten als sie selbst degradiert werden konnten. Dies zeigt, daß die Spaltung der Makromoleküle bzw. die Abtrennung kleinerer struktureller Verbände bei der Degradation von phenolischen Autoxidationsprodukten nicht limitierend sein muß, sondern daß unter bestimmten Bedingungen auch die weitere Transformation oligomerer Spaltprodukte die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses determinieren kann. Keine negative Abbaurate wurde im oligomeren Molekülgrößenbereich unter aeroben Bedingungen gefunden, obwohl die Raten im hochmolekularen Bereich hier darauf hindeuten, daß oligomere Spaltprodukte schneller entstanden sein müssen als unter anaeroben Bedingungen. Offensichtlich ist das Potential, die oligomeren Metabolite zu mineralisieren, unter aeroben Bedingungen bedeutend stärker ausgeprägt als im anaeroben Milieu.

Bei Resorcin-Autoxidat fanden sich die höchsten Abbauraten generell in der kleinsten Molekülgrößenfraktion. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß möglicherweise ein hoher Anteil des Gesamt-DOC hier noch als monomeres Resorcin vorlag, zumal dessen Autoxidationsgeschwindigkeit relativ gering ist, und die Abbaurate in der niedrigsten Molekülgrößenfraktion in hohem Maße aus der Mineralisation des Resorcins resultierte. Dennoch ist auch hier der aerobe Prozeß vor dem nitratreduzierenden Prozeß leistungsfähiger als der sulfatreduzierende und der methanogene Prozeß.

Die Experimente belegen, daß die mikrobielle Degradation phenolischer Autoxidationsprodukte ein langsamer Prozeß ist, bei dem jedoch mit geringer Geschwindigkeit Spaltungs- bzw. Rücklösungsreaktionen ablaufen, die unter Umständen zu einer Akkumulation oligomerer Produkte führen können.

4.3. Untersuchungen zur anaeroben Behandlung von Schwelvollertwasser

4.3.1. Aktivitäten anaerober Mikroorganismen in der Schwelwasserdeponie Vollert-Süd

Der Schwelvollertsee repräsentiert ein typisches Beispiel für die Problematik der phenolischen Deponiewässer in ehemaligen ostdeutschen Industrieregionen. Die stoffliche Zusammensetzung und die Dimension der Altlast gaben Anlaß zu umfangreichen Forschungsarbeiten sowohl zur physiko-chemischen bzw. biologischen Sanierung solcher Altlasten als auch zu chemischen und biologischen Eigenschaften der in hohem Maße vertretenen phenolischen Autoxidationsprodukte.

Im Hinblick auf eine Sanierung mit biologischen Methoden war zunächst die Gewinnung leistungsfähiger Mikroorganismenpopulationen aus Sediment- oder Wasserproben des Sees angestrebt worden, der eine abschätzende Bestimmung dafür relevanter autochthoner mikrobieller Aktivitäten vorausging. Einige Untersuchungen wurden bereits zum Potential von Wasserproben hinsichtlich aerober metabolischer Aktivitäten im See durchgeführt. Jedoch liegen für die unter dem Aspekt der Selbstreinigung und der Gewinnung für anaerobe Reinigungsmethoden geeigneter Populationen entscheidende Charakterisierung des Potentials von Anaerobiern bisher nur Zellzahlen vor (BECKER et al., 1995).

Mit Hilfe einfacher Tests sind deshalb für eine anaerobe Behandlung des Wassers entscheidende Kriterien wie das Potential verschiedener Wasser- und Sedimentproben zur Methanogenese bzw. zur Reduktion extern zugegebener Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat) und die Befähigung zum methanogenen Abbau von Phenol als repräsentativem Wasserinhaltsstoff ermittelt worden. Mittels einer Ja-/Nein-Aussage wurde das Potential verschiedener Proben zur Methanbildung in Gegenwart unterschiedlicher Zusätze charakterisiert (Tabelle 5).

Wurde kein Acetat als leicht utilisierbares Substrat zugegeben, so blieb eine Methanbildung generell aus. In Gegenwart von Acetat bildete das Ufersediment jedoch Methan. Auch in Wasserproben von der Seeoberfläche konnte in diesem Fall eine Methanogenese festgestellt werden, wenn auch mit weitaus geringerer Rate als im Sediment (Daten nicht näher dargestellt). Jedoch konnte in Wasser- und Sedimentproben aus der Seetiefe auch bei Zugabe von Acetat keine Methanbildung beobachtet werden. Die Zugabe von Phosphat brachte weder stimulierende noch inhibierende Effekte. Das Ausbleiben anaerober Prozesse in den Varianten ohne Acetatzugabe kann also nicht auf eine in Betracht gezogene Phosphatlimitation zurückgeführt werden. Jedoch könnte sich im Falle einer aeroben biologischen Reinigungsstufe eine Phosphatzudosierung dennoch als erforderlich erweisen, da bei aeroben Stoffumsetzungen der Abbau von Schadstoffen mit vergleichsweise starker Biomassebildung einhergeht, so daß Phosphat hier zum limitierenden Faktor werden könnte. Die Tatsache, daß

Methan nach Zugabe von Acetat in Oberflächenwasser und Sediment aus der Uferzone entstand, belegt die Vermutung, daß die oberflächennahen Bereiche des Sees an leicht verwertbaren Verbindungen verarmt waren, aber dort Mikroorganismen mit dem Potential zu deren Umsatz in hohen Zellzahlen vertreten waren.

Tabelle 5. Methanbildung in Wasser- und Sedimentproben des Schwelvollertsees

	keine Zugabe	Zugabe von		
		Phosphat	Acetat	Acetat + Phosphat
Wasser (0 m)	nein	nein	ja	ja
Sediment (Ufer)	nein	nein	ja	ja
Wasser (20 m)	nein	nein	nein	nein
Sediment (27 m)	nein	nein	nein	nein

Das Ausbleiben einer Methanbildung in Tiefenwasser und -sediment kann im wesentlichen zwei Ursachen haben: erstens das Fehlen zur Methanogenese befähigter Bakterien und zweitens ungünstige Milieubedingungen wie z.B. hohe Konzentrationen toxischer Verbindungen. BECKER et al., 1995 fanden im Tiefenwasser wesentlich geringere Zellzahlen als im Oberflächenwasser, wobei der Anteil der lebenden Zellen im Tiefenbereich etwa eine Größenordnung geringer war als an der Oberfläche. Das deutet ebenfalls auf eine Limitierung biologischer Abbauvorgänge durch ein ungünstiges Milieu in der Tiefe hin.

Neben der Befähigung zur Methanbildung wurden Sedimentproben von der Tiefe des Sees und aus dem Uferbereich auf ihr Potential zum methanogenen Phenolabbau bei zwei verschiedenen Inkubationstemperaturen und zwei Phenolkonzentrationen getestet. In Tabelle 6 sind die Resultate wiederum als einfache Ja-/Nein-Aussagen dargestellt.

Für das Sediment aus 27 m Tiefe bestätigte sich auch hier der bereits in Tabelle 5 vermittelte Eindruck weitgehend ausbleibender biologischer Abbauprozesse. Weder bei Seetemperatur (6°C) noch bei einer Inkubationstemperatur von 35°C konnte ein Abbau von Phenol festgestellt werden, was auf die beiden bereits genannten Ursachen zurückführbar sein kann. Wurde Sediment aus der Uferzone bei 35°C inkubiert, so wurde Phenol sowohl in einer

Konzentration von 20 mg/l als auch von 100 mg/l degradiert. Dies bestätigt höhere Zahlen von phenolabbauenden Organismen und/oder weniger limitierende Milieubedingungen (z.B. niedrigere Konzentrationen toxischer Verbindungen) im Oberflächenbereich des Sees im Vergleich zur Tiefe. Erfolgte die Inkubation des Sedimentes jedoch bei 6°C, so wurde Phenol nur in einer Konzentration von 20 mg/l abgebaut und bei einer Konzentration von 100 mg/l auch über lange Zeiträume hinweg nicht angegriffen. Dieser Effekt wird nur unter der Annahme erklärbar, daß hier Zusammenhänge zwischen der Temperatur und der Konzentrationsabhängigkeit des Phenolabbaus existieren. Zur vertiefenden Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden Experimente unter dem Aspekt der Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen durchgeführt, deren Resultate im Abschnitt 4.4. vorgestellt werden.

Tabelle 6. Methanogener Phenolabbau in Sedimentproben des Schwelvollertsees

	100 mg/l Phenol	100 mg/l Phenol	20 mg/l Phenol	20 mg/l Phenol
	35°C	6°C	35°C	6°C
Sediment (Ufer)	ja	nein	ja	ja
Sediment (27 m)	nein	nein	nein	nein

Alternativ zur Methanogenese könnten auch andere anaerobe Prozesse ablaufen, die unter Reduktion von Nitrat oder Sulfat als Elektronenakzeptor stattfinden würden. Die Fähigkeit von Sedimentproben des Schwelvollertsees, solche Prozesse durchzuführen, wurde unter Zugabe von 500 mg/l Nitrat (als KNO_3) und 500 mg/l Sulfat (als Na_2SO_4) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen des Schwelvollert-Sedimentes mit Sediment der Weißen Elster getestet. Die Ergebnisse sind in den Bildern 25 und 26 dargestellt. Durch Weiße-Elster-Sediment wurde sowohl Nitrat als auch Sulfat vergleichsweise rasch reduziert und war nach 14 bzw. 37 Tagen vollständig verbraucht. Mit gleicher Geschwindigkeit verliefen auch die Prozesse in den Ansätzen, in denen der Anteil des Ufersedimentes 10 Vol-% am Inoculum betrug. Dies traf auch für den methanogenen Prozeß zu. Derselbe Volumenanteil Tiefensediment führte zwar im Falle nitratreduzierender Bedingungen nur zu einer geringfügigen Verzögerung des Prozesses, jedoch waren die Raten der Sulfatreduktion und der Methanogenese deutlich geringer als beim reinen Weiße-Elster-Sediment. 50 Vol-% Ufersediment am Gesamtinoculum resultierten in einer langsameren Nitratreduktion und einer weitgehenden Stagnation des sulfatreduzierenden und methanogenen Prozesses nach dem 37. Tag. Vermutlich ist dies auf einen Verbrauch der im Weiße-Elster-Sediment befindlichen leicht verwertbaren Verbindungen zurückzuführen.

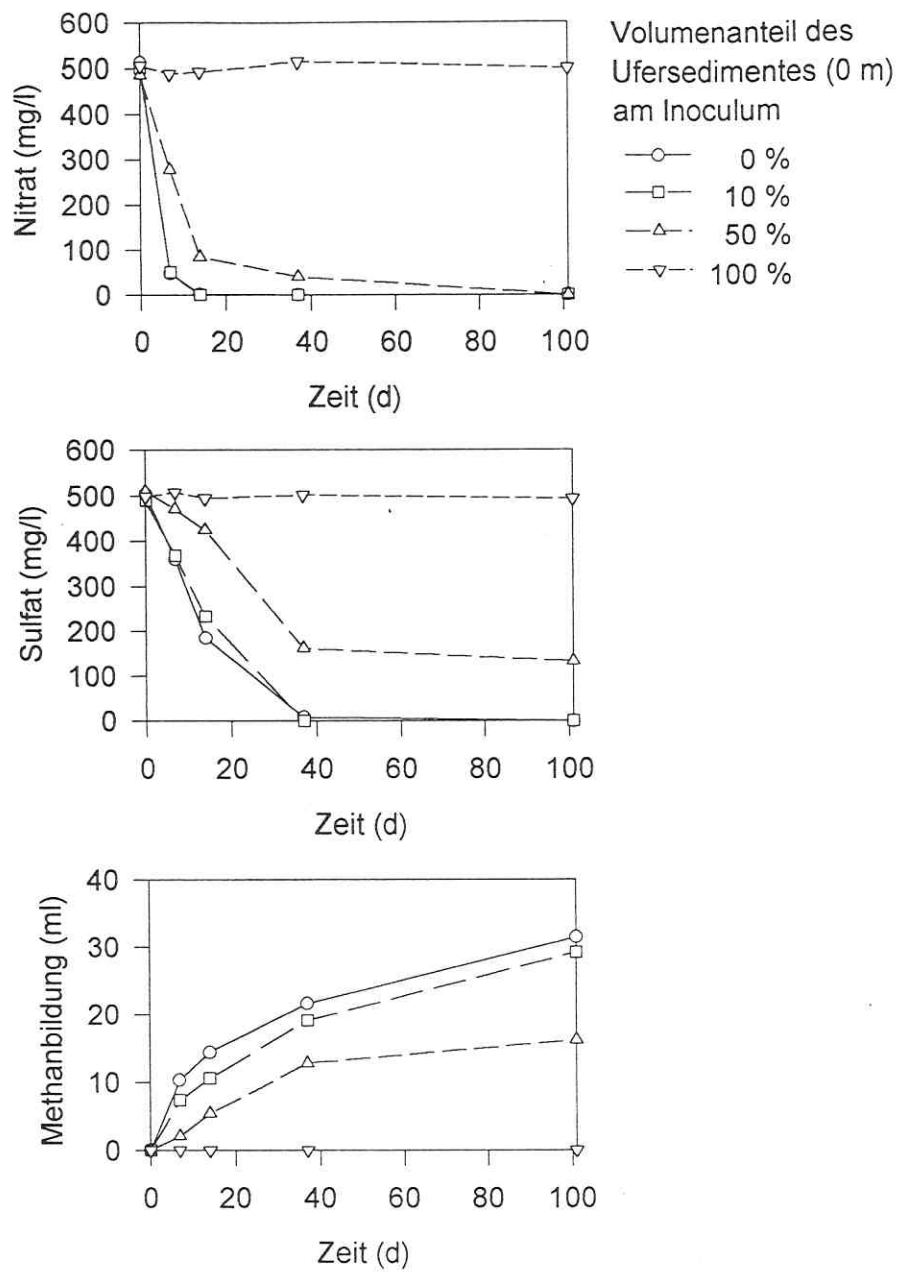


Bild 25. Nitratreduktion, Sulfatreduktion und Methanbildung durch Ufersedimentproben des Schwelvollertsees bei verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Sediment der Weißen Elster.

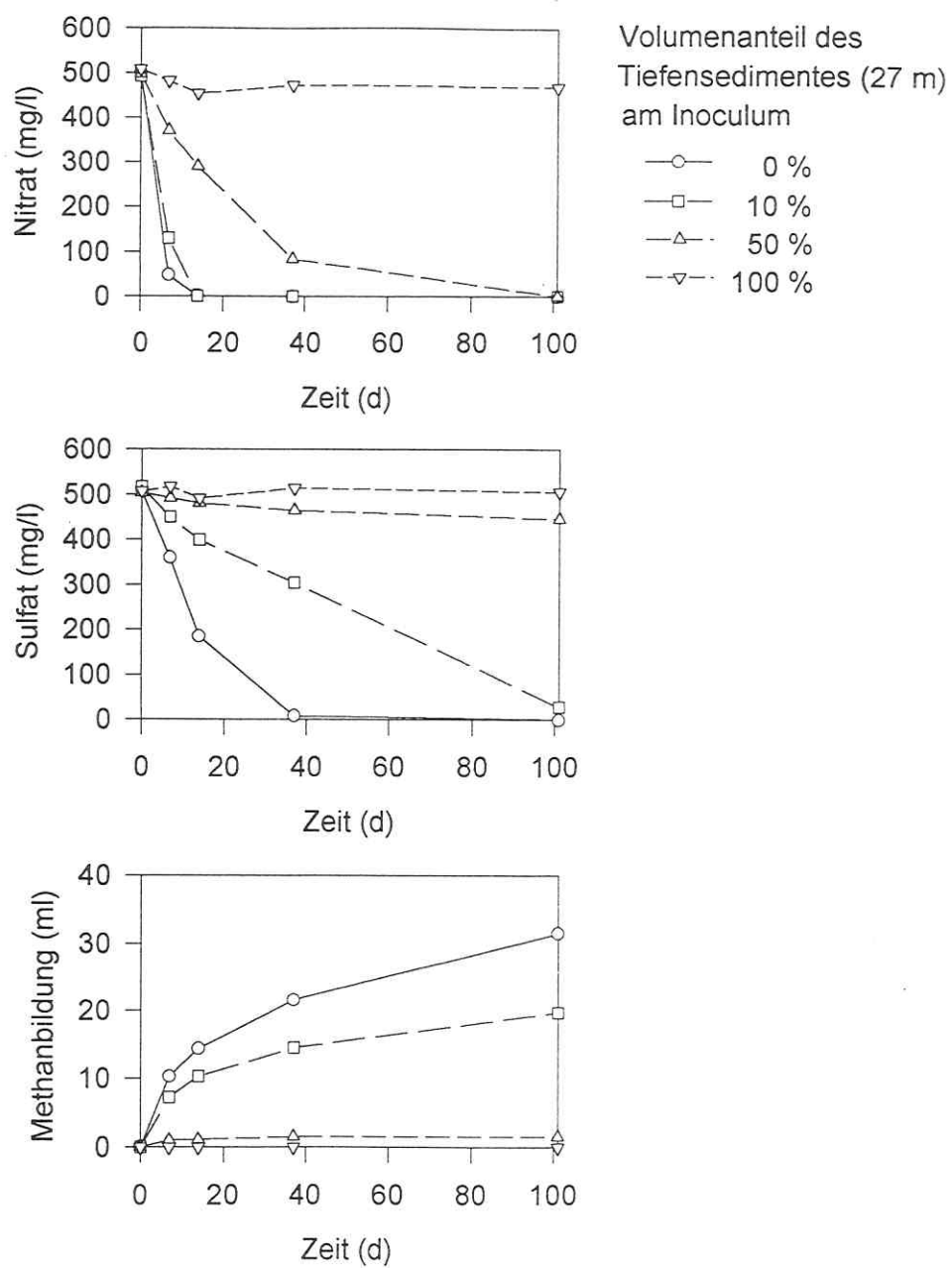


Bild 26. Nitratreduktion, Sulfatreduktion und Methanbildung durch Tiefensedimentproben des Schwelvollertsees bei verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Sediment der Weißen Elster.

Ein Fehlen leicht utilisierbarer Kohlenstoffquellen im Oberflächenbereich des Schwelvollert-sees war bereits diskutiert worden. Ein Volumenanteil von 50 % Tiefensediment am Inoculum erbrachte eine deutlich reduzierte Nitratreduktionsrate und eine fast vollständige Unterbindung des sulfatreduzierenden und des methanogenen Prozesses. In diesem Fall kann die Begründung nicht in einer Substratlimitation zu suchen sein, da der eingesetzte Anteil des Weiße-Elster-Sedimentes die Prozesse ermöglicht hätte (vgl. Ansätze mit 50 % Ufersediment). Offensichtlich handelt es sich hier um toxische Einflüsse, die aus dem Tiefensediment resultieren und eine nahezu vollständige Inhibierung des sulfatreduzierenden und methanogenen Prozesses bewirken. Die nitratreduzierenden Mikroorganismen weisen gegenüber diesen toxischen Verbindungen offenbar eine größere Toleranz auf, denn hier war keine vollständige Hemmung zu beobachten. Ein generelles Ausbleiben der respirativen Prozesse konnte festgestellt werden, wenn Schwelvollert-Tiefensediment oder -Ufersediment ohne Zusatz von Weiße-Elster-Sediment inkubiert wurde. In diesem Fall ist keine eindeutige Ursache benennbar; dieser Effekt kann durch das Fehlen entsprechend befähigter Organismen im Schwelvollertsee, in der Toxizität der Sedimente oder zumindest beim Ufersediment im Fehlen geeigneter Kohlenstoffquellen begründet liegen. Die Untersuchungen zum Methanbildungspotential (Tabelle 5) hatten jedoch gezeigt, daß im Ufersediment Methan entstehen konnte, wenn Acetat zugegeben wurde, was vermuten läßt, daß die toxischen Einflüsse hier nicht das Ausschlaggebende sind. Demgegenüber können starke inaktivierende Einflüsse durch die Sedimenttoxizität in der Tiefe des Sees als sicher angesehen werden.

Eine Anreicherung leistungsfähiger zum Schadstoffabbau befähigter anaerober Mikroorganismenpopulationen aus dem Tiefensediment erschien demzufolge wenig erfolgversprechend zu sein. Zwar konnte im Ufersediment eine Befähigung zum anaeroben Phenolabbau nachgewiesen werden, jedoch trat auch hier im Falle niedriger Temperaturen bereits bei Phenolkonzentrationen von 100 mg/l eine Abbaulimitierung auf. Für alle Degradationsexperimente mit Schwelvollertwasser wurden deshalb Kulturen aus dem Weiße-Elster-Sediment angereichert. Das Ufersediment des Schwelvollertsees wurde jedoch erfolgreich zur Anreicherung phenolabbauender Kulturen unter methanogenen Bedingungen für die Durchführung der Temperatur-Inhibierungs-Experimente (Abschnitt 4.4.) herangezogen.

4.3.2. Anaerobe Semi-batch-Behandlung von Schwelvollert-Tiefenwasser in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren

Wie bereits die im Abschnitt 4.3.1. dargelegten Erkenntnisse verdeutlichen, gingen von Wasser- und Sedimentproben aus der Tiefe des Schwelvollertsees starke inhibitorische Wirkungen aus. Für die Semi-batch-Behandlung wurde Wasser aus 20 m Tiefe deshalb mit einer Nährsalzlösung verdünnt. Das sollte einerseits eine Verknappung erforderlicher Nährstoffe wäh-

rend des Versuches ausschließen und andererseits durch den Verdünnungseffekt eine Reduzierung der inhibierenden Wirkung des Wassers bewirken. Die Wasserproben wurden mit 10 Vol-% Flußsediment (Weiße Elster) angeimpft, das hohe methanogene Aktivitäten aufwies und bei Zugabe von Sulfat und Nitrat diese Elektronenakzeptoren mit hoher Geschwindigkeit reduzieren konnte.

Analytisch verfolgt wurden die Konzentrationen von Phenol, Kresolen und Xylenolen sowie die DOC-Konzentrationen in verschiedenen Molekül-/Partikelgrößenfraktionen des Wassers vor und nach der biologischen Behandlung. Zur Kontrolle stabiler Prozeßverläufe wurden weiterhin die Konzentrationen an Nitrat und Sulfat wöchentlich ermittelt sowie in den methanogenen Ansätzen das gebildete Biogasvolumen bestimmt, wobei diese Meßergebnisse hier aber nicht vorgestellt werden sollen. Die Ausgangskonzentrationen der betrachteten phenolischen Verbindungen lagen bei einer 50%-igen Verdünnung des Wassers für Phenol bei ca. 40 mg/l, zwischen 2 und 7 mg/l für die Kresolisomere und zwischen 0,2 und 1,4 mg/l für die vorgefundenen Xylenolisomere (Bild 27). Die Konzentrationen an 2,4-Xylenol, 2,5-Xylenol und 2,6-Xylenol lagen bereits im Zulauf unter der Nachweisgrenze (0,1 mg/l) und wurden in den Experimenten daher nicht berücksichtigt. Bild 27 zeigt weiterhin eine Darstellung der Konzentrationswerte nach den verschiedenen Methoden der biologischen Behandlung des Wassers. Unter methanogenen Bedingungen wurden lediglich Phenol sowie o-Kresol und p-Kresol angegriffen, wobei die Abbauleistung bei 30-tägiger Verweilzeit extrem niedrig war. Unter sulfatreduzierenden Bedingungen wurden zusätzlich m-Kresol und 3,5-Xylenol metabolisiert. Bei Phenol, o- und p-Kresol lagen die Abbaugeschwindigkeiten jedoch nur geringfügig höher als unter methanogenen Bedingungen. Die extrem niedrigen Abbauraten in diesen Kulturen deuten auf starke inhibitorische Effekte hin, die durch die Inhaltsstoffe des Wassers hervorgerufen wurden. Unter denitrifizierenden Bedingungen konnte ein Angriff aller analytisch bestimmter Verbindungen nachgewiesen werden. Eine vollständige Elimination der Schadstoffe innerhalb der Verweilzeit war für alle drei Kresolisomere sowie für 2,3-Xylenol und 3,4-Xylenol zu verzeichnen. Die im Medium verbleibende Phenolrestkonzentration betrug etwa 2 mg/l. Vergleichsweise langsam verlief der Abbau von 3,5-Xylenol. Hier gelang eine Verringerung der Ausgangskonzentration zu etwas mehr als 50 %. Die denitrifizierende Kultur wies demnach im Vergleich zu den beiden anderen anaeroben Prozessen das breiteste Substratverwertungsspektrum in Verbindung mit den höchsten Abbaugeschwindigkeiten auf. Die biologische Abbaubarkeit monomerer phenolischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen ist relativ gut untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.). In Ergänzung zum bereits bekannten Wissen konnte bei den hier dargelegten Experimenten ein Angriff von 2,3-Xylenol und 3,5-Xylenol unter nitratreduzierenden Bedingungen und von 3,5-Xylenol auch unter sulfatreduzierenden Bedingungen festgestellt werden, obwohl von anderen Autoren vermutet worden war, daß die anaerobe Degradation von Xylenolen die Hxdroxygruppe in p-Stellung zu einer der Methylgruppen erfordert (FLYVBJERG et al., 1993).

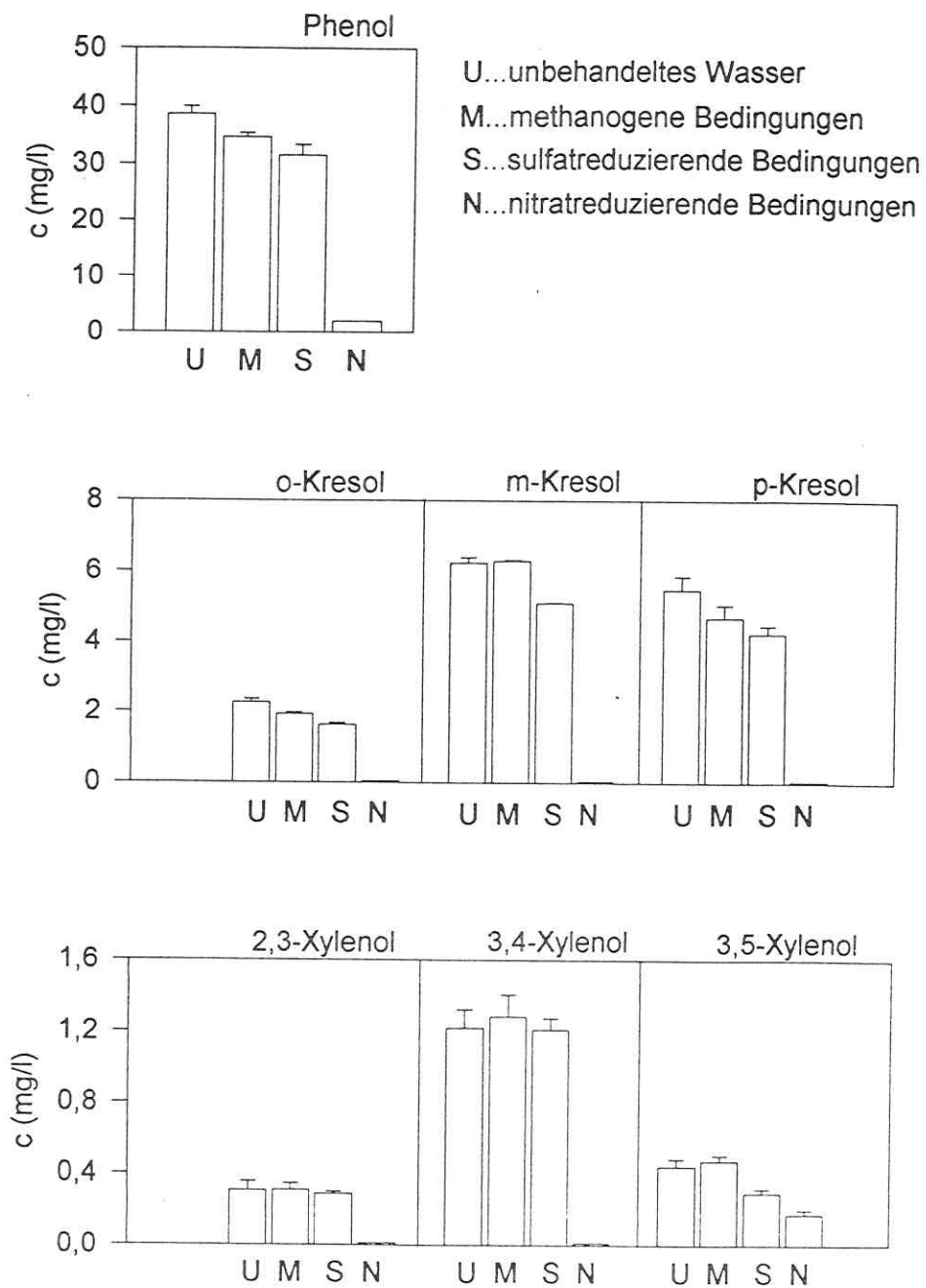


Bild 27. Abbau von phenolischen Verbindungen bei der anaeroben Semi-batch-Behandlung von Schwelvollertwasser in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren.

Separate Batch-Versuche, in denen die Elimination der Xylenolisomere durch die jeweiligen Kulturen angestrebt worden war, wenn die Isomere als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wurden, führten jedoch lediglich im Falle des 3,4-Xylenols unter nitratreduzierenden Bedingungen zum Erfolg. Wurden 2,3-Xylenol bzw. 3,5-Xylenol als einzige Kohlenstoffquellen eingesetzt, so konnte keine Transformation der Verbindungen beobachtet werden. Dies deutet auf cometabolische Mechanismen bei der biologischen Elimination von nicht in p-Stellung hydroxylierten Xylenolen unter anaeroben Bedingungen hin. Das dabei zugrundeliegende unspezifische Transformationspotential der betreffenden Enzyme kann besonders bei Mischkontaminationen verschiedenartiger, aber strukturell doch ähnlicher Verbindungen, wie sie häufig bei phenolischen Deponiewässern oder auch Kreosotkontaminationen vorzufinden sind, von Vorteil sein. Wie weitgehend allerdings die Transformation der Xylenolisomere verlief, kann anhand der dazu durchgeführten Experimente nicht eingeschätzt werden. Möglich ist entweder eine Bildung von dead-end-Metaboliten oder aber eine vollständige Mineralisierung.

Auffallend sind die extrem geringen Abbauleistungen der sulfatreduzierenden und methanogenen Kultur hinsichtlich relativ leicht degradierbarer Verbindungen wie Phenol in Anbetracht einer durchschnittlichen hydraulischen Verweilzeit von 30 Tagen. Möglicherweise resultiert dies aus starken inhibierenden Einwirkungen von Inhaltsstoffen des Schwelvollertwassers. Obwohl die monomeren phenolischen Inhaltsstoffe des die bestimmenden Kontaminanten im unteren Molekülgrößenbereich sind, läßt sich eine starke inhibierende Wirkung auf methanogene und sulfatreduzierende Mikroorganismenkulturen damit nicht allein erklären. Im Vergleich zu Literaturwerten (CHOU et al., 1978; FEDORAK und HRUDEY, 1984; WANG et al., 1989) sind die Konzentrationen wesentlich zu gering, um die Toxizität allein damit begründen zu können. Daher ist die Rolle der höhermolekularen Verbindungen diesbezüglich anzuführen, worauf im Abschnitt 4.3.3. noch näher eingegangen wird.

Die Degradation der höhermolekularen Verbindungen unter anaeroben Bedingungen im Schwelvollertwasser wurde im Rahmen der hier besprochenen Semi-batch-Experimente untersucht. Die Proben aus den biologischen Ansätzen sowie des unbehandelten Wassers wurden mittels Ultrafiltration fraktioniert und der TOC jeder Fraktion bestimmt. In Bild 28 ist die ermittelte prozentuale DOC-Elimination in den verschiedenen Molekül- bzw. Partikelgrößenfraktionen nach den unterschiedlichen Varianten einer anaeroben Behandlung dargestellt. Die Meßwerte repräsentieren jeweils den Durchschnitt dreier Probenahmen. Der DOC des unbehandelten Wassers teilte sich zu etwa einem Drittel in der Molekülgrößenfraktion unter 0,5 kD, zu etwa einem Viertel in der Fraktion von 0,5 bis 3 kD und zu etwas mehr als einem Drittel mit Molekülgrößen > 3kD auf. Die hochmolekulare Fraktion enthielt Komplexe bis in den partikulären Bereich (> 0,3 µm) hinein. Auch hier ist eine deutliche Abhängigkeit der DOC-Elimination in den einzelnen Molekülgrößenfraktionen von der Gegenwart spezifischer Elektronenakzeptoren zu erkennen.

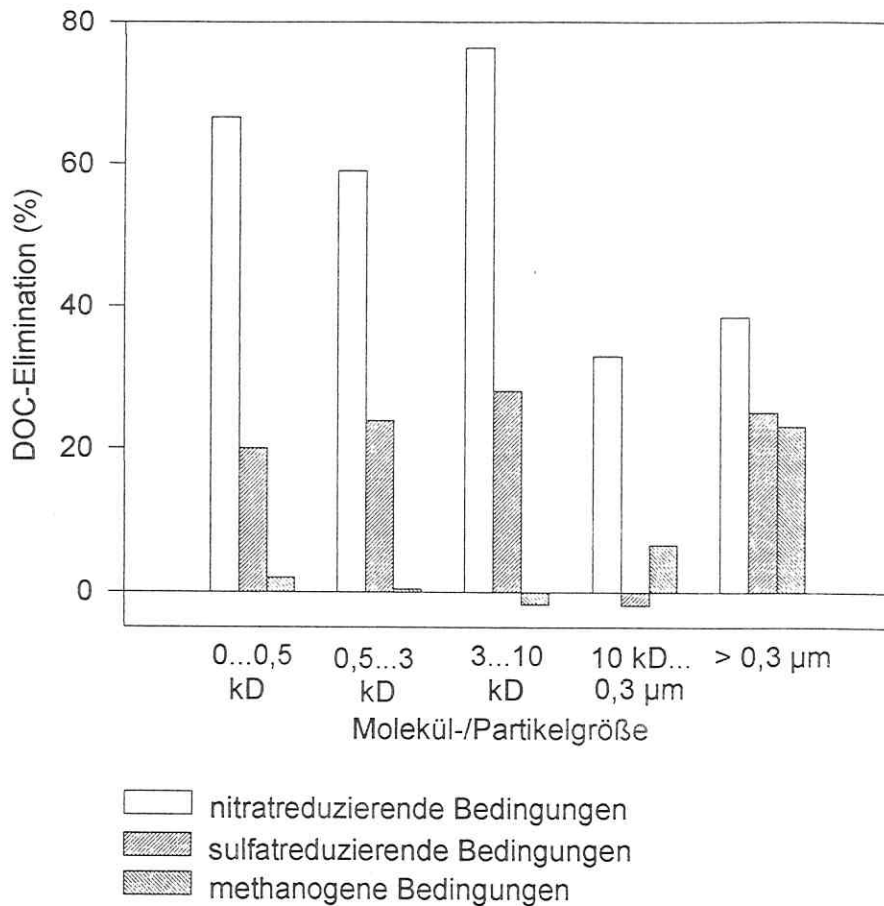


Bild 28. DOC-Elimination in verschiedenen Molekülgrößen-/Partikelgrößenfraktionen bei der anaeroben Semi-batch-Behandlung von Schwelvollertwasser in Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren.
(Behandlungszeit: 11 Monate; Verweilzeit: 30 Tage; Biomassekonzentration: 10 Vol-% Flußsediment; Gesamt-DOC im unbehandelten Wasser: ca. 500 mg/l (Summe aller Fraktionen); pH-Wert 7,0)

Nahezu kein Effekt wurde unter methanogenen Bedingungen erzielt, mit Ausnahme der partikulären Fraktion > 0,3 µm. In der sulfatreduzierenden Kultur wurde der DOC in den Fraktionen bis zu einer Molekülgröße von 10 kD und in der Fraktion > 0,3 µm zu 20 bis 30 % eliminiert. Unter denitrifizierenden Bedingungen kam es zu einer deutlichen DOC-Reduktion in allen Molekülgrößenbereichen, wobei im Bereich bis 10 kD etwa 60 bis 75 %

des DOC eliminiert wurden. In den Fraktionen über 10 kD lagen die Werte zwischen 30 und 40 %. Es muß angenommen werden, daß die im partikulären Bereich ($> 0,3 \mu\text{m}$) ermittelten Eliminationsraten nicht in erster Linie das Ergebnis mikrobieller Prozesse sind, denn die in allen anderen Fraktionen beobachtete starke Abhängigkeit der Eliminationsgrade vom elektronenakzeptierenden Prozeß fiel hier deutlich geringer aus. Naheliegender ist hier in erster Linie eine DOC-Elimination durch sorptive Bindung der Komplexe an die Biomasse. Die starke Neigung dieser Fraktion zur Sorption an Belebtschlamm war bereits von WIESSNER et al., 1994 gezeigt worden und konnte durch Sorptionsexperimente mit einer methanogenen acetatabbauenden Anreicherungskultur untermauert werden. Etwa 57 % des DOC der Fraktion $> 0,3 \mu\text{m}$ wurden von der methanogenen Kultur sorbiert, wobei der Volumenanteil mikrobiellen Schlamms etwa 10 % betrug und damit dem der Degradationsexperimente vergleichbar war. Der sorbierte Anteil in den anderen Fraktionen war vernachlässigbar gering. Obwohl durch die Führung der Experimente im Semi-batch-Modus und Arbeit über lange Zeiträume (11 Monate) angestrebt worden war, Sorptionseffekte zu umgehen, indem mit der Einstellung eines Sorptionsgleichgewichtes gerechnet wurde, können diese Erscheinungen offenbar doch nicht ausgeschlossen werden.

Die Semi-batch-Experimente zur anaeroben Behandlung von Schwelvollertwasser machen deutlich, daß eine starke Abhängigkeit der Reinigungsleistung vom angebotenen Elektronenakzeptor sowohl im Hinblick auf die Elimination monomerer phenolischer Verbindungen als auch bezüglich der makromolekularen Komplexe besteht. Die vergleichsweise hohe Eliminationsleistung der nitratreduzierenden Kultur bei der Entfernung der Makromoleküle bewirkte offenbar gleichzeitig einen Entgiftungseffekt, der auch einen weitgehenden Abbau der monomeren phenolischen Verbindungen in der entsprechenden Verweilzeit ermöglichte. Hingegen beeinträchtigten unter sulfatreduzierenden und methanogenen Bedingungen die nur geringfügig angegriffenen Makromoleküle vermutlich auch den Abbauprozess der Monomere. Der Mechanismus des Angriffs makromolekularer huminartiger Verbindungen durch bakterielle Zellen ist nicht geklärt. Die bereits im Abschnitt 4.3.2. bei der Degradation phenolischer Autoxidationsprodukte dargelegten Vermutungen können aber auch hier zutreffend sein.

In Anbetracht der langen Verweilzeit bei den Semi-batch-Versuchen ist jedoch auch die Reinigungsleistung der nitratreduzierenden Kultur als unzureichend für praktische Aspekte anzusehen. Insgesamt verblieb nach 30-tägiger Verweilzeit etwa die Hälfte der organischen Belastung im Medium. Hinsichtlich der summarisch als DOC bestimmten höhermolekularen Verbindungen ist dabei nicht geklärt, ob durch weitere Verweilzeiterhöhung eine Steigerung der Eliminationsleistung zu erreichen wäre oder ob hier die potentielle Grenze der Leistungsfähigkeit des Prozesses bereits erreicht war.

4.3.3. Toxizität und Fermentierbarkeit von Schwelvollertwasser unter methanogenen Bedingungen nach physiko-chemischer Vorbehandlung

Physiko-chemische Methoden werden bevorzugt zur Abwasserreinigung eingesetzt, wenn die Voraussetzungen für den Erfolg biologischer Maßnahmen nicht in ausreichendem Maße gegeben sind. Das trifft vor allem dann zu, wenn das Abwasser biologisch nicht oder sehr schwer abbaubare Verbindungen enthält. In vielen Fällen ist auch die im Abwasser vorliegende Schadstoffkonzentration entscheidend, wobei sehr niedrige und sehr hohe Konzentrationen für biologische Verfahren oft problematisch sind auf Grund von zur Enzyminduktion erforderlichen notwendigen Mindestkonzentrationen bzw. von starken inhibierenden Wirkungen. Einen Literaturüberblick über erprobte physikalische und chemische Abwasserreinigungsmethoden gaben MATSUMOTO et al., 1993. Im Hinblick auf die Entfernung von makromolekularen Verbindungen, die durch autoxidative Prozesse entstanden sind, sind in erster Linie die Sorption z.B. an Aktivkohle und Fällungsprozesse nach Koagulation mit Eisen(III)- und Aluminium(III)-Salzen (BEHMEL und ZIECHMANN, 1987; AZIZI und ZIECHMANN, 1993; CATHALIFAUD et al., 1993) von Interesse.

Aufgrund der für praktische Aspekte unzureichenden Ergebnisse der anaeroben Semi-batch-Experimente wurde versucht, durch verschiedene Methoden einer physiko-chemischen Vorbehandlung in Kombination mit einer methanogenen Fermentationsstufe, die Reinigungsleistung zu erhöhen. Getestet wurden die Ultrafiltration durch Filter mit einer Trenngrenze von 0,5 und 3 kD, ein naßchemischer Oxidationsprozeß mit Wasserstoffperoxid sowie ein Flockungs-/Fällungsprozeß mit Aluminiumchlorid. Den biologischen Experimenten vorangehend wurden die Konzentrationen an Oxidationsmittel (H_2O_2) und Flockungsmittel ($AlCl_3$) in Vorversuchen optimiert. Tabelle 7 dokumentiert die Wirkung verschiedener Vorbehandlungsmethoden auf den DOC-Gehalt und die Färbung (gemessen als E 436) des Schwelvollertwassers.

Durch alle Methoden wurde eine deutliche Farbreduktion erreicht, die bei Ultrafiltration und Flockung/Fällung mit einer Abnahme der organischen Belastung einherging. Die Oxidation mit H_2O_2 resultierte nur in einer geringfügigen DOC-Abnahme. Demnach kam es hier nicht zu einer vollständigen Oxidation der Verbindungen, sondern in erster Linie zur Spaltung der makromolekularen Komplexe in kleinere Bruchstücke. In jedem Falle wurde aber eine Entfernung der Makromoleküle aus dem Wasser bewirkt, wie auch bereits durch andere Arbeiten gezeigt werden konnte (WIESSNER et al., 1993). Wie sich dies auf die Fermentierbarkeit und die Toxizität des Schwelvollertwassers unter methanogenen Bedingungen auswirkte, wurde nachfolgend in statischen Tests untersucht (Tabelle 8).

Tabelle 7. DOC-Elimination und Entfärbung von Schwelvollertwasser durch verschiedene physiko-chemische Methoden.

Methode	DOC-Elimination (%)	Abnahme E 436 (%)
Ultrafiltration < 3 kD	45	92
Ultrafiltration < 0,5 kD	70	98
Oxidation mit H ₂ O ₂ (100 µM)	9	93
Flockung/Fällung mit AlCl ₃ (6 mM)	34	99

Tabelle 8. Hemmung der acetoclastischen Methanogenese und anaerobe Fermentierbarkeit von Schwelvollertwasser nach physiko-chemischer Vorbehandlung (die Bilanzierung ist bezogen auf das Wasser nach Abtrennung der hochmolekularen Inhaltsstoffe).

Methode	Hemmung der Methanbildung (%)	Fermentierbarkeit zu CH ₄ + CO ₂ (%)
ohne Vorbehandlung	96	22
Ultrafiltration < 3kD	25	54
Ultrafiltration < 0,5 kD	14	85
Oxidation mit H ₂ O ₂	13	37
Flockung/Fällung mit AlCl ₃	13	65

Das unvorbehandelte Wasser wies eine starke inhibierende Wirkung auf den methanogenen Acetatabbau auf und seine organischen Inhaltsstoffe ließen sich zu nur 22 % zu Biogas umwandeln. Alle angewandten physiko-chemischen Methoden resultierten in einer deutlichen Reduzierung der inhibierenden Wirkung. Es ist zu vermuten, daß durch keine der Methoden die niedermolekularen phenolischen Verbindungen entfernt wurden, so daß die verbleibende

hemmende Wirkung wahrscheinlich in erster Linie auf die phenolischen Monomere und eventuell niedermolekulare Komplexe zurückzuführen ist. Besonders die durch Ultrafiltration vorbehandelten Wasserproben lassen durch ihre deutlich reduzierte Toxizität erkennen, daß in erster Linie die im Schwelvollertwasser befindlichen hochmolekularen Komplexe für die stark inhibierend wirkenden Eigenschaften des Wassers verantwortlich sind. Dies wird durch Untersuchungen von WIESSNER et al., 1994 bestätigt. Obwohl der Inhibierungsmechanismus dieser makromolekularen Komplexe nicht bekannt ist, muß es sich hierbei wahrscheinlich um Effekte handeln, die an der Peripherie der Zelle ablaufen, da die Penetration sehr großer Moleküle in die Zelle behindert ist. Ähnlich wie bei den im Abschnitt 4.1. durch phenolische Autoxidationsprodukte hervorgerufenen Erscheinungen wird eine Wechselwirkung mit membrangebundenen bzw. Transportproteinen der Cytoplasmamembran erwogen, wodurch möglicherweise der Stoffaustausch zwischen Zelle und wäßriger Umgebung gestört wird. Andererseits ist aber auch eine Rücklösung niedermolekularer stark inhibierend wirkender Verbindungen von makromolekularen Komplexen in Betracht zu ziehen.

Die Fermentierbarkeit der Wasserinhaltsstoffe zu Biogas verbesserte sich beträchtlich nach Entfernung aller Verbindungen mit Molekülgrößen über 0,5 kD durch Ultrafiltration und ließ auch nach dem Flockungs-/Fällungsprozeß einen Umsatz des Abwasser-DOC zu Biogas zu etwa zwei Drittel, bezogen auf das vorgereinigte Wasser, d.h. nach Abtrennung der hochmolekularen Inhaltsstoffe, zu. Durch die Oxidation mit Wasserstoffperoxid wurden aber offenbar schwerabbaubare Produkte gebildet, die jedoch keine toxischen Eigenschaften unter methanogenen Bedingungen aufwiesen. Eine Entgiftung von o-Kresol und 2,4-Dinitrophenol durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid ist aus der Literatur bekannt (WANG, 1992). Auch hier wurde deutlich, daß sehr hohe Konzentrationen des Oxidationsmittels nötig sind, um die biologische Abbaubarkeit der Verbindungen entscheidend zu verbessern.

Diese Untersuchungen belegen die prinzipielle Möglichkeit, durch geeignete physiko-chemische Methoden eine weitgehende Entgiftung des Schwelvollertwassers mit gleichzeitiger Entfernung persistenter Verbindungen zu erreichen, womit eine wesentliche Voraussetzung zur Garantie eines stabilen und leistungsfähigen anaeroben Reinigungsprozesses geschaffen wäre. Für die Intensivierung von Selbstreinigungsprozessen im Schwelvollertsee haben diese Erkenntnisse den wesentlichen praktischen Aspekt, daß nach einer Entfernung der makromolekularen Strukturen methanogene Abbauprozesse in Gang kommen können. Andererseits wurde deutlich, daß dieses Ziel entsprechender unterstützender Maßnahmen bedarf. Solche Maßnahmen können im technischen Maßstab vorrangig in der *in situ* Flockung/Fällung der makromolekularen Bestandteile gesehen werden, wie sie gegenwärtig im Pilotmaßstab am Schwelvollertsee praktiziert wird.

4.4. Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen

Während die inhibierenden Wirkungen, die von Inhaltsstoffen phenolischer Deponiewässer ausgehen, als auch die Bedeutung des Umweltfaktors Temperatur für die Geschwindigkeit biochemischer Prozesse zum Teil umfangreich untersucht sind, sollten hier Erscheinungen betrachtet werden, die sich aus dem Zusammenwirken beider Einflüsse für die Raten biologischer Reinigungsprozesse ergeben. Als Modells substrat wurde Phenol gewählt, da einerseits diese Verbindung von höchster Umweltrelevanz ist und andererseits genügend Wissen zur Kinetik des Phenolabbaus unter aeroben und anaeroben Bedingungen aus der Literatur zur Verfügung steht. Phenol stellt einen Inhibitor dar, der gleichzeitig Substrat für phenolabbauende Mikroorganismen ist und demzufolge eine Inhibierung hervorruft, die mathematisch mit den Modellen der Substrathemmung beschreibbar ist. Darüber hinaus sollte der Einfluß eines nicht im System metabolisierten Inhibitors auf den Abbau niedriger Phenolkonzentrationen bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden. Als Modells substanz wurde hier Nickel gewählt, welches als Schwermetall Umweltrelevanz besitzt und zum einen nicht metabolisierbar ist und zum anderen eine ausreichende Stabilität seiner Oxidationsstufen unter aeroben und anaeroben Bedingungen garantiert. Nickel gilt als unspezifischer Inhibitor, dessen Wirkung in erster Linie aus der Bindung an die SH-Gruppen der Proteine resultiert. Ebenfalls als unspezifisch ist die Wirkungsweise von Phenol zu betrachten. Der qualitative Unterschied in der Wirkung beider Inhibitoren besteht darin, daß der Prozeß des Phenolabbaus zwingend an einen katalytisch aktiven Enzym-Phenol-Komplex gebunden ist, während ein katalytisch aktiver Enzym-Nickel-Komplex für den Abbau von Phenol keine Rolle spielt. Demnach existiert selektiv bei der Substrathemmung durch Phenol mit dem katalytisch aktiven Enzym-Inhibitor-Komplex eine zusätzlich zu allen unspezifischen Wirkungsorten in der Zelle eine hochspezifische Wirkungsebene. Einerseits wird gerade auf der Wirkungsebene dieses katalytisch aktiven Komplexes die Geschwindigkeit des metabolischen Prozesses (des Phenolabbaus) bestimmend beeinflußt, andererseits wird aber die Konformation dieses Komplexes empfindlich durch den Umweltfaktor Temperatur beeinflußt. Daher sollten bei der Untersuchung von Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen diese beiden Fälle einer Inhibierung getrennt voneinander betrachtet werden.

Für die Durchführung der Experimente wurde ein Temperaturbereich gewählt, der sich den in kontaminierten Habitaten vorherrschenden Temperaturen annähert (12-35°C).

4.4.1. Die Inhibierung des Phenolabbaus durch Nickel in Abhängigkeit von der Temperatur

Zur Untersuchung von Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen ist es naheliegend, in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur die kinetischen Parameter des betrachteten Prozesses zu bestimmen. Die dabei zur Anwendung kommenden mathematischen Modelle sollten einen Inhibierungsterm mit einem für das Ausmaß der Hemmung aussagefähigen Parameter enthalten.

Die Kinetik des Phenolabbaus in Gegenwart verschiedener Nickelkonzentrationen wurde bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht und mit dem PEARSON-Modell

$$v/v_{\max} = 1/(1+(I/K_i)^n)$$

ausgewertet. Das Modell berücksichtigt nicht den Geschwindigkeitseinfluß der veränderlichen Phenolkonzentration, jedoch wurden über einen weiten Konzentrationsbereich konstante Phenolabbauraten ermittelt. Die Bestimmung der Phenolabbauraten konnte somit graphisch durch Linearapproximation der Zeit-Konzentrations-Kurven in einem repräsentativen Bereich erfolgen. Beispielfhaft sind diese Kurven für den aeroben Phenolabbau bei 32°C in Bild 29 dargestellt. Erwartungsgemäß ergab sich in der Tendenz eine Verlangsamung des Phenolabbaus bei steigender Nickelkonzentration.

Bild 30 zeigt die Korrelation der experimentellen Werte für den aeroben und den anaeroben Phenolabbau mit dem PEARSON-Modell. Die einzelnen Punkte repräsentieren dabei Durchschnittswerte paralleler Versuche. Die Modellparameter wurden für jede Temperatur mittels SigmaPlot-Software angepaßt. Sowohl beim aeroben als auch beim anaeroben Abbau von Phenol ergaben sich sinkende normierte Phenolabbauraten mit steigender Nickelkonzentration, wobei eine deutliche Temperaturabhängigkeit zu erkennen ist. Je höher die Temperatur war, desto niedriger waren die normierten Phenolabbauraten bei einer bestimmten Nickelkonzentration. Während unter aeroben Bedingungen bereits unterhalb von 10 mg/l Nickel deutliche Inhibierungseffekte zu beobachten waren, trat unter anaeroben Bedingungen auch bei 20 mg/l Nickel noch keine signifikante Hemmung des Phenolabbaus auf. Die Erklärung für diesen Unterschied kann möglicherweise in einem höheren Nickelbedarf der anaeroben Kultur begründet liegen, da methanogene Bakterien im Gegensatz zu Eubakterien mit Hydrogenase, Kohlenmonoxiddehydrogenase und dem Cofaktor F 430 mehrere nickelhaltige Zellbestandteile aufweisen (GOTTSCALK, 1979). Bei höheren Nickelkonzentrationen spielt dies jedoch offenbar kaum eine Rolle; die normierten Phenolabbauraten des aeroben Prozesses sind dort denen des anaeroben Prozesses ähnlich.

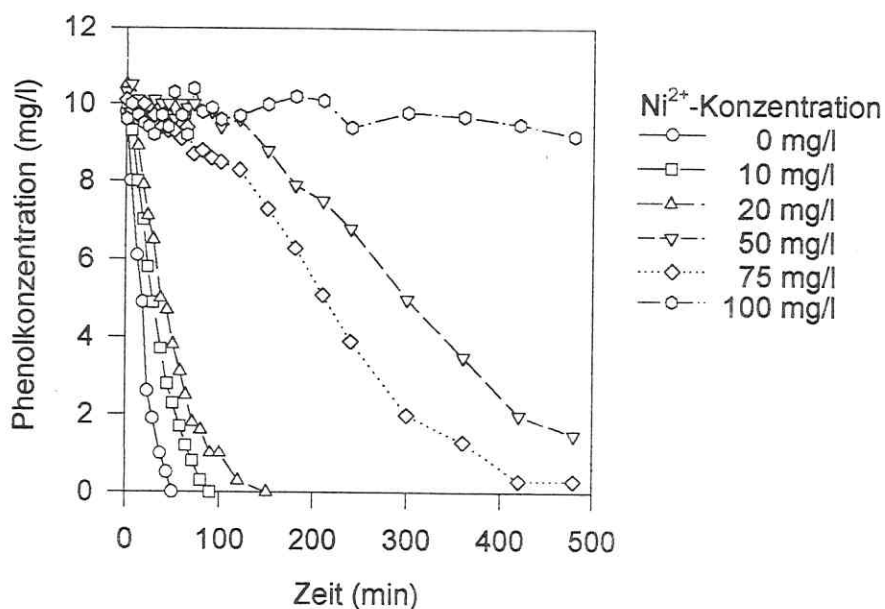


Bild 29. Aerober Phenolabbau bei 32°C in Gegenwart verschiedener Nickelkonzentrationen durch eine Anreicherungskultur (Biomassekonzentration: 50 mg/l).

Die Parameter des PEARSON-Modells, die bei den einzelnen Temperaturen die beste Anpassung der Modellgleichung an die experimentellen Daten ergaben, sind in Bild 31 dargestellt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehlerbereich bei der Modellanpassung an (Standardfehler = Standardabweichung der experimentellen Daten vom Modell / Quadratwurzel der Anzahl experimenteller Werte). Interpretiert man den Wert n analog zu PEARSON et al., 1980 als Sensitivitätsparameter der betrachteten biochemischen Reaktion gegenüber Unterschieden der Inhibitorkonzentration, so ergab sich für den aeroben Phenolabbau zumindest im Temperaturbereich zwischen 24 und 32 °C eine steigende Empfindlichkeit des Phenolabbaus bei steigender Temperatur.

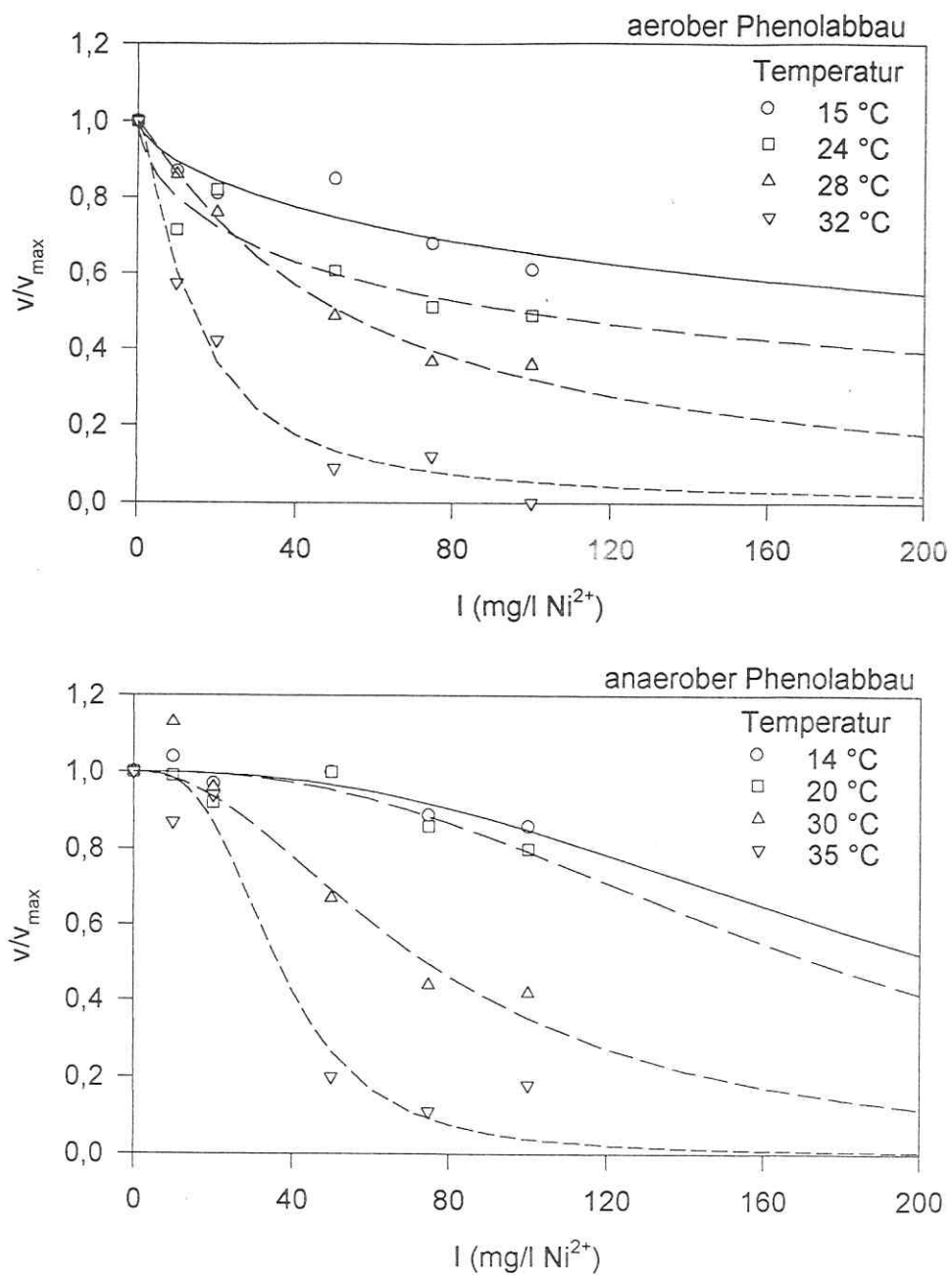


Bild 30. Normierte Phenolabbauraten in Gegenwart verschiedener Nickelkonzentrationen bei unterschiedlichen Temperaturen. (Batchversuch, Biomassekonzentration: 50 mg/l BTS; Anfangs-Phenolkonzentration: 10 mg/l, pH-Wert 7,0).

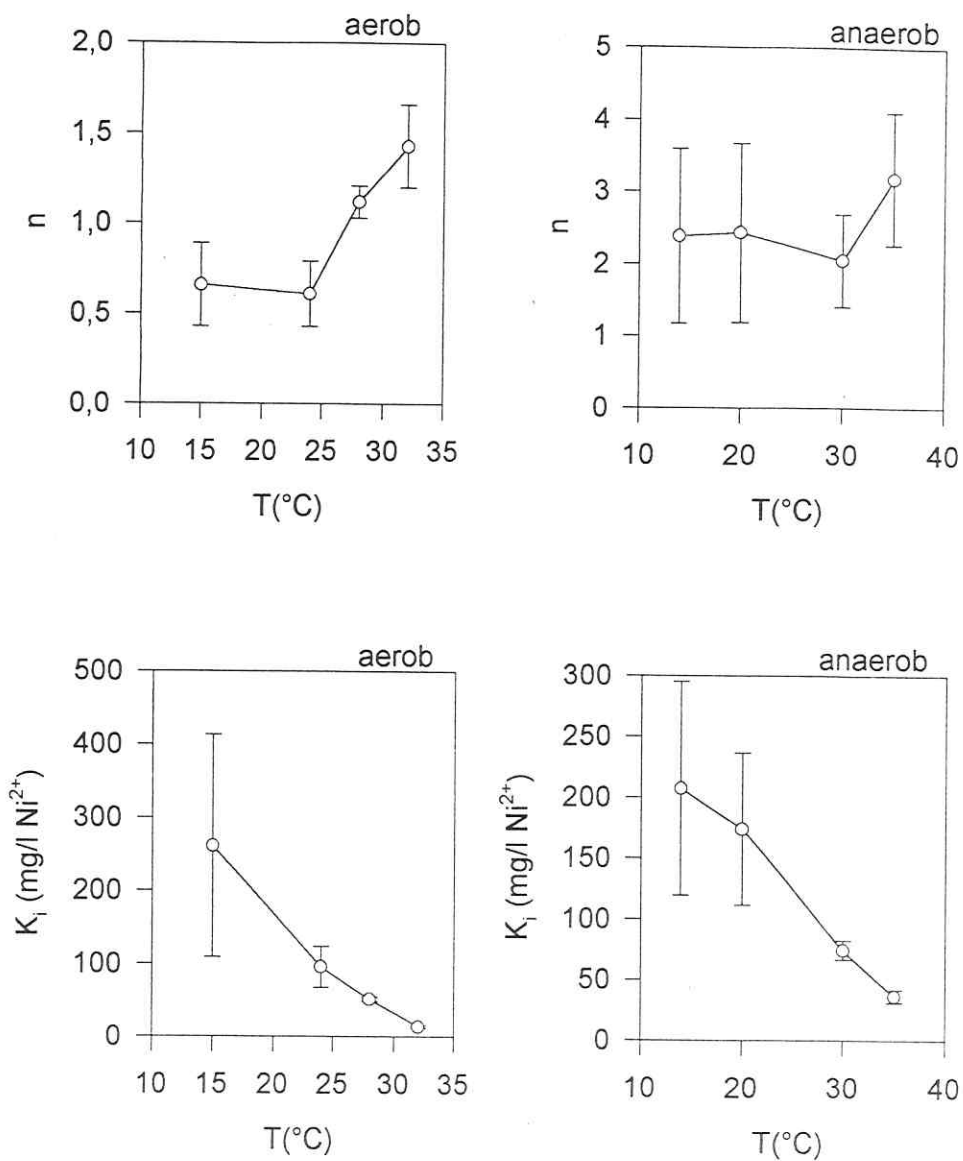


Bild 31. Abhängigkeit der PEARSON-Parameter von der Temperatur für den Abbau von Phenol in Gegenwart von Nickel.

Bei niedrigeren Temperaturen sowie beim anaeroben Phenolabbau läßt die Größe der Fehlerbalken keine sichere Interpretation zu. Unter dem Begriff Empfindlichkeit ist hier nicht unmittelbar die Intensität der Inhibierung zu verstehen, sondern vielmehr die Intensität des Reagierens der Kultur auf Unterschiede der Inhibitorkonzentration (anschaulich aus der Steilheit des Abfalls der PEARSON-Kurve ersichtlich). Das Ausmaß der Inhibierung selbst läßt sich mit dem K_i -Wert beschreiben, welcher im vorliegenden Fall sowohl beim aeroben als auch beim anaeroben Prozeß mit steigender Temperatur sank (Bild 31). Demzufolge nahm die Intensität der Hemmung des Phenolabbaus durch Nickel mit steigender Temperatur zu. Dieses Ergebnis steht im logischen Zusammenhang mit der bei Temperaturanstieg einhergehenden Empfindlichkeitssteigerung, insofern diese aus den ermittelten Daten als gegeben angenommen werden kann. Je empfindlicher eine Zelle auf einen Inhibitor reagiert, desto stärker ist demzufolge die als Geschwindigkeitsquotient veranschaulichte hemmende Wirkung. Die Standardfehlerbereiche für die K_i -Werte waren gerade bei großen K_i -Werten sehr groß. Dies ergibt sich aus dem Umstand, daß in diesen Fällen, also bei vergleichsweise geringer Inhibierung, der Abfall der PEARSON-Kurve sehr flach erfolgt, so daß die Gerade $0,5 \cdot v/v_{\max}$, die von einem aus den Abweichungen der einzelnen Meßpunkte von der PEARSON-Kurve resultierenden Band geschnitten wird, einen sehr breiten Schnittbereich aufweist.

Ein möglicher Temperatureinfluß auf den K_s -Wert für Phenol und damit auf die Reaktionsgeschwindigkeit konnte mit dem PEASON-Modell nicht erfaßt werden. Die Untersuchungsergebnisse zur inhibierenden Wirkung von Nickel auf den Phenolabbau in Abhängigkeit von der Temperatur stehen jedoch in Übereinstimmung mit dem durch Literaturdaten vielfach bestätigten Toxizitäts-Temperatur-Zusammenhang, der eine steigende Toxizität der verschiedensten Verbindungen mit steigender Temperatur widerspiegelt (ADELMAN und SMITH, 1972; CAIRNS et al., 1975; DUANGSAWADSI und KLAVERKAMP, 1979; SMITH und HEATH, 1979; FELTS und HEATH, 1984; KHANGAROT und RAY, 1987). In der Regel wird dieser Zusammenhang auf die erhöhte Zellpermeabilität bei erhöhter Temperatur zurückgeführt, was eine begünstigte Aufnahme des Giftes in die Zelle zur Folge hat (CAIRNS et al., 1975).

4.4.2. Substrathemmung beim Phenolabbau in Abhängigkeit von der Temperatur

Im Unterschied zu Nickel stellt Phenol einen Inhibitor dar, der katalytisch aktive Enzym-Substrat-Komplexe bilden kann. Die Bildung solcher Komplexe ist Voraussetzung für den Ablauf von biologischen Prozessen, die die mikrobielle Entfernung des Inhibitors Phenol zum Ziel haben und stellt gleichzeitig die Grundlage für Zellwachstum und -vermehrung dar, sofern Phenol als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden soll.

Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen, die sich auf solche mikrobiellen Abbauprozesse beziehen, sind bisher nicht näher untersucht worden. Dennoch sind sie von beachtlicher praktischer Bedeutung, da der biologische Abbau von Schadstoffen, die häufig gleichzeitig als Inhibitor agieren, auf katalytisch aktiven Enzym-Inhibitor-Komplexen beruht und damit im Zentrum des Interesses aller natürlichen Reinigungsprozesse und aller technisch genutzten biologischen Abwasser-, Abluft- und Bodenbehandlungsprozesse steht.

Der aerobe und anaerobe Abbau von Phenol bei unterschiedlichen Temperaturen ergab in Abhängigkeit von der Phenolanfangskonzentration über weite Bereiche konstante Geschwindigkeiten, so daß die Phenolabbauraten graphisch aus den Anstiegen dieser Kurvenabschnitte bestimmt werden konnten. Zur Veranschaulichung des Abbauprozesses ist in Bild 32 die zeitliche Abnahme der Phenolkonzentrationen im Versuch unter aeroben Bedingungen bei 31°C für die Ansätze im niederen Konzentrationsbereich dargestellt. Die Biomassekonzentration betrug hierbei 100 mg/l; bei höheren Substratkonzentrationen wurden jedoch höhere Biomassekonzentrationen eingesetzt (bis 1 g/l).

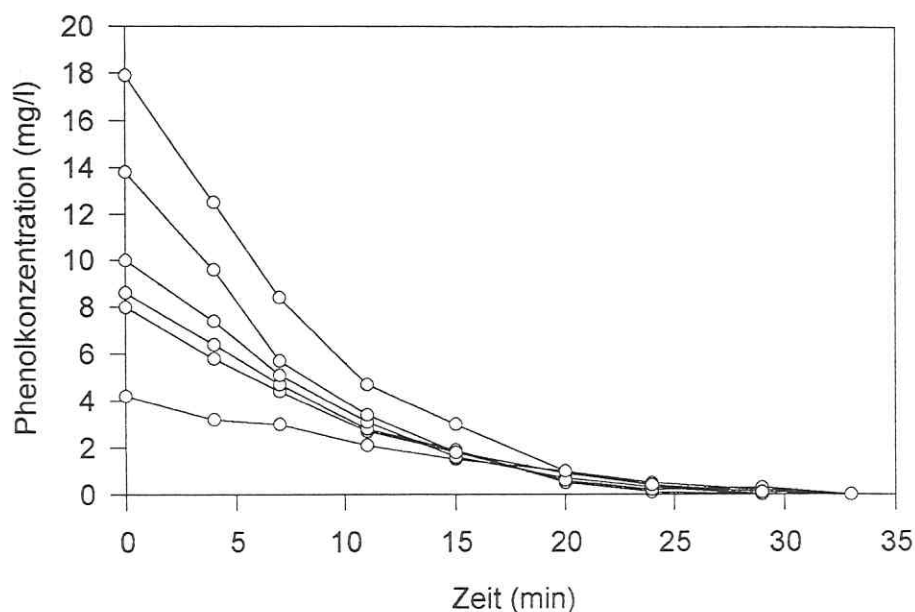


Bild 32. Aerober Phenolabbau bei verschiedenen Phenolanfangskonzentrationen (niederer Konzentrationsbereich, $T = 31^{\circ}\text{C}$, Biomassekonzentration: 100 mg/l)

Wurden die aus den Abbaukurven berechneten Phenolabbauraten den jeweiligen Phenolanfangskonzentrationen zugeordnet, so ergaben sich gute Korrelationen mit dem EDWARDS-Modell

$$v = v_{\max}/(1+K_s/S+(S/K_i)^n)$$

(Bild 33), wobei die Parameter des Modells mittels SigmaPlot-Software angepaßt wurden. Charakteristisch für beide Prozesse ist ein genereller Anstieg der spezifischen Phenolabbauraten mit steigender Temperatur. Bei geringen Substratkonzentrationen wurde mit Konzentrationserhöhung zunächst eine Erhöhung der spezifischen Phenolabbaurate erreicht, die bei weiterer Konzentrationssteigerung nach Durchlaufen eines Maximums wieder sank. Auffällig ist, daß die spezifischen Phenolabbauraten für den aeroben Prozeß wesentlich höher lagen als für den anaeroben Prozeß. Jedoch waren Phenolkonzentrationen, bei denen die gemessenen maximalen spezifischen Phenolabbauraten erreicht wurden, beim anaeroben Prozeß wesentlich höher als beim aeroben Prozeß. Tendenziell werden diese Sachverhalte durch Literaturdaten bestätigt (vgl. Abschnitt 2.3.1.2.).

Die Abhängigkeit der kinetischen Parameter $v_{\max}$ und K_s von der Temperatur ist in Bild 34 dargestellt. Erwartungsgemäß ergab sich ein überproportionaler Anstieg der maximalen spezifischen Phenolabbaurate mit der Temperatur. Dies deutet darauf hin, daß das Temperatur-optimum der verwendeten Mischpopulationen in der Nähe der höchsten getesteten Temperatur oder darüber lag. Offensichtlich führten die niedrigen *in vivo* Temperaturen der Habitate, aus denen die Kulturen gewonnen worden waren, nicht zu einer derart weitgehenden Temperaturadaptation, daß das Temperaturoptimum in den psychrophilen Bereich verschoben worden wäre. Ebenfalls eine steigende Tendenz wurde für die K_s -Werte beim aeroben und anaeroben Phenolabbau bei Temperaturerhöhung diagnostiziert. Im Durchschnitt lagen die K_s -Werte für die aerobe Kultur mehr als eine Größenordnung niedriger als für den anaeroben Prozeß. Ob es sich dabei allerdings um ein charakteristisches Merkmal hinsichtlich des Vergleiches des aeroben und anaeroben Phenolabbaus handelt, kann nicht beurteilt werden. Allein für den aeroben Abbau von Phenol sind aus der Literatur K_s -Werte bekannt, die sich um fast drei Größenordnungen bei verschiedenen Kulturen unterscheiden (MAGBANUA et al., 1994). Die ermittelten K_s -Werte lagen dabei im Bereich zwischen 0,3 mg/l (SHIMIZU et al., 1973) und 266 mg/l (ROZICH et al., 1985).

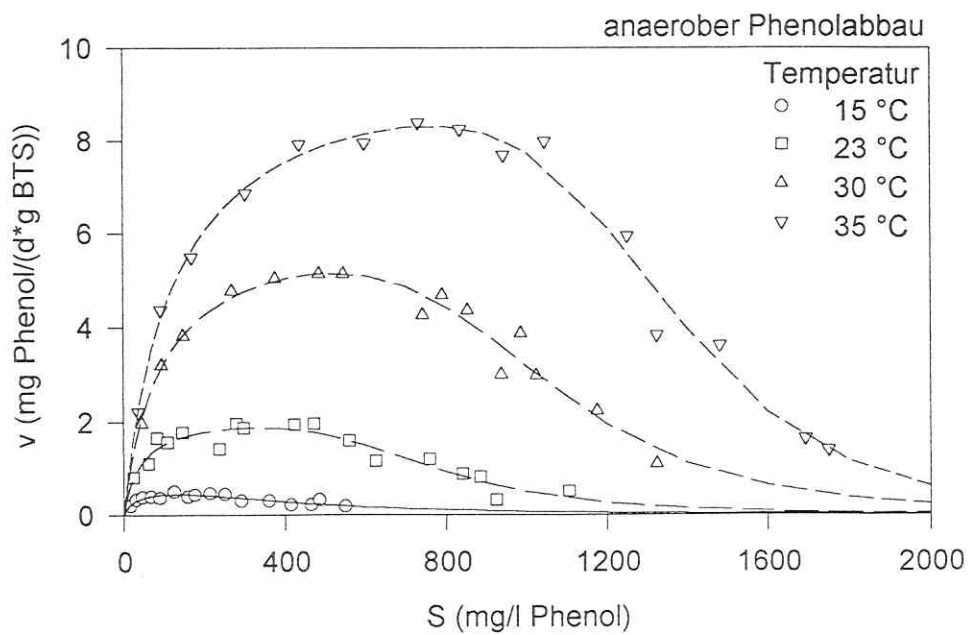
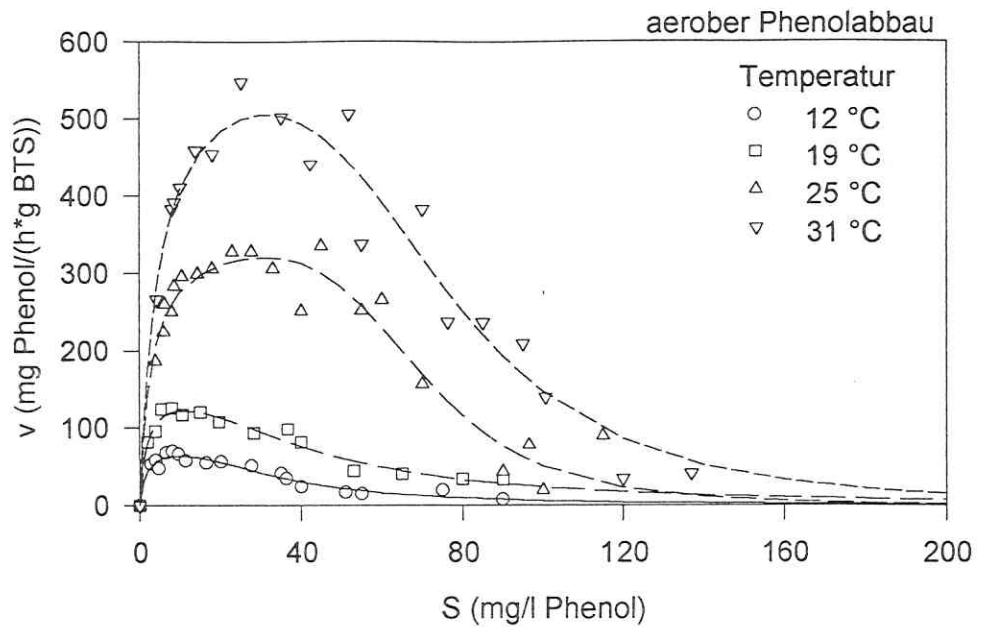


Bild 33. Spezifische Phenolabbauraten bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

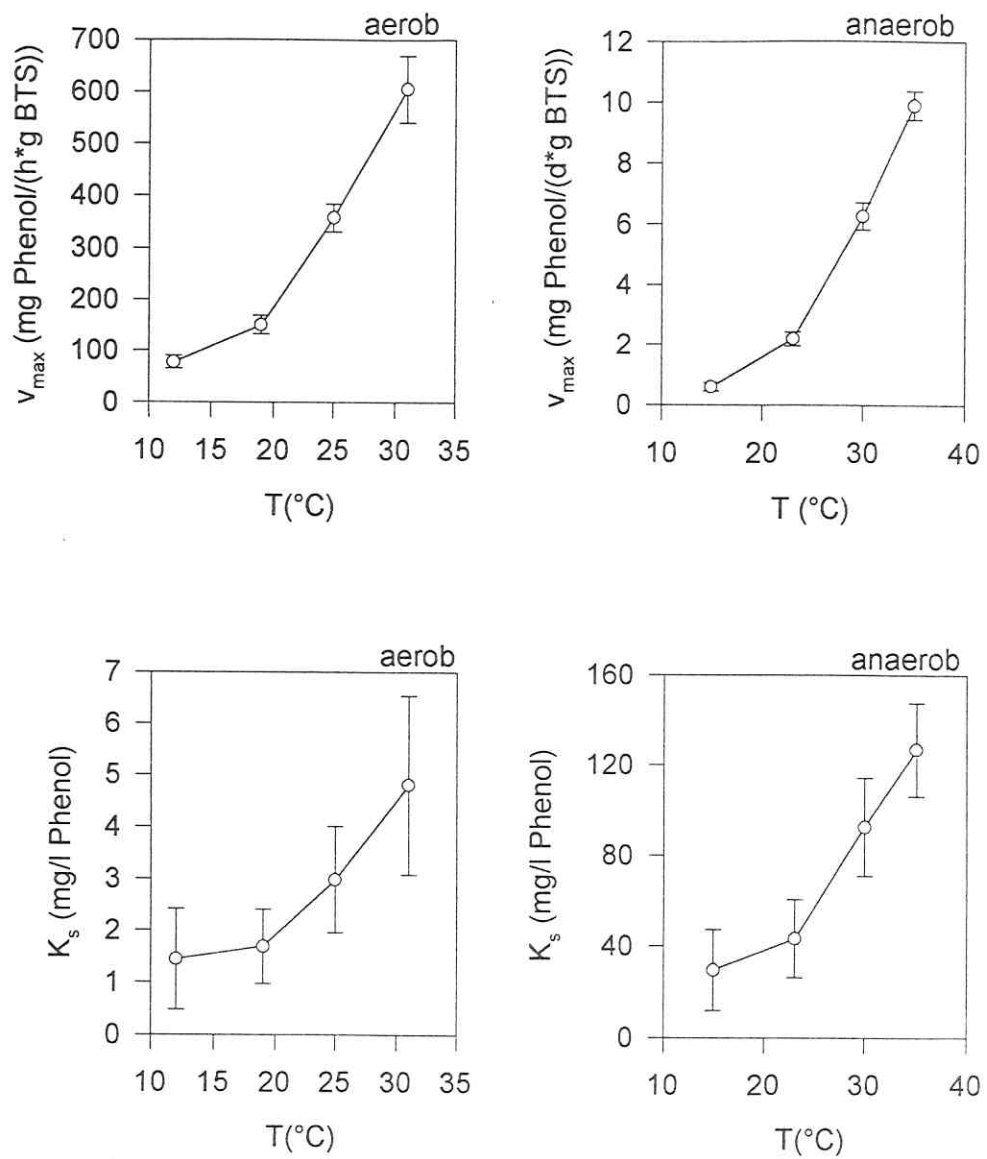


Bild 34. Abhängigkeit der Parameter $v_{\max}$ und K_s beim Phenolabbau von der Temperatur.

Darüber hinaus kann erwogen werden, ob die Vorgeschichte der in den hier beschriebenen Experimenten verwendeten Mischpopulationen zu einer Anpassung der K_S -Werte an das Substratangebot geführt haben kann. Die anaerobe Kultur mit den höheren K_S -Werten wurde aus Sediment eines phenolhaltigen Schwelwassersees angereichert, während die aerobe Population aus Gartenerde gewonnen wurde. Inwiefern die Unterschiede in den K_S -Werten bei den verschiedenen Kulturen ausschließlich das Ergebnis eines Selektionsprozesses sind bzw. ob hinsichtlich der Enzym-Substrat-Affinität auch ein temperaturunabhängiger Adaptationsmechanismus in der Natur existiert bzw. über welche Zeiträume er sich realisiert, ist nicht genau bekannt. Für eine Beurteilung dieses Sachverhaltes kommt erschwerend hinzu, daß die Zusammensetzung einer Population auch durch das Substratangebot reguliert wird, wobei experimentell ermittelte kinetische Daten immer den Durchschnitt der Daten der einzelnen Organismen repräsentieren. Jedoch ist es augenscheinlich so, daß die in natürlichen Systemen vorkommenden Substratkonzentrationen weit unterhalb der Sättigung der jeweiligen Enzyme liegen, also in einem Bereich, der ein sehr sensitives Reagieren der Zelle durch Anpassung der Substratabbaugeschwindigkeit an das aktuelle Substratangebot ermöglicht. Dies macht eine Regulation der K_S -Werte zumindest über evolutionäre Zeiträume wahrscheinlich.

Die in Bild 34 dargestellte steigende Tendenz der K_S -Werte bei Temperaturerhöhung verdeutlicht eine Modulation der Enzym-Substrat-Affinität in Abhängigkeit von der Temperatur in der Weise, daß niedrige Temperaturen zu einer Affinitätserhöhung führten. Ein Enzym arbeitet schneller, wenn seine Fähigkeit, Substrate und Cosubstrate zu binden, beschleunigt ist, d.h. wenn die Affinität des Substrates zum Enzym erhöht ist. Durch die Affinitätserhöhung wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratkonzentrationen unterhalb der Sättigung demzufolge gegenüber Temperatureinflüssen stabilisiert. Dieser Effekt der Temperaturkompensation durch Affinitätsmodulation, der im Abschnitt 2.3.2.2. näher erläutert wurde und in der Natur weitverbreitet ist, wurde hiermit auch für die Prozesse des aeroben und anaeroben Abbaus von Phenol nachgewiesen.

Die Temperaturabhängigkeit der anderen Parameter des EDWARDS-Modells n und K_i ist in Bild 35 dargestellt. Für den anaeroben Phenolabbau wurden steigende n -Werte mit steigender Temperatur ermittelt; auch für den aeroben Phenolabbau liegt diese Tendenz nahe, obwohl eine sichere Interpretation besonders der benachbarten Punkte hier schwerlich möglich ist. Höhere Werte von n bei höheren Temperaturen dokumentieren eine mit Temperaturerhöhung einhergehende Steigerung der Empfindlichkeit der Kultur gegenüber Differenzen in der Substratkonzentration. In der Darstellung $v=f(S)$ in Bild 33 drückt sich dies als steilerer Abfall auf der rechten Seite der EDWARDS-Kurven bei höheren Temperaturen aus.

Von größerer Aussagekraft als der Parameter n ist jedoch der K_i -Wert, für den in diesem Fall sowohl beim aeroben als auch beim anaeroben Phenolabbau eine steigende Tendenz mit steigender Temperatur nachgewiesen wurde.

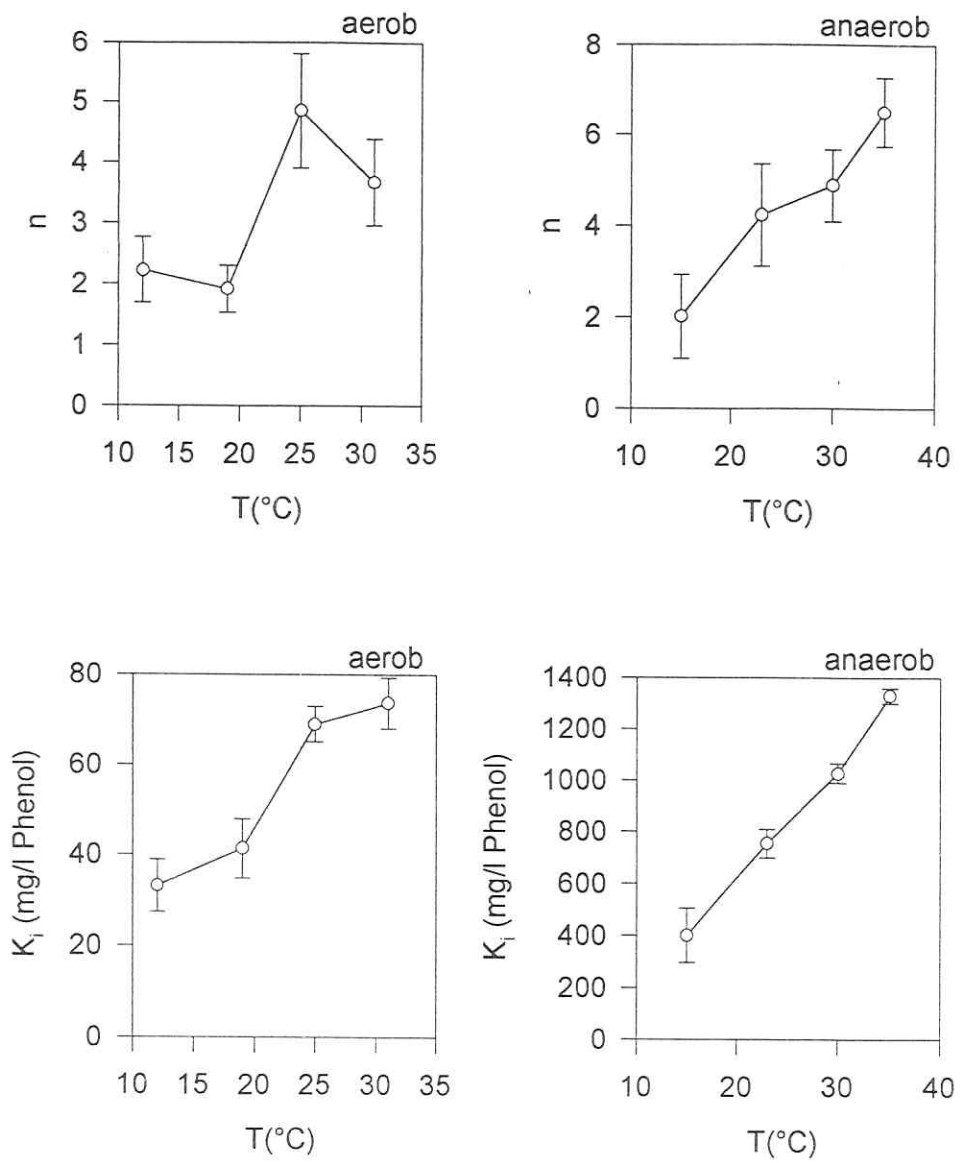


Bild 35. Abhängigkeit der Parameter n und K_i beim Phenolabbau von der Temperatur.

Diese Tatsache muß so interpretiert werden, daß das Substrat Phenol eine höhere inhibierende Wirkung auf seinen eigenen Abbau ausübt, je niedriger die Temperatur ist. Folglich sinkt auch die Konzentrationsgrenze, oberhalb der der mikrobielle Abbau von Phenol auf Grund der Substrathemmung praktisch vollständig unterbunden wird, mit sinkender Temperatur. Zum geschwindigkeitsreduzierenden Einfluß niedriger Temperaturen kommt demzufolge eine Substrattoxizität hinzu, die bei gleichen Konzentrationen, aber höheren Temperaturen, gar nicht auftreten würde. Hinsichtlich der Abhängigkeit $K_i=f(T)$ wurde für die Substrathemmung durch Phenol demzufolge genau die entgegengesetzte Tendenz im Vergleich zur Hemmung des Phenolabbaus durch Nickel beobachtet. Zudem enthält die mit Temperaturerhöhung steigende Tendenz des K_i -Wertes für die Substrathemmung durch Phenol einen scheinbaren inneren Widerspruch zur mit Temperaturerhöhung steigenden Tendenz des Parameters n : Wie kann erklärt werden, daß der Inhibitor Phenol, für den die Sensitivität der Kultur bei höheren Temperaturen größer ist als bei niedrigen, denselben Prozeß (Phenolabbau) trotzdem bei niedrigen Temperaturen stärker hemmt als bei hohen? Auf der Suche nach einer schlüssigen Erklärung für diesen Widerspruch ist eine Konzentration auf die wesentlichen unterscheidenden Merkmale einer Hemmung des Phenolabbaus, zum einen durch Nickel und zum anderen durch das Substrat Phenol selbst, naheliegend. Beiden Inhibitoren ist kein spezifischer Wirkungsort zuzuschreiben; in beiden Fällen handelt es sich wahrscheinlich um eine Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten in der Zelle. Daher sollte die steigende Empfindlichkeit des Phenolabbaus gegenüber beiden Inhibitoren mit steigender Temperatur (ersichtlich aus den Tendenzen $n=f(T)$ und der Steilheit des Abfalls der $v=f(S)$ - bzw. $v/v_{\max}=f(I)$ -Kurven) auf einen allgemeinen und unspezifischen Effekt zurückzuführen sein. In Frage kommt hier die z.B. von CAIRNS et al., 1975 diskutierte erhöhte Membranpermeabilität bei erhöhter Temperatur. Dies trifft offensichtlich sowohl auf die Inhibierung durch Nickel als auch auf die Substrathemmung durch Phenol zu. Der entscheidende qualitative Unterschied zwischen der Nickel- und der Phenolhemmung liegt jedoch in der Ausprägung eines hinsichtlich des Phenolabbaus katalytisch aktiven Komplexes zwischen einem Enzym und dem Inhibitor. Ein solcher Komplex wird selektiv bei der Substrathemmung gebildet und existiert nicht mit dem Inhibitor Nickel. Da der oben beschriebene Widerspruch zwischen den Tendenzen $n=f(T)$ und $K_i=f(T)$ lediglich bei der Substrathemmung auftrat, ist es naheliegend, nach der Ursache des Widerspruches auf der Ebene des Enzym-Substrat-Komplexes, der hier mit dem Enzym-Inhibitor-Komplex identisch ist, zu suchen.

Bei näherer Betrachtung der beiden Graphiken im Bild 33 wird deutlich, daß das Maximum der spezifischen Phenolabbaurate in den EDWARDS-Kurven mit steigender Temperatur nach rechts wanderte, also bei höheren Temperaturen erst bei höheren Substratkonzentrationen erreicht wurde als im niedrigen Temperaturbereich. Die Ursache dafür liegt in den mit der Temperatur steigenden K_s -Werten und damit letztlich im Mechanismus der Temperaturkompensation durch Affinitätsmodulation begründet, die aus Bild 34 ersichtlich wurde. Eine logische

Konsequenz dieses Sachverhaltes ist jedoch, daß der Sättigungszustand bereits bei niedrigeren Substratkonzentrationen erreicht wird. Wird die Substratkonzentration über die Sättigung eines Enzyms hinaus erhöht, muß es auf Grund des Verbrauchs von freiem Enzym zwangsläufig zur Bildung der inaktiven Substrat-Enzym-Substrat-Komplexe kommen, denen die Modellvorstellung einer Substrathemmung zugrundeliegt. Dies geschieht folgerichtig im kompensierten Fall, also bei niedrigen Temperaturen bereits bei niedrigeren Substratkonzentrationen als bei höheren Temperaturen, bei welchen keine oder eine weniger starke Temperaturkompensation auftritt. Demnach ist die Substrathemmung um so stärker ausgeprägt, je niedriger die Temperatur liegt, womit dieselbe Tendenz gegeben wäre, wie sie tatsächlich für den Abbau von Phenol unter aeroben und anaeroben Bedingungen gefunden wurde (Bild 35). Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß ein Beweis für die Übertragbarkeit mechanistischer Interpretationen von der enzymatischen auf die Ebene einer Mischkultur nicht erbracht werden kann. Die Vorgänge in ganzen Zellen sind zu komplex, als daß die beobachteten Effekte eindeutig auf einen Mechanismus an einem Enzym zurückzuführen wären. Die Rolle der Temperaturkompensation für die beobachteten Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen kann demnach zwar in Betracht gezogen werden, bleibt aber hypothetisch.

4.4.3. Temperatursensitivität des Abbaus von Phenol bei Inhibierung durch Nickel bzw. Substrathemmung

Bisher wurden die untersuchten Prozesse stets unter dem Aspekt der Temperaturabhängigkeit der Inhibierung betrachtet, interessant ist jedoch auch der Aspekt der Temperaturempfindlichkeit in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitor-konzentrationen. Als Charakteristikum für die Temperatursensitivität eines Stoffwandlungsprozesses wird in der Regel der ARRHENIUS-Plot herangezogen, eine grafische Veranschaulichung der ARRHENIUS-Beziehung, häufig in Verbindung mit dem Q_{10} -Wert, welcher angibt, um das Wievielfache die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10 Grad steigt. Die ARRHENIUS-Plots für den aeroben und anaeroben Phenolabbau in der Beeinflussung durch verschiedene Nickelkonzentrationen sind in Bild 36 dargestellt. Die einzelnen Punkte wurden unter Zugrundelegung der ermittelten kinetischen Parameter nach der PEARSON-Gleichung berechnet. Die Phenolkonzentration betrug generell 10 mg/l. Für den Abbau von 10 mg/l Phenol ohne Gegenwart von Nickel ergaben sich Kurven, die durch Geraden anzunähern wären, jedoch trat eine leicht konvexe Form der Kurven auf. Mit steigender Nickelkonzentration weichen die Kurven zunächst im höheren Temperaturbereich von diesen ungehemmten Kurven nach unten ab; die Kurven werden flacher.

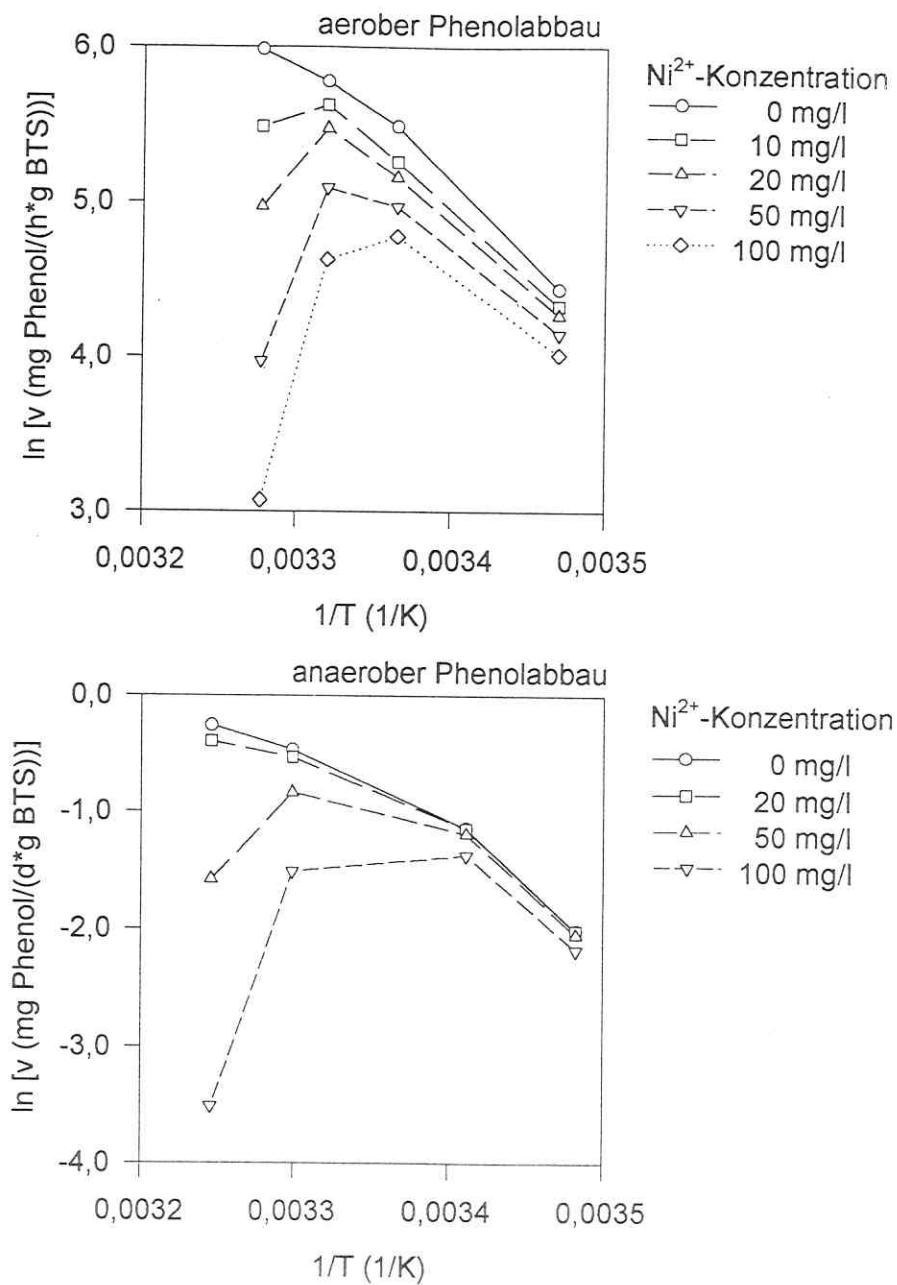


Bild 36. ARRHENIUS-Plots für den Phenolabbau in Beeinflussung durch verschiedene Nickelkonzentrationen.

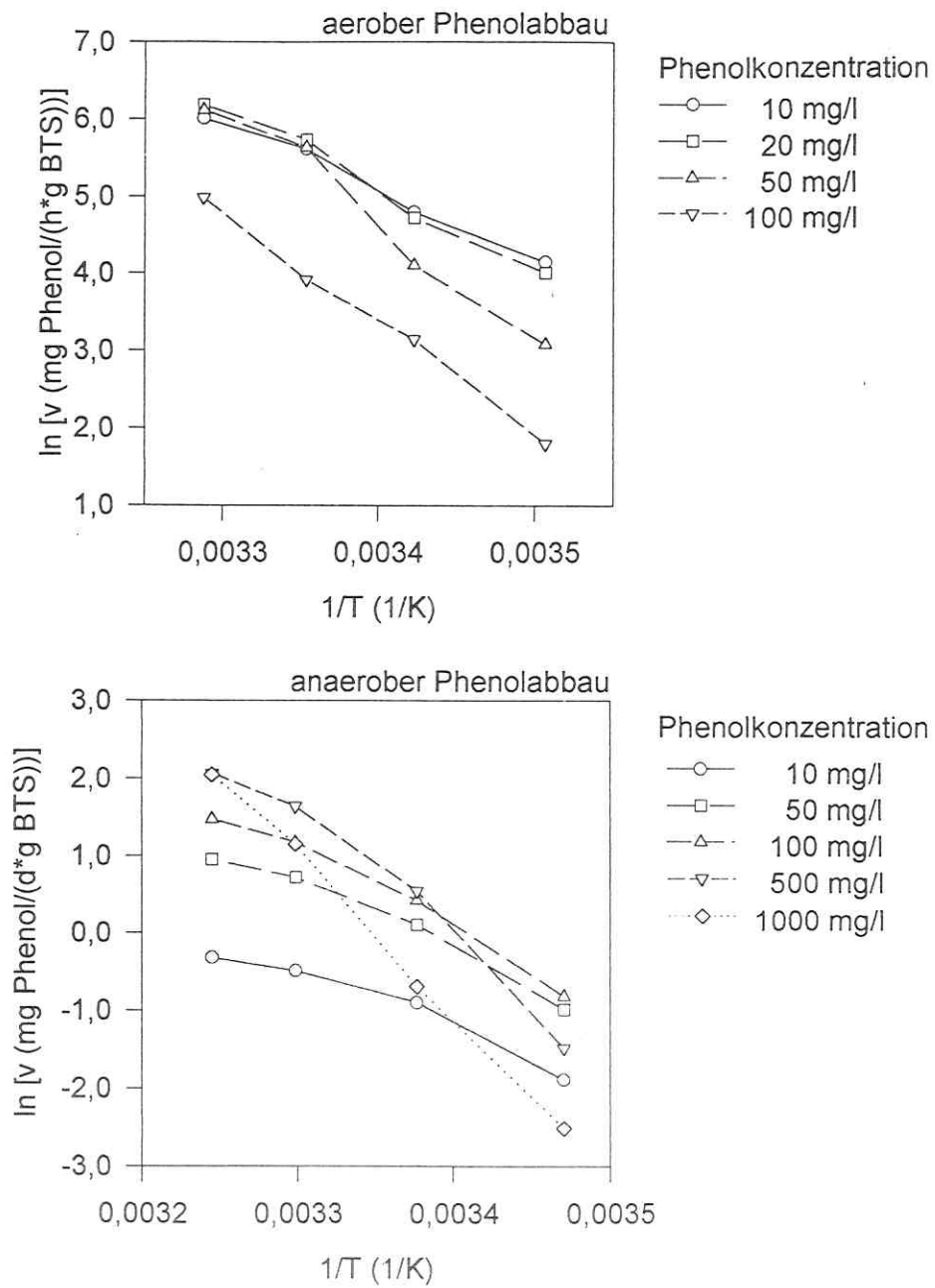


Bild 37. ARRHENIUS-Plots für den Phenolabbau bei verschiedenen Substratkonzentrationen.

Dies ist so zu erklären, daß der Geschwindigkeitsunterschied, der aus der Temperaturdifferenz resultiert, durch eine bei hohen Temperaturen einsetzende inhibierende Wirkung durch Nickel reduziert wird. Demzufolge wird der Umweltfaktor Temperatur auf direktem Wege weniger bedeutsam für die Geschwindigkeit der Reaktion; die Temperatursensitivität des Prozesses sinkt. Bei hohen Nickelkonzentrationen wurde die Inhibierung bei hohen Temperaturen gegenüber der Inhibierung bei niedrigen Temperaturen so groß, daß trotz der höheren Temperatur niedrigere Phenolabbauraten erhalten wurden.

Die Temperaturempfindlichkeit des Phenolabbaus bei verschiedenen Phenolkonzentrationen wurde in ARRHENIUS-Plots dargestellt (Bild 37), deren Punkte mit den ermittelten kinetischen Parametern nach der EDWARDS-Gleichung ermittelt wurden. Bei einer Phenolkonzentration von 10 mg/l ergab sich unter anaeroben Bedingungen wiederum eine leicht konvexe Gestalt der Kurve, während unter aeroben Bedingungen ein nahezu linearer Verlauf zu erkennen war. Beim aeroben Phenolabbau führte eine Steigerung der Substratkonzentration zunächst zu keiner deutlichen Geschwindigkeitserhöhung im Bereich hoher Temperaturen, jedoch zu einer Verminderung der Phenolabbaurate im unteren Temperaturbereich. Bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration kam es auch bei hohen Temperaturen zu einer Geschwindigkeitsreduktion. Im anaeroben Milieu führte die Steigerung der Phenolkonzentration zunächst zu einem Anstieg der Phenolabbaurate im Bereich hoher Temperaturen, jedoch mit zunehmender Konzentrationserhöhung zu einem Sinken der Geschwindigkeit im niederen Temperaturbereich.

Sowohl beim aeroben als auch beim anaeroben Phenolabbau kam es im Zuge der Steigerung der Substratkonzentration zu einer Erhöhung der Steilheit der Kurve, woraus eine steigende Temperatursensitivität des Phenolabbaus bei steigender Substratkonzentration zu schließen ist. Die Ursache dafür ist darin zu suchen, daß eine Substrathemmung im Bereich niedriger Temperaturen bereits bei geringeren Konzentrationen auftrat als bei höheren Temperaturen. Demzufolge wird der Umweltfaktor Temperatur für die Abbaugeschwindigkeit von Phenol von immer größerer Bedeutung, je höher die Substratkonzentration ist. Erst im Konzentrationsbereich, der bei allen Temperaturen eine nahezu vollständige Inhibierung zur Folge hat, wird der Temperatureinfluß seine Bedeutung verlieren.

Auch für die Temperatursensitivität des Phenolabbaus unter aeroben und anaeroben Bedingungen ergaben sich demnach gegensätzliche Tendenzen in ihrer Abhängigkeit von der Inhibitor-konzentration bei der Hemmung zum einen durch Nickel und zum anderen durch das Überschußsubstrat Phenol. Dies ist die logische Folge der gegensätzlichen Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen.

Eindrucksvoll wird die Abhängigkeit der Temperaturempfindlichkeit des Phenolabbaus bei Inhibierung durch Nickel bzw. bei Substrathemmung von der Inhibitor-konzentration auch anhand der Darstellung der Q_{10} -Werte über der Inhibitor-konzentration deutlich (Bild 38). Die Q_{10} -Werte wurden analog zu WESTERMANN et al., 1989 nach der Gleichung

$$\ln Q_{10} = \ln (v_2/v_1) * 10/(T_2-T_1)$$

berechnet. Dabei wird durch den Index 2 jeweils eine hohe, durch den Index 1 eine niedrige Versuchstemperatur gekennzeichnet. Konkret wurden dafür die niedrigsten bzw. höchsten Temperaturen bei den einzelnen Experimenten herangezogen. Einschränkend ist hierbei anzumerken, daß der Q_{10} -Wert einer biochemischen Reaktion temperaturunabhängig sein muß, wenn die *ARRHENIUS*-Beziehung tatsächlich gilt. Im vorliegenden Fall sind jedoch Abweichungen vom linearen Verlauf des *ARRHENIUS*-Plots aufgetreten, d.h. der Q_{10} -Wert ist nicht temperaturunabhängig. Wenn dennoch ein solcher Wert aus der maximalen im Experiment untersuchten Temperaturdifferenz angegeben wird, so stellt dieser Wert einen für diesen Temperaturbereich durchschnittlichen Wert dar.

Unabhängig davon, ob aerobe oder anaerobe Bedingungen vorlagen, zeigen die beiden Kurven für den Fall der Nickelhemmung denselben qualitativen Verlauf. Dasselbe traf auch für den Fall der Substrathemmung des Phenolabbaus zu. Bei der Inhibierung durch Nickel sind beide Kurven nahezu deckungsgleich. Ist kein Inhibitor anwesend, lag der Q_{10} -Wert des Phenolabbaus zwischen 2,0 und 2,5. Bei Erhöhung der Nickelkonzentration erfolgte ein rascher Abfall des Q_{10} -Wertes und eine asymptotische Annäherung an Null. Dies verdeutlicht eine sinkende Temperaturempfindlichkeit des Phenolabbaus bei steigender Nickelkonzentration. Die nach der *ARRHENIUS*-Gleichung geschwindigkeitserhöhende Wirkung höherer Temperaturen wird hier gewissermaßen durch die erhöhte inhibierende Wirkung im oberen Temperaturbereich kompensiert. Demgegenüber stieg der Q_{10} -Wert bei Substrathemmung des Phenolabbaus von Werten um 2,0 mit Konzentrationserhöhung an, um nach Erreichen eines Maximums wieder abzufallen und sich dem Wert Null anzunähern. Unter aeroben Bedingungen erfolgten Anstieg und Abfall der Kurve sehr steil im Vergleich zum Phenolabbau unter anaeroben Bedingungen. Die Ursache dafür liegt in den sehr unterschiedlichen kinetischen Parametern für beide Prozesse begründet (vgl. Abschnitt 4.4.2.). Das Maximum der Kurven liegt bei der Substratkonzentration, bei der die Temperaturempfindlichkeit der Reaktion am größten ist. Dies ist unter aeroben Bedingungen bei Phenolkonzentrationen etwas unter 100 mg/l der Fall und unter anaeroben Bedingungen bei leicht über 1000 mg/l Phenol. Die maximal erreichten Q_{10} -Werte liegen bei 5,5 beim aeroben Phenolabbau und bei 11,5 unter anaeroben Bedingungen.

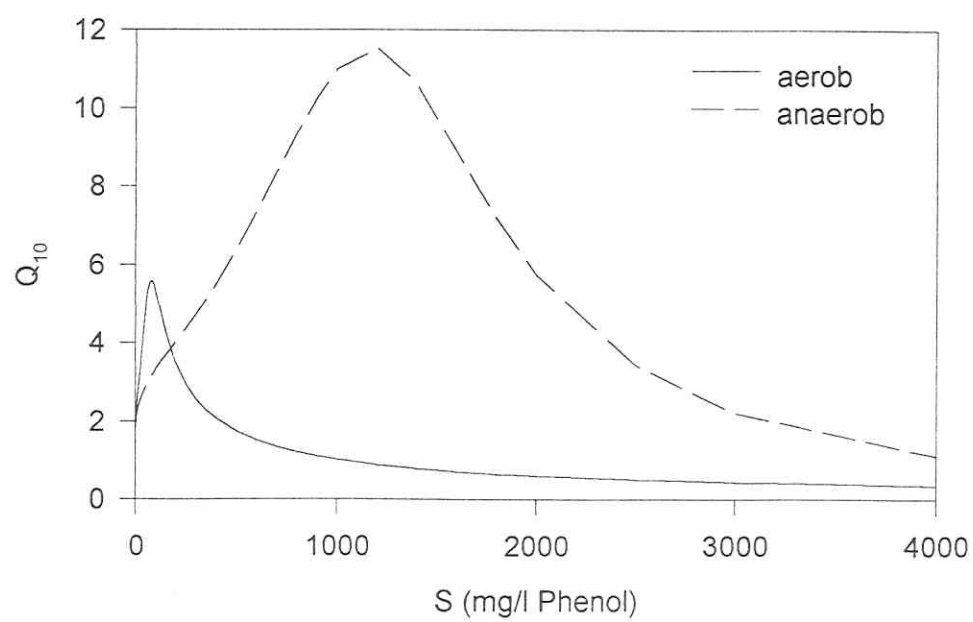
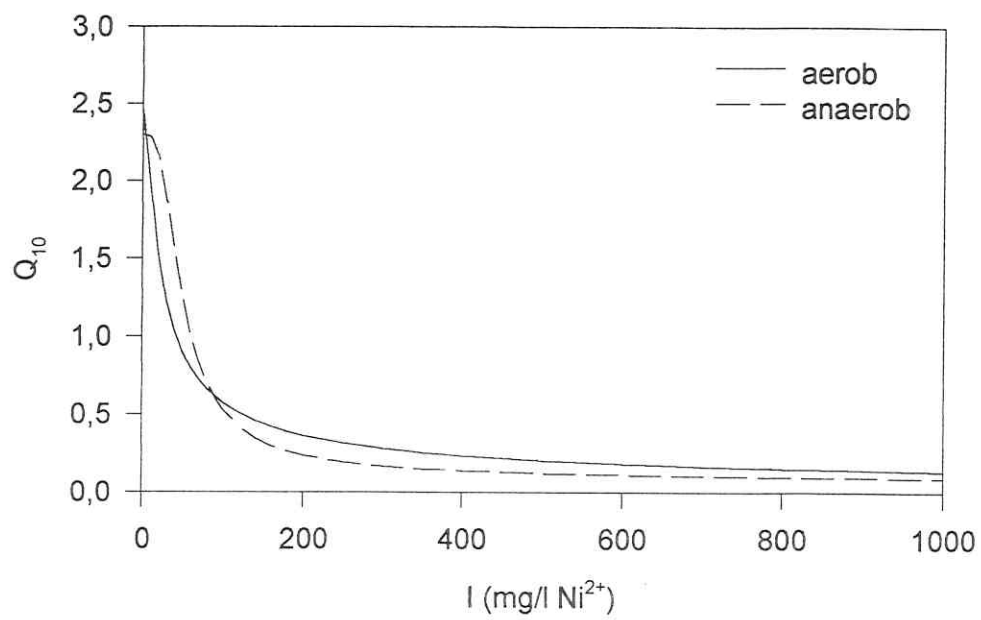


Bild 38. Abhängigkeit der Q_{10} -Werte für den Phenolabbau von der Konzentration der Inhibitoren Nickel bzw. Phenol.

5. Diskussion

5.1. Wirkung und Verhalten phenolischer Autoxidationsprodukte in mikrobiellen Systemen

5.1.1. Das inhibitorische Potential phenolischer Autoxidationsprodukte

Werden phenolische Verbindungen zur Autoxidation gebracht, so bilden sich zunächst Strukturen, die mikrobielle Prozesse bedeutend beeinträchtigen können. Nach weitgehender Oxidation der Verbindungen kommt es jedoch zur Bildung von höhermolekularen Komplexen, die keine oder nur geringe negative Effekte bewirken. Diese prinzipielle Tendenz wurde bereits im Rahmen der Tannin-Theorie vor einigen Jahren formuliert (FIELD et al., 1989). Ohne daß auf die Bedeutung der chemischen Struktur des monomeren phenolischen Ausgangsstoffes dabei eingegangen wurde, repräsentieren diese Arbeiten jedoch die Erkenntnis, daß der Oxidationszustand eines autoxidativ entstandenen Gemisches sein inhibitorisches Potential in entscheidender Weise beeinflußt.

Die Huminstoffforschung hat in der Vergangenheit umfangreiche Beiträge zur Wirkung von Huminstofffraktionen auf mikrobielle Systeme erbracht. Jedoch ist es kaum möglich, aus diesen Arbeiten allgemeingültige Aussagen abzuleiten. Es existieren nahezu ebensoviele Arbeiten, die von einer stimulierenden Wirkung von Huminstoffen berichten wie Arbeiten, in denen auf hemmende Einflüsse hingewiesen wird. So wurde beispielsweise eine verstärkte Synthese der Catechol-1,2-Oxygenase bei einer *Arthrobacter*-Species in Gegenwart einer Fulvinsäure nachgewiesen (DE HAAN, 1976), eine Erhöhung der Ernteerträge beim Weizenanbau durch Zudosierung einer Braunkohle-Huminsäure festgestellt (AHMAD et al., 1992) und die Stimulierung sowohl aerober als auch anaerober Abbauprozesse in Gegenwart verschiedener natürlicher Huminsäuren diagnostiziert (TRANVIK und HÖFLE, 1987; HARTUNG, 1992). Demgegenüber kam es unter Einfluß natürlicher Huminsäuren zum Verlust von Potentialen hinsichtlich des bakteriellen Abbaus phenolischer Verbindungen (SHIMP und PFAENDER, 1985), zur Hemmung der Malatdehydrogenase aus Schweineherzzellen durch Bodenhuminsäuren (PFLUG und ZIECHMANN, 1981) und zur Konservierung bakterieller Zellwände infolge einer Lysozyminhibierung durch Kontaktierung mit Torf- und aus Hydrochinon präparierten Huminsäuren (PFLUG und ZIECHMANN, 1982). All diesen Arbeiten ist gemeinsam, daß eine nähere analytische Charakterisierung der eingesetzten Huminstoffpräparate nicht erfolgt war, so daß die Versuche, die Meßergebnisse zu erklären, meist spekulativen Charakter trugen, sofern überhaupt der Versuch einer Ursachenerklärung unternommen wurde. Die Trennung der Huminstoffgemische in eine Fulvinsäure- und eine

Huminsäurefraktion erfolgt bei einem pH-Wert von 2. Jedoch ist die Löslichkeit einer Substanz bei pH 2 ein physiologisch gänzlich irrelevantes Kriterium, so daß eine Information darüber bei der Untersuchung biologischer Wirkungen von Huminstoffgemischen nahezu bedeutungslos ist. Allerdings ist gerade dies in den meisten Fällen die einzige verfügbare Information über die physiko-chemischen Eigenschaften des Präparates. Da jedoch Kriterien existieren, die wie der Oxidationszustand des Gemisches tatsächlich die Wirkung von Huminstoffen auf biologische Systeme signifikant beeinflussen, fallen dementsprechend die Ergebnisse bei der Untersuchung derartiger Wirkungen im Falle der Vernachlässigung dieser Kriterien teilweise widersprüchlich aus.

Für alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten phenolischen Verbindungen mit Ausnahme von Phenol ergab sich qualitativ dasselbe toxikologische Verhalten im Verlaufe ihrer Autoxidation. Auf die Erhöhung der inhibierenden Wirkung der Autoxidate in den frühen Stadien der Autoxidation folgte ein Entgiftungsprozeß. Die quantitative Ausprägung der einzelnen Teilprozesse hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit und ihres Potentials (maximal erreichte Inhibition, Vollständigkeit des Entgiftungsprozesses) hing von strukturellen Merkmalen der monomeren phenolischen Ausgangsstoffe ab. Dabei läßt sich ein Zusammenhang zwischen der im Abschnitt 4.1.1. dargestellten Autoxidationsgeschwindigkeit einer phenolischen Verbindung und der Geschwindigkeit der Toxizitätserhöhung und Entgiftung ihrer Autoxidate feststellen. Verbindungen mit geringer Autoxidationsgeschwindigkeit benötigen mehr Zeit zur Bildung von Produkten mit starkem inhibitorischen Potential und auch mehr Zeit zu deren Entgiftung. Die für den Entgiftungsprozeß benötigte Zeitspanne liegt ungefähr eine Größenordnung über dem Zeitraum, innerhalb dessen die Autoxidation des Monomers zur Bildung stark inhibierender Verbindungen führt. In der Konsequenz verursachen demnach die in m-Stellung polar substituierten phenolischen Verbindungen im Falle ihrer Autoxidation toxikologisch schwerwiegendere Langzeitwirkungen als die schnell oxidierenden Verbindungen. Bedeutsam ist dies vor allem im Hinblick auf Selbstreinigungsprozesse in phenolischen Deponiewässern, die über lange Zeiträume unter Lufteinfluß gelagert worden sind. Während z.B. aus 4-Methylbrenzkatechin autoxidativ entstandene Strukturen vermutlich relativ schnell entgiftet werden, kann beispielsweise Resorcin zu Verbindungen reagieren, die die Entwicklung leistungsfähiger Mikroorganismenpopulationen in derart kontaminierten Habitaten nachhaltig behindern.

Die autoxidative Entstehung von Strukturen aus ausschließlich in o-Stellung oder p-Stellung hydroxylierten Phenolen über o-Chinon bzw. p-Chinon erzeugt offenbar charakteristische Eigenschaften hinsichtlich der Hemmung des Phenolabbaus unter methanogenen Bedingungen. Da diese Hemmung auch bei hohen Autoxidationszeiten besteht und, wie mittels Molekülgrößenfraktionierung nachgewiesen wurde, durch makromolekulare Komplexe hervorgerufen wird, kommt als Angriffsort der inhibierenden Wirkung in erster Linie die Zellmembran in Frage. Hierbei existieren prinzipielle strukturelle Unterschiede zwischen den phenolangrei-

fenden Eubakterien und den acetatverwertenden methanogenen Bakterien, womit die unterschiedliche Beeinflussung des Acetat- und des Phenolabbaus gedeutet werden kann.

Bei der Autoxidation von im Gemisch vorliegenden phenolischen Verbindungen ist die von den Autoxidaten ausgehende Wirkung in ihrer Gesamtheit nicht mit der Wirkung von Autoxidaten einer der Gemischkomponenten identisch, sondern ergibt sich aus der Geschwindigkeit, mit der die gleichzeitig autoxidierenden Einzelkomponenten zur Bildung von Gemisch-Autoxidaten beitragen. Als wahrscheinlich kann dabei die Ausprägung von Makromolekülen mit strukturellen Inhomogenitäten, die sich aus den unterschiedlichen Autoxidationsgeschwindigkeiten der Einzelkomponenten und den strukturellen Charakteristika ihrer Autoxidate ergeben, angesehen werden, wobei anzunehmen ist, daß die an der Peripherie der Komplexe liegenden Strukturelemente die toxikologischen Eigenschaften der Gemisch-Autoxidate bestimmend beeinflussen.

In den Anfangsstadien eines Autoxidationsprozesses bilden sich chinoide und radikalische Zwischenstufen, die eine kovalente Bindung dieser Strukturen an bakterielle Proteine bewirken und damit eine irreversible Hemmung metabolischer Prozesse hervorrufen. Mit fortschreitender Autoxidation kommt es zum Verbrauch der chinoiden Gruppen und zum Aufbau von Makromolekülen. Damit geht die Bildung weniger reaktionsfreudiger Produkte einher, deren lockere Wechselwirkungen mit Zellbestandteilen zu geringeren inhibierenden Wirkungen führen, die nun in großem Maße reversibel sind. Die Penetration solcher Makromoleküle in die Zelle ist behindert. Daher ist als Wirkungsmechanismus hier eine lockere Bindung der Makromoleküle an membrangebundene Transportproteine oder eine möglicherweise auch damit verbundene Erschwerung der Substrataufnahme in die Zelle denkbar. Eine Ablösung niedermolekularer hochtoxischer Strukturelemente von den Makromolekülen unter den spezifischen physiko-chemischen Bedingungen der Inhibierungsversuche ist unwahrscheinlich, da nach Aufkonzentrierung der hochmolekularen Molekülgrößen-fraktion mittels Ultrafiltration deren nachfolgende Verdünnung in Nährsalzmedium keine Verschiebung der Molekülgrößenverteilung zur Folge hatte. Somit war eine Rücklösung niedermolekularer toxischer Verbindungen aus den makromolekularen Komplexen nicht zu vermuten.

Beim Abbau von Phenol unter methanogenen Bedingungen werden die Initialreaktionen der Abbausequenz (Carboxylierung des Phenols oder Dehydroxylierung des gebildeten Hydroxybenzoatisomers) am empfindlichsten durch phenolische Autoxidationsprodukte beeinflusst. Der Phenolabbau ist demnach nicht nur geschwindigkeitsbestimmend gegenüber dem Benzotabbau, sondern wird auch am stärksten inhibiert. Die Inhibierung des Acetatabbaus fällt geringer aus. In der Konsequenz besteht weder die Wahrscheinlichkeit einer Akkumulation von niederen Fettsäuren in Folge einer Störung der syntrophen mikrobiellen Gemeinschaft durch selektive Hemmung der methanogenen Bakterien noch die Wahrscheinlichkeit einer Benzotakkumulation, da die Geschwindigkeit des Phenolabbaus auch in Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte durch die Geschwindigkeit der Initialreaktionen determiniert

wird. Letzteres hat insofern besondere Bedeutung, da Benzoat ein Schlüsselintermediat beim anaeroben Aromatenabbau darstellt und demzufolge auch bei der Degradation anderer aromatischer Verbindungen entsteht. Eine Akkumulation von Benzoat aus den Abbauprozessen einzelner Verbindungen würde damit das Potential der Mikroorganismengemeinschaft für den Aromatenabbau insgesamt an einer zentralen Stelle limitieren. Unter diesem Gesichtspunkt ist die stärkere Beeinträchtigung sehr substratspezifischer Reaktionen wie der Initialreaktionen des Phenolabbaus durch phenolische Autoxidationsprodukte als positiv zu bewerten.

In biologischen Abwasserreinigungsanlagen, die phenolische Wässer unter anaeroben Bedingungen behandeln, besteht nicht die Gefahr einer Autoxidation von Phenolen, da molekularer Sauerstoff als Reaktionspartner fehlt. Jedoch können bei der Reinigung von phenolischen Deponiewässern, die bereits Autoxidationsprodukte enthalten, empfindliche Störungen der mikrobiellen Abbauprozesse auftreten. Dies kann hinsichtlich des Phenolabbaus auch für hochoxidierte Verbindungen gelten, die bisher im wesentlichen als toxikologisch unproblematisch galten. Eine künstliche Entgiftung solcher Wässer durch vorbehandelnde Belüftung kann demzufolge nicht als generell geeignete Methode anerkannt werden, zumal hierbei persistente Verbindungen aufgebaut werden. Wahrscheinlich gibt es zu einer physiko-chemischen Entfernung inhibierend wirkender Autoxidationsprodukte aus dem Medium im Vorfeld einer biologischen Behandlung des Wassers keine vernünftige Alternative.

Die für die hier untersuchten Autoxidationsprozesse zugrunde gelegte Zeitskala repräsentiert auf Grund des eingestellten pH-Wertes von 12,0 nicht die Geschwindigkeit von unter natürlichen Bedingungen ablaufenden Autoxidationsreaktionen. Der hohe pH-Wert führte zu einer starken Beschleunigung der Prozesse. Die temporären Verhältnisse der einzelnen Teilprozesse zueinander können aber als übertragbar auf natürliche Systeme angesehen werden.

5.1.2. Die Persistenz phenolischer Autoxidationsprodukte

Autoxidationsprodukte phenolischer Verbindungen entstehen nicht nur durch industrielle Produktionsprozesse, sondern auch in der Natur. So spielen sie zum Beispiel eine Rolle bei der Bräunung von Obstsäften, bei der Ausprägung des harten Exoskelettes von Insekten und bei Humifizierungsprozessen im Boden. Für alle Substanzen, die die belebte Natur synthetisiert, hat sie auch Mechanismen zu ihrer Elimination hervorgebracht.

In gut durchlüfteten Bodenzonen sowie in anderen sauerstoffreichen Arealen wird den radikalischen Mechanismen, die durch extrazelluläre Phenoloxidasen katalysiert werden, die Hauptverantwortung für die Humusdegradation zugeschrieben. Diese Enzyme werden von Weißfäulepilzen und einigen Pflanzen gebildet und sind auch maßgeblich am Abbau von Lignin in der Natur beteiligt. Nur durch diese radikalischen Reaktionen, die zunächst außer-

halb der Zelle ablaufen, ist eine Spaltung huminartiger Makromoleküle in großem Umfang möglich.

Da für die Radikalreaktionen der Phenoloxidasen molekularer Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid als Reaktionspartner benötigt wird, stellt sich die Frage nach dem Schicksal von Humus in sauerstofffreien Zonen. Diese Frage ist besonders im Hinblick auf anthropogen entstandene makromolekulare Strukturen von Bedeutung, sofern phenolische leicht autoxidierbare Verbindungen, die in Produktionsprozessen entstehen, sich in anaeroben Arealen wie unterirdischen Gesteinsformationen oder Tagebaurestlöchern wiederfinden. Auf Grund des sauerstoffzehrenden Potentials solcher Verbindungen tragen diese selbst zur Schaffung anaerober Verhältnisse bei. Die Möglichkeiten, solche Substanzen auf mikrobiellem Wege unter anaeroben Bedingungen zu entfernen, sind im Rahmen dieser Arbeit sowohl an Modellautoxidaten als auch an einem langzeitgelagerten huminstoffreichen Braunkohlepyrolyseabwasser (Schwefelvollertsee) näher untersucht worden. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Bedeutung unterschiedlicher beim Abbauprozess zur Verfügung stehender Elektronenakzeptoren gelegt. Auch diese Experimente belegten jedoch, daß der Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte ein langsamer Prozeß ist, über dessen prinzipielle Möglichkeiten und Grenzen zur Zeit keine präzisen Aussagen möglich sind.

Die relative Persistenz phenolischer Autoxidationsprodukte kann möglicherweise durch die räumliche Distanz zwischen den Substraten und ihren potentiellen Abbauenzymen erklärt werden, da Verbindungen mit hoher Molekülgröße kaum oder gar nicht in der Lage sind, in die Zelle zu penetrieren. Die mikrobielle Spaltung von Makromolekülen erfordert von den Mikroorganismen ein Potential zur Ausscheidung von Enzymen, die erstens in der äußeren Umgebung der Zelle stabil sind und zweitens in der Lage sind, Makromoleküle in kleinere Einheiten zu spalten. Ein weiterer Grund für die Persistenz phenolischer Autoxidationsprodukte kann im Charakter der während der Autoxidation geknüpften chemischen Bindungen begründet sein. Nach ZIECHMANN, 1980 handelt es sich hierbei in hohem Maße um C-C- oder C-O-C-Bindungen, die als sehr stabil gelten. Mit fortschreitendem Aufbau der Makromoleküle sollen aber zunehmend auch Carboxylfunktionen eine Rolle spielen, die hydrolytisch spaltbare Bindungen eingehen könnten.

Der Mechanismus, dem die in dieser Arbeit beschriebenen Spaltungs- bzw. Rücklösungsprozesse zugrunde liegen, ist nicht bekannt. Vermutet werden kann aber ein initialer Angriff von makromolekularen Strukturen durch extrazelluläre Enzyme, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß diese Moleküle die Penetrationsbarriere der Zelle überwinden. Die Exkretion von hydrolytisch spaltenden Enzymen ist weitverbreitet und bildet die Grundlage für die Spaltung natürlich vorkommender makromolekularer Verbindungen (Proteine, Polysaccharide). Sie wird z. B. beim Prozeß der anaeroben Stabilisierung von Klärschlamm großtechnisch ausgenutzt. Zwar gilt die Hydrolyse von huminartigen Makromolekülen als nicht sehr effektiv, jedoch ist das hierbei oft angewandte Kriterium die Bildung von Monomeren, die dann in der

Regel chromatographisch bestimmt werden. Voraussetzung für das Entstehen von Monomeren aus einem dreidimensionalen Netzwerk infolge hydrolytischer Spaltung ist aber, daß die monomeren Einheiten ausschließlich über hydrolytisch spaltbare Bindungen mit ihren Nachbareinheiten verbunden sind. Das ist in Anbetracht des hohen Gehaltes an C-C- und C-O-C-Bindungen in solchen Komplexen jedoch von vornherein unwahrscheinlich. Ein besseres Kriterium für die hydrolytische Spaltbarkeit von huminartigen Makromolekülen sollte daher eine Trennung im oligomeren Molekülgrößenbereich sein. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes ist das Potential zur hydrolytischen Spaltung solcher Verbindungen möglicherweise wesentlich größer als gemeinhin angenommen. Eine enzymatische Hydrolyse makromolekularer Autoxidationsprodukte könnte Moleküle in einer Größe liefern, die leichter in die Zelle eindringen können und so intrazellulär unter Energiegewinn für den Organismus mineralisiert werden könnten.

Eine Abnahme der Farbintensität der Autoxidate war in keinem der Fälle zu beobachten, nachdem sich im System pseudostationäre Zustände eingestellt hatten. Das stützt die These, daß durch die vermuteten extrazellulären Initialreaktionen nur kleinere Bruchstücke mit Molekülgrößen bis maximal in den oligomeren Bereich abgespalten worden sind, ohne daß dies die Eigenschaften des Makromoleküls wesentlich beeinflußt hätte. Ähnliche Befunde sind aus der Huminstoffliteratur bekannt. Neben sehr allgemeinen Kriterien wie erhöhtes Biomassewachstum und beschleunigte Sauerstoffzehrung in Gegenwart bestimmter Huminstoffpräparate (RYHÄNEN, 1968) wurden gelegentlich Transformationen an Huminstoffen beobachtet wie die Modifizierung des Carboxylgruppengehaltes in Gegenwart heterotropher Bakterien (KONTCHOU und BLONDEAU, 1990) oder das im Ergebnis solcher Transformationen beobachtete Auftauchen von Brenzkatechin im Fermentationsmedium bei Inoculation mit *Pseudomonas*-Species (SWIFT et al., 1987). Auch war die Spaltung phenolischer Etherbindungen ähnlich der des Lignins durch *Arthrobacter*-Species vermutet worden (DE HAAN, 1972). Eine vollständige Mineralisierung der Huminstoffe durch Bakterienkulturen konnte jedoch in keinem der Fälle beobachtet werden.

Auch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten vielmehr auf Modifikation der autoxidativ entstandenen Makromoleküle als auf vollständigen Abbau hin. Jedoch ist besonders auf die Rolle unterschiedlicher Elektronenakzeptoren im System für die Transformationsleistung hinzuweisen. Während molekularer Sauerstoff unter bestimmten Bedingungen wie im Falle des Resorcin-Autoxidats zu einem unerwünschten Aufbau von Makromolekülen durch Autoxidation führen kann, zeigten nitratreduzierende Kulturen deutlich höhere Transformationsleistungen als methanogene und sulfatreduzierende Kulturen. Wahrscheinlich steigt mit dem Energiegewinn, den die Zelle aus der Veratmung einer organischen Verbindung gewinnen kann, auch das Potential, Enzyme auszusecheiden, die den initialen Angriff makromolekularer phenolischer Autoxidationsprodukte bewerkstelligen können. Versuche, in den Kulturmedien der verschiedenen Anreicherungskulturen extrazelluläre Proteinkonzentrationen zu

bestimmen und diese zum jeweiligen respirativen Prozeß in Beziehung zu setzen, scheiterten. Eine solche Bestimmung extrazellulärer Proteinkonzentrationen erfordert zunächst die Trennung der Proteine von den makromolekularen Autoxidationsprodukten. Die Entwicklung einer dafür geeigneten Methode konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen.

Im Hinblick auf eine mögliche Nitratinleitung in phenolische Deponiewässer mit dem Ziel der Intensivierung von Selbstreinigungsprozessen muß eingeschätzt werden, daß dadurch zwar die Degradation monomerer phenolischer Verbindungen intensiviert werden kann, daß jedoch die Problematik der phenolischen Autoxidationsprodukte mit der Methode der Nitratinjektion nicht umfassend zu lösen ist. Trotz der unter nitratreduzierenden Bedingungen gegenüber sulfatreduzierenden und methanogenen Prozessen erhöhten mikrobiellen Transformationsleistung muß den autoxidativ entstandenen Strukturen eine hohe Stabilität gegenüber Abbauprozessen im anaeroben Milieu zugeschrieben werden.

5.1.3. Die Problematik der analytischen Erfassung von Transformationsreaktionen an phenolischen Autoxidationsprodukten

Generell ermöglichen die Radikalreaktionen, durch die Autoxidationsprozesse eingeleitet werden, eine Vielzahl von Folgereaktionen. Dementsprechend vielfältig sind die Substanzgemische, die im Verlaufe eines Autoxidationsprozesses entstehen. Stets handelt es sich um Gemische zahlreicher unterschiedlicher Molekülstrukturen. Dies findet seinen Niederschlag in den bei der Huminstoffanalytik angewandten Methoden. Diese Methoden erfassen stets Summenparameter, die das Huminstoffgemisch oder einzelne Fraktionen daraus grob charakterisieren. Das klassische Prinzip der Fraktionierung von Huminstoffgemischen besteht in der Trennung in eine Fulvinsäure-, eine Huminsäure- und eine Huminfraktion. Diese Methode beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der einzelnen Fraktionen bei verschiedenen pH-Werten. Andere Summenparameter, die gelegentlich zur Charakterisierung solcher Gemische herangezogen werden, sind der Gehalt an organisch gelöstem Kohlenstoff (DOC), die Elementarzusammensetzung, der Gehalt an verschiedenen funktionellen Gruppen, die Molekülgrößenverteilung oder die summarische Oberflächenladung einzelner Fraktionen.

Sollen chemische oder mikrobielle Transformationsreaktionen an Huminstoffen nachgewiesen werden, so erweist sich das mit diesen Methoden als äußerst problematisch. Zwar lassen sich mit einer gewissen statistischen Wahrscheinlichkeit Tendenzen erkennen, jedoch ist eine sichere Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen kaum möglich, da stets summarische Effekte und damit Ergebnisse sich überlagernder und möglicherweise gegenseitig kompensierender Erscheinungen gemessen werden. Wird beispielsweise eine Abnahme des Gehaltes an Hydroxylgruppen bei gleichzeitiger Zunahme des Gehaltes an Carboxylgruppen diagnostiziert, so deutet das zwar mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf eine Netto-

Umwandlung von Hydroxyl- in Carboxylgruppen hin, jedoch sind Aussagen zu den Prozessen auf der molekularen Ebene und eine Eingrenzung der genauen Reaktionsorte nicht möglich. Selbst die Anwendung von ^{14}C - oder ^{18}O -Methoden stößt hier an Grenzen, solange nicht sicher ist, aus welcher funktionellen Gruppe einzelne Isotope stammen und in welche sie überführt werden. Gerade bei mikrobiellen Umsetzungen sind zudem die Geschwindigkeiten der Prozesse oft so gering, daß eine statistisch sichere Aussage über summarische Veränderungen bestimmter Merkmale häufig schwer zu erhalten ist.

Die sichere Aufklärung molekularer Mechanismen erfordert in jedem Falle die Fraktionierung von Huminstoffgemischen bis hin zur strukturellen Homogenität. Dies setzt jedoch andererseits voraus, daß die strukturell einheitlichen Komponenten unter experimentellen Bedingungen ausreichend stabil sind. Die Präparation strukturell homogener Huminstofffraktionen ist ein bislang ungelöstes Problem. Keine der bisher etablierten Fraktionierungstechniken weist eine ausreichende Selektivität hinsichtlich einzelner Strukturmerkmale auf, da die Trennung stets nach sehr allgemeinen und leicht zugänglichen Kriterien (Molekülgröße, Oberflächenladung, Säurefällbarkeit, usw.) erfolgt. Auch durch Kopplungen dieser Methoden ist bisher nicht der entscheidende Durchbruch erzielt worden. Jede präparative und analytische Methode ermöglicht generell nur Zugang zu einer bestimmten, mit ihr erfaßbaren Huminstofffraktion. Selbst wenn die Gewinnung von strukturell einheitlichen Komponenten aus Huminstoffgemischen gelänge, ergäbe sich die Frage, ob diese Verbindungen überhaupt repräsentativ für das Gesamtgemisch sind oder im Prinzip "Sonderlinge" darstellen. Zwar wurden die technischen Ausrüstungen zur Präparation von Huminstofffraktionen in den letzten Jahren und Jahrzehnten immer ausgereifter und kostspieliger, jedoch führte dies bisher nicht zu einem qualitativen Durchbruch in der Methodenentwicklung.

5.2. Praktische Konsequenzen der Temperaturabhängigkeit von Inhibierungsprozessen

5.2.1. Bedeutung der positiven Temperatur-Inhibierungs-Korrelation bei der Substrathemmung des Schadstoffabbaus für Selbstreinigungsprozesse in kontaminierten Habitaten

Die Formulierung allgemeingültiger Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen erscheint auf Grund der Vielfalt der möglichen Einflußfaktoren schwierig. Für die Hemmung des Phenolabbaus durch Nickel ergab sich tendenziell dasselbe Resultat, wie es bereits CAIRNS et al., 1975 für die Mehrzahl der beobachteten Fälle dargestellt hatten. Die Ursache für die mit steigender Temperatur steigende Hemmwirkung solcher Inhibitoren liegt wahrscheinlich in sehr allgemeingültigen Prinzipien der Aufnahme des Inhibitors in die Zelle und seines Transports begründet und ist weniger in einem für den Inhibitor spezifischen Wirkmechanismus zu suchen. Vermutet werden kann eine begünstigte Aufnahme des Inhibitors bei erhöhter Temperatur infolge der verbesserten Permeabilität der Zellmembran. Für die Substrathemmung beim aeroben und anaeroben Abbau von Phenol wurde eine steigende inhibierende Wirkung mit sinkender Temperatur ermittelt. Demzufolge werden biologische Abbauprozesse in Habitaten, in denen niedrige Temperaturen vorherrschen und die durch starke Belastungen mit toxischen, aber biologisch abbaubaren Verbindungen gekennzeichnet sind, in mehrfacher Hinsicht in ihrer Geschwindigkeit limitiert. Zum einen resultieren niedrige Geschwindigkeiten bereits aus der niedrigen Umgebungstemperatur, was nach der ARRHENIUS-Beziehung zu erwarten ist. Zum anderen inhibiert Phenol seinen eigenen biologischen Abbau und darüber hinaus auch die Degradation weniger toxischer Verbindungen. In den Experimenten zu den Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen konnte für den Abbau von Phenol unter aeroben und anaeroben Bedingungen zusätzlich eine synergistische Verstärkung der inhibierenden Wirkung des Substrates bei Vorliegen niedriger Umgebungstemperaturen nachgewiesen werden. Nach dem EDWARDS-Modell kommt es bei sehr hohen Substratkonzentrationen zu einer asymptotischen Annäherung der Reaktionsgeschwindigkeit an den Nullwert. Im praktischen Fall läßt sich jedoch bei sehr hohen Konzentrationen gar kein Abbauprozess mehr diagnostizieren, d.h. es tritt eine vollständige Hemmung des Substratabbaus ein. Dies bedeutet, daß Selbstreinigungsprozesse, die im Normalfall zumindest mit geringer Geschwindigkeit ablaufen, vollständig unterbunden sind. Unter diesem Gesichtspunkt wird auch erklärbar, daß in Sediment aus der Uferzone des Schwelvollertsees kein Abbau von 100 mg/l Phenol bei 6 °C erfolgte, bei derselben Temperatur mit 20 mg/l Phenol jedoch die Anreicherung einer methanogenen Population möglich war, während bei 35 °C ein

Wachstum der Organismen bei beiden Konzentrationen beobachtet werden konnte. Diese Sachverhalte sind im Abschnitt 4.3.1. näher beschrieben worden.

Die sich aus der positiven Temperatur-Inhibierungs-Korrelation ergebende erhöhte Temperatursensitivität bei höheren Substratkonzentrationen tritt ungünstigerweise gerade in solchen Arealen zutage, die zum einen häufig durch das Vorherrschen niedriger Temperaturen charakterisiert sind (Grundwässer, Sedimente, Böden), in denen sich Schadstoffe akkumulieren und in denen von vornherein besonders hohe Ansprüche an das Selbstreinigungspotential bestehen. Andererseits ist gerade die Akkumulation der Schadstoffe in diesen Zonen jedoch auch eine Folge des aufgrund der beschriebenen Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen reduzierten Selbstreinigungspotentials. Eine hohe Temperaturempfindlichkeit eines Prozesses bedeutet eine starke Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit bei relativ geringfügigen Temperaturänderungen. Häufig führen die saisonalen Temperaturdifferenzen nicht zu sehr bedeutenden Aktivitätsschwankungen der autochthonen Mikroorganismen in Sedimenten (SINKE et al., 1992), was auf die Adaptionsmechanismen an die Umgebungstemperatur, zu denen auch die Temperaturkompensation durch Affinitätsmodulation zählt, zurückgeführt werden kann. In kontaminierten Sedimenten oder Böden sollten jedoch die jahreszeitlichen Temperaturschwankungen infolge der erhöhten Temperatursensitivität einen drastischen Einfluß auf die Umsatzraten aufweisen. Möglicherweise sind damit auch sehr unterschiedliche Q_{10} -Werte erklärbar, die zeitgleich bei verschiedenen Mikroorganismen in einem Habitat festgestellt wurden, wenn eine homogene Schadstoffverteilung im System nicht anzunehmen war. KELLY und CHYNOWETH, 1981 hatten für die Methanogenese in Sedimentproben aus verschiedener Tiefe Q_{10} -Werte zwischen 0,83 und 5,7 ermittelt. Auch zahlreiche andere Arbeiten haben bereits frühzeitig auf die Bedeutung des Umweltfaktors Temperatur für den Ablauf von biochemischen Stoffumsetzungen in Sedimenten und Böden in qualitativer und quantitativer Hinsicht hingewiesen (z.B. ZEIKUS und WINFREY, 1976; CONRAD et al., 1987). KELLY und CHYNOWETH, 1981 fanden weiterhin einen proportionalen Zusammenhang zwischen dem Eintrag organischen Materials in ein Sediment und seiner methanogenen Aktivität. Wie die Arbeiten zu den Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen aber zeigten, wird diese Tendenz gerade ins Gegenteil verkehrt, wenn die Substratkonzentrationen über ein bestimmtes Level hinaus erhöht werden.

5.2.2. Die Gültigkeit der ARRHENIUS-Beziehung für biochemische Reaktionen

Ausgehend von der thermodynamischen Betrachtung chemischer Reaktionen sollten die Aktivierungsenergie und der Q_{10} -Wert für eine enzymkatalysierte Reaktion konstant sein. Zahlreiche Arbeiten haben jedoch über die Veränderlichkeit dieser Größen in Abhängigkeit verschiedener Einflußgrößen berichtet (z.B. HUG und HUNTER, 1974a, b; WESTERMANN

et al., 1989; PAVLOSTATHIS und ZHUANG, 1991). In jedem Falle läßt sich jedoch die Aktivierungsenergie für eine biochemische Reaktion nur dann aus dem ARRHENIUS-Plot richtig bestimmen, wenn ein linearer Verlauf der logarithmierten ARRHENIUS-Beziehung gegeben ist. Andernfalls ist der zugrundeliegende mathematische Zusammenhang nicht mehr mit der ARRHENIUS-Beziehung identisch und eine Bestimmung der Aktivierungsenergie der Reaktion über diesen Weg nicht möglich. Fraglich ist hierbei, ob die in der Literatur in der Regel vorausgesetzte Erfüllung der ARRHENIUS-Beziehung für biochemische Reaktionen tatsächlich immer gegeben ist. Wie die Ergebnisse der im Abschnitt 4.4. vorgestellten Untersuchungen zeigen, kommt es beim Vorliegen inhibierender Effekte zu Abweichungen vom linearen Verlauf des ARRHENIUS-Plots. Dies trifft nicht nur bei einer Inhibierung durch hohe Substratkonzentrationen zu, sondern ebenso bei inhibitorischen Effekten, die durch andere Verbindungen hervorgerufen werden. Die Ursache dafür ist in der unterschiedlichen Beeinflussung der Intensität der Inhibierung durch unterschiedliche Temperaturen zu sehen, wie bereits dargelegt wurde. Ebensolche Erscheinungen sind vorstellbar, wenn sich infolge unterschiedlicher Temperaturen Löslichkeitsgrenzen bestimmter Verbindungen verschieben oder über mit der Temperatur variable pH-Werte chemische Gleichgewichte im System verschoben werden. Solche Effekte können zur Erhöhung oder Verminderung der Verfügbarkeit von Substraten oder anderen Nährstoffen und damit zu einer temperaturabhängigen Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit über die nach der ARRHENIUS-Beziehung zu erwartenden Geschwindigkeitsänderung hinaus führen. Hat dies Abweichungen von der ARRHENIUS-Beziehung zur Folge, so ist ein Rückschluß auf die Aktivierungsenergie der biochemischen Reaktion aus dem Anstieg des ARRHENIUS-Plots nicht möglich. Bei der Vielfalt der möglichen Faktoren, die Abweichungen biochemischer Reaktionen von der ARRHENIUS-Beziehung bedingen können, und ihrer vermutlich weiten Verbreitung (zumindest im Falle der Temperaturkompensation) stellt sich die Frage, ob die Erfüllung der ARRHENIUS-Beziehung bei der thermodynamischen Betrachtung biochemischer Reaktionen überhaupt erwartet werden kann. Zumindest erscheint es nicht gerechtfertigt, sie a priori vorauszusetzen.

5.2.3. Konsequenzen der Temperatur-Inhibierungs-Zusammenhänge für die Bewertung mikrobieller Aktivitätsdaten

Die im Rahmen der Untersuchungen zu den Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen gewonnenen Erkenntnisse relativieren Forschungsergebnisse, die die Bestimmung mikrobieller Aktivitäten in natürlichen Systemen zum Inhalt haben, sofern die Randbedingungen zu deren Bestimmung nicht mit den natürlichen Bedingungen identisch sind. Quantitative Aussagen können hierbei nur dann getroffen werden, wenn sowohl die stoffliche Zusammensetzung der Umweltprobe beim Laborversuch erhalten wird, als auch die Versuchstemperatur mit der *in*

situ Temperatur übereinstimmt. Eine Inkubation der Umweltprobe bei Zimmer- oder noch höheren Temperaturen führt dabei nicht nur im Sinne der ARRHENIUS-Beziehung zu falschen quantitativen Ergebnissen - dies wäre mit einer Schätzung des Q_{10} -Wertes näherungsweise auszugleichen - sondern kann zu qualitativ falschen Interpretationen führen. Wird ein Substrat bei Zimmertemperatur degradiert, so kann für dasselbe Substrat im natürlichen System infolge der niedrigeren Temperatur der Degradationsprozeß auf Grund der höheren inhibierenden Wirkung gehemmt oder gar vollständig unterbunden sein. Einen anschaulichen Beleg für die Relevanz solcher Effekte gibt die Degradation von 100 mg/l Phenol durch eine Sedimentprobe aus dem Schwelvollertsee bei einer Inkubationstemperatur von 35 °C, während dieselbe Konzentration bei der im See herrschenden Temperatur von 6 °C nicht angegriffen wurde. Diese Sachverhalte wurden im Abschnitt 4.3.1. näher dargestellt. Eine Konzentration von 100 mg/l Phenol gilt nach Literaturwerten als nicht problematisch hinsichtlich einer möglichen vollständigen Abbaulimitierung.

Ebenso werden durch die Untersuchungen zu den Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen Ergebnisse von Toxizitätsuntersuchungen relativiert, sofern diese auf Ökosysteme mit niedrigen Temperaturen übertragen werden sollen. Den standardisierten und den darüber hinaus häufig angewandten Toxizitätstests wird in der Regel eine Temperatur zugrunde gelegt, die über den in natürlichen Systemen herrschenden Temperaturen liegt. Wie am Beispiel von Nickel gezeigt worden war, läßt eine niedrigere *in situ* Temperatur eine höhere Toleranz der Testorganismen gegenüber Inhibitoren erwarten, die nicht über enzymatisch aktive Komplexe mit der für den jeweiligen Toxizitätstest genutzten metabolischen Indikatoraktivität verknüpft sind. Demgegenüber kann die Degradation toxischer Verbindungen selbst, wie die Untersuchungen zur Substrathemmung des Phenolabbaus verdeutlichten, bei *in situ* Temperaturen stärker gehemmt sein als bei Raumtemperatur.

5.2.4. Die Doppelrolle des Einflußfaktors Temperatur in biologischen Abwasserreinigungsanlagen

Sofern die Geschwindigkeit mikrobieller Abbauprozesse in biologischen Abwasserreinigungsanlagen durch inhibierende Effekte toxischer Verbindungen limitiert ist, ließe sich möglicherweise mit einer leichten Erhöhung der Betriebstemperatur nicht nur im Sinne der ARRHENIUS-Beziehung im Rahmen der Temperaturtoleranz der Mikroorganismen eine Geschwindigkeitssteigerung erzielen, sondern auch durch die geringere inhibierende Wirkung des Substrates bei der höheren Temperatur. Unter diesem Aspekt kommt dem Einflußfaktor Temperatur auch für technische Systeme eine doppelte Bedeutung zu.

Die mathematischen Modelle zur Beschreibung des Abbaus inhibierender Substrate (z.B. HALDANE, 1930; EDWARDS, 1970) verdeutlichen, daß bei Abbauraten unterhalb der ma-

ximalen Abbaurate jede Reaktionsgeschwindigkeit bei genau zwei Substratkonzentrationen auftritt. Dies eröffnet die Möglichkeit, daß in Chemostaten zwei stationäre Zustände hinsichtlich der Durchflußrate existieren, solange die Durchflußrate klein genug ist, um das Auswaschen der Kultur zu verhindern (ANDREWS, 1968). Während im Bereich der Substratkonzentration, in welchem dv/dS positiv ist, der Prozeß stabil verläuft, liegen bei Substratkonzentrationen, bei welchen dv/dS negativ ist, instabile Verhältnisse vor. Im letzteren Fall führt eine leichte Konzentrationserhöhung (Stoßbelastung) zu einer Reduzierung der Abbaurate, wodurch immer mehr Substrat akkumuliert wird und der inhibierende Effekt verstärkt wird. Letztlich kommt es zum "washout". Im einzelnen sind diese Sachverhalte von SUIDAN et al., 1988 erläutert worden.

Wie im Abschnitt 4.4.2. anhand experimenteller Ergebnisse beim Abbau von Phenol gezeigt werden konnte, verschiebt sich das Maximum der EDWARDS-Kurven bei Erhöhung der Inkubationstemperatur nach rechts. Im Hinblick auf eine kontinuierliche Betriebsweise eines Reaktors bedeutet dies, daß durch eine Temperatursteigerung ein Prozeß, der bei einer bestimmten Substratkonzentration im instabilen Arbeitsbereich liegt, in den stabilen Bereich überführt werden kann, bzw. daß eine über die nach der ARRHENIUS-Beziehung zu erwartende Geschwindigkeitserhöhung hinausgehende Steigerung der Abbaurate erzielt werden kann. Letztlich wären auf Grund dieses Effektes bedeutend höhere Durchflußraten im System möglich.

Technologisch sinnvoll ist eine solche Variante besonders bei Abwasserströmen, die aus dem Produktionsprozeß bereits mit einer erhöhten Temperatur anfallen. Solche Wässer könnten dann ohne zusätzliche energetische Aufwendungen im mesophilen Temperaturbereich (bei ca. 30°C) behandelt werden. Zum Beispiel weisen bei der Kohlepyrolyse entstehende phenolische Abwässer unmittelbar nach dem Entstehungsprozeß häufig Temperaturen von über 80°C auf und müssen zur biologischen Behandlung abgekühlt werden (KUSCHK, 1991). Zudem weisen Kohlepyrolyseabwässer auf Grund ihrer hohen Phenolkonzentration oft ein hohes inhibitorisches Potential auf, so daß diese Prozesse technisch gewöhnlich als Kopplung eines adsorptiven und eines biologischen Prozesses realisiert werden, in dem Aktivkohle die Konzentration phenolischer Komponenten reduziert und gleichzeitig als Immobilisationsfläche für die Mikroorganismen fungiert (FOX et al., 1988, 1990; NAKHLA et al., 1990; NAKHLA und SUIDAN, 1992; FOX und SUIDAN, 1993). Gerade beim Abbau von Phenol führte jedoch eine erhöhte Prozeßtemperatur im getesteten Bereich zu einer verminderten inhibierenden Wirkung, wodurch sich die Leistungsfähigkeit des biologischen Teilprozesses bedeutend erhöhen ließe.

5.2.5. Aspekte bei der mathematischen Beschreibung von Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen

Naheliegender ist der Versuch, die Abhängigkeit einer Inhibierung von der Temperatur mit Hilfe eines mathematischen Modells zu beschreiben. Ein solches Modell könnte eine Extrapolation über das Temperaturverhalten einer Mikroorganismenpopulation in Gegenwart von Inhibitoren ermöglichen. Als Eingangsgrößen für ein solches Modell wären jedoch zum einen die Parameter der HALDANE-Gleichung erforderlich und zum anderen ein mathematischer Zusammenhang, der die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit beschreibt. Auf Grund der mit der Inhibitorkonzentration veränderlichen Temperaturabhängigkeit gestaltet sich jedoch letzteres als äußerst problematisch. Wie bereits dargestellt, kann die ARRHENIUS-Beziehung diese Aufgabe nicht erfüllen, da hier ein linearer Verlauf des ARRHENIUS-Plots vorausgesetzt wird. Alle im Abschnitt 4.4. dargestellten Temperaturabhängigkeiten einer Inhibierung wurden stets nur als tendenzielle Aussagen formuliert, da auf Grund der teilweise geringen statistischen Sicherheit einzelner Werte keine Angaben zu mathematischen Zusammenhängen möglich waren. Es muß angenommen werden, daß die Abhängigkeiten der Inhibierungsparameter von der Temperatur organismenspezifisch und substrat- bzw. inhibitorspezifisch sind. Inwiefern sich aus einer Abhängigkeit $K_S(T)$ auf die Abhängigkeit $K_I(T)$ schließen läßt, ist anhand der wenigen zur Verfügung stehenden Daten schwer zu beurteilen. Beim aeroben Phenolabbau führte die Temperaturerhöhung von 12 °C auf 31 °C zu einer Erhöhung von K_S um das 3,3-fache und zu einer Erhöhung von K_I um das 2,2-fache. Eine etwas stärkere Modulation des K_S -Wertes wurde beim anaeroben Phenolabbau beobachtet. Hier stieg der K_S -Wert bei Temperaturerhöhung von 15 °C auf 35 °C um das 4,3-fache. Dementsprechend stärker war auch der Anstieg des K_I -Wertes, welcher sich bei dieser Temperaturdifferenz um das 3,3-fache erhöhte. Vergleicht man die beiden sich ergebenden Quotienten aus K_S -Anstieg und K_I -Anstieg miteinander, so ergibt sich beim anaeroben Phenolabbau mit einem Wert von 1,5 ein etwas höherer Quotient als beim aeroben Phenolabbau (1,3). Wenngleich diese Resultate das Bild vermitteln, daß die Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen wesentlich durch das Potential zur Modulation des K_S -Wertes bestimmt werden, ist doch die Formulierung eines mathematischen Zusammenhanges mit dem zur Verfügung stehenden Datenmaterial nicht möglich. Dieses Potential müßte in jedem konkreten Fall als Eingangsgröße in ein mathematisches Modell zur Beschreibung des Temperatur-Inhibierungs-Verhaltens eines Prozesses eingehen, was jedoch dessen experimentelle Bestimmung voraussetzt. Unter diesem Gesichtspunkt liefert eine Modellrechnung zur Ermittlung eines Temperatur-Inhibierungs-Zusammenhanges gegenüber dem Experiment kaum Vorteile, da auf die aufwendige experimentelle Bestimmung kinetischer Daten bei verschiedenen Temperaturen in keinem Falle verzichtet werden kann.

5.3. Konsequenzen und Ausblick

Bei mikrobiellen Abbauprozessen in phenolischen Deponiewässern kommen als geschwindigkeitslimitierende Faktoren mehrere Einflüsse zum Tragen. Zunächst sind die Konzentrationen der phenolischen Verbindungen von Bedeutung, die ihren eigenen Abbau im Sinne einer Substrathemmung inhibieren, sofern ihre Konzentration hoch genug ist. Außerdem werden durch die phenolischen Inhaltsstoffe auch Abbauprozesse gehemmt, die die Entfernung weniger persistenter und weniger toxischer Verbindungen zum Ziel haben. Zum Beispiel kommt es zu einer Beeinflussung des Abbaus niederer Fettsäuren. Jedoch deuten die vorliegenden Ergebnisse und auch bereits aus der Literatur verfügbare Angaben darauf hin, daß zumindest unter anaeroben Bedingungen diese Prozesse in geringerem Maße durch phenolische Verbindungen inhibiert werden als der Abbau der Phenole selbst. Das bedeutet in der Konsequenz, daß leichter abbaubare Verbindungen gegenüber den phenolischen Substanzen schneller aus der Lösung entfernt werden. Dies ergibt sich außerdem auch aus der Tatsache, daß die Inhibierung durch phenolische Autoxidationsprodukte in der Regel den Abbau von Phenol in stärkerem Maße betrifft als den Abbau von Acetat.

Ein zusätzlicher geschwindigkeitslimitierender Effekt ergibt sich aus der synergistischen Verstärkung der Substrathemmung im Falle des Vorherrschens niedriger Temperaturen. Dieser Sachverhalt war im Rahmen dieser Arbeit beispielhaft für den anaeroben und den aeroben Abbau von Phenol gezeigt worden, wobei die Möglichkeit besteht, daß er auch beim Abbau anderer Substrate zutreffend ist und auch nicht hinsichtlich der verwendeten mikrobiellen Kulturen spezifisch ist. Zumindest gilt Phenol als Verbindung mit beträchtlicher Umweltrelevanz, was die praktische Bedeutung des Effektes unterstreicht. Während der Einfluß niedriger Temperaturen weniger in technischen Abwasserreinigungsanlagen zum Tragen kommt, ist er in natürlichen Habitaten von um so beachtlicherem Gewicht. Niedrige Temperaturen limitieren dort Selbstreinigungsprozesse auf Grund der positiven Temperatur-Inhibierungs-Korrelation über das nach der *ARRHENIUS*-Beziehung zu erwartende Maß hinaus. Wie gezeigt wurde, führt dies eventuell durch Kombination mit anderen inhibierenden Effekten im Beispiel des Schwelvollertsees zu einer vollständigen Unterbindung des Abbaus von Phenol in den tieferen Wasser- und Sedimentzonen des Sees.

Hinzu kommt eine beträchtliche inhibierende Wirkung durch das Vorhandensein phenolischer Autoxidationsprodukte. Solche Autoxidationsprodukte werden vor allem bei der Lagerung der Abwässer unter dem Einfluß von Luft gebildet und sind deshalb weniger bei frisch anfallenden phenolischen Abwässern relevant. Sie spielen in erster Linie bei der Altlastenproblematik eine wichtige Rolle. Nach Anwendung verschiedener physiko-chemischer Vorbehandlungsmethoden, die die Entfernung der hochmolekularen Verbindungen aus der Lösung bewirkten, sank die inhibierende Wirkung des Wassers und erhöhten sich die Erfolgchancen einer biologischen Behandlung des Wassers im technischen Maßstab. Gleichzeitig werden

durch solche Maßnahmen Voraussetzungen für die Entwicklung eines natürlichen Selbstreinigungspotentials geschaffen. Durch verschiedene Experimente mit Schwelvollertwasser sowie mit synthetischen Modellautoxidaten erhärtete sich der Eindruck einer weitgehenden Persistenz der höhermolekularen Verbindungen. Die Unterschiede in der Abbauleistung verschiedener Anreicherungskulturen bei Zugabe unterschiedlicher Elektronenakzeptoren für die Atmungskette der Mikroorganismen können nicht als praktisch relevant im Sinne einer biologischen Entfernung dieser Verbindungen gewertet werden. Zu physiko-chemischen Maßnahmen der Entfernung phenolischer Autoxidationsprodukte existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine echte Alternative. Der gelegentlich beschriebene Einsatz von Weißfäulepilzen zur Entfärbung huminstoffreicher Wässer ist vermutlich kein Ersatz im großen Maßstab, denn es werden zum einen kohlehydratische Cosubstrate für das Pilzwachstum und zum anderen molekularer Sauerstoff als Reaktionspartner und als Endakzeptor in der Atmungskette benötigt. Hinsichtlich der Gegenwart von Sauerstoff in autoxidativ entstandenen Gemischen konnte jedoch gezeigt werden, daß dadurch weitergehende Autoxidationsprozesse gefördert werden können. Andererseits verlangt die sauerstoffzehrende Wirkung solcher Gemische im Falle einer technischen Realisierung gerade höhere Sauerstoffeintragsraten, um den abiotischen Sauerstoffverbrauch zu kompensieren.

Die phenolischen Autoxidationsprodukte können infolge ihrer weitgehenden Persistenz unter dem Aspekt der Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen als Inhibitoren betrachtet werden, die in erster Linie keine Substrathemmung verursachen, sondern den Abbau anderer Verbindungen beeinträchtigen. Unter der Annahme, daß in diesem Falle dieselbe Temperatur-Inhibierungstendenz zutrifft, wie sie für Nickel gefunden wurde und zuvor für zahlreiche andere Inhibitoren dieser Art gezeigt worden war (CAIRNS et al., 1975), wäre die Konsequenz eine reduzierte inhibierende Wirkung der phenolischen Autoxidationsprodukte bei *in situ* Temperaturen gegenüber der in den Laborversuchen ermittelten Hemmung. Demnach könnten diese Verbindungen im Schwelvollertsee Abbauprozesse in geringerem Umfang hemmen als dies unter Laborbedingungen ermittelt worden war. Infolge der beobachteten Temperatur-Inhibierungstendenzen verschiebt sich demnach die Verantwortlichkeit für die Inhibierung bei Temperaturänderung, die bei der Überführung von Probenmaterial aus dem Schwelvollertsee in das Labor oder in technische Abwasserreinigungsanlagen vonstatten geht. Während bei niedrigen Temperaturen unter *in situ* Bedingungen die Substrathemmung der phenolischen Verbindungen selbst hauptverantwortlich für geringe Geschwindigkeiten beim Abbau phenolischer Wasserinhaltsstoffe ist, wird bei Temperaturerhöhung die Hemmung durch die phenolischen Autoxidationsprodukte gegenüber der Substrathemmung immer bestimmender. Dies unterstreicht die Bedeutung von physiko-chemischen Vorbehandlungsmaßnahmen, deren Ziel in der Entfernung der hochmolekularen Verbindungen besteht, im Falle einer *ex situ* Sanierung der Schwelwasserdeponie. Die in Lösung verbleibenden niedermolekularen phenolischen Verbindungen würden bei den relativ hohen Temperaturen einer externen biologischen

Behandlungsstufe nur noch geringe inhibierende Einflüsse ausüben, wie auch mit Hilfe experimenteller Ergebnisse festgestellt werden konnte.

Andererseits stellt sich jedoch bei einer Konzentration auf *in situ* Maßnahmen bei der Sanierung des Schwelvollertsees die Frage, ob die Entfernung der hochmolekularen Verbindungen z.B. durch einen Flockungs-/Fällungsprozeß die inhibierende Wirkung des Wassers in der Tiefe des Sees bei den dort herrschenden niedrigen Temperaturen tatsächlich signifikant vermindern kann, da hier der bestimmende inhibitorische Einfluß möglicherweise aus der Substrathemmung der niedermolekularen phenolischen Verbindungen resultiert. Die Konzentration dieser Verbindungen wird durch einen Flockungs-/Fällungsprozeß nahezu nicht beeinflusst. Diese Frage sollte entscheidenden Einfluß auf die Entwicklung leistungsfähiger Mikroorganismenbiozöten nach der Entfernung der hochmolekularen phenolischen Autoxidationsprodukte im Schwelvollertsee ausüben und damit perspektivisch für die Ausprägung eines entsprechenden Selbstreinigungspotentials von Bedeutung sein.

An Hand des Beispiels Schwelvollertsee wird offensichtlich, wie weitreichend die Konsequenzen sind, die sich aus dem inhibitorischen Potential phenolischer Autoxidationsprodukte im Zusammenhang mit den ermittelten Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen ergeben.

6. Zusammenfassung

Bei der Betrachtung geschwindigkeitslimitierender Einflußgrößen beim mikrobiellen Abbau von Schadstoffen in phenolischen Deponiewässern sind vor allem zwei Einflüsse von besonderer Bedeutung: erstens die Konzentration inhibierender Verbindungen und zweitens die Temperatur. Letzteres ist dabei besonders im Rahmen der Altlastenproblematik hinsichtlich des Selbstreinigungspotentials kontaminierter Habitate von Relevanz.

Dementsprechend befaßt sich die vorliegende Arbeit schwerpunktmäßig mit der Untersuchung der Wirkungen und des Verhaltens phenolischer Autoxidationsprodukte in biologischen Systemen, wobei das Hauptaugenmerk auf mikrobiell anaerobe Prozesse gelegt wurde, sowie mit der näheren Untersuchung von Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen beim mikrobiellen Schadstoffabbau.

Folgende generelle Erkenntnisse konnten in Auswertung der experimentellen Arbeiten gewonnen werden:

Im Verlaufe der Autoxidation phenolischer Verbindungen kommt es zu beträchtlichen Veränderungen ihres inhibitorischen Potentials. Während die inhibierende Wirkung in den Anfangsstadien der Autoxidation rasch zunimmt, erfolgt im weiteren Verlauf der Reaktion eine deutliche Entgiftung. Dieser qualitative Verlauf ist unabhängig von der chemischen Struktur der monomeren phenolischen Ausgangsstoffe, jedoch wird die quantitative Ausprägung der verschiedenen Stadien signifikant durch die Struktur der Monomere beeinflusst. Dabei geht die Veränderung der inhibierenden Wirkung der Autoxidate im allgemeinen zeitlich mit dem Fortschreiten des Autoxidationsprozesses einher. Vor allem die in der Anfangsphase der Autoxidation entstehenden Produkte bedingen eine irreversible Inhibierung. Es konnte gezeigt werden, daß die inhibierende Wirkung eines Autoxidationsgemisches nicht, wie bisher angenommen, generell durch das Molekulargewicht der Komponenten bestimmt wird, sondern daß vielmehr der Oxidationszustand des Gemisches den ausschlaggebenden Faktor hierfür darstellt. Innerhalb der metabolischen Sequenz des anaeroben Phenolabbaus sind die Initialreaktionen, die die Transformation des Phenols zum Benzoat bewirken, nicht nur generell geschwindigkeitsbestimmend, sondern reagieren auch am empfindlichsten auf die Gegenwart phenolischer Autoxidationsprodukte. Demzufolge ist die Degradation phenolischer Verbindungen, die über den Benzoatweg abgebaut werden, in langzeitgelagerten phenolischen Deponiewässern nicht an zentraler Stelle limitiert, sondern hängt im wesentlichen von der Sensitivität der Initialreaktionen gegenüber phenolischen Autoxidationsprodukten ab.

Der mikrobielle Abbau phenolischer Autoxidationsprodukte ist ein sehr langsamer Prozeß, über dessen prinzipielle Möglichkeiten und Grenzen zur Zeit keine genauen Aussagen möglich sind, was in erster Linie auf die Komplexität der Materie und das Fehlen geeigneter analytischer Methoden zurückzuführen ist.

Die Untersuchungsergebnisse lassen eine Abhängigkeit der Abbauleistung verschiedener Mischkulturen von der Gegenwart verschiedener Elektronenakzeptoren erkennen. Unter methanogenen und sulfatreduzierenden Bedingungen sind höhermolekulare Verbindungen (Molekülgröße > 3 kD) wesentlich stabiler als unter nitratreduzierenden und aeroben Bedingungen. Diese Abhängigkeit existiert auch hinsichtlich des Abbaus niedermolekularer phenolischer Komponenten im Sinne der Breite der Substratverwertungsspektren und der Geschwindigkeit der Abbauprozesse.

Die Spaltung hochmolekularer Verbindungen ist bei der Degradation autoxidativ entstandener Makromoleküle nicht in jedem Fall geschwindigkeitsbestimmend - auch die weitere Mineralisierung von oligomeren Spaltprodukten kann die Kinetik des Gesamtprozesses determinieren. Unter aeroben Bedingungen kann es zur weiteren Autoxidation niedermolekularer Inhaltsstoffe kommen, die wesentlich schneller verläuft als die Spaltung der Makromoleküle und damit zur weiteren Entstehung relativ persistenter Verbindungen führt.

Zu einer physiko-chemischen Entfernung phenolischer Autoxidationsprodukte aus wässrigen Lösungen (z.B. durch Flockungs-/Fällungsprozesse) gibt es im technischen Maßstab derzeit kaum eine vernünftige Alternative.

Die Inhibierungskonstanten geeigneter kinetischer Modelle wurden für die Hemmung des Abbaus von Phenol durch Nickel sowie für die Substrathemmung durch Phenol in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Für die Substrathemmung des Phenolabbaus durch aerobe und anaerobe Anreicherungskulturen wurde eine steigende Hemmung mit sinkender Temperatur festgestellt, während Nickel auf den Phenolabbau bei höheren Temperaturen stärker inhibierend wirkte. Die Empfindlichkeit beider Prozesse gegenüber Unterschieden in der InhibitorKonzentration (ausgedrückt als Sensitivitätsparameter der entsprechenden Modelle bzw. ersichtlich aus der Steilheit der Konzentrations-Geschwindigkeits-Kurven) stieg mit der Temperatur.

Als praktische Konsequenz der beobachteten Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen ergeben sich Abweichungen von der ARRHENIUS-Beziehung und gegenläufige Tendenzen für die Temperaturempfindlichkeit der beiden Gruppen inhibitorischer Prozesse. Während beim Abbau von Phenol in Gegenwart von Nickel die Temperaturempfindlichkeit der Reaktion mit steigender InhibitorKonzentration sinkt, nimmt sie bei der Substrathemmung mit steigender InhibitorKonzentration zu. Für den Abbau toxischer Substrate in kontaminierten Habitaten bedeutet dieser Effekt eine synergistische Verstärkung der Inhibierung infolge niedriger Temperaturen und damit eine Limitierung von Selbstreinigungsprozessen.

Die Bedeutung des inhibitorischen Potentials phenolischer Autoxidationsprodukte im Zusammenhang mit den beschriebenen Temperatur-Inhibierungs-Beziehungen ist exemplarisch für die Schwelwasserdeponie "Vollert Süd" diskutiert worden.

Literaturverzeichnis

Abel, P.D.: Water pollution biology. Ellis Horwood Ltd., Chichester (1989)

Acton, D.W.; Barker, J.F.: In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. J. Contam. Hydrol. 9, 325-352 (1992)

Adelman, I.R.; Smith, L.L.: Toxicity of hydrogen sulphide to goldfish (*Carassius auratus*) as influenced by temperature, oxygen and bioassay techniques. J. Fish Res. Bd. Can. 29, 1309-1317 (1972)

Ahmad, N.; Mir, S.; Abbasi, Y.Z.: Effect of Pakistani lignite derived humic acids on the agricultural growth. Part 1. Effects of various small concentrations of humic acids on the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum*) under different conditions. Sci. Int. (Lahore) 4, 283-286 (1992)

Allsop, P.J.: The dynamics of aerobic phenol degradation. University of Waterloo, ON, Canada. (1989)

Andreux, F.G.; Portal, J.M.; Schiavon, M.; Bertin, G.: The binding of atrazine and its dealkylated derivatives to humic-like polymers derived from catechol. Sci. Tot. Environ. 117/118, 207-217 (1992)

Andrews, J.F.: A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. Biotechnol. Bioengin. 10, 707-723 (1968)

Atkinson, D.E.: Regulation of enzyme activity. Ann. Rev. Biochem. 35, 85-124 (1966)

Azizi, P.; Ziechmann, W.: Wechselwirkungen zwischen Huminstoffen und Fe^{II}/Fe^{III}-Ionen. Chem. Erde 53, 355-362 (1993)

Bakker, G.: Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. FEMS Microbiol. Lett. 1, 103-108 (1977)

Battermann, G.; Werner, P.: Beseitigung einer Untergrundkontamination mit Kohlenwasserstoffen durch mikrobiellen Abbau. Grundwasserforschung-Wasser/Abwasser 125, 366-373 (1984)

Beart, J.H.; Lilley, T.H.; Haslam, E.: Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observation on some polymeric proanthocyanidins. *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2*, 9, 1439-1443 (1985)

Becker, F.: Mikrobiell anaerobe Toxizität und Abbaubarkeit künstlicher Huminstoffe. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Verfahrenstechnik, Institut für Bioverfahrens- und Reaktionstechnik (1993)

Becker, P.M.; Wand, H.; Weißbrodt, E.; Kusch, P.; Stottmeister, U.: Untersuchungen zum standorteigenen Reinigungspotential der mit Phenolen und Autoxidationsprodukten belasteten Schwelwasserdeponie "Vollert-Süd". Posterbeitrag zum Symposium Umwelt-Biotechnologie des Verbandes Deutscher Biologen e.V., 2./3.3.1994, Bochum (1994)

Becker, P.M.; Wand, H.; Weißbrodt, E.; Kusch, P.; Stottmeister, U.: Distribution of contaminants and the self-purifying potential of a carbonization waste water deposit. Frühjahrstagung der VAAM 1995, Stuttgart (1995)

Behmel, P.; Ziechmann, W.: Die Bestimmung phenolischer Bodeneinhaltsstoffe, ihrer Humifizierbarkeit und Komplexbildungstendenz mit Al^{3+} -Ionen und $H[AlCl_4]$. *Chem. Erde* 47, 243-253 (1987)

Beller, H.R.; Edwards, E.A.; Grbic-Galic, D.; Hutchins, S.R.; Reinhard, M.: Microbial degradation of alkylbenzene under sulfate-reducing and methanogenic conditions. US Environmental Protection Agency report EPA/600/S2-91/027. Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, Ada, OK, USA (1991)

Benner, R.; Maccubbin, A.E.; Hodson, R.E.: Anaerobic biodegradation of the lignin and polysaccharide components of lignocellulose and synthetic lignin by sediment microflora. *Appl. Environ. Microbiol* 47, 998-1004 (1984)

Benstead, J.; Archer, D.B.; Lloyd, D.: Rapid method for monitoring methanogenic activities in mixed culture: effects of inhibitory compounds. *Biotechnol. Techniques* 7, 31-36 (1993)

Bergmann, C.: Übersicht zur Problematik Phenolversehung im Raum Profen und Deuben. Bericht MIBRAG, Verwaltung Geotechnik/Hydrogeologie, Gaschwitz (1993)

Berry, D.F.; Francis, A.J.; Bollag, J.-M.: Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions. *Microbiol. Rev.* 51, 43-59 (1987)

- Berry-Spark, K.; Barker, J.F.: Nitrate remediation of gasoline contaminated groundwaters. In: Proc. NWWA/API Conf. Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water- Prevention, Detection and Restoration, Nov. 1987. NWWA, Dublin, OH, USA, pp. 127-144 (1987)
- Birch, R.R.; Biver, C.; Campagna, R.; Gledhill, W.E.; Pagga, U.; Steber, J.; Reust, H.; Bontonck, W.J.: Screening of chemicals for anaerobic biodegradability. *Chemosphere* 19, 1527-1550 (1989)
- Bisaillon, J.-G.; Lépine, F.; Beaudet, R.; Silvestre, M.: Potential for carboxylation-dehydroxylation of phenolic compounds by a methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.* 39, 642-648 (1993)
- Blake, C.K.; Hegeman, G.D.: Plasmid pCBI carries genes for anaerobic benzoate catabolism in *Alcaligenes xylosoxidans subsp. denitrificans* PN-1. *J. Bacteriol.* 169, 4873-4883 (1987)
- Blum, D.J.W.; Hergenroeder, R.; Parkin, G.F.; Speece, R.E.: Anaerobic treatment of coal conversion wastewater constituents: biodegradability and toxicity. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.* 58, 122-131 (1986)
- Bossert, I.D.; Rivera, M.D.; Young, L.Y.: p-cresol biodegradation under denitrifying conditions: isolation of bacterial coculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38, 313-319 (1987)
- Bradford, M.M.: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- Cairns, J.Jr.; Heath, A.G.; Parker, B.C.: The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiol.* 47, 135-171 (1975)
- Carpenter, H.M.; Zhang, Q.; El Zahr, C.; Selivonchick, D.P.; Brock, D.E.; Curtis, L.R.: In vitro and in vivo temperature modulation of hepatic metabolism and DNA adduction of aflatoxin B1 in rainbow trout. *J. Biochem. Toxicol.* 10, 1-10 (1995)
- Cathalifaud, G.; Wais Mossa, M.T.; Mazet, M.: Performed ferric hydroxide flocs as adsorbents of humic substances. *Wat. Sci. Technol.* 27, 55-60 (1993)

- Cerniglia, C.E.: Aromatic hydrocarbons: Metabolism by bacteria, fungi and algae. In: Reviews in Biochemical Toxicology. E. Hodgson, J.R. Bend, and R.M. Philpot (Eds.); Elsevier/North Holland, New York. Vol. 3, 321-361 (1981)
- Chang, K.Y.: Interaction of phenol with the polysaccharide of bacterial cell wall. Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 900-906 (1973)
- Changeaux, J.P.: Allosteric interactions interpreted in terms of quaternary structure. In: Subunit structure of proteins, Brookhaven Symp. Biol. 17, 232-249 (1964)
- Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M.: Information provided on humic substances by E₄/E₆ ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41, 352-358 (1977)
- Chen, Y.R.; Varel, V.H.; Hashimoto, A.G.: Effect of temperature on methane fermentation kinetics of beef-cattle manure. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 10, 325-339 (1980)
- Colberg, P.J.; Young, L.Y.: Anaerobic degradation of soluble fractions of [¹⁴C-lignin]lignocellulose. Appl. Environ. Microbiol. 49, 345-349 (1985a)
- Colberg, P.J.; Young, L.Y.: Aromatic and volatile acid intermediates observed during anaerobic metabolism of lignin-derived oligomers. Appl. Environ. Microbiol. 49, 350-358 (1985b)
- Colleran, E.; Concannon, F.; Golden, T.; Geoghegan, F.; Crumlish, B.; Killilea, E.; Henry, M.; Coates, J.: Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. Wat. Sci. Technol. 25, 31-40 (1992)
- Conrad, R.; Schütz, H.; Babel, M.: Temperature limitation of hydrogen turnover and methanogenesis in anoxic paddy soil. FEMS Microbiol. Ecol. 45, 281-289 (1987)
- Crawford, D.L.; Crawford, R.L.: Microbial degradation of lignin. Enzyme and Microbial Technology 2, 11-22 (1980)
- Dagley, S.: New perspectives in aromatic catabolism. In: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. FEMS Symposium No.12. T. Leisinger, R. Hütter, A.M.Cook, J. Nüesch (Eds.); Academic Press, 181-188 (1981)

- De Haan, H.: Some structural and ecological studies on soluble humic compounds from Tjeukemeer. Verh. Internat. Verein. Limnol. 18, 685-695 (1972)
- De Haan, H.: Evidence for the induction of catechol-1,2-oxygenase by fulvic acid. Plant and Soil 45, 129-136 (1976)
- Dixon, M.; Webb, E.C.: Enzymes. (2. ed.), Longmans, London, Colchester (1964)
- Duangawatsi, M.; Klaverkamp, J.F.: Acephate and fenitrothion toxicity in rainbow trout: Effects of temperature stress and investigations on the site of action. In: Aquatic Toxicology. Proceedings of the Second Annual Symposium on Aquatic Toxicology. Eds.: Marking, L.L., Kimerle, R.A. (1979)
- duPreez, J.C.; Bosch, M.; Prior, B.A.: Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 521-525 (1987)
- Dwyer, D.F.; Krumme, M.L.; Boyd, S.A.; Tiedje, J.M.: Kinetics of phenol degradation by an immobilized methanogenic consortium. Appl. Environ. Microbiol. 52, 345-351 (1986)
- Edwards, V.H.: The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. Biotechnol. Bioeng. 12, 679-712 (1970)
- Edwards, E.A.; Grbic-Galic, D.: Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2663-2666 (1992)
- Emerson, E.: The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds. J. Org. Chem. 8, 417-428 (1943)
- Evans, W.C.; Fuchs, G.: Anaerobic degradation of aromatic compounds. Ann. Rev. Microbiol. 42, 289-317 (1988)
- Fedorak, P.M.; Hrudey, S.E.: The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. Water Res. 18, 361-367 (1984)
- Fedorak, P.M.; Knetting, E.; Hrudey, S.E.: The effects of activated carbon on the methanogenic degradation of phenolics in H-coal wastewater. Environ. Technol. Lett. 6, 181-188 (1985)

- Fedorak, P.M.; Hrudey, S.E.: Anaerobic treatment of phenolic coal conversion wastewater in semicontinuous cultures. *Water Res.* 20, 113-122 (1986)
- Felts, P.A.; Heath, A.G.: Interactions of temperature and sublethal environmental copper exposure on the energy metabolism of bluegill, *Lepomis macrochirus Rafinesque*. *J. Fish Biol.* 25, 445-453 (1984)
- Fewson, C.A.: Biodegradation of aromatics with industrial relevance. In: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. FEMS Symposium No.12. T. Leisinger, R. Hütter, A.M. Cook, J. Nüesch (Eds.); Academic Press, 141-179 (1981)
- Field, J.A.; Lettinga, G.: The methanogenic toxicity and anaerobic degradability of a hydrolyzable tannin. *Water Res.* 21, 367-374 (1987)
- Field, J.A.; Lettinga, G.: The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biol. Wastes* 29, 161-179 (1989)
- Field, J.A.; Kortekaas, S.; Lettinga, G.: The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biol. Wastes* 29, 241-262 (1989)
- Field, J.A.; Lettinga, G.; Habets, L.H.A.: Measurement of low molecular weight tannins: indicators of methanogenic toxic tannins. *J. Ferment. Bioeng.* 69, 148-153 (1990a)
- Field, J.A.; Lettinga, G.; Habets, L.H.A.: Oxidative detoxification of aqueous bark extracts. Part 1: Autoxidation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 49, 15-33 (1990b)
- Flyvbjerg, J.; Arvin, E.; Jensen, B.K.; Olsen, S.K.: Microbial degradation of phenols and aromatic hydrocarbons in creosote-contaminated groundwater under nitrate-reducing conditions. *J. Contam. Hydrol.* 12, 133-150 (1993)
- Fox, P.; Suidan, M.T.; Pfeffer, J.T.: Anaerobic treatment of biologically inhibitory wastewater. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.* 60, 86-92 (1988)
- Fox, P.; Suidan, M.T.; Pfeffer, J.T.; Bandy, J.T.: Hybrid expanded-bed GAC reactor for treating inhibitory wastewaters. *J. Environ. Engineer.* 116, 438-453 (1990)
- Fox, P.; Suidan, M.T.: A comparison of expanded-bed GAC reactor designs for the treatment of refractory/inhibitory wastewaters. *Water Res.* 27, 769-776 (1993)

Gale, E.F.; Taylor, E.S.: The assimilation of amino acids by bacteria. 2. The action of thyrocidin and some detergent substances on releasing amino acids from the internal environment of *Streptococcus faecalis*. J. Gen. Microbiol. 1, 77-84 (1947)

Genthner, B.R.S.; Townsend, G.T.; Chapman, P.J.: Anaerobic transformation of phenol to benzoate via para-carboxylation: use of fluorinated analogues to elucidate the mechanism of transformation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 162, 945-951 (1989)

Gersberg, R.M.; Dawsey, W.J.; Bradley, M.D.: Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons under denitrifying conditions. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47, 230-237 (1991)

Gibson, D.T.: Microbial degradation of aromatic compounds. Science 161, 1093-1097 (1968)

Gibson, A.M.; Bratchell, N.; Roberts, T.A.: The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62, 479-490 (1987)

Glenn, J.K.; Gold, M.H.: Decolorization of several polymeric dyes by lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1741-1747 (1983)

Gorny, N.; Schink, B.: Hydroquinone degradation via reductive dehydroxylation of gentisyl-CoA by a strictly anaerobic fermenting bacterium. Arch. Microbiol. 161, 25-32 (1994)

Gottschalk, G.: Bacterial metabolism. 2. Ed.; Springer-Verlag, Berlin, New York, Heidelberg, Tokio. (1985)

Grbic-Galic, D.; Vogel, T.H.: Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. Appl. Environ. Microbiol. 52, 200-202 (1986)

Haag, F.; Reinhard, M.; McCarty, P.L.: Degradation of toluene and p-xylene in anaerobic microorganisms: evidence for sulphate as a terminal electron acceptor. Environ. Toxicol. Chem. 10, 1379-1389 (1991)

Hagerman, A.E.: Tannin-protein interactions. In: Phenolic compounds in food and their effect on health. 1. Bd., Eds.: Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C.T., American Chemical Society (1992)

- Haider, K.M.; Martin, J.P.: Mineralization of ^{14}C -labelled humic acids and of humic-acid bound ^{14}C -xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium*. Soil Biol. Biochem. 20, 425-429 (1988)
- Haldane, J.B.S.: Enzymes. The M.T.I. Press (1930)
- Harrison, E.M.; Barker, J.F.: Sorption and enhanced biodegradation of trace organics in a groundwater reclamation scheme - Gloucester Site, Ottawa, Canada. J. Contam. Hydrol. 1, 349-373 (1987)
- Hartung, H.A.: Stimulation of anaerobic digestion with peat humic substance. Sci. Tot. Environ. 113, 17-33 (1992)
- Haslam, E.; Lilley, T.H.; Warminski, E.; Liao, H.; Cai, Y.; Martin, R.; Gaffney, S.H.; Gouling, P.N.; Luck, G.: Polyphenol complexation. A study in molecular recognition. In: Phenolic compounds in food and their effect on health. 1. Bd., Eds.: Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C.T., American Chemical Society, Washington (1992)
- Haworth, R.D.: The chemical nature of humic acid. Soil Sci. 111, 71-79 (1971)
- Hazel, J.R.; Prosser, C.L.: Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. Physiol. Rev. 54, 620-677 (1974)
- Heipieper, H.-J.; Keweloh, H.; Rehm, H.-J.: Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1213-1217 (1991)
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N.: The adaptation of enzymes to temperature. Comp. Biochem. Physiol. 27, 659-668 (1968)
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N.: Strategies of biochemical adaptation. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto (1973)
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N.: Biochemical adaptation. Princeton University Press, Princeton, New Jersey (1984)
- Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzyme inhibition of quinones. In: Metabolic inhibitors. 2. Bd., Eds.: Hochster, R.M., Quastel, J.H., Academic Press, New York, London (1963)

- Hug, D.H.; Hunter, J.K.: Effect of temperature on urocanase from a psychrophile, *Pseudomonas putida*. *Biochem.* 13, 1427-1431 (1974a)
- Hug D.H.; Hunter, J.K.: Effect of temperature on histidine ammonia-lyase from a psychrophile, *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 119, 92-97 (1974b)
- Hugo, W.B.: The action of phenol and 2-phenoxyethanol on the oxidation of various substances by *Escherichia coli* and by disrupted cell preparation of the organism. *J. Gen. Microbiol.* 15, 315-323 (1956)
- Hugo, W.B.: The inactivation of vegetative bacteria by chemicals. In: Inhibition and inactivation of vegetative microbes. The Society for Applied Bacteriology. Symposium series No. 5, 1-11. Eds.: Skinner, F.A., Hugo, W.B. Academic Press, New York (1976)
- Hutchins, S.R.: Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2403-2407 (1991)
- Hutchins, S.R.; Sewell, G.W.; Kovacs, D.A.; Smith, G.A.: Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 68-76 (1991)
- Jones, G.A.; Allister, T.A.; Muir, A.D.; Cheng, K.-J.: Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1374-1378 (1994)
- Kaminski, U.; Kusch, P.; Janke, D.: Degradation of different aromatic compounds from Saale river sediment to either o-, m- or p-cresol. *J. Basic Microbiol.* 30, 259-265 (1990)
- Kennedy, K.J.; McCarthy, P.J.; Droste, R.L.: Batch and continuous anaerobic toxicity of resin acids from chemithermomechanical pulp wastewater. *J. Ferment. Bioengin.* 73, 206-212 (1992)
- Kelly, C.A.; Chynoweth, D.P.: The contribution of temperature and of the input of organic matter in controlling rates of sediment methanogenesis. *Limnol. Oceanogr.* 26, 891-897 (1981)

- Keweloh, H.; Heipieper, H.-J.; Rehm, H.-J.: Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 383-389 (1989)
- Keweloh, H.; Weyrauch, G.; Rehm, H.-J.: Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 66-71 (1990)
- Keweloh, H.; Heipieper, H.-J.; Diefenbach, R.; Rehm, H.-J.: Mechanisms of phenol degrading bacteria for the protection from substrate toxicity. DEHEMA Biotechnology Conference 5, VCH Verlagsgesellschaft (1992)
- Khandelwal, K.C.; Gaur, A.C.: Degradation of humic acids, extracted from manure and soil by some Streptomyces and fungi. *Zbl. Bakt. II. Abt.* 135, 119-122 (1980)
- Khangarot, B.S.; Ray, P.K.: Studies on the acute toxicity of copper and mercury alone and in combination to the common guppy *Poecilia reticulata* (Peters). *Arch. Hydrobiol.* 110, 303-314 (1987)
- Kindzierski, W.B.; Gray, M.R.; Fedorak, P.M.; Hruddy, S.E.: Activated carbon and synthetic resins as support material for methanogenic phenol-degrading consortia - comparison of surface characteristics and initial colonization. *Water Environ. Res.* 64, 766-775 (1992)
- Kluge, C.; Tschuch, A.; Fuchs, G.: Anaerobic metabolism of resorcylic acids (m-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 155, 68-74 (1990)
- Knackmuss, H.-J.: Perspektiven der biologischen Elimination von Trinitrotoluol (TNT) und kongeneren Verbindungen. Symposium Umwelt-Biotechnologie des Verbandes Deutscher Biologen e.V., 2./3.3.1994, Bochum (1994)
- Knoll, G.; Winter, J.: Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge. Benzoate formation from phenol and CO₂ in the presence of hydrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 384-391 (1987)
- Knowles, G.; Downing, A.L.; Barrett, M.L.: Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer. *J. Gen. Microbiol.* 38, 263-278 (1965)

- Kobayashi, T.; Hashinaga, T.; Mikami, E.; Suzuki, T.: Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges. *Water Sci. Technol.* 21, 55-65 (1989)
- Koenig, K.; Andreesen, J.R.: Aerobier und anaerobier Abbau von heterocyclischen, aromatischen Verbindungen durch Bakterien. *BioEngineering* 8, 78-84, (1992)
- Kontchou, C.Y.; Blondeau, R.: Effect of heterotrophic bacteria on different humic substances in mixed cultures. *Can. J. Soil Sci.* 70, 51-59 (1990)
- Kopinke, F.-D.; Pörschmann, J.; Stottmeister, U.: Sorption of organic pollutants on anthropogenic humic matter. *Environ. Sci. Technol.* 29, 941-950 (1995)
- Kotte, H.; Gründig, B.; Vorlop, K.-D.; Strehlitz, B.; Stottmeister, U.: Methylphenazonium-modified enzyme sensor based on polymer thick films for subnanomolar detection of phenols. *Anal. Chem.* 67, 65-70 (1995)
- Kraus, D.C.: Kinetic study of fatty acid aerobic degradation. Dissertation, University of Missouri, Columbia (1971)
- Kuhn, E.P.; Colberg, P.J.; Schnoor, J.L.; Wanner, O.; Zehnder, A.J.B.; Schwarzenbach, R.P.: Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: laboratory column studies. *Environ. Sci. Technol.* 19, 961-968 (1985)
- Kuhn, E.P.; Zeyer, J.; Eicher, P.; Schwarzenbach, R.P.: Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 490-496 (1988)
- Kusch, P.: Untersuchungen zur mikrobiologisch anaeroben Reinigung von Braunkohlepyrolyseabwässern. Dissertation, Universität Oldenburg, Fachbereich Biologie (1991)
- Kusch, P.; Wießner, A.; Martius, G.; Weißbrodt, E.; Stottmeister, U.: Untersuchungen zur Sanierung wäßriger Altlasten der Braunkohlepyrolyseindustrie. *Energieanwendung, Energie- und Umwelttechnik* 43, 309-312 (1994)
- Laudelout, H.; Tichelen, L.: Kinetics of the nitrate oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*. *J. Bacteriol.* 79, 39-42 (1960)

Leduc, R.; Samson, R.; Al-Bashir, B.; Al-Hawari, J.; Cseh, T.: Biotic and abiotic disappearance of four PAH compounds from flooded soil under various redox conditions. *Wat. Sci. Technol.* 26, 51-60 (1992)

Licht, P.: Thermal adaptation in the enzymes of lizards in relation to preferred body temperatures. In: *Molecular mechanisms of temperature adaptation*. Ed.: Prosser, C.L., AAAS Publ. 84, 131-145 (1967)

Livernoche, D.; Jurasek, L.; Desrochers, M.; Veliky, I.A.: Decolorization of a kraft mill effluent with fungal mycelium immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnol. Lett.* 3, 701-706 (1981)

Lovley, D.R.; Lonergan, D.J.: Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1858-1864 (1990)

Major, D.W.; Mayfield, C.I.; Barker, J.F.: Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand. *Ground Water* 26, 8-14 (1988)

Matsumoto, M.R.; Jensen, J.N.; McGinley, P.M.; Reed, B.E.: Physicochemical processes. *Wat. Environ. Res.* 65, 309-324 (1993)

McManus, J.P.; Davis, K.G.; Beart, J.E.; Gaffney, S.H.; Lilley, T.H. Haslam, E.: Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; Some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J. Chem. Soc. Perk. Trans.* 2, 9, 1429-1438 (1985)

Morgan, P.; Lewis, S.T.; Watkinson, R.J.: Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated ground-water. *Environ. Pollut.* 82, 181-190 (1993)

Moussavi, M.: Effect of polar substituents on autoxidation of phenols. *Water Res.* 13, 1125-1128 (1979)

Müller-Wegener, U.: Wechselwirkungen zwischen Phenolen und Huminstoffen. Dissertation, Universität Göttingen, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (1976)

- Murphy, T.; Brouwer, H.; Moller, A.; Fox, M.; Jeffries, D.; Thachuk, J.; Savile, H.; Don, H.: Preliminary analysis of in situ bioremediation in Hamilton Harbour. Proceedings of Workshop on the removal and treatment of contaminated sediments, Environment Canada's Great Lakes Cleanup Fund, Toronto (1993)
- Musso, H.: Über Phenol-Oxydationen. *Angew. Chem.* 75, 965-977 (1963)
- Mutchmor, J.A.: Temperature adaptation in insects. In: Molecular mechanisms of temperature adaptation. Ed.: Prosser, C.L., AAAS Publ. 84, 165-176 (1967)
- Nakhla, G.F.; Suidan, M.T.; Pfeffer, J.T.: Control of anaerobic GAC reactors treating inhibitory wastewaters. *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.* 62, 65-72 (1990)
- Nakhla, G.F.; Suidan, M.T.: Modelling of toxic wastewater treatment by expanded-bed anaerobic GAC reactors. *J. Environ. Engineer.* 118, 495-512 (1992)
- Neufeld, R.D.; Mack, J.D.; Strakey, J.D.: Anaerobic phenol kinetics. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 52, 2367-2377 (1980)
- Novak, J.: Temperature-substrate interactions in biological treatment. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.* 46, 1984-1994 (1974)
- Okaygun, M.S.; Green, L.A.; Akgerman, A.: Effects of consecutive pulsing of an inhibitory substrate on biodegradation kinetics. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1746-1752 (1992)
- Owen, W.F.; Stuckey, D.C.; Healy, J.B.; Young, L.Y.; McCarty, P.L.: Bioassay for monitoring biochemical methanepotential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492 (1979)
- Parkin, G.F.; Speece, R.E.; Yang, C.H.J.; Kocher, W.M.: Response of methane fermentation systems to industrial toxicants. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.* 55, 44-53 (1983)
- Patel, G.B.; Agnew, B.J.; Dicaire, C.J.: Inhibition of pure cultures of methanogens by benzene ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2969-2974 (1991)
- Paule, M.R.: The effect of temperature on the kinetics of adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylase from *Rhodospirillum rubum*. *Biochem.* 10, 4509-4517 (1971)

- Pavlostathis, S.G.; Zhuang, P.: Effect of temperature on the development of anaerobic cultures from a contaminated subsurface soil. *Environ. Technol.* 12, 679-687 (1991)
- Pearson, F.; Shiun-Chung, C.; Gautier, M.: Toxic inhibition of anaerobic degradation. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 52, 472-482 (1980)
- Persson, I.; Hahn-Hägerdal, B.: The influence of the temperature on the regulation of the metabolism in hydrocarbon degrading microorganisms. Soil decontamination using biological processes. *Int. Symp.*, 531-535, Karlsruhe (1992)
- Pfeiffer, S.; Manns, O.: Photometrische Bestimmung einiger Arzneimittel mit 4-Aminoantipyrin. *Pharmazie* 12, 401-408 (1957)
- Pflug, W.; Ziechmann, W.: Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 13, 293-299 (1981)
- Pflug, W.; Ziechmann, W.: Humic acids and the disruption of bacterial cell walls by lysozyme. *Soil Biol. Biochem.* 14, 165-166 (1982)
- Porter, L.J.; Woodruffe, J.: Haemanalysis: the relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochem.* 23, 1255-1256 (1984)
- Prosser, C.L.: *Adaptational biology. Molecules to organisms.* John Wiley & Sons (1986)
- Puhakka, J.A.; Viitasaari, M.A.; Latola, P.K.; Määttä, R.K.: Effect of temperature on anaerobic digestion of pulp and paper industry wastewater sludges. *Wat. Sci. Technol.* 20, 193-201 (1988)
- Ramanand, K.; Suflita, J.M.: Anaerobic degradation of m-cresol in anoxic aquifer slurries: carboxylation reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1689-1695 (1991)
- Rasmussen, R.A.; Rasmussen, L.E.: Some observations on the protein and enzyme levels and fractions in normal and stressed elasmobranchs. *Trans. N.Y.Acad.Sci.Ser.2*, 29, 397-413 (1967)

- Ratkowski, D.A.; Lowry, R.K.; McMeekin, T.A.; Stokes, A.N.; Chandler, R.E.: Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 1222-1226 (1983)
- Rav-Acha, C.; Rebhuhn, M.: Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment. *Water Res.* 26, 1645-1654 (1992)
- Read, K.R.H.: Thermostability of proteins in poikilotherms. In: *Molecular mechanisms of temperature adaptation*. Ed.: Prosser, C.L., AAAS Publ. 84, 93-106 (1967)
- Roberts, D.J.; Fedorak, P.M.; Hrudey, S.E.: Comparison of the fates of the methyl-carbons of m-cresol and p-cresol in methanogenic consortia. *Can. J. Microbiol.* 33, 335-338 (1987)
- Roberts, D.J.; Fedorak, P.M.; Hrudey, S.E.: CO₂ incorporation and 4-hydroxy-2-methylbenzoic acid formation during anaerobic metabolism of m-cresol by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 472-478 (1990)
- Rosso, L.; Lobry, J.R.; Flandrois, J.P.: An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 162, 447-463 (1993)
- Rosso, L.; Lobry, J.R.; Bajard, S.; Flandrois, J.P.: Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610-616 (1995)
- Rudolphi, A.; Tschsch, A.: Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 155, 238-248 (1991)
- Ryhänen, R.: Die Bedeutung der Humussubstanzen im Stoffhaushalt der Gewässer Finnlands. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 14, 168-178 (1968)
- Scherrer, J.R.: L'activité acétylcholinestérasique d' érythrocytes humain en fonction de la température. *Biochem. Biophys. Acta* 105, 137-148, (1965)
- Shelton, D.R.; Tiedje, J.M.: General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 850-857 (1984)

- Shimp, R.; Pfaender, F.K.: Influence of naturally occurring humic acids on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 402-407 (1985)
- Shukuya, R.: On the kinetics of human blood cholinesterase. *J. Biochem. (Japan)* 40, 135-140 (1953)
- Sierra-Alvarez, R.; Lettinga, G.: The methanogenic toxicity of wastewater lignins and lignin related compounds. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 50, 443-455 (1991)
- Sinke, A.J.C.; Cornelese, A.A.; Cappenberg, T.E.; Zehnder, A.J.B.: Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic Lake Loosdrecht, The Netherlands. *Biogeochem.* 16, 43-61 (1992)
- Smith, M.G.; Heath, A.G.: Acute toxicity of copper, chromate, zinc and cyanide to freshwater fish: effect of different temperatures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 113-119 (1979)
- Smolenski, W.J.; Suflita, J.M.: Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 710-716 (1987)
- Soto, M.; Mendez, R.; Lema, J.M.: Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. *Water Res.* 27, 1361-1376 (1993)
- Spargue, J.B.: The measurement of pollutant toxicity to fish 2. Utilising and applying bioassay results. *Water Res.* 4, 3-32 (1970)
- Strotmann, U.J.; Eismann, F.; Hauth, B.; Bias, W.R.: An integrated test strategy for the assessment of anaerobic biodegradability of wastewaters. *Chemosphere* 26, 2241-2254 (1993)
- Suflita, J.M.; Liang, L.-N.; Saxena, A.: The anaerobic biodegradation of o-, m- and p-cresol by sulfate-reducing bacterial enrichment cultures obtained from a shallow anoxic aquifer. *J. Ind. Microbiol.* 151, 541-545 (1989)
- Suidan, M.T.; Najm, I.N.; Pfeffer, J.T.; Wang, Y.T.: Anaerobic biodegradation of phenol: inhibition kinetics and system stability. *J. Environ. Engineer.* 114, 1359-1376 (1988)
- Swift, R.S.; Delisle, G.; Leonard, R.L.: Biodegradation of humic acids from New Zealand soils. *Sci. Tot. Environ.* 62, 423-430 (1987)

- Szewzyk, U.; Szewzyk, R.; Schink, B.: Methanogenic degradation of hydroquinone and catechol via reductive dehydroxylation to phenol. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 79-87 (1985)
- Szewzyk, U.; Schink, B.: Degradation of hydroquinone, gentisate and benzoate by a fermenting bacterium in pure or defined mixed culture. *Arch. Microbiol.* 151, 541-545 (1989)
- Takechi, M.; Tanaka, Y.; Takehara, M.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I.: Structure and antihyperthermic activity among the tannins. *Phytochem.* 24, 2245-2250 (1985)
- Taylor, W.I.; Battersby, A.R.: Oxidative coupling of phenols. Marcel Dekker, Inc., New York (1967)
- Taylor, B.F.; Campbell, W.L.; Chinoy, I.: Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. *J. Bacteriol.* 102, 430-437 (1970)
- Tell, J.G.; Uchrin, C.G.: Relative contributions of soil humic acid and humin to the adsorption of toluene onto an aquifer solid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 547-554 (1991)
- Tranvik, L.J.; Höfle, M.G.: Bacterial growth in mixed cultures on dissolved organic carbon from humic and clear waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 482-488 (1987)
- Tschech, A.; Schink, B.: Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids. *Arch. Microbiol.* 143, 52-59 (1985)
- Tschech, A.; Fuchs, G.: Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying *Pseudomonas*. *Arch. Microbiol.* 148, 213-217 (1987)
- Tschech, A.: Der anaerobe Abbau von aromatischen Verbindungen. *Forum Mikrobiologie* 12, 251-264 (1989)
- Varshovi, A.; Sartain, J.B.: Chemical characteristics and microbial degradation of humate. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24, 2493-2505 (1993)
- Viraraghavan, T.; Kikkeri, S.R.: Effect of temperature on anaerobic filter treatment of dairy wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 22, 191-198 (1990)
- Wang, Y.-T.; Suidan, M.T.; Pfeffer, J.T.; Najam, I.: The effect of concentration of phenols on their batch methanogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1353-1357 (1989)

- Wang, Y.-T.; Gabbard, H.D.; Pai, P.-C.: Inhibition of acetate methanogenesis by phenols. *J. Environ. Engineer.* 117, 487-500 (1991)
- Wang, Y.-T.: Effect of chemical pretreatment on anaerobic biodegradation of refractory organic compounds. *Environ. Prog.* 11, 210-215 (1992)
- Watson, J.D.: The importance of weak chemical interactions. In: *The molecular biology of the gene*, 102-141, Benjamin, New York (1970)
- Webb, J.L.: *Enzyme and metabolic inhibitors*. Academic Press (1963)
- Wedding, R.T.; Hansch, C.; Fukuto, T.R.: Inhibition of malate dehydrogenase by phenols and the influence of ring substituents on their inhibitory effectiveness. *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 9-21 (1967)
- Wershaw, R.L.; Burcar, P.J.; Goldberg, M.C.: Interaction of pesticides with natural organic material. *Environ. Sci Technol.* 3, 271-273 (1969)
- Westermann, P.; Ahring, B.K.; Mah, R.A.: Temperature compensation in *Methanosarcina barkeri* by modulation of hydrogen and acetate affinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1262-1266 (1989)
- Wiegel, J.; Kohring, G.-W.; Zhang, X.; Utkin, I.; Dalton, D.; Wu, Q.; Bedard, D.: Temperature an important factor in the anaerobic transformation and degradation of chlorophenols and PCBs. Soil decontamination using biological processes. *Int. Symp.*, 101-108, Karlsruhe (1992)
- Wießner, A.; Kusch, P.; Weißbrodt, E.; Stottmeister, U.; Pörschmann, J.; Kopinke, F.-D.: Charakterisierung des Wassers und des Sedimentes einer Braunkohle-Schwelwasserdeponie. *WasserAbwasserPraxis* 6, 375-379 (1993)
- Wießner, A.; Kusch, P.; Martius, G.; Eismann, F.; Zehnsdorf, A.; Weißbrodt, E.; Stottmeister, U.: Abbaubarkeit von Schadstoffen im Braunkohlepyrolyse-Altwasser. *WasserAbwasserPraxis* 4, 44-47 (1994)
- Winteringham, F.P.W.; Fowler, K.S.: Substrate and dilution effects on the inhibition of acetylcholinesterase by carbamates. *Biochem. J.* 101, 127-134 (1966)

Wu, W.-M.; Hickey, R.F.; Bhatnagar, L.; Jain, M.K.; Zeikus, J.G.: Fatty acid degradation as a tool to monitor anaerobic sludge activity and toxicity. 44th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan 48118 (1990)

Yang, J.; Speece, R.E.: Effects of engineering controls on methane fermentation toxicity response. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.* 57, 1134-1141 (1985)

Yang, J.; Speece, R.E.: The effects of chloroform toxicity on methane fermentation. *Water Res.* 20, 1273-1279 (1986)

Zehnder, A.J.B.: *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. (1988)

Zeikus, J.G.; Winfrey, M.R.: Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 99-107 (1976)

Zeikus, J.G.; Wellstein, A.L.; Kirk, T.K.: Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 193-197 (1982)

Ziechmann, W.: *Huminstoffe - Probleme, Methoden, Ergebnisse*. Verlag Chemie, Weinheim (1980)

Zwietering, M.H.; DeKoos, J.T.; Hasenack, B.E.; DeWit, J.C.; Van't Riet, K.: Modelling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1094-1101 (1991)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stottmeister für die organisatorische Förderung meiner Arbeit sowie für zahlreiche interessante und hilfreiche Diskussionen.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ing. Wiesmann für das Interesse an der Thematik und für die Übernahme eines Gutachtens.

Besonders danke ich Herrn Dr. Kuschik für seine allseitige Unterstützung, sowohl auf organisatorischem als auch auf fachlichem Gebiet.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Moo-Young für die Möglichkeit, im Rahmen eines viermonatigen Arbeitsaufenthaltes an der Universität Waterloo (Kanada) Experimente zur Abbaubarkeit phenolischer Autoxidationsprodukte durchführen zu können.

Frau Dipl.-Ing. Franka Becker danke ich herzlich für die konstruktive und fruchtbare Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zum Schwelvollertsee.

Herrn Dr. Kopinke und Herrn Dr. Remmler gilt mein Dank für die Ermöglichung der gaschromatographischen Methananalysen sowie für anregende Diskussionen.

Mein Dank gilt weiterhin allen Kollegen, die durch ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere Frau Weichert für die Übernahme zahlloser DOC-Analysen, Frau Plötze für die Nitrat- und Sulfatanalytik und vielen nicht namentlich genannten Personen, die durch ihre Aufgeschlossenheit und Gesprächsbereitschaft wesentlichen Anteil an der Schaffung eines angenehmen und konstruktiven Arbeitsklimas hatten.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Leipzig, 17.12.1995

Frank Eismann

Lebenslauf

Name	Frank Eismann
Geburtsdatum	27.09.1965
Geburtsort	Plauen/V.
Familienstand	ledig
1972-1980	Polytechnische Oberschule
1980-1984	Erweiterte Oberschule (Abitur)
1984-1987	Wehrdienst
1987-1992	Studium der Verfahrenstechnik/Biotechnologie an der Technischen Hochschule Merseburg Diplomarbeit Thema: Entwicklung eines Screening-Verfahrens zur anaeroben Abbaubarkeit von Schadstoffen (bei BASF Ludwigshafen) Abschluß: Diplom-Ingenieur
1992-1995	Wissenschaftliche Hilfskraft mit Hochschulabschluß in der Sektion Sanierungsforschung des Umweltforschungszentrums Leipzig/Halle GmbH (Doktorand) Arbeit an der Dissertation in der Sektion Sanierungsforschung des Umweltforschungszentrums Leipzig/Halle Thema: Geschwindigkeitslimitierende Einflußgrößen beim mikrobiellen Schadstoffabbau in phenolischen Deponiewässern
seit November 1995	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Leipzig, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen

Autor:

Frank Eismann
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Sanierungsforschung
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2220
Telefax 0341/235-2492