

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

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

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

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

1. Einleitung

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

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

2. Ergebnisse und Diskussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Literaturverzeichnis

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

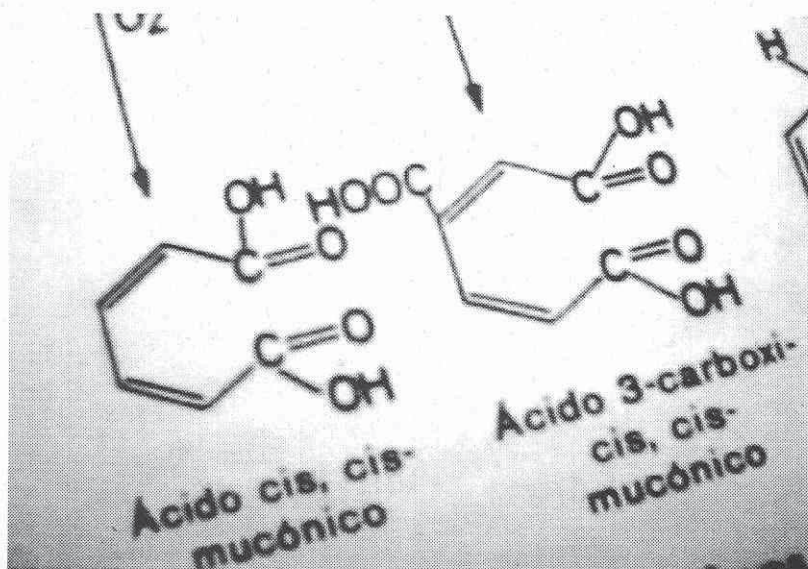
Workshop-Bericht

Bioremediation of polluted areas

La Plata, am 6. und 7. November 1997

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

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



Luise Berthe-Corti (Hrsg.)