

7.2 Abbaupotential methanotropher Bakterien

K.-D. WENDLANDT, M. JECHOREK, M. BECK, J. HELM

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig

Methanotrophe Bakterien zeichnen sich u.a. durch ihre Fähigkeit zur Metabolisierung/Cometabolisierung eines sehr breiten Substratspektrums aus. Das dafür verantwortliche Enzym ist die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO).

Während über die Oxidation/den Abbau chlorierter aliphatischer Kohlenwasserstoffe zahlreiche Befunde vorliegen, sind die Kenntnisse über die sMMO-katalysierte Biodegradation von halogenierten Aromaten, die auch im Chemiedreieck Leipzig-Halle-Bitterfeld eine wichtige Problemstoffgruppe darstellen, gering.

In einer Publikation von Halden [1] gibt es Hinweise auf die Degradation von chlorierten Aromaten (Chlorbenzen, Dichloranilin, Chlortoluen, Chlorphenol, Dichlornitrobenzen) durch den methanotrophen Stamm *Methylosinus trichosporium* OB3b. Da aber keine Angaben über Reaktionsprodukte sowie Bilanzen gemacht werden, erscheinen Aussagen über ein wirkliches biologisches Abbaupotential als etwas vage. Mit demselben methanotrophen Stamm untersuchten Sullivan et al. [2] die Biotransformation von Trichlorbenzen. Durch die Oxidation entstand allerdings das toxische Produkt Trichlorphenol.

Die bisherigen Forschungen zur *in situ*-Sanierung mittels Methanotropher, die ausschließlich autochthone Bakterien nutzen, zeigen, daß die Abbaureaktionen relativ langsam ablaufen und eine Optimierung dieser Prozesse notwendig ist, wobei sowohl Laboruntersuchungen als auch Feldversuche erforderlich sind.

Für das SAFIRA-Vorprojekt wurden insgesamt 15 Wasser- und Bodenproben, teils als Einzel-, teils als Mischproben bearbeitet. Die Proben wurden sowohl auf unterschiedlichen Medien im Schüttelkolben als auch mittels Auftropfmethode auf Agarplatten angesetzt. Der pH-Wert wurde zwischen 6,3 und 6,8 eingestellt, die Kultivierungstemperatur wurde zwischen 20 und 30°C variiert. In ausgewählten Ansätzen wurde TCE zugesetzt, um den Selektionsdruck für ein hohes Abbaupotential zu erhöhen. Die Nährmedien wurden sowohl mit als auch ohne Kupfersalze bereitet, damit die Ausbildung einer sMMO begünstigt wird. Begast wurde mit einem Gemisch 30 % Methan, 70 % Luft.

Am deutlichsten ausgeprägt war das Wachstum unter methanotrophen Bedingungen in einer Mischprobe aus 16 - 22 m Tiefe. Über eine Vielzahl von Passagen wurden 4 verschiedene methanotrophe Bakterienspezies angereichert, die allerdings bisher nicht als Reinkulturen isoliert werden konnten. Dieser Befund ist aus der Kenntnis, daß methanotrophe Kulturen generell besser in Misch- als in Reinkulturen wachsen,

nicht unerwartet. Die erhaltenen Anreicherungskulturen wurden mit dem bekannten „Naphthalintest“ [3] auf die Ausbildung von sMMO, des für die Dechlorierung maßgeblichen Enzyms, untersucht. Es konnte in keinem Fall sMMO-Aktivität nachgewiesen werden, obwohl die ursprünglichen Proben günstige Milieu-bedingungen (Kupferionen nur in Spuren) aufwiesen.

Da in den Bitterfelder Bohrproben keine autochthonen methanotrophen Bakterien mit cometabolischem Abbaupotential nachgewiesen werden konnten, wurde für Modellversuche auf einen Stamm der internen Stammsammlung der Sektion zurückgegriffen. Der Stamm WI 14 war aus einem Abwasser/Gülle-gemisch isoliert worden und kann unter Kupfermangel eine sMMO ausbilden. Die Versuche wurden zunächst in Headspace-Röhrchen von 23 ml Volumen angesetzt, diese wurden bei 25 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Biomassekonzentration betrug ca. 0,2 g/l, die Schadstoffkonzentration wurde zwischen 5 - 16 mg/l für TCE und 2-8 mg/l für Chlorbenzen vorgegeben. Das kupferfreie Nährmedium war gepuffert, so daß der pH-Wert bei 6,5 konstant gehalten werden konnte, die Flüssigkeit wurde mit 2 - 5 % Methan gesättigt. Die Versuche wurden über 48 h durchgeführt, sie wurden durch die Analysen von TCE, Chlorbenzen (gaschromatographisch), Chlorid-, Kupferionen, Nitratstickstoff, CSB (Dr. Lange-Küvettest) und Phosphat (kolorimetrisch nach Reaktion mit VM-Reagenz) kontrolliert.

In Abhängigkeit von der Anfangskonzentration konnte für TCE eine Degradation zwischen 95 und 20 % erreicht werden. Durch die Messung der Chloridkonzentration konnte eine Bilanz erstellt und die vollständige Mineralisierung nachgewiesen werden. In Abb. 1 ist ein Beispiel für einen TCE-Abbau sowie die Zunahme der Chloridkonzentration im Medium dargestellt. Interessant ist, daß bei niedrigen TCE-Anfangskonzentrationen der Abbau bereits nach 6 h fast vollständig abgeschlossen ist.

Mit dem Stamm WI 14 konnten auch Abnahmen von Chlorbenzen gemessen werden: in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration nahm die Chlorbenzenkonzentration innerhalb von 48 h zwischen 60 und 38 % ab.

In Abb. 2 ist die prozentuale Abnahme des Chlorbenzen bei verschiedenen Anfangskonzentrationen sowie in Kontrollversuchen ohne Mikroorganismen dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, daß die Abnahme in den ersten 6 Versuchsstunden am stärksten ist, eine vollständige Abnahme wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen in keinem Fall erreicht. Über den möglichen Abbaumechanismus können noch keine Aussagen getroffen werden, da bislang keine Metabolite analysiert wurden. Eine Aufstellung der Chloridbilanz gibt in diesem Fall keine Aufschlüsse, da Chlorid nur ca. 30 % des Chlorbenzens ausmacht, und die aus der Mineralisierung resultierenden Konzentrationsänderungen innerhalb der Fehlergrenze der Meßmethode liegen.

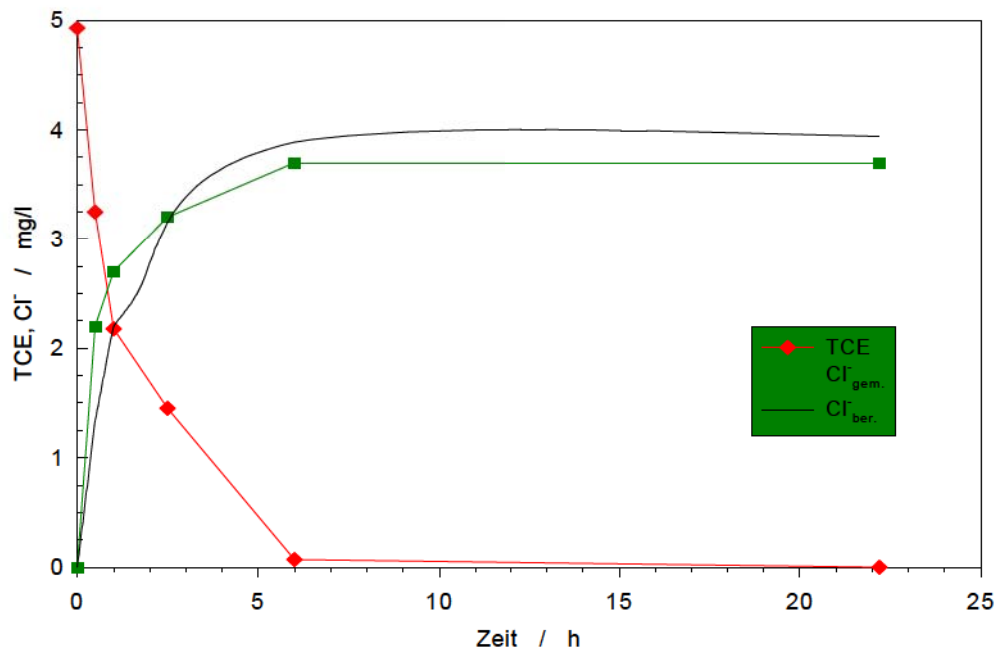


Abb. 1: Degradation von Trichlorethen mittels WI 14

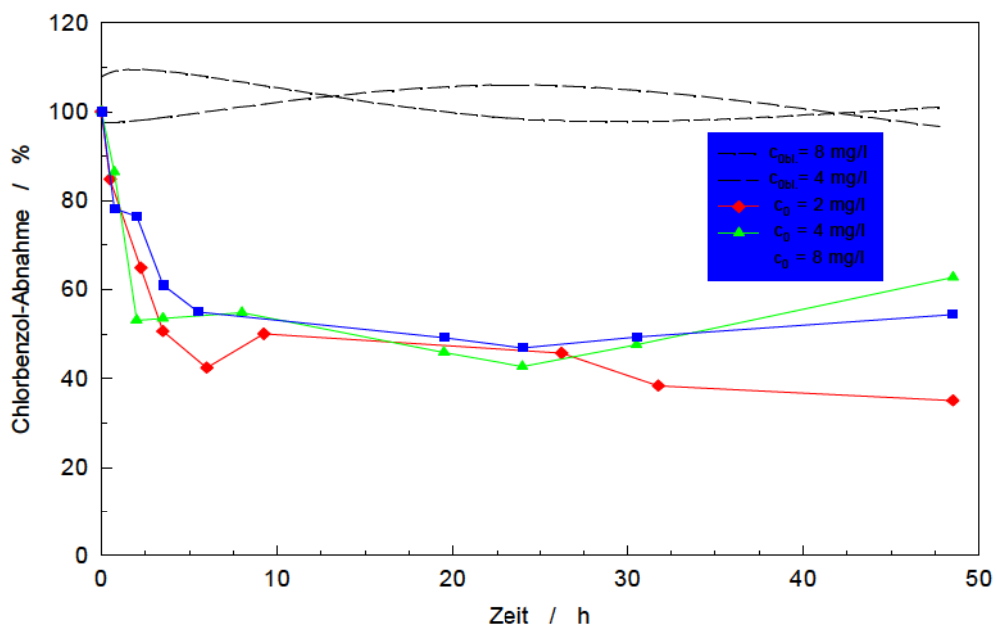


Abb. 2: Chlorbenzol-Abnahme mit WI 14, Anfangskonzentrationen $c_0 = 2, 4, 8$ mg/l und Blindversuche mit Anfangskonzentrationen $c_{0bl} = 4$ u. 8 mg/l

Literatur

- [1] HALDEN, K. (1991): Methanotrophic Bacteria for the in Situ Renovation of Polluted Aquifers, Trans/ChemE, Vol. 69 Part B, Aug.
- [2] SULLIVAN, J.P.& CHASE, H.A.(1995): Biotransformation of Chlorinated and Nonchlorinated Aromatics and Alicyclis by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane Mono-oxygenase, 3th Int. Symp. on Biochemical Engineering, Stuttgart, March 6-8 1995, 123-125
- [3] GRAHAM, D.W.; KORICH, D.G.; LEBLANC, R.P.; SINCLAIR, N.A. & ARNOLD, R.G. (1992): Application of a Colorimetric Plate Assay for Soluble Methane Monooxygenase Activity, Appl. Environm. Microbiol. 58, 7, 2231-2236

Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA)

Bericht zur Machbarkeitsstudie für den Modellstandort Bitterfeld

Holger Weiß¹⁾, Georg Teutsch²⁾, Birgit Daus¹⁾ (Hrsg.)

1) UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
PB Industrie- und Bergbaufolgelandschaften
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig

2) Eberhard-Karls-Universität
Geologisches Institut
Sigwartstraße 10, 72076 Tübingen