

he



UFZ-Bericht

UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 31/2000

Dissertation

**Cometabolische Degradation von
Trichlorethen in Wässern mittels
methanotropher Bakterien**

Matthias Beck

ISSN 0948-9452

Cometabolische Degradation von Trichlorethen in Wässern mittels methanotropher Bakterien

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zum Erlangen des akademischen Grades

DOKTOR RERUM NATURALIUM
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur Matthias Beck
geboren am 07. April 1969
in Köthen

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 06.11.2000



Gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt.

Gutachter:

- Prof. Dr. Hans-Peter Kleber
Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Talstr. 33, 04103 Leipzig
- Prof. Dr. Ulrich Stottmeister
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung,
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig
- Prof. Dr. Jan Páca
Hochschule für Chemische Technologie, Institut für Gärungschemie und Bioverfahrens-
technik, Technická 5, CZ-16628 Praha 6

Bibliographische Beschreibung

Matthias Beck

Cometabolische Degradation von Trichlorethen in Wässern mittels methanotropher Bakterien

Universität Leipzig, Dissertation
S. 94, Lit. 111, Abb. 45, Tab. 10

Referat

Chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW), wie beispielsweise Trichlorethen (TCE), besitzen ein hohes Gefährdungspotential und treten vor allem an Standorten auf, an denen viel mit Lösungsmitteln gearbeitet wurde. Es besteht erheblicher Handlungsbedarf, CKW kontaminierte Habitate zu reinigen. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, abiotische und biotische Methoden. Zu den biotischen Methoden zählen die verbreiteten cometabolischen Reaktionen, zu denen auch methanotrophe Bakterien befähigt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH isolierte Bakterienstämme hinsichtlich Wachstum und Expression der löslichen Methanmonooxygenase (MMO) untersucht. Ein Mikroorganismus (*Methylocystis* sp. GB 14 – DSM 12955) wurde für weitere Untersuchungen der cometabolischen Degradation von TCE ausgewählt. Dieser Stamm gehört zu den Typ II methanotrophen Bakterien und ist in der Lage, sMMO zu bilden. Untersuchungen des Einflusses von Milieubedingungen auf die sMMO-Aktivität zeigten, daß sowohl bei niedrigen Temperaturen (um 12°C) als auch bei hohen TCE-Konzentrationen ($> 100 \text{ mg l}^{-1}$) noch sMMO-Aktivität zu messen ist. In Röhren-, Säulen- und Immobilisatversuchen wurden Bilanzen für Chlor erstellt, wobei eine nahezu vollständige Dechlorierung nachgewiesen wurde. Zur Klärung der Beziehung Wachstumssubstrat – Cosubstrat wurden die Abhängigkeiten der TCE-Abbaugeschwindigkeit von Methan- bzw. TCE-Anfangskonzentration untersucht. Modifizierte Haldane-Kinetiken wurden berechnet. Für die Immobilisierung des methanotrophen Bakteriums wurden LentiKats® verwendet. Die immobilisierten Zellen waren zum Wachstum und zur sMMO-Exprimierung in den LentiKats® fähig. Mit dem Immobilisat war eine zyklische Wiederholung des TCE-Abbaus, nach Regenerierung der sMMO durch erhöhte Applikation von Methan, möglich.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Möglichkeiten der Sanierung von Chlorkohlenwasserstoff-Kontaminationen	1
1.1.1.	Vergleich von abiotischen und biotischen Verfahren	2
1.1.2.	Ausgewählte biologische Sanierungsverfahren	4
1.2.	Methanotrophe Bakterien	10
1.2.1.	Physiologie und Biochemie methanotropher Bakterien	10
1.2.2.	Nutzung methanotropher Bakterien für die Sanierung von CKW-Kontaminationen	16
1.3.	Ziel der Arbeit	26
2.	Materialien und Methoden	27
2.1.	Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen	27
2.2.	Beschreibung der Versuche / Apparaturen	27
2.3.	Meß- und Analyseverfahren	30
2.3.1.	Bestimmung der Biomassekonzentration	30
2.3.2.	Lichtmikroskopische Untersuchungen	30
2.3.3.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	30
2.3.4.	Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit	31
2.3.5.	Bestimmung der sMMO-Aktivität	33
2.3.6.	TCE-Analytik	33
2.3.6.1.	Festphasenmikroextraktion	33
2.3.6.2.	Headspace-Analytik	36
2.3.7.	Chloridbestimmung	36
2.3.8.	Gaskonzentrationsbestimmung	37
2.3.9.	Kupferkonzentration	38
2.3.10.	Nitrat- und Phosphatkonzentration	38
2.3.11.	Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	39
2.4.	Genetische Methoden	39
2.4.1.	Detektion des mmoX- und mmoY-Gens	39
2.4.2.	Random Amplifizierte Polymorphe DNA (RAPD) PCR	39
3.	Ergebnisse	41

3.1.	Screening und Isolation von methanotrophen Bakterien	41
3.1.1.	Wachstum von ausgewählten sMMO-positiven Stämmen	43
3.1.2.	Charakterisierung und Wachstum des Isolats WI 14	47
3.2.	Umweltrelevante Einflüsse auf die sMMO-Aktivität	49
3.2.1.	Niedrige Umgebungstemperaturen	49
3.2.2.	Einfluß der TCE-Konzentration	50
3.3.	Abbau von Trichlorethen (TCE)	51
3.3.1.	Bilanz des Abbaus	51
3.3.2.	Kinetik des TCE-Abbaus in Abhängigkeit von der TCE-Anfangskonzentration	57
3.3.2.	Kinetik des TCE-Abbaus in Abhängigkeit von der Methankonzentration	59
3.3.4.	Modell des Einflusses von TCE- und Methankonzentration auf die TCE-Abbauraten	61
3.3.5.	Aktivität der sMMO während des TCE-Abbaus	63
3.3.6.	TCE-Abbau mit immobilisierten Zellen des Stammes <i>Methylocystis</i> sp. GB 14	64
3.3.7.	Vergleich der TCE-Abbauraten	67
4.	Diskussion	69
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literatur	82

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

AN-NMS	Ammonium-Nitratmineralsalzmedium
BTS	Biomassetrockensubstanz [mg l^{-1}]
CF	Chloroform
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
DCA	Dichlorethan
DCE	Dichlorethen
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikrobiologie in Braunschweig
c-DCE	cis-Dichlorethen
t-DCE	trans-Dichlorethen
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MMO	Methanmonooxygenase
NMS	Nitratmineralsalzmedium
OD	Optische Dichte
PCE	Tetrachlorethen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pMMO	Membrangebundene Methanmonooxygenase
PVAL	Polyvinylalkohol
RAPD-PCR	Random Amplifizierte Polymorphe DNA PCR
sMMO	Lösliche Methanmonooxygenase
TCA	Trikarbonsäurezyklus
TCE	Trichlorethen
VC	Vinylchlorid
a	sMMO-Aktivität [$\text{nmol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$]
r	Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$]
q	Abbaurrate [$\mu\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$]
q _{max}	Maximale Abbaurrate [$\mu\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$]
T _C	Transformationskapazität [mg mg^{-1}]
μ _{max}	Maximale Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}]
c _{TCE}	TCE-Konzentration [mg l^{-1}]
c _{CH₄}	Gelöstmethankonzentration [mg l^{-1}]

K_s	Saturationskonstante [mg l^{-1}]
K_i	Hemmkonstante [mg l^{-1}]
n	Faktor der modifizierten Haldane-Kinetik

1. Einleitung

1.1. Möglichkeiten der Sanierung von Chlorkohlenwasserstoff-Kontaminationen

Chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) sind Hauptkontaminanten an Standorten, an denen viel mit Lösungsmitteln gearbeitet wurde (z.B. Chemische Reinigungen, ehemals militärisch genutzte Standorte u.a.). Die CKW dringen auf Grund ihrer Dichte im Boden bis in größere Tiefen vor und gelangen damit bis in die Grundwasserleiter.

Aus toxikologischer Sicht besitzen die CKW ein hohes Gefährdungspotential. Untersuchungen der US-Environmental Protection Agency (EPA) am Beispiel von Trichlorethen (TCE) zeigen die Wirkung auf Wasserlebewesen, Säugetiere und die menschliche Gesundheit (EPA 1980). Die akute Toxizität für Süßwasserorganismen beginnt bei einer TCE-Konzentration ab $45 \mu\text{g l}^{-1}$, bei Salzwasserorganismen schon ab $2 \mu\text{g l}^{-1}$. Für den Menschen ist TCE hauptsächlich wegen der Wirkung als Karzinogen gefährlich. Als Kriterium für ein erhöhtes Krebsrisiko beim Menschen wurden durch die EPA TCE-Konzentrationen ab $27 \mu\text{g l}^{-1}$, bei einer Konsumierung von 2 l Trinkwasser und 6,5 g Fisch täglich, ermittelt. Zum Schutz der natürlichen Ressourcen sowie der menschlichen Gesundheit wurden weitreichende Gesetze und Verordnungen erlassen. In der Trinkwasserverordnung der Bundesrepublik Deutschland ist der Grenzwert für organische Chlorverbindungen als Summenparameter mit $10 \mu\text{g l}^{-1}$ festgelegt (TVO-BRD). Für Boden- und Grundwasserkontaminationen werden die holländischen Richtwerte als inoffizielle Richtlinie genommen. Im Boden sind aliphatische CKW in der Summe bis 7 mg kg^{-1} Trockenmasse und im Grundwasser bis $15 \mu\text{g l}^{-1}$ tolerierbar. Ab Konzentrationen von 70 mg kg^{-1} Trockenmasse im Boden bzw. $70 \mu\text{g l}^{-1}$ im Grundwasser sind Sanierungsmaßnahmen zwingend erforderlich (NIEDERLÄNDISCHES MINISTERIUM FÜR WOHNUNGSWESEN, RAUMORDNUNG UND UMWELT).

Zum Schutz der menschlichen Gesundheit wurde außerdem die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) in der Umgebungsluft eingeführt. Diese MAK-Werte betragen für Tetrachlorethen, Trichlorethen, trans/cis-1,2-Dichlorethen, 1,1-Dichlorethen und Chloroform jeweils 345, 270, 790, 8 bzw. 10 mg m^{-3} Luft (RIPPEN). Für Dichlorethan ist kein MAK-Wert festgelegt.

Entsprechend den aufgeführten Grenzwerten, Richtlinien und Gefährdungspotentialen besteht erheblicher Handlungsbedarf zur Sanierung CKW-kontaminierter Standorte.

1.1.1. Vergleich von abiotischen und biotischen Verfahren

Für die Sanierung von CKW-kontaminierten Standorten gibt es zwei Hauptstrategien, die abiotische und die biotische Sanierung. In Abb. 1 sind schematisch die Möglichkeiten für die Sanierung dargestellt.

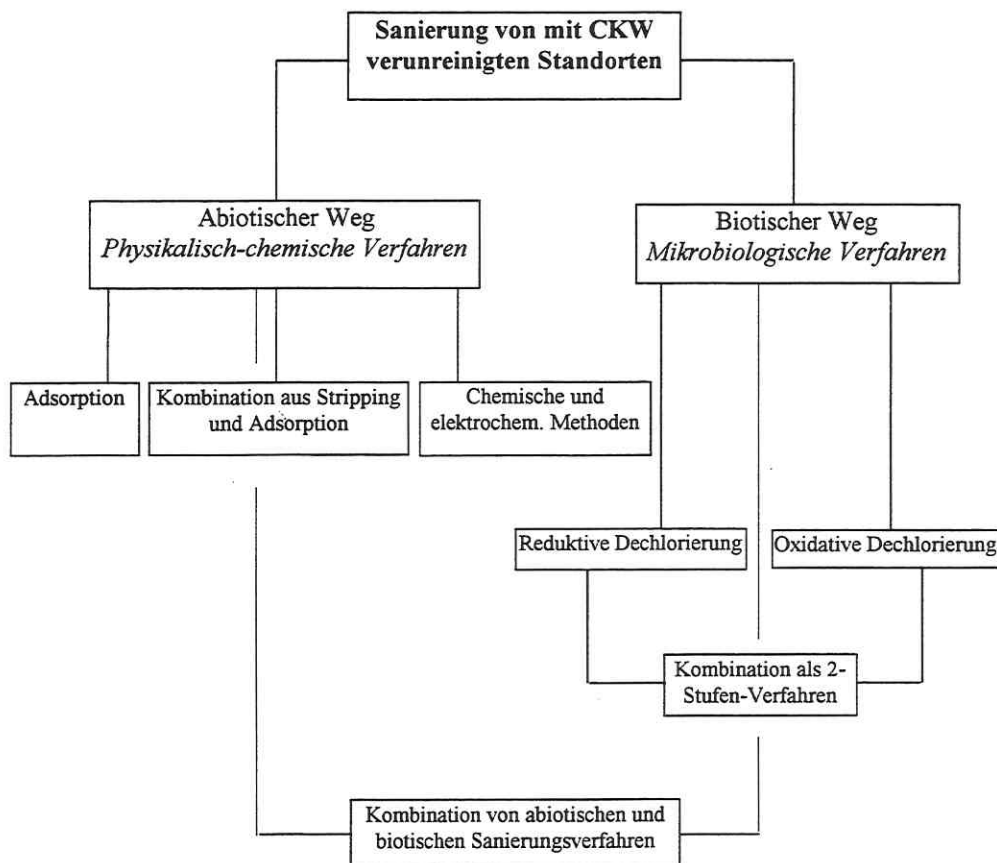
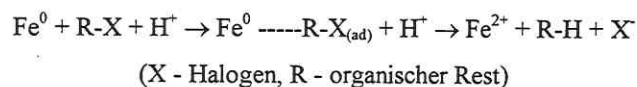


Abb. 1: Möglichkeiten der Sanierung von CKW-kontaminierten Standorten

Abiotische Verfahren nutzen chemische Reaktionen bzw. physikalische Mechanismen oder eine Kombination von beiden zur Sanierung. Ende der 70er Jahre wurden zwei Verfahren entwickelt und für die Wasseraufbereitung angewandt (HANERT 1988):

- Strippverfahren
- Adsorptionsverfahren

Bei den Stripverfahren werden die leichtflüchtigen Kohlenwasserstoffe durch Ausblasen mit Luft entfernt. Die Anlagerung der Schadstoffe an Sorbenten (z.B. Aktivkohle (KOCHETKOVA et al. 1987, KOHLER und HALBARTSCHLAGER 1986, BALDAUF 1985), Adsorberharze (ISACOFF und BITTNER 1979, ASCHE 1990)) wird bei den Adsorptionsverfahren genutzt. Da Stripverfahren nie allein verwendet werden können, wird häufig die Kombination von Strip- und Adsorptionsverfahren angewandt (BALDAUF 1985). Die beim Strippen beladene Luft wird dazu über einen Adsorber geleitet. Bei diesen Verfahren konzentrieren sich die Schadstoffe lediglich auf und werden nicht zu unschädlichen Stoffen umgewandelt. Damit besteht weiterhin das Problem der Entsorgung der beladenen Sorbenten. Eine Umwandlung der Schadstoffe erfolgt bei chemischen bzw. elektrochemischen Methoden. Zur elektrochemischen Dechlorierung von PCE wird eine Elektrolysezelle, in der Kathoden- und Anodenraum getrennt sind, eingesetzt (GEMMLER et al. 1990). In der Elektrolysezelle kommt es zur Abspaltung von Chlorid. Außer PCE waren Chloroform (CF), Methylenchlorid und TCE durch diese Methode abbaubar. Die Probleme dieses Verfahrens liegen in der elektrolitischen Zersetzung von Wasser, also der Entstehung von Wasserstoff, in der Verunreinigung der Elektroden und in den Abdampfverlusten. Für ein Übertragen in eine industriell anwendbare Verfahrenstechnik müssen noch bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden: z.B. Verfahrenssicherheit und -beherrschbarkeit und ein wirtschaftliches Kosten-Nutzen-Verhältnis. Eine weitere Möglichkeit der abiotischen Dehalogenierung ist die Nutzung von elementaren Metallen, z.B. Eisen (MATHESON und TRATNYEK 1994). Die Dehalogenierung erfolgt nach folgendem Schema:



Eine Optimierung der Reaktion wurde durch die Palladierung der Eisenoberfläche erreicht (MUFTIKAN et al. 1995). Bei der Dehalogenierung von Trichlorethen und Tetrachlorethan entstanden Ethan, Butan, Hexan und andere Produkte.

Dieses Verfahren der Dehalogenierung mittels elementarem Eisen kommt bei einer inzwischen weit verbreiteten Methode für in-situ Sanierungen, den reaktiven Wänden und "Funnel-and-Gate" Systemen, zum Einsatz. Reaktive Wände werden im Grundwasserstrom in den Boden eingebaut und mit den entsprechenden Stoffen für die Dehalogenierung befüllt. Bei "Funnel-and-Gate" Systemen handelt es sich um undurchlässige Wände (Funnel), die an einer bzw. an mehreren Stellen mit durchlässigen, reaktiven Zonen (Gate) versehen sind. Die "Funnel-and-Gate" Systeme werden ebenfalls in den Grundwasserstrom eingebaut. Reaktive Wände werden beispielsweise in einer kanadischen Arbeit (GILLHAM 1996) beschrieben. Es wird elementares Eisen für die Dehalogenierung von PCE, TCE und CF genutzt. Das Eisen wurde in die reaktive Wand gefüllt, um den Grundwasserstrom zu reinigen. Produkte der Dehalogenierung waren Ethane, Ethene, Chlorid, DCE und VC. Reaktive Wände und "Funnel-and-Gate" Systeme sind, infolge der tiefbaulichen Maßnahmen, sehr kostenintensiv.

Die Oxidation von Trichlorethen und Tetrachlorethen mittels Wasserstoffperoxid ist eine weitere Möglichkeit der abiotischen Sanierung (HIRVONEN et al. 1996). Es wurden zwei Systeme getestet: O_3/H_2O_2 und UV/H_2O_2 . In beiden Systemen wurde sowohl Trichlorethen als auch Tetrachlorethen vollständig mineralisiert. Studien zu dieser Methode liegen bisher im Labormaßstab vor. Feldstudien und vor allem Rentabilitätsuntersuchungen stehen noch aus.

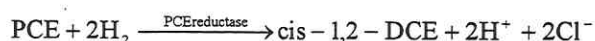
1.1.2. Ausgewählte biologische Sanierungsverfahren

Biologische oder auch biotische Verfahren sind Sanierungsverfahren, bei denen das Sanierungsziel durch biologische Aktivitäten erreicht wird. Chlorierte Kohlenwasserstoffe können durch Mikroorganismen durch verschiedene Möglichkeiten entfernt werden (MÜLLER und LINGENS 1987):

- Hydrierung
- Dehydrodehalogenierung
- hydrolytische Dehalogenierung
- oxidative Dehalogenierung

Chlor kann durch Hydrierung reduktiv entfernt werden, es wird durch Wasserstoff ersetzt. Für diese Reaktion müssen Reaktionsäquivalente zur Verfügung gestellt werden. Folglich laufen

diese Reaktionen unter anaeroben, meist methanogenen oder denitrifizierenden Bedingungen ab. Chlor kann allerdings auch zusammen mit einem Wasserstoffatom des benachbarten Kohlenstoffs entfernt werden. Da eine Doppelbindung entsteht, ist diese Dehydrodehalogenierung nur bei gesättigten aliphatischen Halogenkohlenwasserstoffen möglich. Bei der hydrolytischen Dehalogenierung wird das Chlor durch eine Hydroxylgruppe aus dem Wasser ersetzt. Die oxidative Dehalogenierung ersetzt das Chlor ebenfalls durch eine Hydroxylgruppe, wobei der Sauerstoff darin aus der Luft stammt. Gleichzeitig wird bei der Reaktion das Substrat oxidiert. In Tabelle 1 sind die Bakterienstämme aufgeführt, bei denen die Dehalogenierung nachgewiesen wurde. Es sind einige Bakterienstämme bekannt, die über ein Enzymsystem mit Dehalogenasen verfügen (BELKIN 1992, DOLFING 1990, HOLLIGER 1992, NEUMANN et al. 1994). Diese Bakterien verwenden die CKW als Kohlenstoff- und Energiequelle. In *Dehalobacter restrictus* verläuft die Dehalogenierung nach folgender Gleichung (HOLLIGER und SCHUMACHER 1994):



Die Dehalogenierungsraten liegen bei 0,005 mg PCE g⁻¹ Protein h⁻¹. Als Produkte des Metabolismus entstehen Alkohole, Ketone, Säuren bzw. ihre halogenierten Derivate. Ein Patent von Hazen und Mitarbeitern (HAZEN und LOPEZ-DE-VICTORIA 1992) beschreibt ein Verfahren, bei dem TCE in den Boden injiziert wird, um die TCE-abbauende Bakterien, wie *Welchia alkenophila*, zu stimulieren und damit die TCE-Degradation zu erhöhen.

In zahlreichen Untersuchungen arbeitet man mit nicht identifizierten Bakterienkulturen (NEUMANN et al. 1994, DISTEFANO et al. 1991, MEYER et al. 1993, CARTER und JEWELL 1993, VIJGEN 1996). Meist werden Gruppen von Stämmen durch Substratzugabe stimuliert.

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung von CKW-Abbaureaktionen leistete Kästner in seiner Dissertation (KÄSTNER 1988). Der Autor beschreibt in seiner Arbeit die Isolation von Bakterienkulturen aus kontaminierten Standorten und entwickelt Methoden zur schnellen Erkennung des Abbaus bei Reinkulturen.

Bei in-situ Untersuchungen wird das Potential an autochthonen Mikroorganismen verwendet (MEYER et al. 1993, VIJGEN 1996, ROBERTS 1989). Der Cometabolismus der Mikroorganismen wird genutzt. Cometabolismus ist die Transformation eines nicht zum

Wachstum verwendbaren Substrats in Anwesenheit eines Substrats, welches zum Wachstum nutzbar ist (FRITSCH 1990). Die Transformationen sind vielfach Einschritt-Reaktionen. Das verwertbare Substrat ermöglicht das Wachstum der Mikroorganismen, sein Metabolismus stellt Energie und Reaktionsäquivalente für enzymatische Reaktionen bereit. Es sind folgende Transformationsreaktionen bekannt: Reduktion, Oxidation und Hydrolyse. Handelt es sich bei der Transformationsreaktion um eine Oxidation, spricht man von Co-Oxidation. Voraussetzung für derartige Transformationsreaktionen ist das Vorhandensein von Oxygenasen. Sowohl Wachstumssubstrat als auch Cosubstrat werden durch das Oxygenase-System transformiert. Abb. 2 zeigt den Mechanismus der Co-Oxidation.

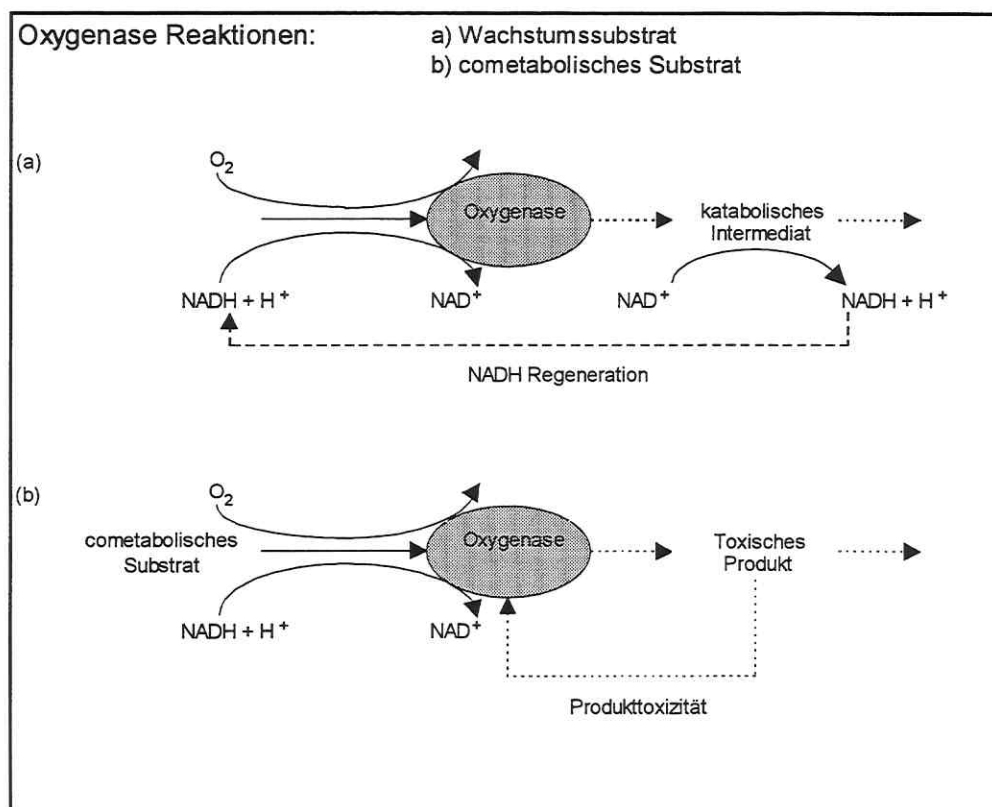


Abb. 2: Oxygenase Reaktionen beim Cometabolismus (nach CHANG und ALVAREZ-COHEN 1995)

Die wachsenden Zellen haben zwei Funktionen. Sie exprimieren das Oxygenase-System und stellen durch den Intermediärstoffwechsel die notwendigen Cofaktoren, z.B. Reduktionsäquivalente und Energie, zur Verfügung (FRITSCH 1998). Bei der Transformation des Cosubstrats werden diese Cofaktoren nicht gebildet.

Zwischen Wachstums- und Cosubstrat besteht eine Konkurrenz um das Oxygenase-Enzym. Meist kommt es zur kompetitiven Hemmung zwischen beiden Substraten.

In einer Studie zur in-situ Sanierung eines mit CKW verunreinigten Standortes werden die autochthonen Mikroorganismen durch das Einbringen von verschiedenen Substraten stimuliert (MEYER et al. 1993). Es wurden methanogene Bedingungen mit Saccharose bzw. Acetat als Cosubstrate und sulfatreduzierende Bedingungen mit Lactat als Cosubstrat getestet.

Die oxidative Dechlorierung wird durch Oxygenasen katalysiert. Reaktionsprodukte sind hier Chlorid, Ethene, Ethane und Kohlendioxid bei vollständiger Mineralisierung.

Tabelle 2 zeigt für die Biodegradation von TCE typische Cosubstrate und die dazugehörigen Transformationskapazitäten. Diese Transformationskapazitäten wurden für Mischkulturen ermittelt. Die höchste Transformationskapazität hat demzufolge eine mit Methan angereicherte Mischkultur und niedrigste Transformationskapazität wurde für die mit Propan angereicherte Mischkultur bestimmt.

Tab. 2: Transformationskapazitäten T_c für die TCE Degradation (CHANG und ALVARZ-COHEN 1995)

Bakterien	T_c (mg mg ⁻¹)
methan-oxidierende	0,0500
propan-oxidierende	0,0065
toluen-oxidierende	0,0073
phenol-oxidierende	0,0310

Die Kombination von aerober und anaerober Dechlorierung bei der in-situ Sanierung wird in einer anderen Arbeit untersucht (VIJGEN 1996). PCE und TCE werden anaerob und DCE wird aerob degradiert. Als Cosubstrat wird Phenol in den Standort eingebracht. Die Injektion von Phenol in den Boden ist auf Grund der Toxizität des Phenols problematisch. Als Cosubstrat ist auch Toluol oder Propan verwendbar (CHANG und ALVAREZ-COHEN 1995). In dieser Studie wurden die CKW-Abbaufähigkeiten von methan-, propan-, phenol- und toluenoxidierenden Mischkulturen verglichen. Nur die methan- und propanverwertenden

Mischkulturen konnten sowohl gesättigte als auch ungesättigte CKW degradieren. Die Phenol- und Toluolverwerter degradierten nur ungesättigte CKW, wie z.B. TCE.

Abbaukapazitäten für die Biodegradation von CKW wurden ebenfalls bei methanotrophen Bakterien gefunden (COLBY et al. 1977). Bei der Dehalogenierung durch Methanotrophe handelt es sich um einen Cometabolismus. In einem Patent (HANSON und LIPSCOMB 1989) wird eine Methode zur Degradation von TCE mit einer Reinkultur bzw. mit gereinigter sMMO in vitro beschrieben.

Die Kombination von abiotischen und biotischen Verfahren kann ebenfalls angewandt werden. Beispielsweise kann durch Stripping mit CKW beladene Luft durch einen Biofilter bzw. durch einen Bioreaktor geleitet werden, in denen der biologische Abbau der CKW erfolgt (MEYER et al. 1995). An diesem Modellstandort Eppelheim wurde die integrierte Behandlung von Boden, Luft und Wasser untersucht. Es lagen hauptsächlich reduktive Bedingungen vor.

Tab. 1: Auswahl von Mikroorganismen, bei denen die Dehalogenierung nachgewiesen wurde

Mikroorganismus	Untersuchungsobjekt	Referenz
<i>Hyphomicrobium</i>	Nachweis des Dichlormethan-Abbaus bei gleichzeitiger Denitrifikation	KÄSTNER 1988
<i>Pseudomonas</i> DM1 <i>Hyphomicrobium</i> DM2	Chlormethan, Dichlormethan als Kohlenstoff- und Energiequelle	BELKIN 1992
<i>Xanthobacter autotrophicus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,2-Dichlorethan (DCA) als Kohlenstoff- und Energiequelle	BELKIN 1992
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	Kopplung von reduktiver Dehalogenierung und Wachstum, anaerob	DOLFING 1990
<i>Dehalobacter restrictus</i>	Dechlorierung von PCE als Elektronenakzeptor	HOLLIGER 1992
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Dechlorierung von PCE als Elektronenakzeptor	NEUMANN et al. 1994
nicht identifizierte Bakterienkultur DCB-1	anaerobe Dechlorierung von PCE	FATHEPURE et al. 1987
nicht identifizierte Methanolverwerter	anaerobe Dechlorierung von PCE zu Ethen und VC	DISTEFANO et al. 1991
autochtone, nicht identifizierte Bakterienkulturen	CKW-Abbau unter methanogenen (Wachstumssubstrat Saccharose oder Acetat) oder unter sulfatreduzierenden (Wachstumssubstrat Lactat) Bedingungen (die Autoren bezeichnen die Wachstumssubstrate fälschlicherweise als Cosubstrate)	MEYER et al. 1993
anaerobe Mischkultur	reduktive Dechlorierung von PCE zu TCE, 1,2-Dichlorethen (DCE), VC und Ethen, Cometabolismus mit Saccharose als Cosubstrat	CARTER und JEWELL 1993
autochtone, nicht identifizierte Phenolverwerter	anaerobe Dechlorierung von PCE und TCE, aerobe Dechlorierung von DCE, Cometabolismus mit Phenol als Cosubstrat	VIJGEN 1996
nicht identifizierte Toluolverwerter	cometabolische aerobe Dechlorierung von ungesättigten CKW	CHANG und ALVAREZ-COHEN 1995
nicht identifizierte Propanverwerter	cometabolische aerobe Dechlorierung von gesättigten und ungesättigten CKW	CHANG und ALVAREZ-COHEN 1995
nicht identifizierte Benzol-, Toluol- und Katecholverwerter	cometabolische aerobe Dechlorierung von TCE nur durch Benzol- und Toluolverwerter, mit Katecholverwerter keine Dechlorierung	LU et al. 1995
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	oxidative Dechlorierung von TCE, CF und DCE, Cometabolismus mit Methan als Kohlenstoffquelle	OLDENHUIS et al. 1991
<i>Methylosinus sporium</i> 5	oxidative Dechlorierung von TCE, Cometabolismus mit Methan als Kohlenstoffquelle	BOWMAN und SAYLER 1994
<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	oxidative Dechlorierung von TCE, Cometabolismus mit Methan als Kohlenstoffquelle	BOWMAN und SAYLER 1994
<i>Methylomonas methanica</i> 68-1	oxidative Dechlorierung von TCE, Cometabolismus mit Methan als Kohlenstoffquelle	BOWMAN und SAYLER 1994
<i>Methylocystis</i> sp. 9BB	oxidative Dechlorierung von TCE, Cometabolismus mit Methan als Kohlenstoffquelle	BOWMAN und SAYLER 1994
<i>Methylocystis</i> sp. M	oxidative Dechlorierung von TCE, Cometabolismus mit Methan als Kohlenstoffquelle	OKADA et al. 1995

1.2. Methanotrophe Bakterien

1.2.1. Physiologie und Biochemie methanotropher Bakterien

Mit der Existenz von methanoxidierenden Bakterien beschäftigt man sich schon viele Jahre (SÖHNGEN 1906, LEADBETTER und FOSTER 1958). Damals gelang es allerdings nicht, diese als Reinkulturen zu isolieren. Die ersten Isolate wurden alle als Varianten einer Spezies, *Pseudomonas methanica*, charakterisiert (LEADBETTER und FOSTER 1958, DWORKIN und FOSTER 1956). In den 60iger Jahren wurden dann zwei Spezies gramnegativer, aerober Methanutilisierer isoliert. Es waren *Methanomonas methanooxidans* (BROWN et al. 1964) und *Methylococcus capsulatus* (FOSTER und DAVIS 1966).

Anfang der 70iger Jahre gelang es dann einer Gruppe unter Whittenbury (WHITTENBURY et al. 1970) mehr als 100 gramnegative, strikt aerobe, methanutilisierende Bakterien zu isolieren. Sie klassifizierten die Bakterien anhand ihrer Morphologie und Feinstruktur. Es wurde eine Einteilung in fünf Gruppen und in weitere Untergruppen vorgenommen. Die fünf Gattungen wurden *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylomonas*, *Methylobacter* und *Methylococcus* benannt.

Eine wichtige taxonomische Eigenschaft der Methanotrophen sind die intrazellulären Membranstrukturen (HIGGINS et al. 1981, WHITTENBURY und DALTON 1983). Die Einteilung erfolgt im wesentlichen in drei Gruppen auf Grund der Lokalisierung der intrazellulären Membranen, der Fähigkeit zur Rosettenbildung, des Weges der Kohlenstoffassimilation, der Typen von Zysten und der Vollständigkeit bzw. Unvollständigkeit des Zitronensäurezyklus (tricarboxylic acid cycle - TCA). In Tabelle 3 sind die Gruppen und ihre Unterschiede dargestellt (WHITTENBURY und DALTON 1983).

Tab. 3: Einteilung der methanotrophen Bakterien

	Typ I	Typ II	Typ X
Morphologie	Stäbchen	Stäbchen, Spiralen	Kokken
Membranstruktur			
- Bündel von Bläschen zentral oder am Rand angeordnet	Ja	Nein	Ja
- gepaarte Membranen parallel zur cytoplasmatischen Membran	Nein	Ja	Nein
Ruhender Zustand	Cysten	Exosporen oder Cysten	Cysten
Rosettenbildung	Nein	Ja	Nein
Kohlenstoffassimilationsweg	RuMP ^a	Serin ^b	RuMP/Serin
TCA	unvollständig	vollständig	unvollständig
CO ₂ Fixierung	Nein	Nein	Ja
Beispiel	<i>Methylobacter</i> <i>methanica</i>	<i>Methylobacter</i> <i>trichosporium</i>	<i>Methylobacter</i> <i>capsulatus</i>

^a Einbindung des Formaldehyds über den Ribulosemonophosphat-Zyklus

^b Einbindung des Formaldehyds über den Serin-Zyklus

Die Unvollständigkeit des TCA bei Typ I und Typ X Methanotrophen besteht im Fehlen des Enzyms 2-Oxoglutaratdehydrogenase. Alle anderen enzymatischen Aktivitäten, verbunden mit dem TCA, sind nachgewiesen worden, wenn auch auf relativ niedrigem Niveau.

Die Primäroxidation des Methans wird durch die Methanmonooxygenase katalysiert. Die weitere Utilisierung erfolgt über Methanol, Formaldehyd, Formiat bis zum Kohlendioxid (siehe Abb. 3).

Das Formaldehyd wird bei methanotrophen Bakterien über zwei verschiedene Assimilationswege in den Kohlenstoffmetabolismus eingebunden. Bei den Typ II Methantrophen ist es der Serinweg (Abb. 4). Formaldehyd wird an Glycin unter Serinbildung angelagert. Eine zweite C₁-Verbindung wird bei dieser Assimilation eingebunden. Kohlendioxid wird durch die PEP-Carboxylase in Oxalacetat eingebaut. Das entstehende Acetyl-CoA ist die Ausgangsverbindung

für den Aufbau der Zellsubstanz. Dieser Weg der Kohlenstoffassimilation wird von *Methylosinus*- und *Methylocystis*-Arten genutzt.

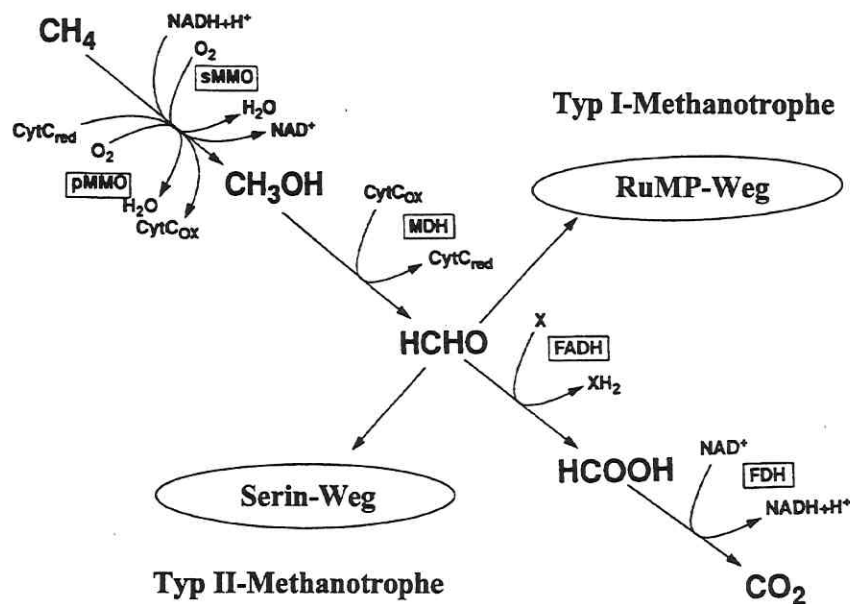


Abb. 3: Methanoxidation in methanotrophen Bakterien (HANSON und HANSON 1996)

Der zweite Assimilationsweg der methanotrophen Bakterien ist der Ribulosemonophosphat Zyklus (Abb. 5). Er wird von *Methylococcus* Arten genutzt. Das Formaldehyd wird durch Kondensation mit einer aktivierten Pentose (Ribulose-5-phosphat) eingebunden. Im Ribulosemonophosphat Zyklus entstehen zwei Triosen, die zum einen in den Anabolismus gehen und zum anderen zur Regenerierung des Ribulose-5-phosphats dienen.

Das Interesse zur Nutzung methanotropher Bakterien lässt sich in drei Hauptetappen einteilen. Die Gewinnung von Einzellerprotein (single cell protein - SCP) aus Methan bzw. Erdgas kann als die erste dieser Etappen betrachtet werden. Ein Patent von Wendlandt (WENDLANDT et al. 1988) beschreibt unter anderem ein Verfahren zur unsterilen Kultivierung einer methanotrophen Mischkultur auf Methan bzw. Erdgas. Das gewonnene Endprodukt enthält 75% Rohprotein und alle lebenswichtigen Aminosäuren.

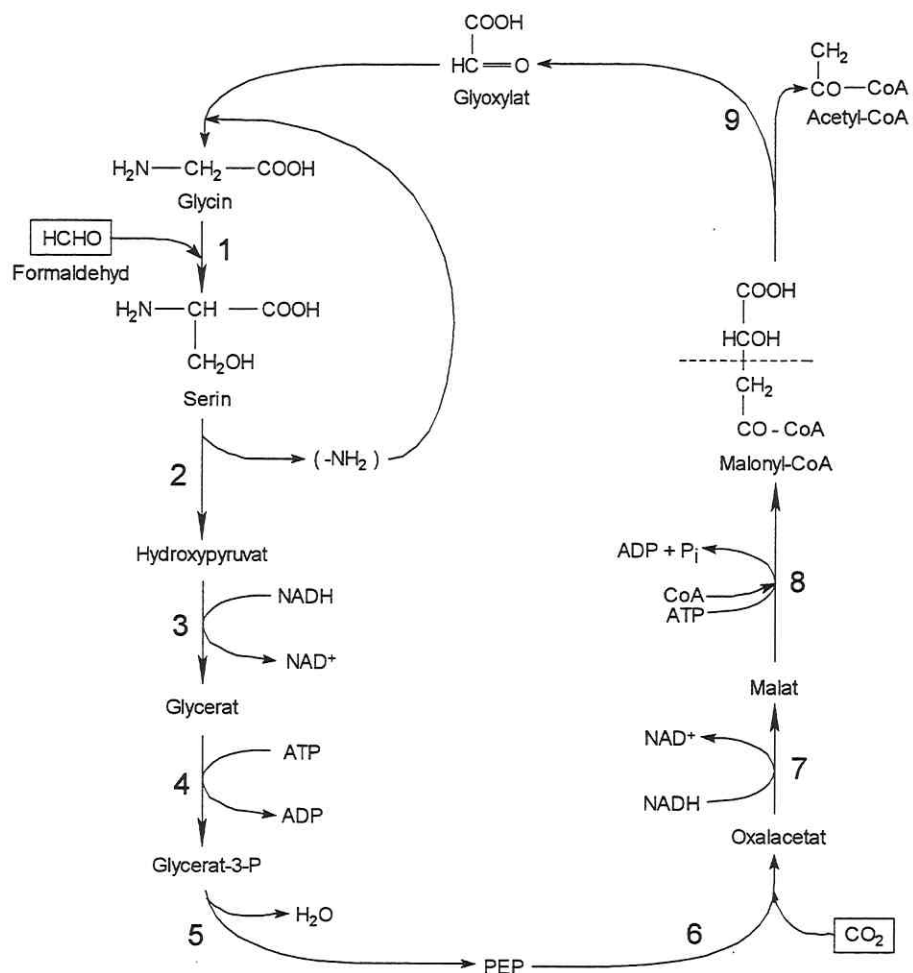


Abb. 4: Serinweg (FRITSCH 1990)

1 - Serinhydroxymethyltransferase, 2 - Seringlyoxylat-Aminotransferase, 3 - Hydroxypyruvat-Reductase, 4 - Glyceratkinase, 5 - Phosphoglyceratmutase und Enolase, 6 - PEP-Carboxylase, 7 - Malatdehydrogenase, 8 - Malyl-CoA-Synthase, 9 - Maleyl-CoA-Lyase

Die zweite Etappe war die Nutzung von methanotrophen Bakterien zur Biotransformation von Kohlenwasserstoffen (DALTON 1980). Es wurde die Fähigkeit der Methanmonooxygenase (MMO) nicht nur Methan, sondern auch Alkane, substituierte Methanderivate, Alkene, Ether,

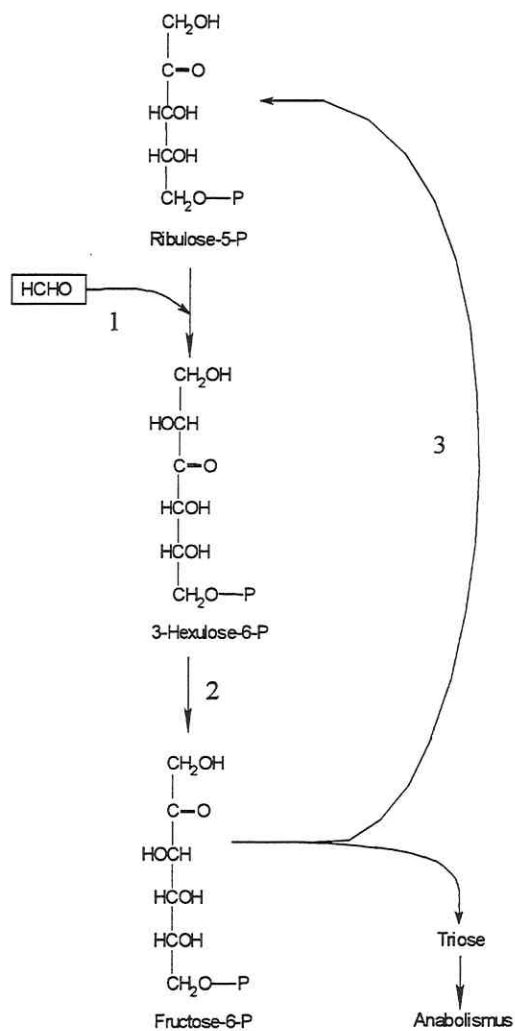


Abb. 5: Ribulosemonophosphat-Weg (FRITSCH 1990)

1 - Hexulose-6-phosphat-Synthase, 2 - Hexulosephosphat-Isomerase, 3 - Transaldolase-Transketolase + Pentophosphat-Isomerase + Epimerase

aromatische und heterozyklische Kohlenwasserstoffe zu oxidieren, gefunden. In dieser Fähigkeit widerspiegelt sich die geringe Substratspezifität der MMO.

In der Verwertung eines breiten Substratspektrums durch die Methanmonooxygenase liegt die Bedeutung der methanotrophen Bakterien für die Lösung von Umweltproblemen.

Die MMO kann in den Zellen in zwei Formen vorliegen. Die lösliche Form der MMO (soluble methane monooxygenase - sMMO) ist gelöst im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Die zweite Form ist die membrangebundene oder partikuläre Form der MMO (particulate methane monooxygenase - pMMO). Die meisten Untersuchungen gibt es über die sMMO, da die Isolation der löslichen Fraktion weniger kompliziert ist (TONGE et al. 1977, WOODLAND und DALTON 1984) und die Aktivität der pMMO sehr von der Funktionalität der Membranstrukturen abhängig ist, die bei der Isolation zerstört werden. Über die sMMO weiß man, daß sie sich aus drei Komponenten, den Komponenten A, B und C, zusammensetzt (WOODLAND und DALTON 1984). Die Komponente A ist eine Hydroxylase, die in die Untereinheiten α , β und δ unterteilt wird. Die Komponente B stellt ein Regulationsprotein dar und C ist ein Flavoprotein. In Abb. 6 ist der Mechanismus der Methanoxidation durch die MMO dargestellt.

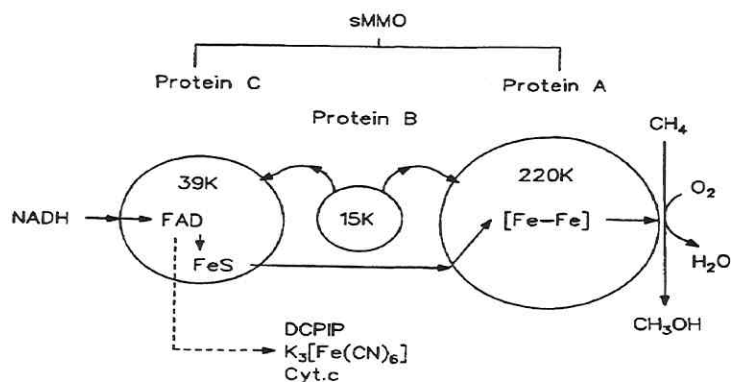


Abb. 6: Mechanismus des Elektronentransfers durch den Methanmonooxygenasekomplex (DALTON 1991)

Hauptregulator beim Umschalten zwischen sMMO- bzw. pMMO-Expression ist die Kupferkonzentration. Sie beeinflusst das Zusammenwirken der drei Untereinheiten der Komponente A der sMMO (ANTHONY 1986). Untersuchungen ergaben, daß die Aktivität der MMO bis zu einer Kupferkonzentration von 1 μM Cu²⁺ hauptsächlich in der löslichen Fraktion zu finden war (BURROWS et al. 1984). Außerdem ist für die Expression der sMMO ein Wachstum mit Nitrat als Stickstoffquelle notwendig. Die Aktivität der MMO in ihrer Gesamtheit kann durch Oxidation von Propylen zu Propylenoxid bestimmt werden (COLBY et al. 1977). Der Nachweis des sMMO basiert auf der quantitativen Identifizierung der Reaktionsprodukte von

für die sMMO typischen Reaktionen. Eine dieser Methoden ist die Oxidation von Naphthalin zu Naphthol und dessen spektrofotometrischer Nachweis (PARSON et al. 1955, BRUSSEAU et al. 1990). Eine zweite Möglichkeit ist die Oxidation von Cyclohexan zu Cyclohexanol (GRAHAM et al. 1993).

1.2.2. Nutzung methanotropher Bakterien für die Sanierung von CKW-Kontaminationen

Die geringe Substratspezifität der MMO läßt die Schlußfolgerung zu, daß außer gesättigten, ungesättigten und aromatischen Kohlenstoffen auch deren halogenierte Derivate durch die MMO oxidiert werden können. Ende der 70er Jahre wird diese Hypothese durch eine Arbeit von Colby et al. bestätigt (COLBY et al. 1977). Die Oxidation von Mono-, Di- und Trichlormethan durch ein Enzymextrakt aus *Methylococcus capsulatus* wurde nachgewiesen. Erst ab Mitte der 80er Jahre wurden Untersuchungen hinsichtlich der Anwendbarkeit methanotropher Bakterien für die Biodegradation von CKW fortgesetzt. Zunächst beschränkten sich die Untersuchungen auf nicht weiter identifizierte Mikroorganismen. Beispielsweise wurden Abbauversuche von TCE in ungesättigten Bodensäulen durchgeführt (WILSON und WILSON 1985). Das TCE wurde degradiert, wenn die Säule mit einem Gemisch aus 0,6 % Erdgas in Luft begast wurde. Mittels ^{14}C -markiertem TCE wurde Kohlendioxid als Reaktionsprodukt gefunden. Die Degradation von Chloroform zu Kohlendioxid wurde ebenfalls in einer Bodensäule mit einem Erdgas-Luft-Gemisch untersucht (STRAND und SHIPPERT 1986). Der nächste Schritt waren Abbauuntersuchungen mit methanutilisierenden Anreicherungskulturen (FOGEL et al. 1986). TCE, Vinylchlorid und 1,2-Dichlorethen wurden durch eine Mischkultur, die auf Methan als Kohlenstoffquelle angereichert wurde, zu Kohlendioxid degradiert. Untersuchungen mit ^{14}C -TCE bewiesen, daß ca. 50% des TCE zu Kohlendioxid umgesetzt wurden. Tetrachlorethen wurde nicht abgebaut, Acetylen, Methanol und Propanol inhibieren die Biodegradation. Bereits 1985 begannen Wissenschaftler der Stanford University mit Studien zur in-situ Sanierung von Aquiferen, die mit aliphatischen Chlorkohlenwasserstoffen kontaminiert waren (SEMPRINI et al. 1987, 1989, 1992). Die Studie wurde auf einer Marinebasis in der Nähe von San Francisco (Moffett Naval Air Station) durchgeführt. Für die Biostimulation reichte das Einbringen von gelöstem Methan

und Sauerstoff aus. Eine Zugabe von zusätzlichen Nährstoffen war nicht nötig. Die geologische Charakteristik wurde durch Bodenproben und -bohrungen bestimmt. Der Flüssigkeits- und Kontaminantentransport wurde mit Bromid-Tracer-Tests untersucht. Die Kontaminanten sind in Konzentrationen von 50-100 $\mu\text{g l}^{-1}$ injiziert worden. Die Autoren stellten im Verlaufe einiger Wochen eine sinkende Methankonzentration und eine Biotransformation des TCE fest. Nach Beendigung der Methaninjektion sank die Konzentration des Intermediats Trichlorethen Epoxid. Bei der Untersuchung der Mikroorganismenflora konnten Reinkulturen von methan- und ethenutilisierenden Bakterien isoliert werden, die beide zur TCE Transformation fähig sind. Versuche mit verschiedenen Methankonzentrationen bestätigten die Theorie der kompetitiven Inhibierung. TCE Konzentrationen von mehr als 10 mg l^{-1} wurden als inhibierend für Methanoxidation und TCE Transformation ermittelt. Die Autoren schlußfolgern aus ihren Ergebnissen, daß eine in-situ Biostimulation angesiedelter methanotropher Mischkulturen ein durchaus erfolgversprechende Möglichkeit zur cometabolischen Biotransformation von chlorierten Kontaminanten ist.

Versuche zur gezielten Injektion von gelöstem Methan, Propan und Luft zur Biostimulation der autochthonen Mikroorganismen folgten (WILSON et al. 1987). Auf Grund des gewachsenen Interesses für die Degradationsfähigkeit der methanotrophen Bakterien war es notwendig, den Mechanismus der Dechlorierung näher zu untersuchen. Dazu wurden Versuche mit methanotrophen Reinkulturen und der ^{14}C -Tracertechnik durchgeführt und die entsprechenden Abbauprodukte bestimmt (LITTLE et al. 1988). In Abb. 7 ist der Abbaumechanismus für TCE dargestellt, der aus den Versuchsergebnissen ermittelt wurde. Die Gefahr der Entstehung von Phosgen aus dem entstehenden Kohlenmonoxid und dem freigesetzten Chlorid besteht nicht, da das Kohlenmonoxid mit Formiat (siehe Abb. 3) zu Kohlendioxid umgesetzt wird. Das erste Patent zur Biodegradation von halogenierten Kohlenwasserstoffen wurde 1988 von Little angemeldet (LITTLE 1988). Die Autorin beansprucht die Degradation von halogenierten aliphatischen Kohlenwasserstoffen in Wasser mittels methanotropher Bakterien in Anwesenheit von Sauerstoff und einem niederen Alkohol als Kohlenstoffquelle. Der Patentanspruch schließt die Initiierung des aeroben Wachstum durch Methan und den anschließenden Austausch bzw. teilweisen Austausch des Methans durch Methanol ein. Es wurden methanoxidierende Misch- und Reinkulturen verwendet. Diese

unterliegen nicht dem Patentanspruch. Die methanotrophen Reinkulturen werden nicht weiter spezifiziert.

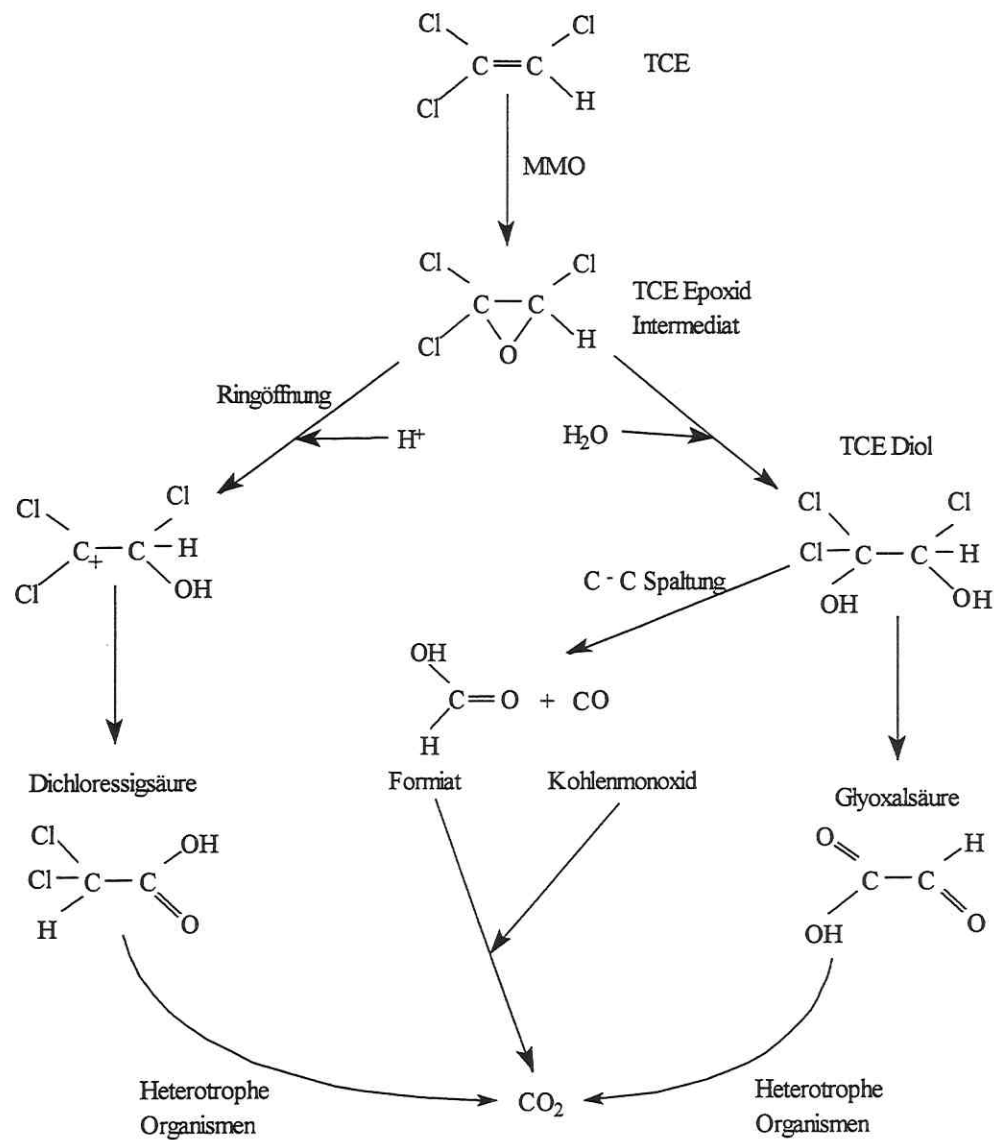


Abb. 7: Mechanismus der TCE Biodegradation durch ein methanotrophes Bakterium (LITTLE et al. 1988)

Ein großer Teil der Untersuchungen wurde mit dem Stamm *Methylosinus trichosporium* OB3b durchgeführt. Dazu existiert ein Patent von Hanson (HANSON und LIPSCOMB 1989). Es wird beansprucht: der Einsatz von Bakterienkonzentrationen zwischen $0,10 \text{ g l}^{-1}$ und 20 g l^{-1} , Vorzuziehen sind Konzentrationen zwischen $0,2 \text{ g l}^{-1}$ und $2,0 \text{ g l}^{-1}$, das Erreichen einer MMO-Konzentration von 5-30 % der Biomassetrockensubstanzkonzentration, das Methan-Luft Gemisch-Verhältnis von 25:1 bis 1:20, die Ausgangskonzentration des TCE bis zu $10000 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ und eine Degradationsrate von $500\text{-}10000 \text{ } \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ Zellen.

Die Biodegradation von halogenierten, aliphatischen Kohlenwasserstoffen in einem Bioreaktor mit einer methanotrophen Mischkultur wird in einem Patent (MOORE et al. 1989) geschützt. Das Wachstum des methanotrophen Konsortiums und die Methankonzentration werden kontrolliert, um eine optimale Degradation zu gewährleisten. Das beschriebene Verfahren kann zur Beseitigung von im Grundwasser gefundenen halogenierten, aliphatischen Kohlenwasserstoffen, wie TCE, c-DCE, t-DCE, VC, Methylenchlorid und 1,1,1-Trichlorethan, mit Anfangskonzentrationen von 10-10000 ppb verwendet werden.

Eine Methode und Apparatur zur Oxidation von toxischem Dampf mittels methanotropher Bakterien wurde 1991 zum Patent eingereicht, befindet sich aber noch im Status "US Statutory Invention Registration" (APEL und DUGAN 1991). Als toxische Dämpfe sollen Methan und TCE in einem Gasphasenbioreaktor mit *Methylobacterium methanica*, *Methylosinus trichosporium* und einer nicht identifizierten Anreicherungskultur oxidiert werden. Der Bioreaktor besteht aus einem geschlossenen Schleifensystem oder aus einem Durchlaßsystem. Nach Wachstum der Bakterien in Füllkörpern wird der kontaminierte Dampf über die Füllkörper gepumpt. Sowohl der Bioreaktor als auch das Verfahren werden durch das Patent beansprucht. Ein weiteres, auf einem Bioreaktor basierendes Patent wurde 1992 eingereicht (DONALDSON und WILSON 1992). Es nutzt die Kombination von abiotischen und biotischen Sanierungsverfahren. Organische Kontaminanten, wie TCE, werden mit Wasserdampf aus Grundwasser ausgestrippt, anschließend kondensiert und in einen Bioreaktor mit methanotrophen Bakterien geleitet. Das TCE wird zu 95% durch die methanotrophen Bakterien, welche nicht weiter benannt werden, im Bioreaktor zu Kohlendioxid umgesetzt.

Neben den Bestrebungen zur weiteren Aufklärung des Degradationsmechanismus und der Degradationskinetik (JANSSEN et al. 1987, LANZARONE et al. 1989, OLDENHUIS et al. 1991, ALVAREZ-COHEN und MCCARTY 1991, HENRY und GRBIC-GALIC 1991)

wurden weiter methanotrophe Bakterien, welche die Fähigkeit zur Degradation von CKW besitzen, isoliert. Ein Typ II methanotrophes Bakterium wurde von japanischen Wissenschaftlern isoliert und untersucht (UCHIYAMA et al. 1989, 1992, NAKAJIMA et al. 1992). Sie bezeichneten diesen Stamm als Stamm M. Stamm M konnte sowohl Methan als auch Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden. Später wurde dieser Stamm dann als *Methylocystis* sp. Strain M charakterisiert. Insbesondere wurde die Rolle von heterotrophen Bakterien untersucht. Mit ^{14}C -markiertem TCE wurde die Biodegradation durch *Methylocystis* sp. M als Reinkultur und mittels einer Mischkultur, welche heterotrophe Bakterien enthielt, verfolgt. Bei der Degradation mittels Reinkultur wurden ca. 32% des ^{14}C -markierten Kohlenstoffs in Glyoxylsäure, Dichloressigsäure und Trichloressigsäure wiedergefunden. Weitere 32% des ^{14}C -Kohlenstoffs waren zu Kohlendioxid und Kohlenmonoxid transformiert worden. Im Gegensatz dazu wurden durch die Mischkultur mit heterotrophen Bakterien die wasserlöslichen Zwischenprodukte ebenfalls zu Kohlendioxid umgesetzt.

Nicht alle methanotrophen Bakterien besitzen die Fähigkeit der Expression von sMMO. Deshalb befassen sich weitere Studien mit der Isolation von methanotrophen Bakterien, die sMMO exprimieren können (KOH et al. 1993). Koh und Mitarbeiter isolierten aus einer mit TCE kontaminierten Gegend ein methanotrophes Bakterium. Es wurde als *Methylomonas methanica* 68-1, ein Typ I Methanotroph, klassifiziert. Die Untersuchungen ergaben eine höhere sMMO Aktivität als bei *Methylosinus trichosporium* OB3b. Mittels Genanalyse wurden Ähnlichkeiten zwischen beiden Enzymen festgestellt, die die Autoren auf evolutionäre Differenzierungen zurückführen.

Eine andere Möglichkeit für die sMMO-abhängige Biodegradation ist der Einsatz von Mutanten. In einer Arbeit von Phelps und Mitarbeitern (PHELPS et al. 1992) wird eine Methode beschrieben, mit der Mutanten von *Methylosinus trichosporium* OB3b isoliert werden können. Diese Mutante kann Kupfer nicht verstoffwechseln und hat damit nicht die Fähigkeit, pMMO zu bilden, sie exprimiert nur sMMO. Zur Selektion wird Dichlormethan in Gegenwart von Kupfer im Medium verwendet. Es können nur die Mutanten durch sMMO Expression und damit Inaktivierung des Dichlormethans überleben. Die pMMO exprimierenden Zellen werden durch das Dichlormethan abgetötet. Dieses Verfahren wurde patentiert (GEORGIU et al. 1992).

Ende der achtziger Jahre wurden die Arbeiten zu Sanierungen von kontaminierten Aquiferen intensiviert. Innerhalb eines großen Forschungsvorhabens in den USA, welches von 1987 bis 1992 durchgeführt wurde, sollte die Reinigung von kontaminiertem Abwasser mittels aerober Bakterien, die Methan als Kohlenstoffquelle nutzen, untersucht werden. In der ersten Phase wurde ein aerobes Festbettreaktorsystem entwickelt (JEWELL et al. 1990/PB91-167536). Das Festbett wird durch einen stabilen methanotrophen Film gebildet. Eine Abbaukinetik für TCE wurde ermittelt. Der Reaktor wurde als stabiles biologisches System charakterisiert. Die maximale Abbaurate war $800 \text{ mg TCE l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, für die Saturationskonstante wurde 3 mg TCE l^{-1} ermittelt. In der zweiten Phase wurde vor den aeroben Festbettreaktor ein anaerober Festbettreaktor geschaltet, der unter methanogenen Bedingungen arbeitet (JEWELL et al. 1990/PB92-123645). So konnten Schadstoffe, welche nur unter anaeroben Bedingungen abbaubar sind (z.B. Tetrachlorethen), in der ersten anaeroben Stufe transformiert werden, um dann in der zweiten aeroben Stufe abgebaut zu werden. Endprodukt der anaeroben Stufe war Vinylchlorid, das in der aeroben Stufe vollständig abgebaut wurde. Die Degradationsraten in der anaeroben Stufe waren 100mal höher als in der methanotrophen Stufe. In der letzten Phase des Forschungsvorhabens wurden die Ergebnisse aus den beiden vorangegangenen Phasen validiert und in einem Pilotversuch bestätigt (JEWELL et al. 1992). Die Abbauraten für TCE konnten zwar ständig erhöht werden, allerdings war die Effizienz immer kleiner 50%. Im Gegensatz dazu war die Degradation von Vinylchlorid schnell und effizient (max. Abbaurate $180 \text{ mg g}^{-1} \text{ VS d}^{-1}$). PCE und TCE wurden unter anaeroben Bedingungen schnell zu DCE und VC dechloriert. Das System wurde erfolgreich für die Reinigung von Abwasser, Beseitigung von CKW und Entfernung von Stickstoff und Phosphor, getestet.

Bei den bisher bekannten in-situ Versuchen wurde praktisch nur das Verfahren der Biostimulation angewandt. Das bedeutet, es werden die autochthonen methanotrophen Bakterien durch Injektion eines Methan-Luft-Gemischs aktiviert (SEMPRINI et al. 1992, HENRY und GRBIC-GALIC 1994). Gegebenenfalls werden auch Nähr- bzw. Spurensalzmedien eingebracht. Ein solches Verfahren wurde bei Untersuchungen zur in-situ Sanierung von CKW-kontaminiertem Boden und Grundwasser eingesetzt (HAZEN et al. 1992). Abb. 8 zeigt schematisch das Versuchsfeld. Unvermeidlich ist ein Stripping-Effekt. Die ausgestrippten Schadstoffe wurden hier durch eine katalytische Oxidation beseitigt. Dieses Verfahren wurde

patentrechtlich geschützt (HAZEN und FLIERMANS 1994). Statt Methan ist auch Erdgas zur Biostimulation der autochthonen Mikroorganismen verwendbar (HAZEN et al. 1997).

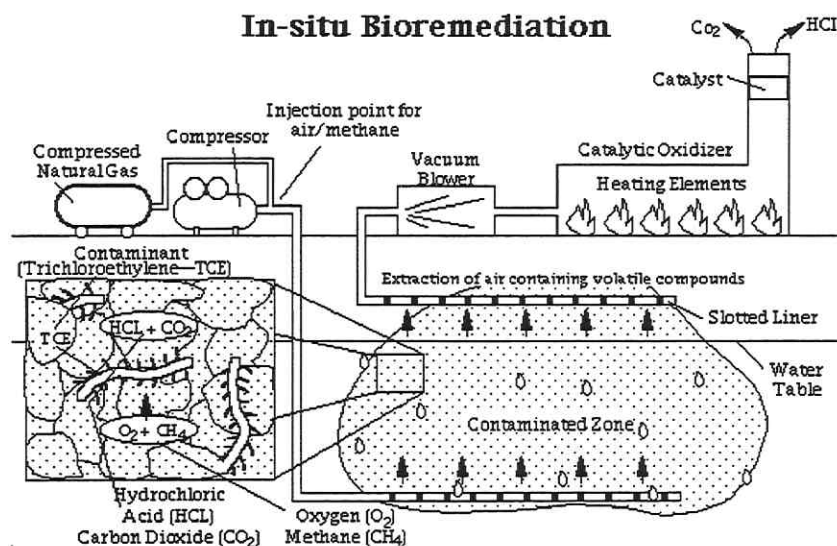


Abb. 8: Versuchsfeld der in-situ Sanierung von mit TCE kontaminiertem Boden (HAZEN et al. 1992)

Eine vor allem in den letzten Jahren weiterentwickelte Methode ist die Anwendung von methanotrophen Bakterien in Biofiltern bzw. als Biofilm. Beide Verfahren werden für on-site Sanierungen verwendet. Erfolgreich getestet wurde ein Biofilter aus ruhenden Zellen von *Methylosinus trichosporium* OB3b (TAYLOR et al. 1993). Nach Kultivierung der Zellen in einem 5 l-Bioreaktor und Expression der sMMO wurden sie in Boden gegeben. Die Funktionsfähigkeit des Biofilters ist von der Langlebigkeit der intrazellulären sMMO abhängig. Es wurden Aussagen zur Halbwertszeit der sMMO gemacht: Im Vergleich zu einer Halbwertszeit von 3 Tagen beim Ernten der Zellen während der logarithmischen Wachstumsphase (PARK et al. 1991) bzw. 6 Tagen beim Ernten während der langsamen Wachstumsphase (PARK et al. 1991) wurden bei der beschriebenen Methode Halbwertszeiten von 35 Tagen erreicht. In einer anderen Studie wurden zwei verschiedene Bioreaktoren getestet. Ein Wirbelschichtreaktor mit immobilisierten Zellen von *Methylocystis* sp. M und ein Hohlfasermembranreaktor mit der selben Kultur wurden verglichen (OKADA et al. 1995). Die Biodegradation von TCE wurde untersucht. Die Degradationseffizienz des Wirbelschichtreaktors lag bei 80-90%, die des Hohl-

fasermembranreaktors bei 90-99%. Die Untersuchungen an dem Hohlfasermembranreaktor wurden fortgesetzt. Es wurde ein Reaktor für die kontinuierliche Biodegradation von TCE konstruiert (HASEGAWA et al. 1997). Ebenfalls ein Hohlfasermembranreaktor wurde bei Untersuchungen des TCE-Abbaus mit *Methylosinus trichosporium* OB3b verwendet (AZIZ et al. 1995). Kontaminiertes Wasser wurde durch die Fasern gepumpt, außerhalb der Fasern zirkulierten Zellen der Mutante PP358 von *Methylosinus trichosporium* OB3b durch einen externen Wachstumsreaktor (PHELPS et al. 1992). Bei den Versuchen wurden 80-99% des TCE aus dem Wasser entfernt, wovon ca. 75% degradiert wurden.

Eine Arbeit von kanadischen Wissenschaftlern (TARTAKOVSKY et al. 1998) beschäftigt sich mit einer Methode der Coimmobilisierung von methanogenen und methanotrophen Bakterien für die Biodegradation von chlorierten Kohlenwasserstoffen. Zwei aerob/anaerob Bioreaktoren wurden eingesetzt. In dem einen Reaktor war Anaerob-Schlamm zusammen mit *Methylosinus sporium* immobilisiert in Chitosan, in dem zweiten nur Anaerob-Schlamm in Chitosan. Die Biodegradation von PCE wurde untersucht. Ohne Zugabe von PCE vermehrten sich stark die sMMO-negativen methanotrophen Arten. Bei Zugabe von PCE nahm die Zahl der sMMO-positiven Bakterien beträchtlich zu. Bei dem kombinierten System betrug die Dechlorierungseffizienz 88%, während die Dechlorierungseffizienz im System ohne sMMO-positive Bakterien nur bei 40% lag.

Die Biodegradation mit immobilisierten methanotrophen Bakterien bzw. mit Zellrückhaltung stellen ein vielversprechendes Verfahren für eine kontinuierliche Degradation dar.

Aus der zahlreichen bisher zum Thema "Dehalogenierung mit methanotrophen Mikroorganismen" veröffentlichten Literatur läßt sich zusammenfassend ableiten:

- Die prinzipielle Eigenschaft des Schlüsselenzyms Methanmonooxygenase zur oxidativen Dehalogenierung läßt sich durch intakte Zellen von Rein- und Mischkulturen methanotropher Bakterien nutzen.
- Bevorzugt untersuchte Substrate (Cosubstrate) sind unter praktischen Gesichtspunkten halogenierte Ethane (Trichlor- oder Perchlorethen).
- Die Dehalogenierung verläuft über den intermediären Schritt Trichlorepoxyethan.

- Der löslichen MMO (sMMO) konnte die zentrale Rolle bei der Dehalogenierung zugeschrieben werden. Diese kann jedoch nicht durch alle methanotrophen Bakterien gebildet werden.
- Die aktuelle Kupferkonzentration beeinflusst entscheidend die Bildung der sMMO auch bei Bakterien, die prinzipiell dazu in der Lage sind (hohe Konzentrationen hemmen)
- Praktische Untersuchungen zur Dehalogenierung insbesondere an TCE und PCE sind sowohl in Bioreaktoren mit suspendierten methanotrophen Rein- und Mischkulturen als auch mit fixierten Zellen beschrieben.
- In situ-Versuche sind durch die Stimulation autochthoner Bakterien bekannt geworden.

Die Verwendung von Methan als Substrat und die cometabolische Umsetzung der halogenierten kurzkettigen Kohlenwasserstoffe ist unter praxisrelevanten Aspekten vielversprechend, da sich insbesondere für in situ-Sanierungen als auch bei pump-and-treat-Verfahren ökonomische Verfahrensvarianten zur Sanierung von Chlorkohlenwasserstoff-kontaminierten Grundwässern entwickeln lassen.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse einzelner Forschergruppen hat sich das Verfahren bisher in der Praxis nur bedingt durchsetzen können.

Als Erklärung dafür kann herangezogen werden:

- Nicht in jedem Fall waren in situ-Sanierungsansätze erfolgreich. Eine Systematik bei den positiven oder negativen Ergebnissen war nicht zu erkennen.
- Das Sanierungsergebnis war nicht ausreichend und nicht den jeweiligen gesetzlichen Vorgaben genügend.
- Die Handhabung des in Mischung mit Luftsauerstoff explosiven Methans ist technisch nicht einfach oder bei bestimmten Schadensfällen nicht realisierbar (Bebauung).

Aus der Kenntnis der Literatur, den praktischen Erfahrungen der Arbeitsgruppe "methanotrophe Bakterien" des UFZ und der internationalen Kooperation ließen sich Gründe für die wechselnde Erfolgsrate praktischer Sanierungen ableiten:

- Die spezifischen mikrobiologischen Anforderungen an die Kultivierung methanotropher Bakterien wurden nicht oder ungenügend beachtet und das biologische System als "black box" behandelt.

- Die Kinetik der Dehalogenierung im Zusammenhang mit der Besonderheit der Methanutilisation als komplexes System von Oxidation und Cooxidation somit von Substrat und Cosubstrat (meistens in der Literatur falsch betrachtet mit Methan als Cosubstrat), mit einer Konkurrenz um die beiden Substrate, jedoch auch deren teilweise Inhibierungseffekte, wurde nicht beachtet und genutzt.
- Die vor einem Sanierungsbeginn prinzipiell zu treffende Entscheidung über den Einsatz der Methode muß standortbezogen sowohl geogene (z.B. Kupferkonzentration) als auch mikrobielle Aspekte (Können die autochthonen methanotrophen Bakterien überhaupt sMMO bilden?) mit in die Betrachtung einbeziehen, was meistens nicht geschehen ist.

Um die Dehalogenierung von kurzkettigen Chlorkohlenwasserstoffen durch methanotrophe Bakterien naturwissenschaftlich besser zu durchdringen und daraus für praktische Sanierungen Schlußfolgerungen zu ziehen, lassen sich folgende Fragenkomplexe ableiten:

- Gibt es einen Zusammenhang zwischen Wachstumskinetik auf dem Substrat Methan, dessen Konzentration sowie der Konzentration des Cosubstrats CKW?
- Läßt sich die komplexe Oxidation-Cooxidationsbeziehung durch die Betrachtung der Kinetik optimieren und sind diese Erkenntnisse praxisrelevant für einen technischen Prozess oder eine in situ Sanierung?
- Spielt die nicht-Methan-utilisierende Begleitflora eine Rolle bei der Utilisation des CKW?
- Wie beeinflußt die Inhibierung der sMMO-Ausbildung durch standortspezifische Bedingungen (z.B. Kupferkonzentration) die gewünschte Reaktion bei in situ Prozessen?

1.3. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Konzentration auf die kinetischen Fragen des Wachstums von methanotrophen Bakterien, wobei insbesondere die Betrachtung Substrat - Cosubstrat eine wesentliche Rolle spielte. Diese erfolgte in bislang publizierten Arbeiten noch nicht in der strengen Trennung Substrat = Methan, Cosubstrat = CKW. Die teilweise in der Literatur falsche Betrachtung hatte wesentliche Auswirkung auf die praktische Nutzung und dürfte eine der möglichen Erklärungen für Nichtreproduzierbarkeiten oder Mißerfolge der Sanierungsverfahren mit methanotrophen Bakterien sein.

Die Anwendung der kinetischen Bestimmungen sollte in einem Verfahrensvorschlag erfolgen, dessen Grundlagen zu erarbeiten sind.

Zur Lösung dieser Zielstellung wurde folgender Weg gewählt. Durch gezieltes Screening methanotropher Stämme sollen Reinkulturen mit hohem Degradationspotential selektiert werden. Wachstum und sMMO-Expression sollen in Abhängigkeit von den Milieubedingungen optimiert werden. Dabei soll auch die Aktivität der sMMO in verschiedenen Wachstumsphasen der Bakterien bestimmt werden.

Für die Biodegradation von TCE sollen verschiedene Apparaturen erprobt werden. Es werden sowohl ruhende als auch strömende Medien und verschiedene Maßstäbe untersucht. Für diese Apparaturen sind optimale Methanversorgungsmöglichkeiten zu finden. Bei Degradationsversuchen mit unterschiedlicher Parameter wird die Kinetik des TCE-Abbaus bestimmt, Kohlenstoff- und Chloridbilanz sind dabei zu erstellen.

Zur Biodegradation von TCE werden außer Zellsuspensionen auch immobilisierte Zellen methanotropher Bakterien eingesetzt. Beide Verfahren sind zu vergleichen. Weiterhin sind Maßnahmen zur Erhöhung der Effizienz der Biodegradation, wie z.B. ein zyklischer Wechsel zwischen Abbau und sMMO-Regenerierung, zu erproben.

2. Materialien und Methoden

2.1. Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Stämme sind Isolate der Sektion Sanierungsforschung des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH. Die Aufbewahrung der Reinkulturen erfolgte auf Platten im Kühlschrank bei 8°C. Außerdem wurden Tiefkühlkonserven von allen Stämmen bei -85°C eingelagert.

Die Kultivierung der Bakterien für die Abbauprobversuche erfolgte steril in einem Volumen von 100 ml in 1 Liter Erlenmeyerkolben mit speziellen Aufsätzen zur sterilen Begasung mit Methan und in einem Kleinfermentorsystem mit einem Arbeitsvolumen von 300 ml bzw. in einem Fermentor mit 4 l Arbeitsvolumen der Firma Braun Biotech. Als Kultivierungsmedium wurde ein kupferarmes Nitratsalzmedium NMS Cu-frei (HIGGINS et al. 1981) folgender Zusammensetzung verwendet: NaNO_3 850 mg l⁻¹; K_2SO_4 170 mg l⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 37 mg l⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 70 mg l⁻¹; KH_2PO_4 530 mg l⁻¹; Na_2HPO_4 860 mg l⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,574 mg l⁻¹; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,446 mg l⁻¹; H_3BO_3 0,124 mg l⁻¹; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,096 mg l⁻¹; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,096 mg l⁻¹; KI 0,166 mg l⁻¹; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11,2 mg l⁻¹; H_2SO_4 (1 mM) 1 ml l⁻¹. Außerdem wurde ein kupferarmes Ammoniumsalzmedium AN-NMS Cu-frei gleicher Zusammensetzung, lediglich NaNO_3 wurde durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ersetzt, eingesetzt. Die Kultivierungstemperatur betrug 30°C, der pH 6,7. Die Erlenmeyerkolben wurden mit 30 vol% und die Fermentoren mit 20vol% Methan in Luft begast.

Alle Untersuchungen wurden mit intakten Zellen der entsprechenden Stämme durchgeführt.

2.2. Beschreibung der Versuche / Apparaturen

Die Abbauprobversuche wurden unsteril in Glasröhrchen, in einer Säulenapparatur und in einem Wirbelschichtreaktor durchgeführt. Die Glasröhrchen haben ein Volumen von 22 ml und waren mit 10 ml Kulturflüssigkeit gefüllt. Sie wurden gasdicht mit Aluminiumkappen und teflonbeschichteten Septen verschlossen, um ein Entweichen der CKW auf Grund ihrer Flüchtigkeit

zu verhindern. Die R hrchenversuche wurden als Versuchsserien durchgeführt. In zeitlichen Abständen wurden Röhrchen entnommen und der Abbau durch Einfrieren abgebrochen.

Abb. 9 zeigt das Schema der Säulenapparatur. Die Apparatur besteht aus zwei Glassäulen. Die Begasungssäule (2) enthält 1 l Bakteriensuspension, die durch eine Taumelkolbenpumpe (4, Fa. QVC) in die F llk rpers ule (1) gepumpt wird. Die Füllkörper sind Raschigringe mit einem Durchmesser und einer Länge von 5 mm; sie werden von oben mit der Bakteriensuspension berieselt. Die durchgelaufene Suspension wird in die Begasungssäule zurückgeführt. Der Gasraum über der Bakteriensuspension in der Begasungssäule dient als Gasreservoir. Dieser Gasraum wird mit einem definiertem Methan-Luft-Gemisch gef llt.  ber die Mass-Flow-Controller (5, 6, Fa. Bronkhorst) wird das Methan-Luft Verhältnis eingestellt.

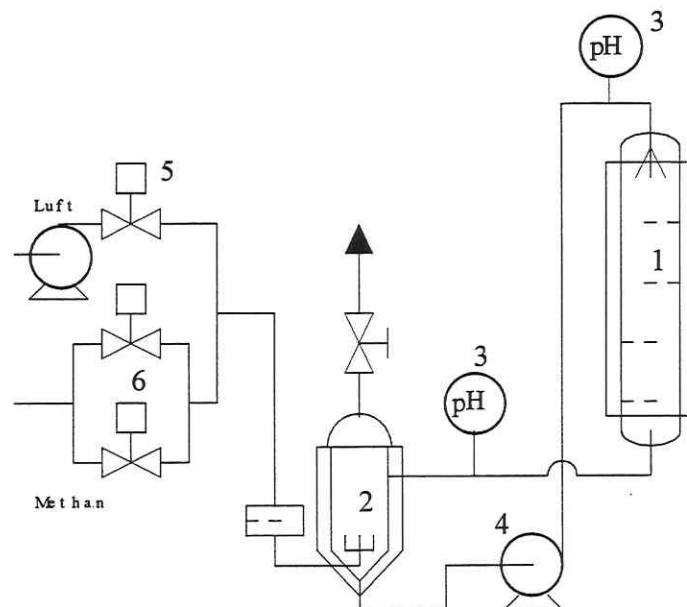


Abb. 9: Säulenapparatur

Im Zufluß und im Abfluß der F llk rpers ule sind Meßstellen (3) zur pH-Messung angebracht. Beide Säulen sind durch einen Doppelmantel temperierbar.

Neben den Versuchen mit Bakteriensuspensionen wurden Versuche mit immobilisierten methanotrophen Bakterien durchgeführt. Die Immobilisierung wurde dankenswerterweise durch die Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Technologie in Braun-

schweig durchgeführt. Kultivierung und Abbauprobversuche mit dem Immobilisat wurden in einem Wirbelschichtreaktor mit 100 ml Arbeitsvolumen durchgeführt (Abb. 10). Der Wirbelschichtreaktor (1) ist durch einen Doppelmantel temperierbar. Das Wachstum und die Expression von sMMO im Immobilisierungsmaterial wurde bei 30°C und einer Durchflußbegasung mit 50vol% Methan in Luft erreicht. Vor Beginn der Abbauprobversuche erfolgte die Begasung des Wirbelschichtreaktors mit einem Gemisch von 5-20vol% Methan in Luft. Die Einstellung der Begasungsverhältnisse wurde mittels Mass-Flow-Controller (3, Fa. Bronkhorst) realisiert. Anschließend wurde die Durchflußbegasung beendet, das System geschlossen und mit Hilfe einer Gaspumpe (2, Taumelkolbenpumpe der Fa. QVC) der Kopfraum des Reaktors rezirkuliert. Über Septen im Kopfraum konnten dann TCE zugesetzt und Proben der Kulturflüssigkeit entnommen werden.

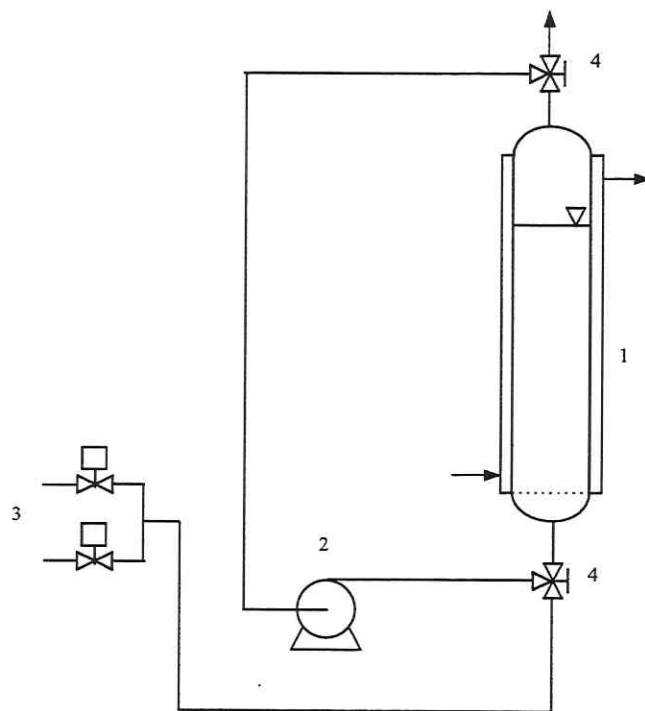


Abb. 10: Wirbelschichtreaktor

2.3. Meß- und Analyseverfahren

2.3.1. Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Konzentration der Biomasse während des Bakterienwachstums und während der Abbauprobe wurde spektrofotometrisch mit einem Spekol 11 (Fa. Carl Zeiss Jena) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Aus der gemessenen optischen Dichte wurde mittels einer Eichkurve die Konzentration der Biomassetrockensubstanz errechnet.

2.3.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden zwecks Kontrolle der Reinheit der verschiedenen Stämme sowie zur Einschätzung ihres physiologischen Zustands durchgeführt. Dazu wurde ein Lichtmikroskop Optiphot-2 der Fa. Nikon und ein Binokular Nikon SMZ-2T verwendet. Fotos wurden mit dem Bildauswertungssystem Lucia M (Fa. LIM s.r.o., Tschechische Republik) aufgenommen.

2.3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an der Universität Leipzig angefertigt. Die Zellen der zu untersuchenden Stämme (geerntet am Ende der logarithmischen Wachstumsphase) wurden nach zwei Waschschritten (25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0) in 3% Glutardialdehyd (in Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4) über Nacht vorfixiert. Nach viermaligem Spülen der Proben (in Na-Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,4, je 45 min) erfolgte die Fixierung mittels Osmiumtetroxid (1 % OsO_4 in Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4, für 45 min). Anschließend wurden die Proben dreimal gewaschen (in Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4, je 45 min) und mittels steigender Ethanolkonzentration (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %, je 45 min) entwässert. Anschließend erfolgte eine Blockkontrastierung (1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 70% Ethanol) und schrittweise Überführung in das

Einbettungsmedium (DURCUPAN). Die mittels Ultramikrotom hergestellten Ultradünnschnitte wurden danach schnittkontrastiert (1,33 g Bleinitrat, 1,76 g Natriumcitrat, 8 ml 1 M NaOH auf 50 ml aqua bidest.) und im Elektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss, Oberkochen, BRD) betrachtet.

2.3.4. Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit

Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit als Maß der Aktivität der methanotrophen Kultur wurde mittels einer Sauerstoffauszehrzelle (Abb. 12, Fa. Biolytik) mit einem Volumen von 2 ml bestimmt. Die auf Versuchstemperatur temperierte Auszehrzelle wird mit ebenfalls temperierter Pufferlösung gefüllt. Es werden 100 µl der zu vermessenden Bakteriensuspension in die Auszehrzelle eingespritzt. Über 2 Minuten wird die Sauerstoffauszehrung und damit die endogene Stoffwechselaktivität gemessen. Anschließend werden 200 µl einer ebenfalls temperierten und methangesättigten Pufferlösung eingespritzt. Wiederum wird die Sauerstoffauszehrung über 2 Minuten verfolgt. Ein Referenzwert (A_0), welcher der vollständigen Sauerstoffzehrung entspricht, wird durch Einspritzen von 100 µl gesättigter Natriumsulfitlösung bestimmt.

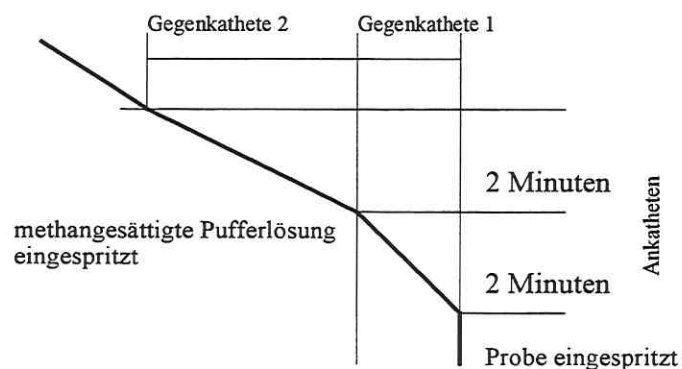


Abb. 11: Auswertung eines Schreiberausdrucks der Sauerstoffauszehrzelle

Die Auswertung des Schreiberausdrucks erfolgte entsprechend der in Abb. 11 dargestellten Zeichnung. Aus beiden Gegenkatheten wird jeweils eine Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit nach folgender Formel errechnet:

$$r_{O_2} = \frac{C_{O_2} \cdot A}{2 \cdot X \cdot A_0}$$

r_{O_2} ... Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol O}_2/\text{mg BTS} \cdot \text{min}$]

X ... Konzentration der Biomasse [mg l^{-1}]

C_{O_2} ... Sauerstoffsättigungskonzentration bei der entsprechenden Temperatur [$\mu\text{mol l}^{-1}$]

A ... Gegenkathete 1 bzw. 2 [mm]

A_0 ... Gegenkathete bei vollständiger Sauerstoffzehrung [mm]

Die erste Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit ist ein Maß für die Summe der endogenen Stoffwechselaktivitäten der Zelle, die zweite Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit stellt ein Maß für die Summe der methanabhängigen oxidativen Aktivitäten der Zelle dar.

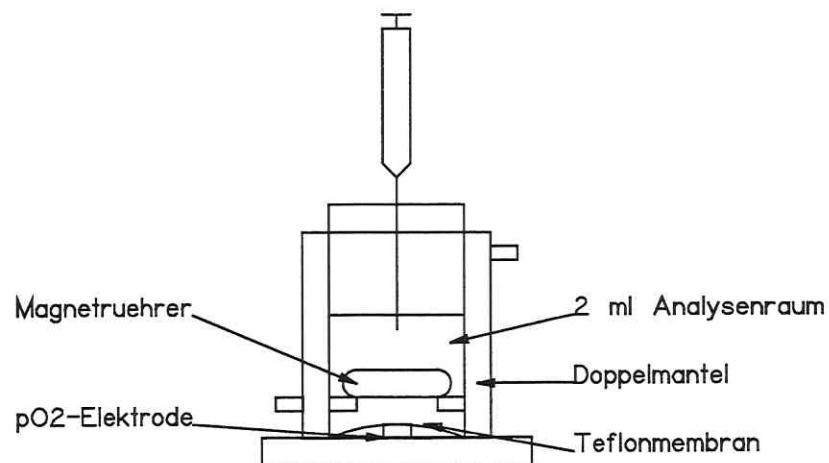


Abb. 12: Darstellung der Sauerstoffauszehrzelle (Fa. Biolytik)

2.3.5. Bestimmung der sMMO-Aktivität

Die Bestimmung der sMMO-Aktivität erfolgt indirekt über die Naphtholbildungsrate (nmol Naphthol gebildet pro mg Biomassetrockensubstranz und Stunde) bei der Oxidation von Naphthalin zu Naphthol. Diese Methode ist selektiv für die sMMO.

Die Bestimmung der sMMO-Aktivität auf Platten wurde entsprechend einer Arbeit von Graham durchgeführt (GRAHAM et al. 1992). Nach Inkubierung der Platten mit Naphthalin-kristallen bei 30°C, werden die Platten mit o-Dianisidinlösung (5 mg ml⁻¹) besprüht. Kolonien, die sMMO exprimieren, färben sich rot.

Zur Bestimmung der sMMO-Aktivität in Flüssigkulturen wurde die bei Bowman (BOWMAN und SAYLER 1994) beschreibende Methode verwendet. Dazu wird 1 ml Flüssigkultur zusammen mit 1 ml gesättigter Naphthalinlösung bei 30°C eine Stunde inkubiert. Anschließend werden 100 µl einer 0,2 %igen o-Dianisidinlösung zugegeben und spektrofotometrisch bei 525 nm vermessen. Die sMMO-Aktivität wird anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{sMMO-Aktivität}[\text{nmolmg}^{-1} \text{ h}^{-1}] = \frac{\text{Extinktion}_{525\text{nm}}}{38000 \text{ nmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{Küvettenstärke}[\text{cm}] \cdot 1 \text{ h} \cdot \text{BTS}[\text{mg l}^{-1}]}$$

2.3.6. TCE-Analytik

Es wurden zwei Methoden der Probenvorbereitung für die TCE-Analytik getestet: die Festphasenmikroextraktion (Solid Phase Micro Extraction - SPME) und die Headspace-Analytik.

2.3.6.1. Festphasenmikroextraktion

Die Festphasenmikroextraktion ist eine Methode, die sich erst in den letzten Jahren durchgesetzt hat. In Abb. 13 ist die SPME-Methode schematisch dargestellt. Die Extraktion mittels SPME ist eine variable Methode, die sich auch für die Analyse natürlicher Proben eignet.

Für den Nachweis der leicht-flüchtigen chlorierten Kohlenwasser-stoffe wurde eine Mikrofaser mit 100 μm Polydimethylsiloxan in einem SPME-Halter verwendet (beides von Sulpeco). Es wurde ein Gaschromatograph HP 5890/2 mit einem ECD (Hewlett Packard) eingesetzt. Als Trennsäule wurde auch hier eine Säule SPB-5, 30 m $\times$ 0,32 mm, Filmdicke 0,25 μm benutzt. Das Temperaturprogramm war das gleiche wie bei der Headspace-Analytik.

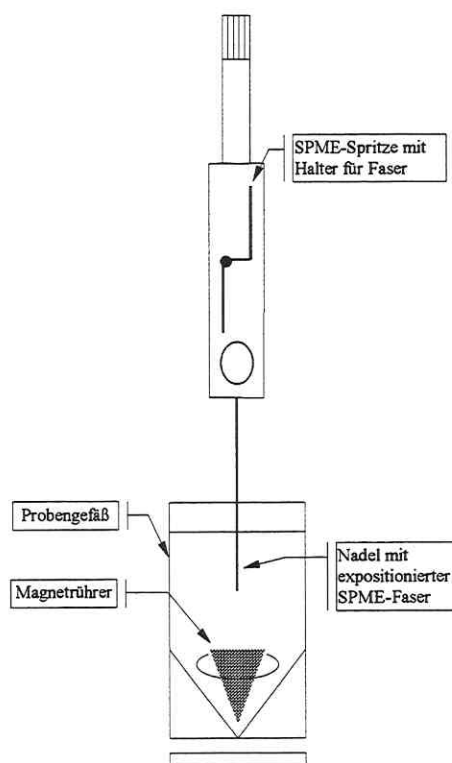


Abb. 13: SPME-Methode

Während der Probenvorbereitung wurde die Faser 10 Minuten der Probe in einem mit Teflon-septum verschlossenen Gefäß ausgesetzt. Die zu analysierende Probe wurde bei 600 U min^{-1} gerührt. Anschließend wurde die Nadel der SPME-Spritze in den Injektor des Chromatographen eingestochen. Die extrahierten Substanzen wurden dann von der Faser desorbiert. Dafür verblieb die Faser für 2 Minuten bei einer Temperatur von 260°C im Injektor.

des Gaschromatographen. Diese Bedingungen müssen bei allen Analysen eingehalten werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

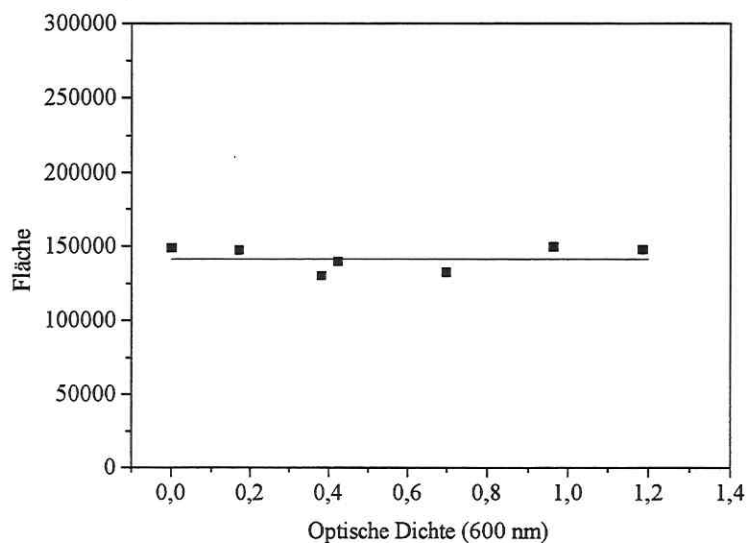


Abb. 14: Abhängigkeit der Peakfläche von der Optischen Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$)

Um diese Methode für Analysen in Proben zu verwenden, die Mikroorganismen enthalten, muß geprüft werden, ob diese das Extraktionsverhalten der Mikrofaser beeinflussen. Das wurde untersucht, indem Proben mit immer der gleichen definierten TCE-Konzentration und unterschiedlichen Mikroorganismenkonzentrationen getestet wurden. Die Konzentration der Mikroorganismen ist als optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm dargestellt. Abb. 14 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Es ist zu erkennen, daß die Anwesenheit von Mikroorganismen auch bei etwa 500 mg l^{-1} Biomassetrockensubstanz (optische Dichte 1,2) im untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluß auf die Analysenergebnisse hat.

2.3.6.2. Headspace-Analytik

Die im Versuchsverlauf genommenen Proben wurden durch sofortiges Einfrieren und Aufbewahren bei -18°C konserviert. Die Bestimmung der TCE-Konzentration in der Kulturflüssigkeit wurde mit einem Gaschromatograph (Hewlett-Packard HP 6890), der mit einem Headspace-Autosampler (Hewlett-Packard HP 7694) gekoppelt war, durchgeführt. Der Gaschromatograph war mit einem Splitt/Splittless-Injektor, einer Kapillarsäule (HP-624, $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 1,4\text{ }\mu\text{m}$) und einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) ausgestattet. Folgende Analysebedingungen wurden verwendet:

Headspace-Autosampler:

- Röhrchentemperatur: 70°C
- Nadeltemperatur: 80°C
- Transferleitungstemperatur: 90°C
- Gleichgewichtseinstellungszeit: 30 min

Gaschromatograph:

- Trägergas: Helium
- Injektortemperatur: 250°C
- Splitt: unterschiedlich, abhängig von der TCE-Konzentration
- Ofentemperatur: 100°C (1 min) $\Rightarrow 30^{\circ}\text{C}/\text{min} \Rightarrow 150^{\circ}\text{C}$ (2,33 min)
- Detektortemperatur: 300°C

2.3.7. Chloridbestimmung

Zur Bestimmung der Chloridkonzentration im Kulturmedium wurden ein spektrofotometrischer Küvettest (Fa. Dr. Lange GmbH, Meßbereich: $1\text{--}70\text{ mg l}^{-1}$, Fehler: 3%) und eine Chloridelektrode (Fa. WTW, Meßbereich: $2\text{--}35000\text{ mg l}^{-1}$, Fehler: 2%) eingesetzt. Für die spektrofotometrische Analyse mußte bakterienfreie Suspension verwendet

werden. Dazu wurde die Bakteriensuspension mit 10000 U min^{-1} zentrifugiert. Für die Bestimmung mittels Chloridelektrode war ein Zentrifugieren nicht notwendig.

2.3.8. Gaskonzentrationsbestimmung

Sowohl die Methan- als auch die Kohlendioxidkonzentration wurde in gasförmigen Proben, die mittels einer gasdichten Spritze genommen wurden, bestimmt. Die Probenvolumina betrugen $250 \mu\text{l}$. Die Analysen wurden mit einem GC (Hewlett-Packard HP6890), ausgestattet mit einer Schaltung von zwei Gepacktsäulen (Säule 1: HP19096C-010, Füllung Porapak Q, 80/100 Mesh; Säule 2: HP19001A-MA2, Füllung Molecular Sieve 5A, 60/80 Mesh) und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, durchgeführt. Säule 2 ist zwischen Säule 1 und Detektor installiert. Mittels eines pneumatischen Ventils kann Säule 2 ein- bzw. ausgeblendet werden. Mit Säule 1 ist die Trennung von Stickstoff und Sauerstoff aus der Luft nicht möglich, deshalb wird vor Erscheinen des Gesamtpeaks ($\text{N}_2 + \text{O}_2$) die Säule 2 zwischengeschaltet, welche die Trennung von Stickstoff und Sauerstoff realisiert. Abb. 15 zeigt ein Beispielchromatogramm. Folgende Analysebedingungen waren eingestellt:

- Trägergas: Helium
- Injektortemperatur: 250°C
- Ofentemperatur: 40°C (0) $\Rightarrow 10^\circ\text{C/min} \Rightarrow 100^\circ\text{C}$ (1 min) $\Rightarrow 5^\circ\text{C/min} \Rightarrow 120^\circ\text{C}$ (0)
- Detektortemperatur: 250°C

Zur Kalibrierung wurden Eichgase der Fa. AGA verwendet.

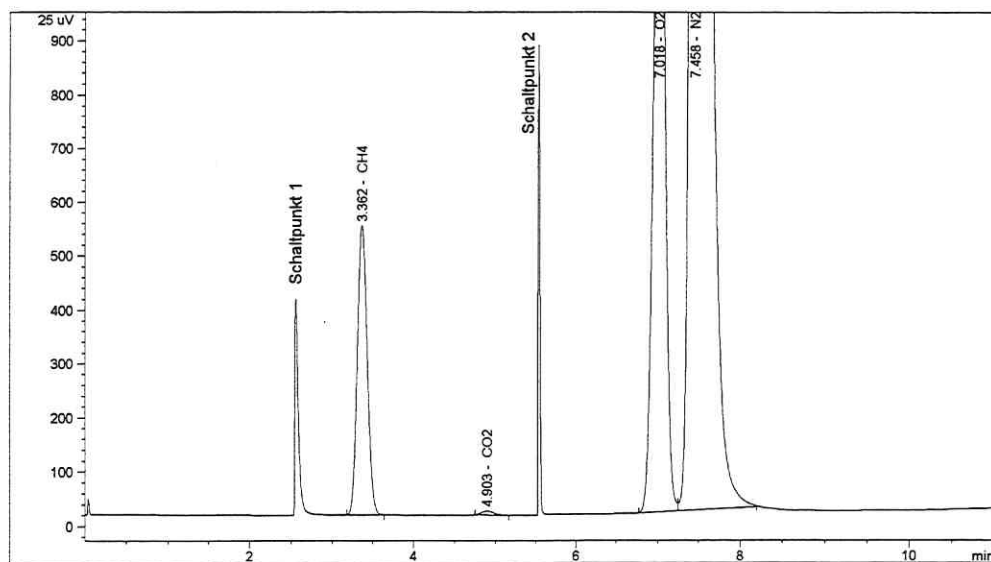


Abb. 15: Gastrennung mittels Kombination von gepackten Säulen

2.3.9. Kupferkonzentration

Die Kupferkonzentration im Kulturmedium wurde ebenfalls spektrofotometrisch mit einem Küvettentest der Fa. Dr. Lange GmbH bestimmt. Die Proben wurden zuvor bei 10000 U min^{-1} zentrifugiert. Die Bestimmung erfolgte im Bereich von $0,01\text{-}8,00 \text{ mg l}^{-1}$.

2.3.10. Nitrat- und Phosphatkonzentration

Die Nitrat- und Phosphatkonzentration wurden in als Nitratstickstoff- bzw. ortho-Phosphat-Phosphorkonzentration bestimmt. Dazu wurden ebenfalls Küvettentests (Fa. Dr. Lange GmbH) verwendet. Die Nitratstickstoffkonzentration wurde im Bereich $0,23\text{-}35,00 \text{ mg l}^{-1}$ und die Phosphat-Phosphorkonzentration im Bereich $0,15\text{-}20,00 \text{ mg l}^{-1}$ bestimmt.

2.3.11. Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Der CSB als Maß für den Sauerstoffverbrauch bei der Verbrennung des organischen Kohlenstoffs in der Kultursuspension wurde nach Zentrifugieren der Proben bei 10000 U min^{-1} auch mittels eines Küvettentests (Fa. Dr. Lange GmbH) bestimmt. Der Bereich für den CSB lag bei $15\text{-}10000 \text{ mg l}^{-1}$.

2.4. Genetische Methoden

2.4.1. Detektion der mmoX- und mmoY-Gene

Mittelpunkt der Methoden ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), bei der bestimmte Sequenzen der DNA experimentell amplifiziert werden und durch gelelektrophoretische Auftrennung nachgewiesen werden. Es wurden Primersets verwendet, die am Biotechnology Research Institute (BRI) in Montreal (Kanada) entwickelt wurden (ROGGE 1996). Diese basieren auf Gensequenzen der Hydroxylasekomponente der sMMO von *Methylococcus capsulatus* (Bath). Primerset mmoX1+2 ist von dem mmoX-Gen, das die alpha-Untereinheit kodiert und Primerset mmoY1+2 von dem mmoY-Gen, das die beta-Untereinheit kodiert, abgeleitet.

Nukleotidsequenzen der sMMO-spezifischen Primer:

mmoX1: 5'-CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGT-3'

mmoX2: 5'-GGCTCGACCTTGAAGTTGGAGCCATACTCG-3'

mmoY1: 5'-CGAGACCACGGAGCTGCGCACCGTCGACTG-3'

mmoY2: 5'-CGGCCTTCGGCACCGCTGTGGACTCGTCGA-3'

2.4.2. Random Amplifizierte Polymorphe DNA (RAPD) PCR

Diese Methode dient zur Differenzierung neu isolierter Stämme. Durch Verwendung von Zufallsprimern (RAPD-PCR) ist es möglich, ohne Kenntnis der DNA-Sequenzen der

unterschiedlichen Kulturen, genetische Fingerprints zu erhalten, die eine stammspezifische Differenzierung und Zuordnung ermöglichen (ROGGE 1996). Außerdem ist diese Methode geeignet, die Identität eines Stammes nachzuweisen. Für die RAPD-PCR wurde der Primer 0940-12 CM3 verwendet. Dieser Primer hatte folgende Nukleotidsequenz:

ACG CGC CCT C .

3. Ergebnisse

3.1. Screening und Isolation von methanotrophen Bakterien

Die interne Stammsammlung der AG Methanotrophe Bakterien des UFZ-Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH enthält diverse eigene Isolate methanotropher Bakterien aus unterschiedlichen Quellen. Eine Auswahl von 15 Stämmen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Expression von sMMO untersucht.

Tab. 5: Verzeichnis vorhandener und isolierter Stämme

Bezeichnung	Quelle	Naphthalin-Methode sMMO	sMMO Gen ^{*)}	
			mmoX	mmoY
FI 20	Fermentationsprozeß 15.02.95	+	+	-
GB 4	Straßenstaub	-	-	-
GB 21	Straßenstaub	-	-	-
GB 25	Straßenstaub	-	-	-
GB 130	Straßenstaub	-	-	-
FI DIKO	Fermentationsprozeß Febr. 95	+	+	+
FI 311	Fermentationsprozeß Nov. 94	-	-	-
WI 11	Abwasser	+	+	-
WI 12	Abwasser	+	+	-
WI 13	Abwasser	+	+	-
WI 14	Gülle	+	+	-
WI 15	Gülle	+	+	-

^{*)} ROGGE 1996

In Tabelle 5 sind diese Stämme und die Ergebnisse der Untersuchungen zusammengefasst. Mittels der Naphthalin-Methode wurde die momentane Expression von sMMO während der Kultivierung verfolgt. Die Detektion des mmoX- bzw. mmoY-Gens beweist die generelle Fähigkeit des Stammes zur Expression von sMMO auf genetischer Ebene (Abb. 16). Zwischen Nachweis der sMMO mittels Naphthalin-Methode und Nachweis des mmoX-Gens besteht eine Übereinstimmung. Die genetische Differenzierung der Stämme wurde mittels RAPD-PCR (Random Amplifizierte Polymorphe DNA) vorgenommen (ROGGE 1996).

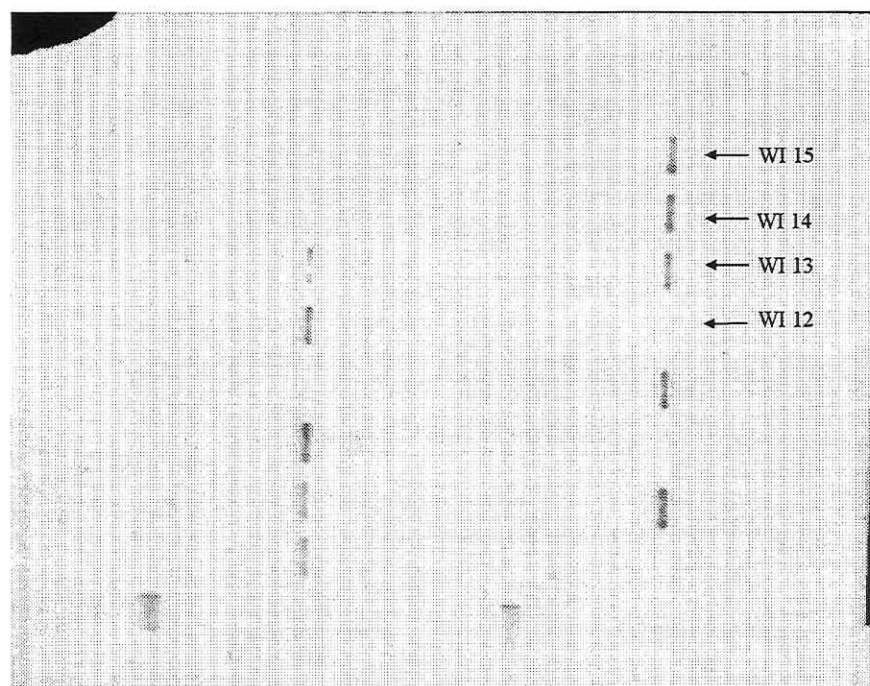


Abb. 16: Elektrophoretische Analyse der PCR-amplifizierten Produkte von Reinkulturen mit Primer mmoX1 bzw. mmoX2 (ROGGE 1996)

Mittels RAPD-PCR wurden die Produkte, die mit dem Primer 0940-12 CM3 gewonnen wurden, elektrophoretisch analysiert. Wie aus Abb. 17 ersichtlich, zeigen die genetischen Fingerprints eine Identität der Stämme WI 12 mit WI 13 und WI 14 mit WI 15.

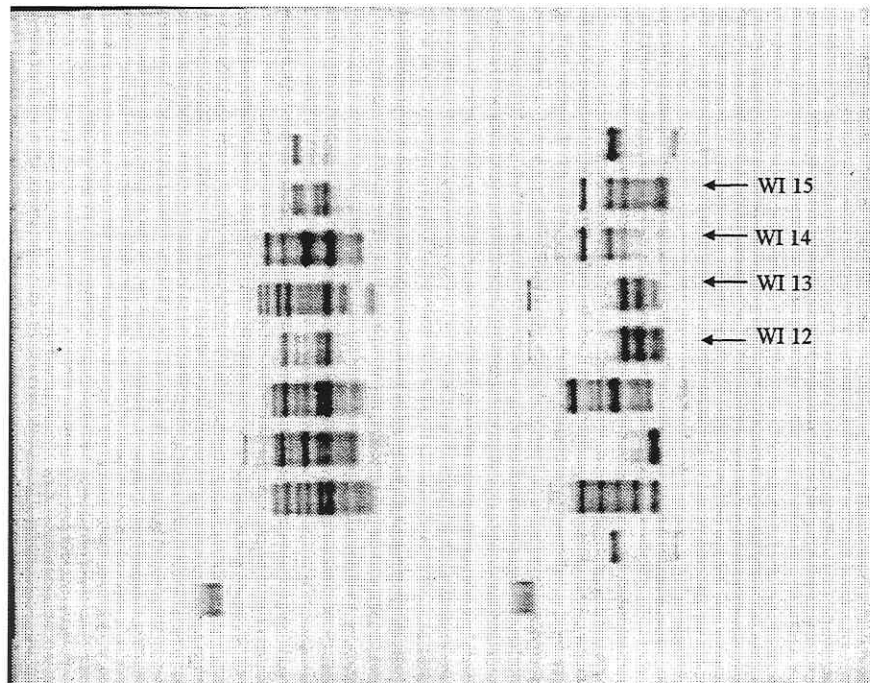


Abb. 17: RAPD-PCR-Profil von Reinkulturen mit dem Primer 0940-12 CM3: ACG CGC CCT C (ROGGE 1996)

3.1.1. Wachstum von ausgewählten sMMO-positiven Stämmen

Mit den fünf sMMO-positiven Reinkulturen wurden weitergehende Versuche unternommen. Das Wachstum der Isolate WI 11 und WI 13 auf AN-NMS kupferfrei und das Wachstum der Isolate WI 14, FI DIKO und FI 20 auf NMS kupferfrei wurden verglichen. Die Wachstumsversuche wurden in Schüttelkolben über 27 Stunden mit einer Anfangsbiomassekonzentration von 30 mg l^{-1} bei 30°C (WI 11, 13, 14, FI 20) bzw. 38°C (FI DIKO) durchgeführt. Die maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten wurden für jeden Stamm errechnet.

Die Abb. 18-22 zeigen das Wachstum der Isolate bei gleichzeitiger Betrachtung der sMMO-Aktivität während der Wachstumsphasen.

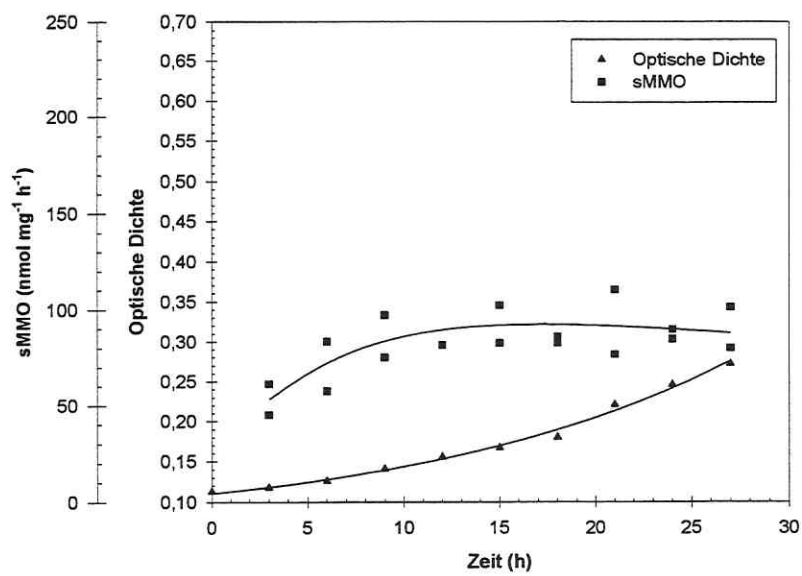


Abb. 18: Wachstum und sMMO-Aktivität von WI 11

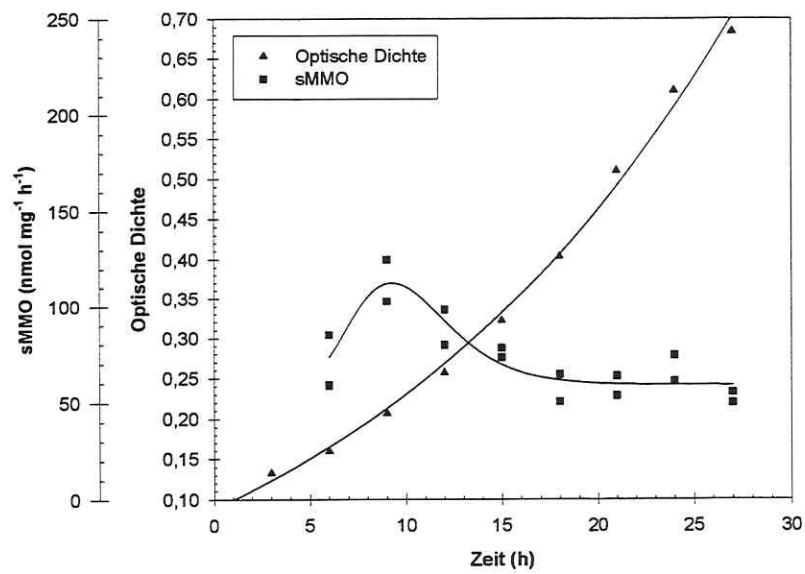


Abb. 19: Wachstum und sMMO-Aktivität von WI 13

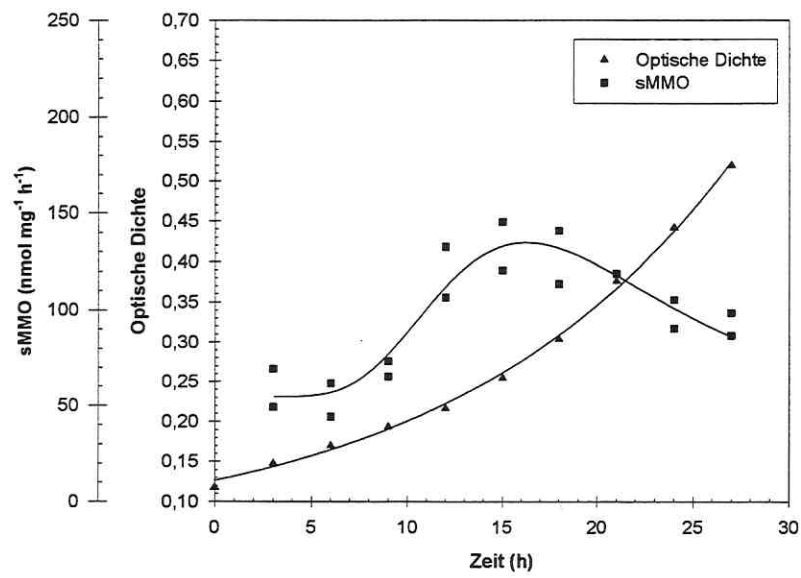


Abb. 20: Wachstum und sMMO-Aktivität von WI 14

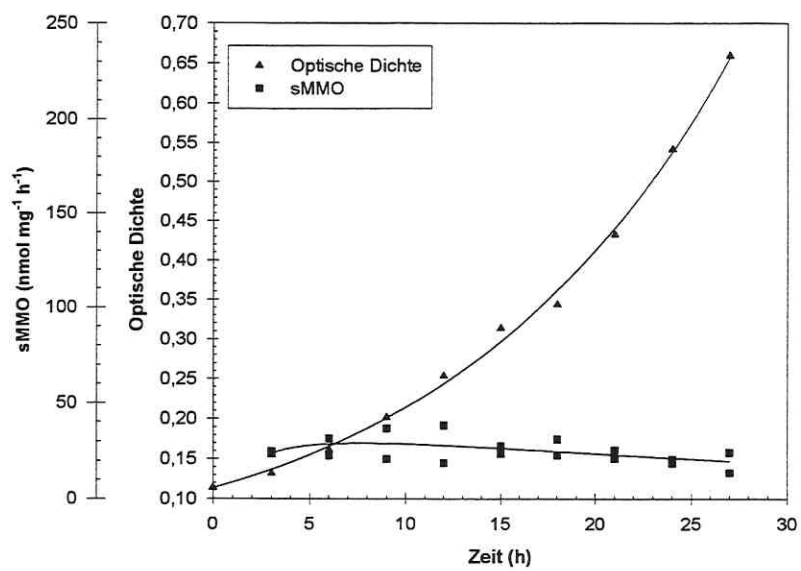


Abb. 21: Wachstum und sMMO-Aktivität von FI DIKO

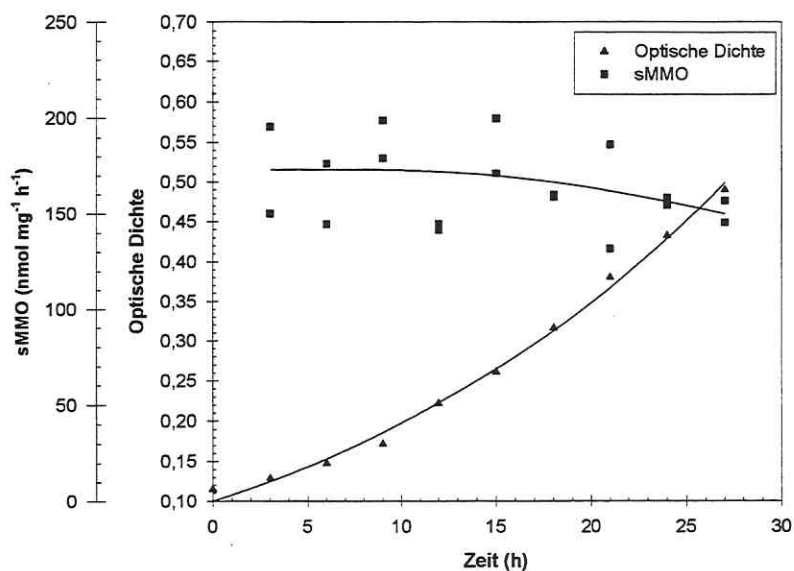


Abb. 22: Wachstum und sMMO-Aktivität von FI 20

In Tabelle 6 sind die maximale Wachstumsgeschwindigkeit und die maximalen sMMO-Aktivitäten dargestellt. Für die weiteren Arbeiten wurde das Isolat WI 14 ausgewählt, da es mit einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,067 \text{ h}^{-1}$ und einer sMMO-Aktivität von $132,9 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ die besten Voraussetzungen für ein hohes Degradationspotential besitzt.

Tab. 6: Maximale Wachstumsgeschwindigkeit und maximale sMMO-Aktivität der untersuchten sMMO-positiven Stämme

Isolat	Maximale Wachstumsgeschwindigkeit $\mu_{\text{max}} (\text{h}^{-1})$	Maximal erreichbare sMMO-Aktivität ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
WI 11	0,061	92,3
WI 13	0,048	112,1
WI 14	0,067	132,9
FI DIKO	0,068	28,8
FI 20	0,043	173,2

3.1.2. Charakterisierung und Wachstum des Isolats WI 14

Die Bestimmung dieses Stammes an der DSM - Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen in Braunschweig ergab eine Zuordnung zur Art *Methylocystis*, so daß das Isolat die Bezeichnung *Methylocystis* sp. GB 14 - DSM 12955 erhielt. Abb. 23 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Membranstruktur von *Methylocystis* sp. GB 14 nach Wachstum auf NMS mit einer Kupferkonzentration von 0,1 μM . Die deutlich zu erkennende Anordnung der Membranen parallel zur cytoplasmatischen Membran ordnen den Stamm eindeutig den Typ II methanotrophen Bakterien zu.

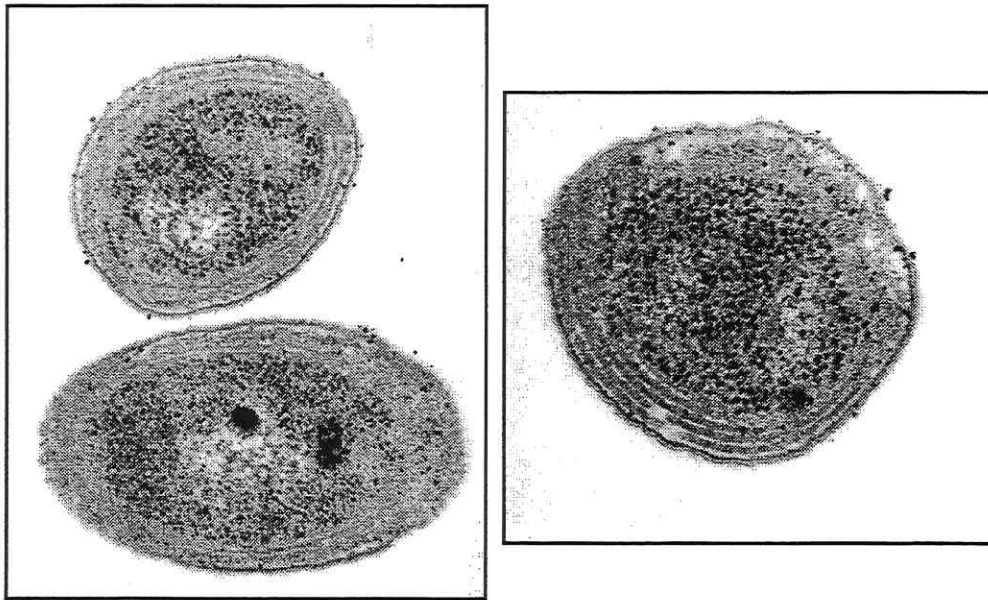


Abb. 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären Membranstruktur von *Methylocystis* sp. GB 14 (gewachsen in Gegenwart von 0,1 μM Cu^{2+}) (100.000fach).

Bei Kultivierung auf kupferarmen Medium werden die Membran abgebaut (Abb. 24) (GROSSE 1998).

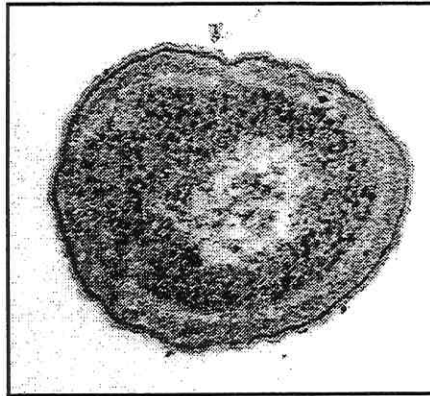


Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme der intrazellulären Membranstruktur von *Methylocystis* sp. GB 14 (in einem kupferarmen Medium kultiviert, $0,016 \mu\text{M Cu}^{2+}$) (100.000fach).

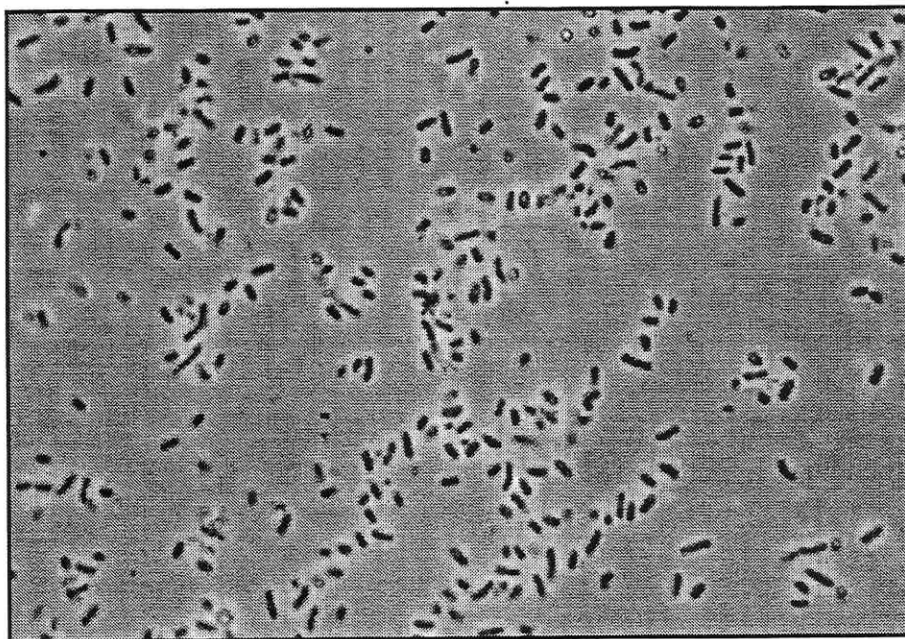


Abb. 25: Phasenkontrastaufnahme von *Methylocystis* sp. GB 14 (1000fache Vergrößerung)

3.2. Umweltrelevante Einflüsse auf die sMMO-Aktivität

3.2.1. Niedrige Umgebungstemperaturen

Einer der Haupteinflüsse auf die sMMO und damit auf das Degradationspotential ist die Umgebungstemperatur. Bei einem möglichen Einsatz von methanotrophen Bakterien in natürlichen Habitaten, ist mit Temperaturen von 15°C oder weniger zu rechnen. Enzymaktivitäten sind stark temperaturabhängig. Versuche zur Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der sMMO als Schlüsselenzym bei der Biodegradation von CKW mittels methanotropher Bakterien zeigten, daß bei einer Umgebungstemperatur von 12°C noch 26% der bei 25°C gemessenen Aktivität vorhanden war. Abb. 26 zeigt die Temperaturabhängigkeit der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit im Bereich 15-30°C und der sMMO-Aktivität im Bereich 12-25°C. Die Messungen wurden jeweils nach 24 h Kultivierung in Schüttelkolben durchgeführt.

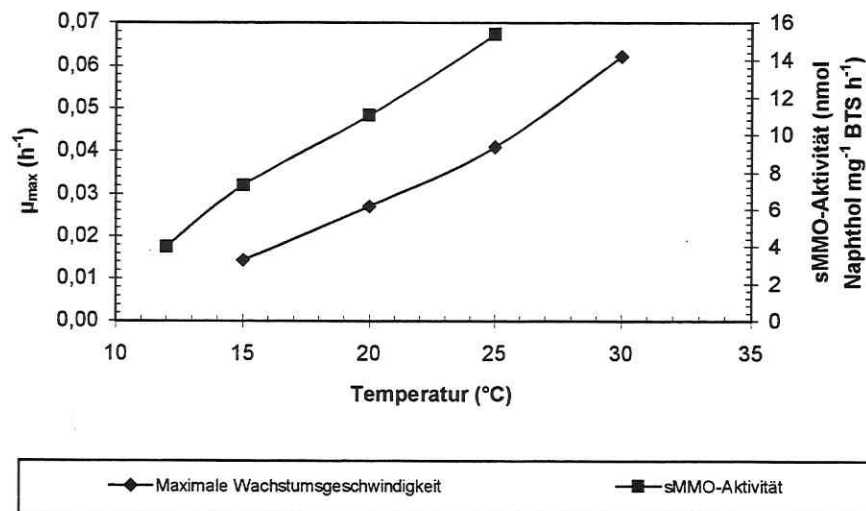


Abb. 26: Maximale Wachstumsgeschwindigkeit und sMMO-Aktivität von *Methylocystis* sp. GB 14 bei verschiedenen Temperaturen

3.2.2. Einfluß der TCE-Konzentration

Aus der Literatur ist die toxische Wirkung des TCE bzw. von Abbauprodukten auf die Zellen bekannt (LITTLE et al. 1988). Zur Ermittlung der toxischen Wirkung wurde die TCE-Konzentration im Bereich von 0-100 mg l⁻¹ variiert und die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit bzw. sMMO-Aktivität der Kultur gemessen. Die Kultivierung für diese Versuche erfolgte in Schüttelkolben. Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit wurde in der Sauerstoffauszehrzelle, beschrieben in Punkt 2.3.4.) gemessen.. Die sMMO-Aktivität wurde entsprechend Punkt 2.3.5. ermittelt. Die Zellen waren jeweils analysenbedingt 4 Minuten bei der Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und 60 Minuten bei Bestimmung der sMMO-Aktivität dem TCE ausgesetzt.

Abb. 27 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Es ist ersichtlich, daß beide Größen korrelieren.

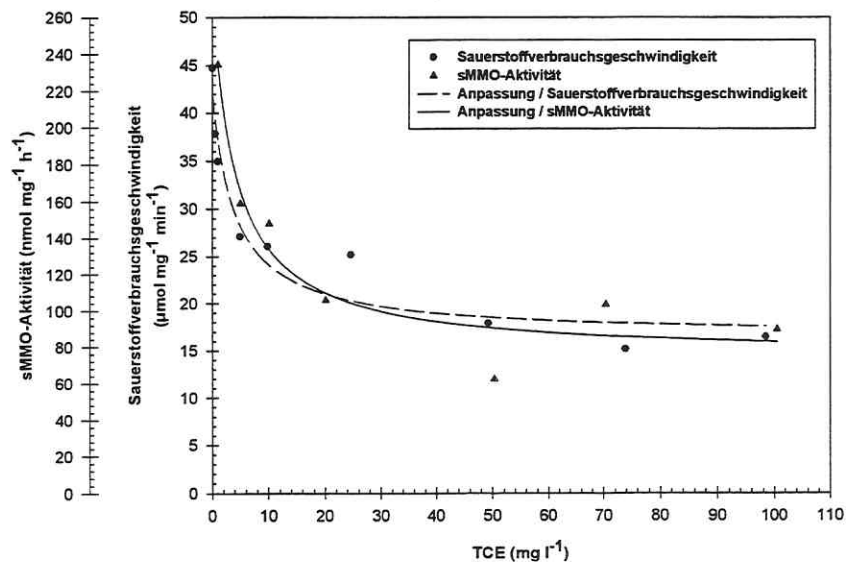


Abb. 27: Abhängigkeit der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und der sMMO-Aktivität von *Methylocystis* sp. GB 14 von der TCE-Konzentration

Sowohl für die sMMO-Aktivität, als auch für die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit konnte folgende, modifizierte Monod-Anpassung gefunden werden:

sMMO-Aktivität:

$$a = a_0 - \frac{A_{\max} \cdot c_{TCE}}{K_a + c_{TCE}}$$

Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit:

$$r = r_0 - \frac{R_{\max} \cdot c_{TCE}}{K_r + c_{TCE}}$$

In Tabelle 7 sind die errechneten Konstanten zusammengefaßt.

Tab. 7: Errechnete Monod-Konstanten für sMMO-Aktivität und Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit

	a_0, r_0	$A_{\max}, R_{\max}$	$K_{a, r}$	Korrelationskoeffizient
Sauerstoffverbrauchs- geschwindigkeit	42,0047 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	25,4967 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	4,2596 mg l^{-1}	0,967
sMMO-Aktivität	270,2714 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	195,4808 $\text{nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	4,3629 mg l^{-1}	0,964

3.3. Abbau von Trichlorethen (TCE)

3.3.1. Bilanz des Abbaus

In mehreren Versuchen in mit Teflonseptum verschlossenen Röhrchen wurde der Abbau von TCE verfolgt. Die Bilanzierung erfolgte über die Chlorid- und Kohlenstoffkonzentration in der Bakteriensuspension. Unter Voraussetzung einer vollständigen Dechlorierung des TCE wurde aus der Abnahme der TCE-Konzentration die theoretische Zunahme der Chloridkonzentration in der Bakteriensuspension berechnet. Da 80,95 % der molaren Masse von TCE Chlor ist, wurde jeweils 80,95% des umgesetzten TCE als Zunahme des Chlorids angenommen. In Abb. 28 und 29 sind die Verläufe der TCE-, der gemessenen und der berechneten Chloridkonzentration über die Zeit dargestellt. Wie die Darstellung zeigt, ist nach 6 Stunden das TCE bei einer Anfangskonzentration von 5 mg l^{-1} nahezu vollständig abgebaut. Die Differenz zwischen berechneter und gemessener Chloridkonzentration liegt im Fehlerbereich der Analysenmethode. Damit kann eine mindestens 90%ige Dechlorierung nachgewiesen

werden. Das zeigt ebenfalls die Bilanz der prozentualen Anteile von Chlor im TCE und Chlorid in der Bakteriensuspension in Abb. 30.

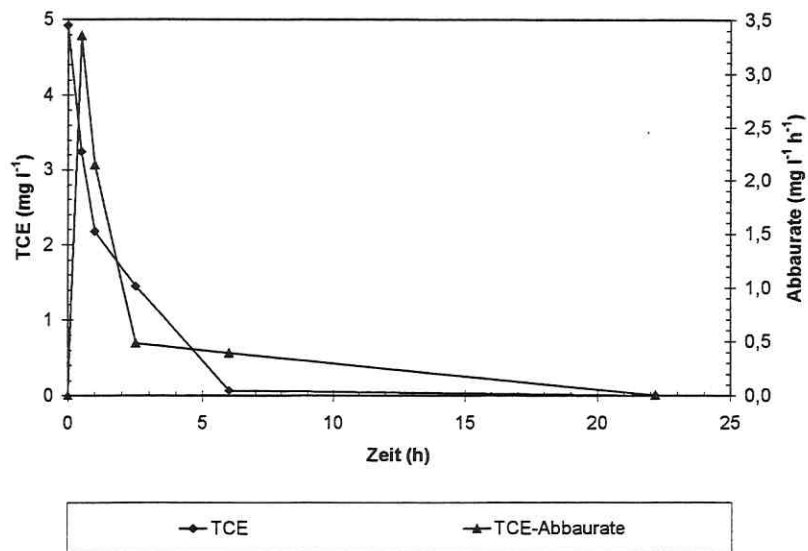


Abb. 28: Verlauf von TCE-Konzentration und TCE-Abbaurrate über die Zeit

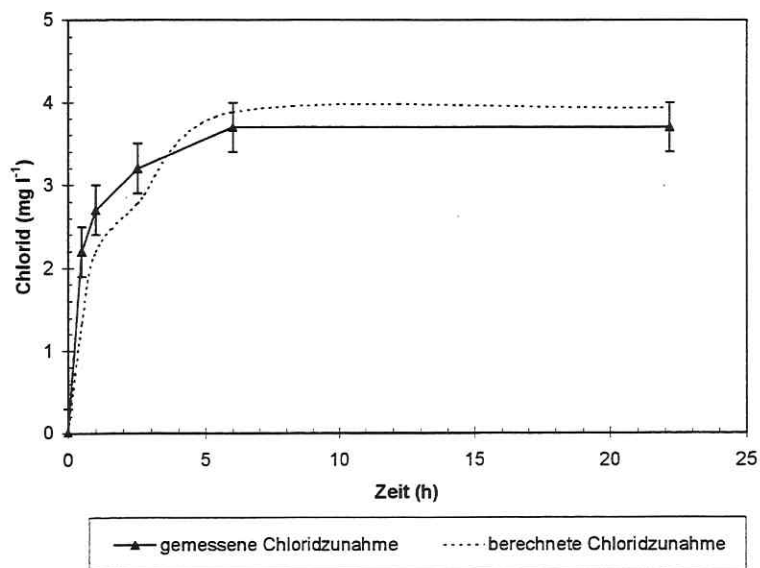


Abb. 29: Gemessene und berechnete Chloridzunahme

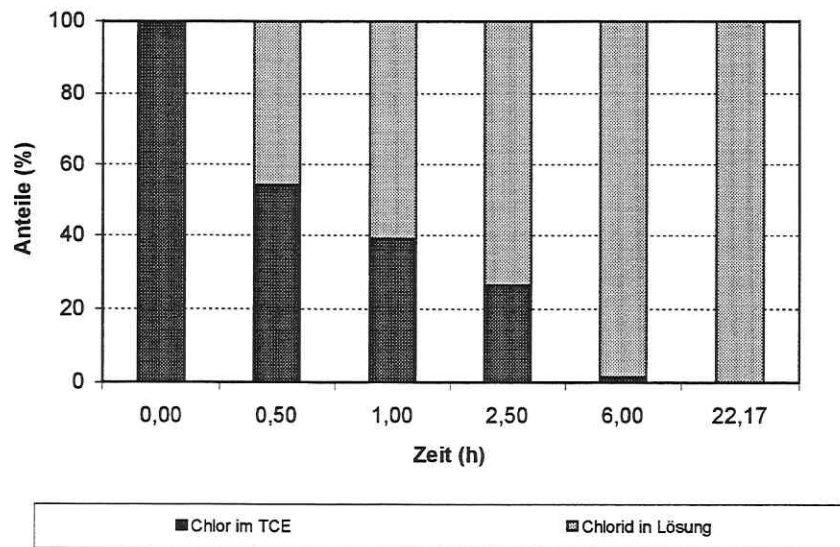


Abb. 30: Chloridbilanz (auf 100% normiert) für den TCE-Abbau mit dem *Methylocystis* sp. GB 14

Die Versuche wurden dann auf die in Punkt 2.2. beschriebenen Säulenapparatur übertragen. Zur Ermittlung der Kinetik des Abbaus von TCE wurden zahlreiche Versuche durchgeführt. Als am geeignetsten erwies sich, die in Abb. 31 dargestellten Anpassungen für TCE und Chlorid. Die Korrelationskoeffizienten von 0,996 für TCE und 0,979 für Chlorid beweisen die Anwendbarkeit der verwendeten Anpassung für die Säulenversuche. Die berechnete Konstante a entspricht der TCE-Abbaurrate bzw. der Chlorid-Bildungsrate. Eine Chlorid-Bilanz bzw. der Vergleich von gemessener und berechneter Chloridkonzentration war in der Säulenapparatur nicht möglich, da durch die pH-Elektroden Chlorid freigesetzt wird, und es damit zur Verfälschung der Chloridbestimmung kommt. Der in Abb. 32 und 33 dargestellte Versuch wurde ohne pH-Messung durchgeführt.

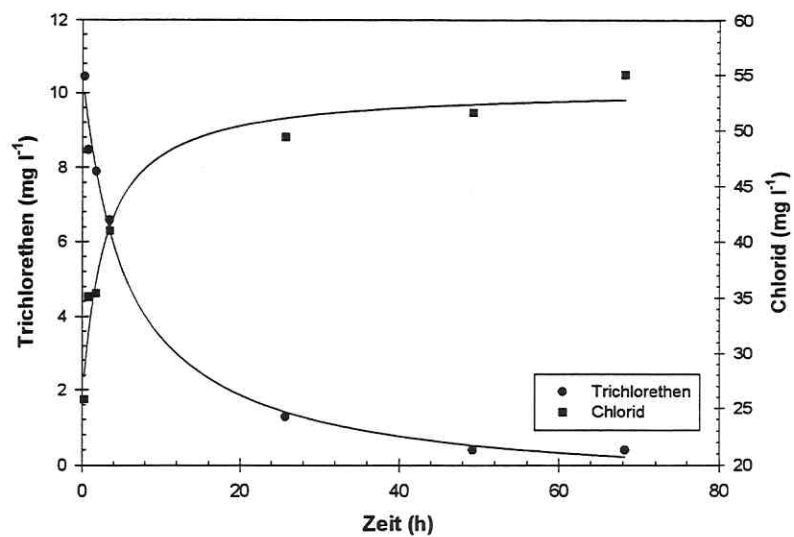


Abb. 31: Verlauf der TCE-Konzentration und der Chloridkonzentration bei Versuchen in der Säulenapparatur

Verwendete Anpassungen:

$$c = c_0 + \frac{a \cdot t}{b + t}$$

Anpassung für TCE:

$$c = 10,4 - \frac{11,1 \cdot t}{5,9 + t}$$

$$r = 0,996$$

Anpassung für Chlorid:

$$c = 25,5 + \frac{28,3 \cdot t}{2,7 + t}$$

$$r = 0,979$$

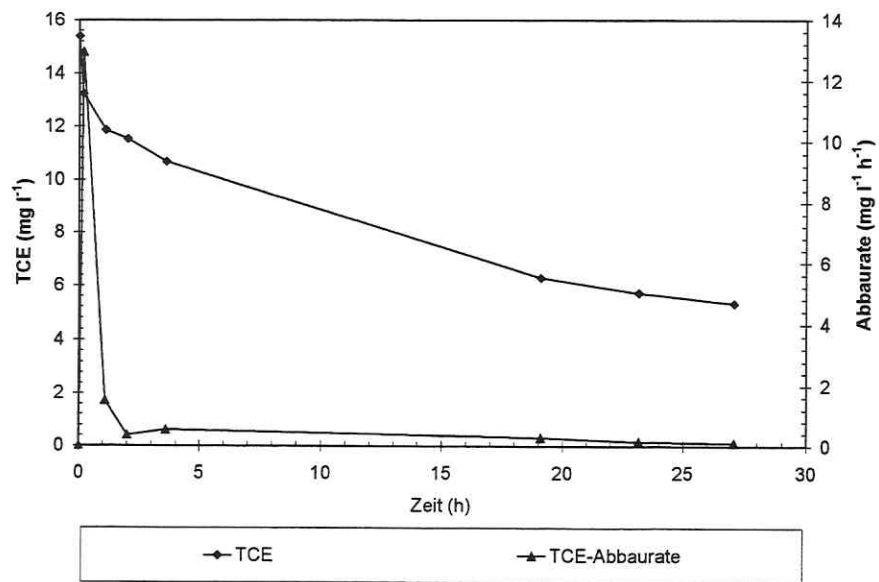


Abb. 32: Verlauf der TCE-Konzentration und der TCE-Abbaurrate während Säulenversuchen

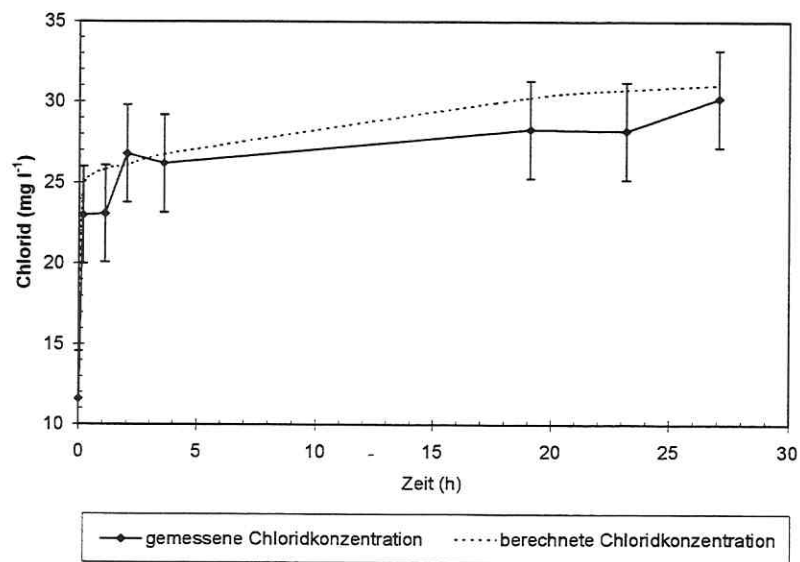


Abb. 33: Verlauf von gemessener und berechneter Chloridkonzentration während Säulenversuchen

Die pH-Elektroden wurden aus dem System entfernt, so daß zusätzlich kein Chlorid freigesetzt werden konnte. Bei diesem Versuch lag die Differenz zwischen berechneter und gemessener Chloridkonzentration wieder im Fehlerbereich der Analyseverfahren.

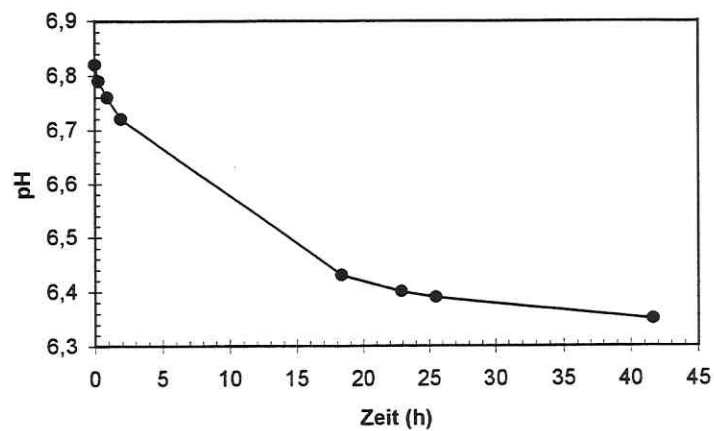
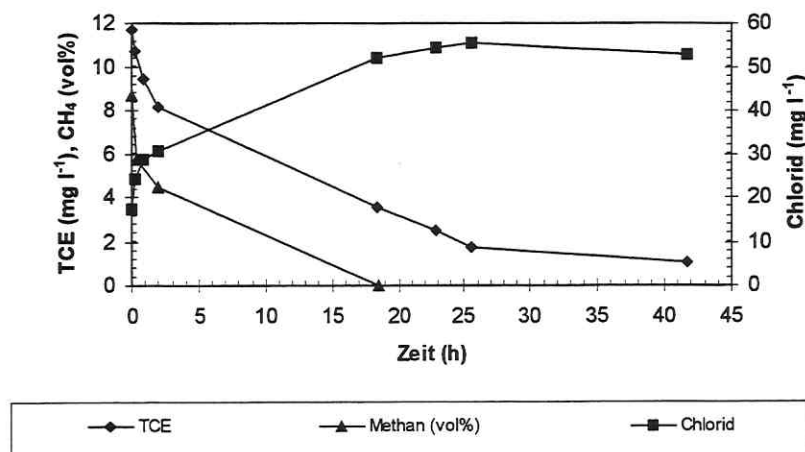


Abb. 34 u. 35: Verlauf von TCE-Konzentration, Methan in Kopfraum der Begasungssäule, pH und Chloridkonzentration beim Abbau von TCE durch *Methylocystis* sp. GB 14 in der Säulenapparatur

Bei den Säulenversuchen wurden die TCE-Konzentration, die Chloridkonzentration und die Biomassetrockensubstanz durch Probennahme verfolgt. Zur Bestimmung der Methankonzentration im Kopfraum der Begasungssäule wurden Proben mit einer gasdichten Spritze entnommen und am GC vermessen.

Nach 42 Stunden ist in der Säulenapparatur das TCE bei einer Anfangskonzentration von ca. 12 mg l^{-1} zu 92% abgebaut (Abb. 34). Der Verlauf der Chloridkonzentration und der Verlauf der pH-Abnahme (Abb. 35) beweisen die Biodegradation des TCE. Beim Wachstum des Stammes *Methylocystis* sp. GB 14 steigt der pH-Wert an. Die Abnahme des pH-Wert parallel zur Abnahme der TCE-Konzentration und die Zunahme der Chloridkonzentration weisen auf die Bildung von dissoziierter Säure hin. Die Methankonzentration im Kopfraum der Begasungssäule ist nach 18 Stunden von ca. 10vol% unter die Nachweisgrenze abgesunken.

Eine Kohlenstoffbilanz konnte nicht erstellt werden, da die Kohlenstoffanteile im TCE von 0,1-1,7 mg verschwindend gering gegenüber den Kohlenstoffanteilen im Methan mit 75-380 mg bzw. im Kohlendioxid von 118-137 mg waren. Diese hohen Kohlenstoffanteile im Methan und im Kohlendioxid sind darauf zurückzuführen, daß ein Gasraum von 6,065 l als Gasreservoir genutzt wurde.

Eine vollständige Mineralisierung konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr steigt der Anteil an organischem Kohlenstoff, ausgedrückt in Form des CSB, in der Bakteriensuspension.

3.3.2. Kinetik des TCE-Abbaus in Abhängigkeit von der TCE-Anfangskonzentration

Bei den Röhrchenversuchen wie auch bei den Säulenversuchen wurden die maximalen TCE-Abbauraten bei verschiedenen TCE-Anfangskonzentrationen ermittelt. Ab einer TCE-Anfangskonzentration von $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ war eine Abnahme der maximalen Abbauraten zu beobachten.

Die Anwendung einer Monod-Kinetik erwies sich nicht als zweckmäßig, da ein Inhibierungsterm fehlt.

Monod-Kinetik:

$$q = \frac{c \cdot q_{\max}}{K_S + c}$$

Die bessere Anpassung ergab eine modifizierte Haldane-Kinetik (YAMANE et al. 1976):

$$q = \frac{c \cdot q_{\max}}{K_S + c + c \left(\frac{c}{K_I} \right)^n}$$

In Abb. 36 ist die Abbaukinetik dargestellt. Die beste Anpassung ergab sich bei dem Faktor $n=2$.

Nach Berechnung der Konstanten ergibt sich folgende Beziehung:

$$q = \frac{c_{TCE} \cdot q_{\max}}{K_S + c_{TCE} + c_{TCE} \left(\frac{c_{TCE}}{K_I} \right)^2}$$

$$\begin{aligned} q_{\max} &= 92,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1} \\ K_S &= 4,0 \text{ mg l}^{-1} \\ K_I &= 14,5 \text{ mg l}^{-1} \end{aligned}$$

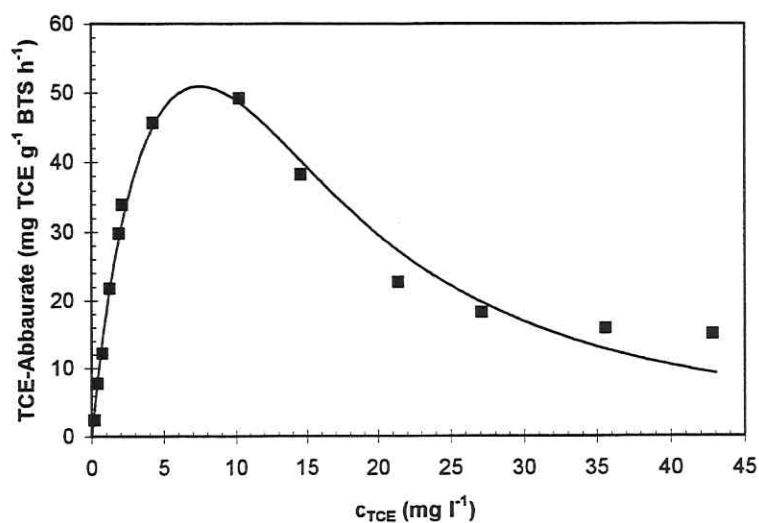


Abb. 36: Maximale TCE-Abbaurrate von *Methycystis* sp. GB 14 in Abhängigkeit von der TCE-Anfangskonzentration

Die maximale Abbaurrate von $50,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wird bei einer TCE-Anfangskonzentration von $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht.

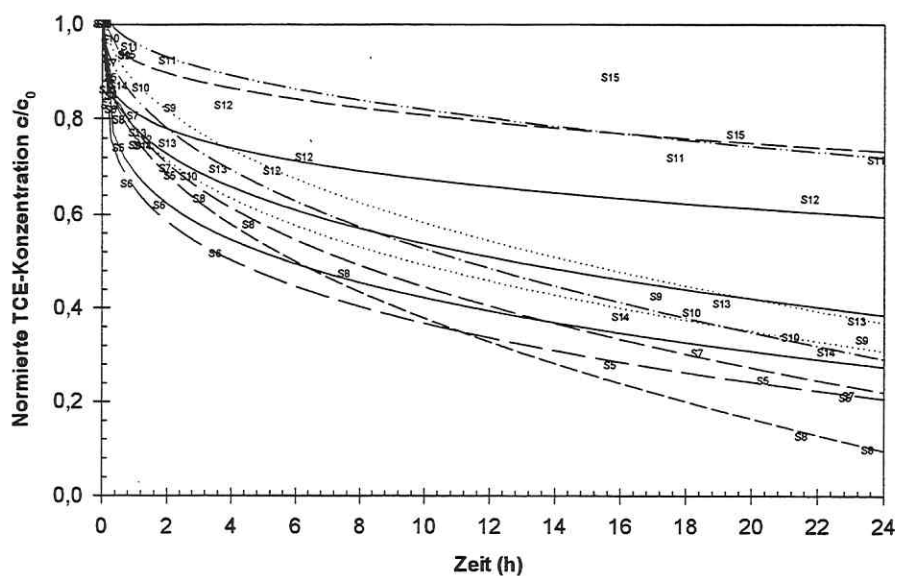


Abb. 37: Verlauf der normierten TCE-Konzentration in den ersten 24 Stunden

Die Versuche wurden anschließend auf die Säulenapparatur übertragen. In Abb. 37 sind die Verläufe der normierten TCE-Konzentrationen in Abhängigkeit von der TCE-Anfangskonzentration dargestellt.

3.3.3. Kinetik des TCE-Abbaus in Abhängigkeit von der Methankonzentration

Einen weiteren inhibierenden Einfluß auf den TCE-Abbau stellt das Methan dar. Bei Methankonzentrationen oberhalb der optimalen Konzentration oxidieren die Bakterien bevorzugt das Methan und nicht den Schadstoff. Daher war es notwendig zu untersuchen, bei welchen Methankonzentrationen es zur Hemmung des TCE-Abbaus kommt. Diese

Untersuchungen wurden analog den Versuchen zum Einfluß der TCE-Anfangskonzentration in Röhrchen durchgeführt. Die definierten Methanmengen wurden in Form einer methangesättigten Nährlösung zugesetzt. Die Konzentrationen von gelöstem Methan in der Bakteriensuspension lagen zwischen 0,0-4,2 mg l⁻¹, was einer Methansättigung von 21,9% bei 30°C entspricht.

Wie Abb. 38 zeigt, erwies sich auch hier die Anpassung mit einer modifizierten Haldane-Kinetik als zweckmäßig.

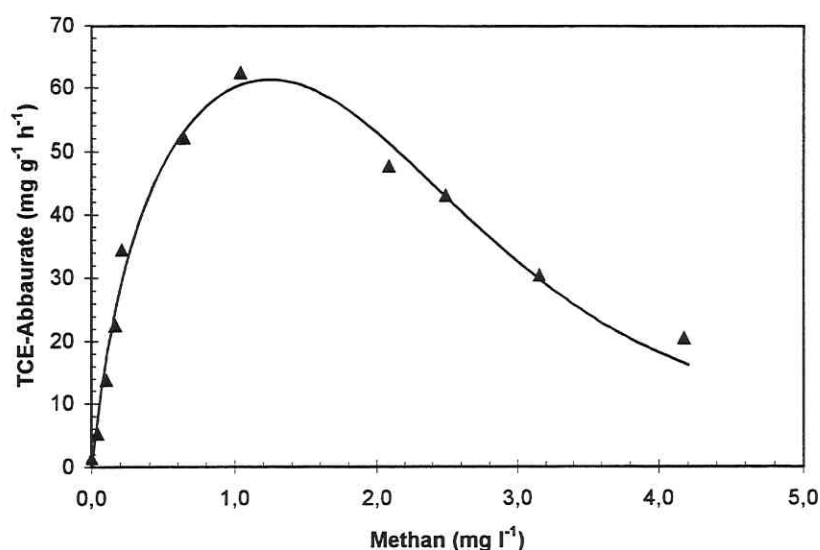


Abb. 38: Funktion der maximalen TCE-Abbaureate des *Methylocystis* sp. GB 14 in Abhängigkeit von der Methankonzentration

Modifizierte Haldane-Kinetik:

$$q = \frac{c_{CH_4} \cdot q_{\max}}{K_S + c_{CH_4} + c_{CH_4} \left(\frac{c_{CH_4}}{K_I} \right)^3}$$

Folgende Konstanten konnten berechnet werden:

$$q_{\max} = 89,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 0,4 \text{ mg l}^{-1}$$

$$K_I = 2,6 \text{ mg l}^{-1}$$

$$n = 3$$

Die maximale Abbaurrate von $61,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wird bei einer Methanankonzentration von $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ in der Kulturflüssigkeit erreicht. Diese Methankonzentration von $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ entspricht 6,5% der Sättigungskonzentration von Methan bei 30°C .

3.3.4. Modell des Einflusses von TCE- und Methankonzentration auf die TCE-Abbaurrate

Durch Kombination der Haldane-Kinetiken sowohl für die TCE-Anfangskonzentration als auch für die Methanankonzentration konnte das in Abb. 39 dargestellte Modell entwickelt werden.

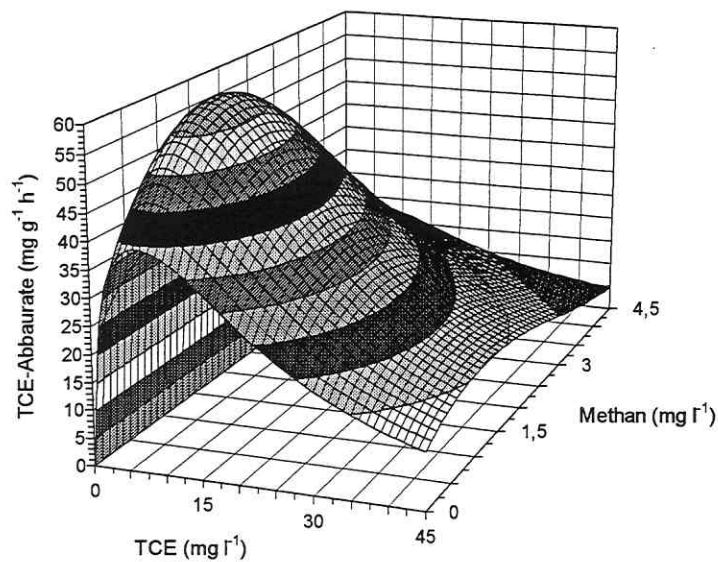


Abb. 39: Funktion der maximalen TCE-Abbaurrate in Abhängigkeit von Methan- und TCE-Anfangskonzentration

Dem dargestellten Modell liegt folgende Gleichung zu Grunde:

$$q = \frac{q_{\max} \cdot c_{TCE}}{\left(K_{STCE} + c_{TCE} + c_{TCE} \cdot \left(\frac{c_{TCE}}{K_{ITCE}} \right)^2 \right)} \cdot \frac{K_{ICH_4}^3}{\left(c_{CH_4}^3 + K_{ICH_4}^3 \right)} \cdot \left(1 + \frac{c_{CH_4}}{K_{SCH_4} + c_{CH_4} + c_{CH_4} \cdot \left(\frac{c_{CH_4}}{K_{ICH_4}} \right)^3} \right)$$

$$q_{\max} = 48,7 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$K_{STCE} = 1,0 \text{ mg l}^{-1}$$

$$K_{ITCE} = 23,4 \text{ mg l}^{-1}$$

$$\text{Korrelationskoeffizient } r = 0,807$$

$$K_{SCH_4} = 0,9 \text{ mg l}^{-1}$$

$$K_{ICH_4} = 3,6 \text{ mg l}^{-1}$$

Der hier genannte Korrelationskoeffizient von 0,807 gilt für die zur Bestimmung der Kinetiken verwendeten Meßpunkte. Die Praxisrelevanz dieses Modell ist nicht überzubewerten. Eine Validierung des Modells stellt einen großen Arbeitsaufwand dar und hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Dennoch kann man damit die maximale Geschwindigkeit der cometabolischen Oxidation des Schadstoffes TCE - Cosubstrat - in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des Wachstums- und Cosubstrates abschätzen.

3.3.5. Aktivität der sMMO während des TCE-Abbaus

Um Aussagen über das Verhalten der sMMO während des TCE-Abbaus zu treffen, wurde die sMMO-Aktivität während verschiedener Abbauprobe verfolgt.

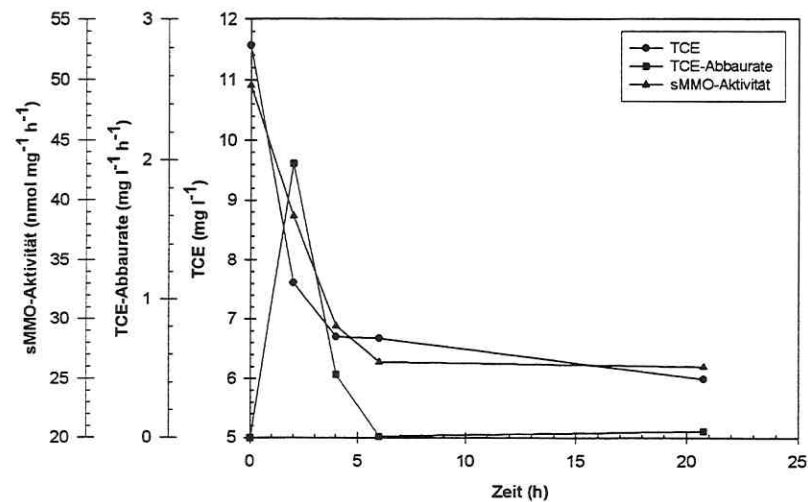


Abb. 40: Verlauf der TCE-Konzentration, TCE-Abbaureate und der sMMO-Aktivität während des TCE-Abbaus

Aus Abb. 40 ist ersichtlich, daß parallel zur sMMO-Aktivität die TCE-Abbaureate während des Versuches fällt. Nach 6 h hat die sMMO-Aktivität um ca. 50% abgenommen und die TCE-Abbaureate ist praktisch auf Null gefallen. Das läßt den Schluß zu, daß eine minimale sMMO-Aktivität vorhanden sein muß, um eine Abbaureate zu erreichen. Zu diesem Zeitpunkt lag mit $0,78 \text{ mg l}^{-1}$ die Gelöstmethankonzentration bei 62,4% der in Punkt 3.3.3. ermittelten optimalen Konzentration von $1,25 \text{ mg l}^{-1}$.

3.3.6. TCE-Abbau mit immobilisierten Zellen des Stammes *Methylocystis* sp. GB 14

Intakte Zellen, welche sMMO exprimierten, wurden in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig (FAL) mittels eines neuen Verfahrens immobilisiert (JEKEL et al. 1998). Das Verfahren ist markenrechtlich unter der Bezeichnung LentiKats® geschützt. Die LentiKats® bestehen aus einem PVAL-Hydrogel (10% PVAL und 90% Wasser). Die Gelierung zum PVAL-Hydrogel erfolgt bei Zimmertemperatur, was schonender für die zu immobilisierenden Mikroorganismen ist. Bisherige Immobilisierungsverfahren erreichen die Gelierung durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der wäßrigen PVAL-Suspension. Neu ist außerdem die Linsenform der LentiKats®. Sie haben einen Durchmesser von 3 bis 4 mm und eine Dicke von 200 bis 400 µm.

Die Versuche mit den LentiKats® wurden dann in dem in Punkt 2.2. beschriebenen Wirbelschichtreaktor durchgeführt. Die Biomassekonzentration wurde konstant gehalten. Das Immobilisat war immer mit 2% beladen, d.h. die Biomassekonzentration lag bei 300 mg l⁻¹. Abb. 41 zeigt die mikroskopische Aufnahme einer LentiKats® vor bzw. nach Bewuchs.

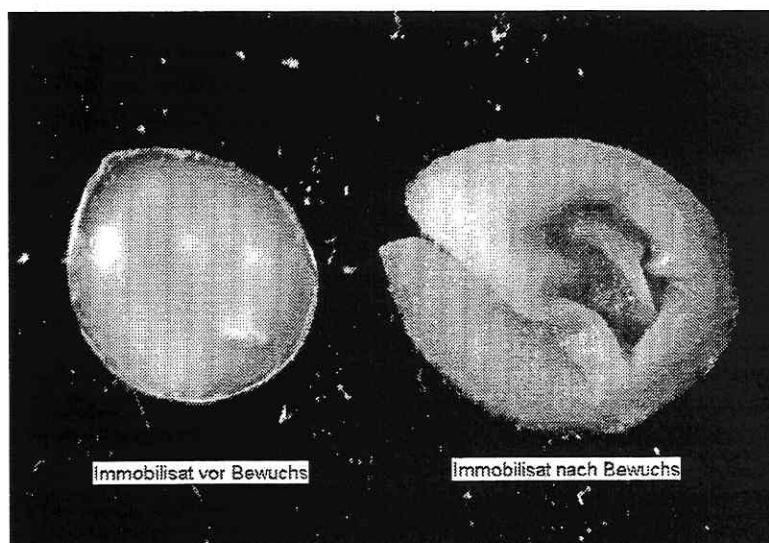


Abb. 41: Mikroskopische Aufnahme von Immobilisat vor bzw. nach Bewuchs mit *Methylocystis* sp. GB 14 (10fache Vergrößerung)

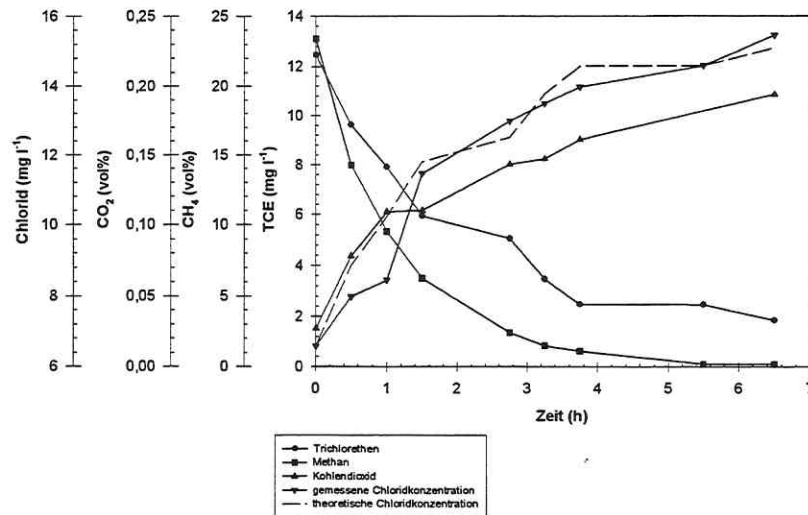


Abb. 42: Verlauf von TCE-Konzentration, gemessener und theoretischer Chloridkonzentration und von Methan- und Kohlendioxidkonzentration im Gasraum bei Abbauprobungen mit immobilisierten Zellen von *Methylocystis* sp. GB 14

Nach Wachstum und Expression von sMMO wurden die Abbauprobungen durchgeführt. Abb. 42 zeigt die Verläufe von TCE-Konzentration, theoretischer und gemessener Chloridkonzentration und Abnahme der Methankonzentration bzw. die Zunahme der Kohlendioxidkonzentration im Gasraum des Wirbelschichtreaktors. Eine vollständige Dechlorierung kann festgestellt werden, da die Differenz von gemessener und berechneter Chloridkonzentration wiederum im Fehlerbereich der Analysenmethode liegt. Abb. 43 zeigt die Kohlenstoffbilanz für den TCE-Abbau mit immobilisierten Zellen. Bis auf den Wert zum Zeitpunkt Null wird ein Gesamtkohlenstoffgehalt von $5,0 \pm 0,5 \mu\text{g}$ immer wiedergefunden. Bei den Abbauprobungen mit immobilisierten Zellen war es möglich, die Bakterien zu regenerieren, d.h. nach Ablauf des Abbauprobens wurden das System wieder mit dem Methan-Luft-Gemisch begast (siehe Punkt 2.2.). Die Bestimmung der sMMO-Aktivität der in den LentiKats® immobilisierten Zellen wurde dahingehend modifiziert, daß die Extinktion des entstehenden Farbkompleses nach Inkubation eines LentiKats® mit Naphthalinlösung bei 525 nm vermessen und als Maß für sMMO-Aktivität genommen wurde. Diese Modifizierung

wurde unternommen, da eine genaue Biomassebestimmung zu aufwendig war. Nach 2 Tagen konnte wieder die ursprüngliche sMMO-Aktivität (Extinktion von 0,6 bis 0,7) gemessen werden. Diese zyklische Verfahrensweise konnte bis zu fünfmal wiederholt werden.

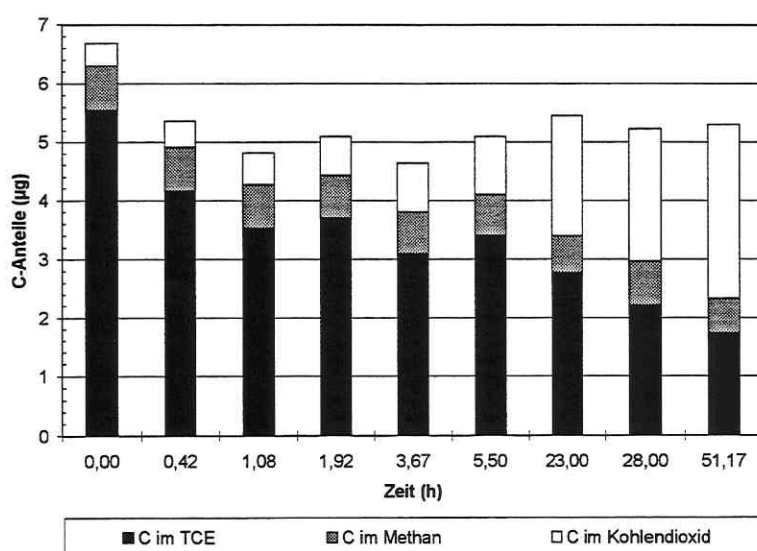


Abb. 43: Kohlenstoffbilanz für den TCE-Abbau mittels immobilisierter Zellen von *Methylocystis* sp. GB 14

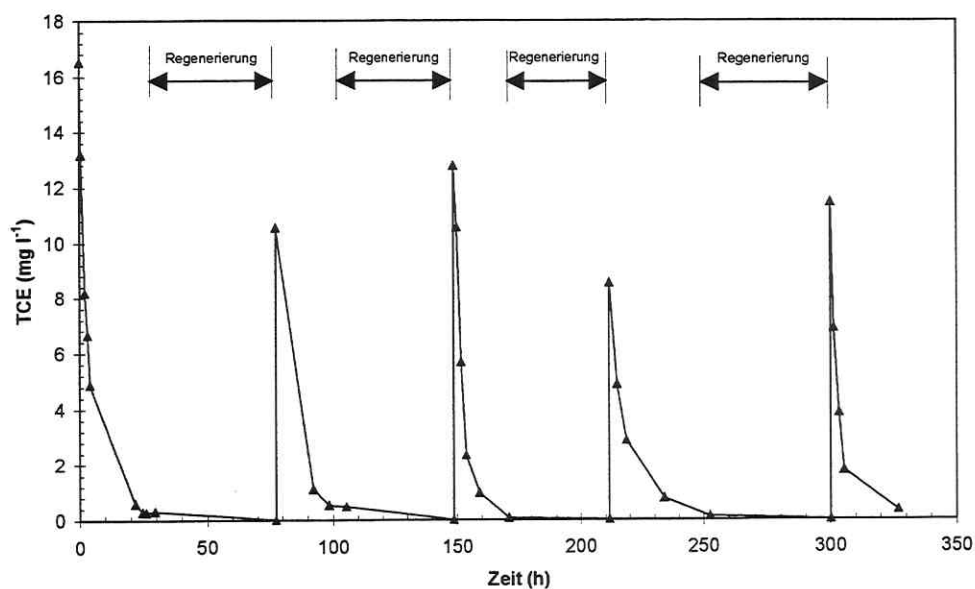


Abb. 44: Zyklischer TCE-Abbau nach Regenerierung der Zellen

Abb. 44 zeigt einen solchen Zyklus des TCE-Abbaus nach Regenerierung. Nach mehrmaliger Wiederholung der Zyklen kam es vor allem auch zu vermehrtem Abrieb des Immobilisatmaterials, weshalb es dann notwendig wurde, dies auszutauschen.

3.3.7. Vergleich der TCE-Abbauraten

Um die Röhrchen-, Säulen- bzw. Immobilisatversuche vergleichen zu können, wurden die TCE-Abbauraten berechnet. Die Versuche wurden jeweils bei gleichen Bedingungen durchgeführt (300 mg l⁻¹ BTS, TCE-Anfangskonzentration 10 mg l⁻¹). In Abb. 45 sind die Ergebnisse dargestellt. In Tabelle 8 sind die maximalen TCE-Abbauraten zusammengefaßt. Es ist zu erkennen, daß die höchsten Abbauraten unter diesen Bedingungen in den Immobilisatversuchen erzielt wurden.

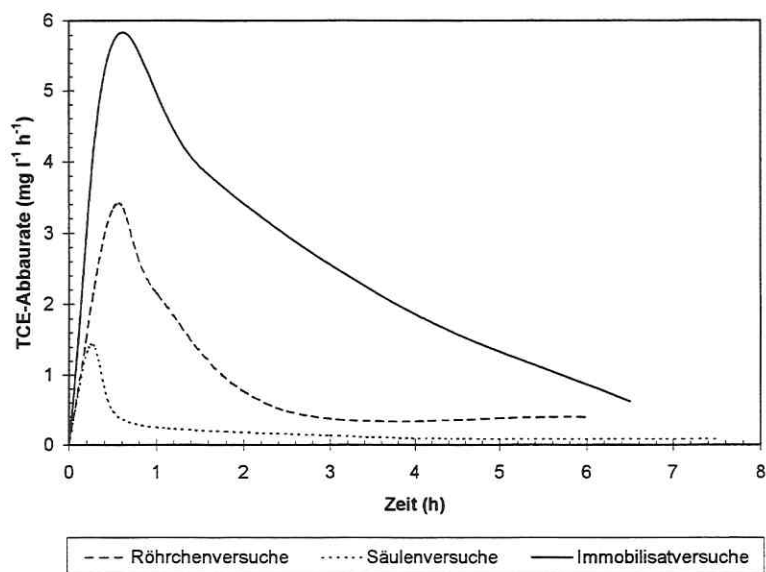


Abb. 45: Vergleich der TCE-Abbauraten

Tab. 8: Maximale TCE-Abbauraten

Versuch	Maximale TCE-Abbauraten ($\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Immobilisatversuch	5,69
Röhrchenversuch	3,35
Säulenversuch	1,44

Das Maximum der Abbauraten ist nach 1 h überschritten. Bedeutende Unterschiede sind auch im Verlauf der TCE-Abbauraten während der Versuche zu verzeichnen. So sinken die TCE-Abbauraten bei den Versuchen unterschiedlich schnell ab. Während die Abbauraten im Immobilisatversuch erst nach ca. 2,7 h um 50% gesunken ist, so sind im Röhrchenversuch nach ca. 1,2 h nach 50% Abbauraten zu verzeichnen und bei den Säulenversuchen ist schon nach ca. 0,2 h die Abbauraten um 50% gefallen. Nach 4 h betrugen die Abbauraten in den Immobilisatversuchen 35%, in den Röhrchenversuchen 12% und in den Säulenversuchen 5,7% der jeweiligen maximalen Abbauraten.

4. Diskussion

Chlorierte Kohlenwasserstoffe, wie beispielsweise TCE, besitzen ein hohes Gefährdungspotential und treten vor allem an Standorten auf, an denen viel mit Lösungsmitteln gearbeitet wurde. Es besteht erheblicher Handlungsbedarf, CKW kontaminierte Habitats zu reinigen. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten: abiotische und biotische Methoden. Abiotische Methoden werden zwar noch häufiger in der Sanierungspraxis angewendet. Allerdings haben sie meist den Nachteil, daß der Schadstoff nicht abgebaut wird, sondern nur entfernt und verlagert wird. Biotische Methoden hingegen bieten die Möglichkeit einer vollständigen Mineralisierung und damit Beseitigung der Schadstoffe. Zu den biotischen Methoden zählen die verbreiteten cometabolischen Reaktionen, zu denen auch methanotrophe Bakterien befähigt sind.

Die Zielstellung der Untersuchungen läßt sich zusammenfassen - kinetische Untersuchungen zum Einfluß von Substrat (Methan) und Cosubstrat (CKW) auf die Dehalogenierung mit dem Ziel, Grundlagen eines praxisrelevanten Sanierungsverfahrens abzuleiten, zu prüfen und zu optimieren.

Die Oxidation von TCE durch methanotrophe Bakterien wird durch die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO) katalysiert. Dieses Enzym realisiert im Metabolismus der methanotrophen Bakterien die Primäroxidation des Methans zum Methanol. Die sMMO wird zum einen nicht von allen methanotrophen Stämmen und zum anderen nicht unter allen Umgebungsbedingungen exprimiert. DiSpirito (DISPIRITO et al. 1992) berichtet zwar über die Oxidation von TCE durch die pMMO in verschiedenen Typ I, II und X Methanotrophen, allerdings waren die Abbauraten wesentlich geringer als bei einer Oxidation durch die sMMO. Nach Auswahl der 5 sMMO-positiven Stämme wurden für diese die maximalen Wachstumsgeschwindigkeiten beim Wachstum auf kupferfreiem NMS bzw. kupferfreiem AN-NMS bei 30°C bzw. 38°C bestimmt. Neben dem Erzielen von hohen Wachstumsgeschwindigkeiten ist es vor allem notwendig sMMO mit möglichst hohen Aktivitäten zu exprimieren. Dies wurde als Auswahlkriterium für die Isolate definiert.

Bei allen Isolaten wurde die maximale sMMO-Aktivität während der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Aus dem Screening zur Verfügung stehender Stämme, die aus unterschiedlichsten Habitaten isoliert wurden, hob sich der Stamm WI 14 unter optimierten Laborbedingungen durch eine besonders hohe sMMO-Aktivität hervor, die im Vergleich zu anderen Isolaten um etwa 16% höher lag. Somit wurde das Isolat WI 14 mit einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,067 \text{ h}^{-1}$ und einer sMMO-Aktivität von $132,9 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Mit diesem durch eine hohe sMMO-Aktivität hervorgehobenen leistungsfähigen Stamm wurde der Einfluß externer Faktoren auf die sMMO-Aktivität und auf die Dehalogenierung untersucht. Damit war die Grundlage gegeben, kinetische Effekte, Inhibitionen usw. besser einschätzen zu können.

Ein Hauptkriterium für die Typ Zuordnung der methanotrophen Bakterien ist Anordnung der Membranen in der Zelle (WHITTENBURY et al. 1983). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die periphere Anordnung der Membranen und erlauben daher eindeutig die Zuordnung des Stammes zu den Typ II methanotrophen Bakterien. Dieses erstmalig in seinem kinetischen Verhalten charakterisierte Isolat wurde von der DSM - Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen als *Methylocystis* sp. GB 14 - DSM 12955 bestimmt. Das rudimentäre Auftreten der Membran (Abb. 24) beim Wachstum auf kupferarmen Medium deuten auf die Expression von sMMO hin. Diese Feststellung wurde schon von Koh (KOH et al. 1993) beim Wachstum von *Methylomonas methanica* 68-1 auf kupferfreiem Medium gemacht. Einen vollständigen Verlust der intrazellulären Membranstrukturen wurde beim Wachstum von *Methylomonas alba* beschrieben (COLLINS et al. 1991).

Von Colby (COLBY et al. 1977) wurde festgestellt, daß MMO, extrahiert aus *Methylococcus capsulatus*, neben gesättigten, ungesättigten und aromatischen Kohlenwasserstoffen auch deren halogenierte Derivate oxidieren kann. Später wurden diese Oxidationsreaktionen als Cometabolismus erkannt. Für die sMMO aus dem verwendeten Stamm *Methylocystis* sp. GB 14 wurde die geringe Substratspezifität des Enzyms durch Große nachgewiesen (GROSSE 1998). Tabelle 9 zeigt eine Auswahl von Substraten, die durch die sMMO aus *Methylocystis* sp. GB 14 oxidiert werden.

Tab. 9: Substratspezifität der sMMO aus *Methylocystis* sp. GB 14 (nach GROSSE 1998)

Substrat	Produkt
Ethen	Ethenoxid
Propan	2-Propanol
Diethylether	Ethanol, Acetaldehyd
Benzen	Phenol
Toluen	Kresol
Xylen	Xylenol
Naphthalen	Naphthol
Chlorpentan	Chlorpentanol

Da es sich bei der Biodegradation von TCE um eine cometabolische Oxidation handelt, sind Wachstum und Cooxidation nicht miteinander gekoppelt (FRITSCH 1998). Hinsichtlich einer praktischen Anwendung ist es notwendig, ein schnelles Wachstum verbunden mit der Expression von sMMO mit hoher Aktivität zu erzielen. Die Temperatur von Grundwasserleitern in europäischen Breiten beträgt 5-15°C. Das heißt, die Cooxidationsreaktionen müssen dann bei Temperaturen ablaufen, die unter der optimalen Wachstumstemperatur liegt. Dazu gibt es bisher kaum erstzunehmenden Untersuchungen. Der untersuchte Stamm *Methylocystis* sp. GB 14 zeigt, bezogen auf die sMMO-Aktivität (100%ige Aktivität) bei 25°C, bei 12°C noch eine Aktivität von 26%. Daraus resultiert, daß dieser Stamm auch bei Grundwassertemperaturen eine Abbaukapazität zeigen wird. Japanische Wissenschaftler (Fa. Ebara, Japan) berichten davon, daß auf Grund der geographischen Lage Japans, die Grundwassertemperaturen bei 20°C und höher liegen, wodurch sich die Bedingungen für in-situ Sanierungen dort besser gestalten.

Ein weiterer Einflußfaktor ist die Konzentration des TCE. Bereits Little (LITTLE et al. 1988) berichtet über diesen Einfluß des TCE bzw. von Abbauprodukten auf die Zellen. Es wird ein Spontanzerfall des TCE-Epoxid in Dichloressigsäure, Glyoxylsäure, Formiat und Kohlenmonoxid beschrieben. Die Entstehung des TCE-Epoxids konnte bisher nur mittels aufwendiger on-line Gaschromatographie nachgewiesen werden (HYLCKAMA VLIEG et al.

1996). Das Formiat und Kohlenmonoxid wird durch die Zellen zu Kohlendioxid umgesetzt. Untersuchungen von Uchiyama (UCHIYAMA et al. 1992) mit ^{14}C -Tracetechnik belegen den Abbauweg des TCE. Bei der Degradation mittels Reinkultur von *Methylocystis* sp. Strain M wurden ca. 32% des ^{14}C -markierten Kohlenstoffs in Glyoxylsäure, Dichloressigsäure und Trichloressigsäure wiedergefunden. Weitere 32% des ^{14}C -Kohlenstoffs waren zu Kohlendioxid bzw. Kohlenmonoxid transformiert worden. Durch eine verwendete Mischkultur mit heterotrophen Bakterien wurden hier die wasserlöslichen Zwischenprodukte ebenfalls zu Kohlendioxid umgesetzt.

Für *Methylocystis* sp. GB 14 wurden die oxidativen Aktivitäten als Sauerstoffverbrauchs geschwindigkeit und die sMMO-Aktivität bei verschiedenen Schadstoffkonzentrationen verglichen. Beide Aktivitäten korrelieren (Abb. 27), da die Oxidation des Methans zum Methanol mittels der MMO die einzige Stelle im Metabolismus der Zelle ist, an der molekularer Sauerstoff fixiert wird.

Auf beide Aktivitäten wurde die gleiche modifizierte Monod-Anpassung angewandt:

$$a, r = a_0, r_0 - \frac{A_{\max}, R_{\max} \cdot c_{\text{TCE}}}{K_a, K_r + c_{\text{TCE}}}$$

Folgende Konstanten der modifizierten Monod-Anpassungen errechnet:

Tab. 10: Konstanten der modifizierten Monod-Anpassungen

	a_0, r_0	$A_{\max}, R_{\max}$	K_a, r	Korrelationskoeffizient
Sauerstoffverbrauchs- geschwindigkeit	42,0047 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	25,4967 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	4,2596 mg l^{-1}	0,967
sMMO-Aktivität	270,2714 $\text{nmol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$	195,4808 $\text{nmol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$	4,3629 mg l^{-1}	0,964

Die Konstanten a_0 bzw. r_0 stellen die entsprechende Aktivität ohne Schadstoffeinfluß dar. Der zweite Term entspricht einer gespiegelten Monod-Anpassung. Die Korrelation von Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und sMMO-Aktivität wird hier in den fast identischen Konstanten K_a und K_r deutlich.

Es kann festgestellt werden, daß bis zu einer TCE-Konzentration von ca. 10 mg l⁻¹ beide Aktivitäten um ca. 50% abnehmen. Bei ca. 100 mg l⁻¹ TCE können immer noch ca. 40% beider Aktivitäten gemessen werden. Bei Untersuchungen an methanotrophen Mischkulturen stellte Broholm (BROHOLM et al. 1990) schon bei 13 mg l⁻¹ eine völlige Inhibierung des Methanverbrauchs fest. Bei Strand (STRAND et al. 1990) endete die oxidative Aktivität schon bei 7,77 mg l⁻¹. In Studien von Semprini (SEMPRINI et al. 1987, 1989, 1992) wurde eine Hemmung der Methanoxidation und TCE Transformation ab TCE Konzentrationen von mehr als 10 mg l⁻¹ festgestellt. Damit zeigt der untersuchte Stamm eine wesentliche höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber TCE als bisher in der Literatur beschriebene Stämme.

Die Bilanzierung des TCE-Abbaus wurde über eine Chloridbilanz durchgeführt. Setzt man eine vollständige Dechlorierung des TCE voraus, so ergibt sich stöchiometrisch, daß 80,95% der Masse an TCE als Chlorid entstehen müssen. Aus den Versuchen in den gasdicht verschlossenen Headspace-Röhrchen (Abb. 28 und 29) kann konstatiert werden, daß die gesamte Menge an TCE dechloriert wird. Dies wird durch den Vergleich der prozentualen Chloranteile im TCE bzw. als Chlorid in der Suspension (Abb. 30) bestätigt. Die maximale TCE-Abbaurrate von 3,4 mg l⁻¹ h⁻¹ wird innerhalb der ersten Versuchsstunde erreicht und fällt anschließend bis auf 0,5 mg l⁻¹ h⁻¹ ab. Anschließend nimmt die Abbaurrate weiter ab. Der Nachweis der Dechlorierung über die quantitative Bildung von Chlorid wird auch von Hoppenheidt (HOPPENHEIDT und HANERT 1993) und Nelson (NELSON et al. 1987) verwendet.

Die Übertragung der Versuche auf die Säulenapparatur gestaltete sich als problematisch. Bei diesen Versuchen (Abb. 31) wurde sowohl für den TCE-Abbau als auch für die Chloridbildung Anpassungen der Form $c = c_0 + ((a \cdot t)/(b + t))$ verwendet. Ein Chloridbilanz war hier schwierig, da in der Säulenapparatur eine pH-Messung mittels pH-Elektroden eingeführt wurde. Durch den Elektrolyt in den Elektroden wurden zusätzlich Chloridionen an die Bakteriensuspension abgegeben und verfälschten damit die Analysenergebnisse. Die gemessenen Chloridkonzentrationen lagen immer über den theoretisch erreichbaren. Daher wurden Versuche ohne pH-Messung durchgeführt (Abb. 32 und 33). Bei diesen Versuchen korrelieren berechnet und gemessene Chloridkonzentration, was für eine vollständige Dechlorierung des TCE spricht.

Die Dechlorierung des TCE ist mit der Bildung von dissoziierter Salzsäure verbunden, das heißt der pH im System müßte mit der Abnahme des TCE ebenfalls sinken. Im Gegensatz dazu steigt der pH beim Wachstum der Kultur. Anhand der Abb. 34 und 35 ist ersichtlich, daß der pH entsprechend der TCE-Abnahme sinkt.

Eine vollständige Mineralisierung konnte nicht nachgewiesen werden. Dies war auch nicht zu erwarten, da die Versuche mit methanotrophen Reinkulturen durchgeführt wurden. Das Ansteigen des CSB-Wertes als Maß für den gelösten organischen Kohlenstoff deutet auf die Anreicherung von löslichen organischen Abbauprodukten hin. Dabei handelt es sich um Dichloressigsäure und Glyoxylsäure, die wasserlöslichen Produkte des Spontanzerfalls von TCE-Epoxid (LITTLE et al. 1988).

Im Falle der Co-Oxidation des TCE, stellt Methan das Wachstumssubstrat und TCE das Cosubstrat dar. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß viele Autoren in ihren Arbeiten eine Unkorrektheit zulassen, in dem sie vom Methan als Cosubstrat sprechen (OLDENHUIS et al. 1989, MEYER et al. 1993). Diese Autoren gehen vermutlich vom Schadstoffabbau als Hauptstoffwechselweg aus, was aber aus biochemischer Sicht nicht richtig ist. Das geht aus der Definition für den Cometabolismus hervor: Cometabolismus ist die Transformation eines nicht zum Wachstum verwendbaren Substrats in Anwesenheit eines Substrats, welches zum Wachstum nutzbar ist (FRITSCH 1990).

Zwischen Wachstums- und Cosubstrat besteht eine Konkurrenz um den Bindungsplatz an der Oxygenase. Meist kommt es zur kompetitiven Hemmung zwischen beiden Substraten.

Auf Grund der Substratkonkurrenz ergibt sich die Notwendigkeit, ebenfalls eine TCE-Konzentration mit geringster Hemmungswirkung zu finden. Dazu wurde die TCE-Abbauraten in Abhängigkeit von der TCE-Anfangskonzentration gemessen (Abb. 36). Die Nichtanwendbarkeit einer einfachen Monod-Kinetik wurde nachgewiesen. Von Herbst (HERBST 1995) wurde eine Haldane-Kinetik für den mikrobiologische Abbau von Dichlormethan und Dichlorethan verwendet, da Inhibierungseffekte durch die Monod-Kinetik nicht berücksichtigt werden. Eine modifizierte Haldane-Kinetik, wie im Abschnitt 3.3.2. beschrieben, gab die besten Ergebnisse. Die maximale TCE-Abbauraten betrug $50,9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ und wird bei einer TCE-Anfangskonzentration von $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht. In einer Arbeit von Brusseau (BRUSSEAU et al. 1990) wird diese Abhängigkeit der TCE-Abbauraten von TCE-

Anfangskonzentration für *Methylosinus trichosporium* OB3b betrachtet. Es wird hier allerdings unterlassen, den hemmenden Einfluß des TCE bei höheren Konzentrationen in Betracht zu ziehen. So belegen die Autoren ihre Ergebnisse nur mit einer einfachen Monod-Kinetik.

Bei der Co-Oxidation hat das Methan als Wachstumssubstrat die Aufgabe der Regenerierung von Reduktionsequivalenten für die MMO. Zu hohe Methankonzentrationen führen wiederum zur kompetitiven Hemmung der Co-Oxidation. Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluß der Anfangsmethankonzentration auf die TCE-Abbauraten klären sollten. Abb. 38 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Die Anwendung einer modifizierten Haldane-Kinetik erwies sich auch hier als zweckmäßig. Die maximale Abbaurrate von $61,3 \mu\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ wird bei einer Methananfangskonzentration von $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ in der Kulturflüssigkeit erreicht. Das entspricht 6,5% der Sättigungskonzentration von Methan bei 30°C . Bei Methananfangskonzentrationen größer $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ kommt es demzufolge zur Hemmung der Co-Oxidation durch Substratkonkurrenz; bei Methananfangskonzentrationen kleiner $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ wird die Co-Oxidation durch nicht ausreichende Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten inhibiert. Auch die Abhängigkeit der TCE-Abbaurrate von der Methankonzentration wird für *Methylosinus trichosporium* OB3b in der schon zitierten Arbeit untersucht (BRUSSEAU et al. 1990). Die Autoren berichten von der Erzielung einer maximalen Abbaurrate bei einer Methansättigung von 5% bei 30°C . Die Konkurrenz der Methankonzentration zur Cosubstratkonzentration und damit der gewünschten Dehalogenierung wurde prinzipiell bereits von Brusseau erkannt. Diese Autoren betrachten jedoch nicht die gleichzeitigen Inhibierungseffekte einer steigenden TCE-Konzentration. Die entsprechende Ableitung einer Haldane-Kinetik gestattet erstmalig beispielhaft die wichtige Aussage, in welchen Bereichen sich das schmale "Fenster" eines optimalen Reaktionsverlaufes befindet.

Mit den ermittelten Haldane Kinetiken wurde versucht rechnerisch ein Modell abzuleiten, um TCE-Abbauraten in Abhängigkeit sowohl von Methan- als auch von TCE-Anfangskonzentration abzuschätzen (Abb. 39).

Folgende Gleichung wurde für dieses Modell ermittelt:

$$q = \frac{q_{\max} \cdot c_{TCE}}{\left(K_{STCE} + c_{TCE} + c_{TCE} \cdot \left(\frac{c_{TCE}}{K_{ITCE}} \right)^2 \right)} \cdot \frac{K_{ICH_4}^3}{\left(c_{CH_4}^3 + K_{ICH_4}^3 \right)} \cdot \left(1 + \frac{c_{CH_4}}{K_{SCH_4} + c_{CH_4} + c_{CH_4} \cdot \left(\frac{c_{CH_4}}{K_{ICH_4}} \right)^3} \right)$$

Um dieses Modell in der Praxis für genaue Berechnungen einzusetzen, bedarf es der Validierung des Modells mit weiteren Meßwerten. Für Abschätzungen der TCE-Abbauraten ist das Modell durchaus geeignet, wie der im Abschnitt 3.3.4. berechnete Korrelationskoeffizient von 0,807 belegt.

Für eine derartige Betrachtung und Modellierung gibt es in der bisherigen Literatur keine Beispiele. Es wäre durchaus erfolgversprechend, das Modell weitergehend zu validieren bzw. zu optimieren. Dies war aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Da die lösliche Methanmonooxygenase das Schlüsselenzym für die Biodegradation mittels methanotropher Bakterien darstellt, hat die Betrachtung der sMMO-Aktivität während einer Abbaureaktion eine große Bedeutung. Als ein wichtiger weiterer Fakt wurde erkannt, daß es nicht ausreicht, überhaupt eine sMMO-Aktivität nachzuweisen, sondern, daß zusätzlich diese eine gewisse Mindestgröße aufweisen muß. Es kann festgestellt werden, daß die TCE-Abbauraten während des Versuches parallel zur sMMO-Aktivität fällt (Abb. 40). Nach 6 h Versuchsdauer ist die TCE-Abbauraten praktisch auf Null gefallen obwohl noch 50 % der ursprünglichen sMMO-Aktivität vorhanden waren. Dieser Widerspruch ist entweder durch die toxische Wirkung des TCE oder aus der Notwendigkeit des Vorhandenseins einer minimalen sMMO-Aktivität zu erklären. Die toxische Wirkung des TCE bei einer TCE-Anfangskonzentration von 11,6 mg l⁻¹ kann entsprechend den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen ausgeschlossen werden. Damit kann konstatiert werden, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen eine minimale sMMO-Aktivität von ca. 27 nmol mg⁻¹ h⁻¹ vorhanden sein muß, um eine Abbauraten zu erreichen.

Einige Autoren, die die cometabolischen Fähigkeiten methanotropher Bakterien nutzen, betrachteten diese Wachstums-Cosubstrat Beziehung nicht. Bei der Biostimulation am

Modellstandort Eppelheim (MEYER et al. 1993) wurde nur konstatiert, daß die in-situ Sanierung mittels autochthoner methanotropher Bakterien hier nicht zum Erfolg führte, ohne genauer deren Eigenschaften zu untersuchen.

Zur Erzielung maximaler Abbauleistungen mit *Methylocystis* sp. GB 14 wie auch mit jedem anderen Stamm, ist es notwendig, die Bedingungen hinsichtlich Konzentration von Wachstums- und Co-Substrat in einem "schmalen Fenster" um die optimalen Konzentrationen zu halten. Berücksichtigt man, daß eine meßbare Dehalogenierung vonstatten gehen soll, müssen folgende Randbedingungen für eine praktische Anwendung gegeben sein: TCE-Konzentration nicht über 7,5 mg l⁻¹, Methankonzentration nicht über 1,25 mg l⁻¹. Da das in Praxis nicht möglich sein wird, müssen Kompromisse gefunden werden, die sich den Idealbedingungen so weit wie möglich nähern (BECK et al. 1998).

Damit ist für in situ-Sanierungen für die mikrobiologische Seite eine Abschätzung über Effektivität und Anwendbarkeit möglich. Nicht vergessen werden darf, daß es weitere Faktoren gibt, die die Reaktionsfähigkeit bestimmen, wie z.B. die geogenen Kationenkonzentrationen (BOWMAN und SAYLER 1994).

Aus dieser Komplexität und der bisherigen Unkenntnis der Zusammenhänge ließen sich die wechselnden Erfolge und auch Mißerfolge der Methancooxidationsprozesse erklären. Sehr viel einfacher und besser steuerbarer sind ex-situ Vorgänge, bei denen alle die Faktoren weitaus besser im optimalen Bereich gehalten werden können.

Die Versuche mit immobilisierten Zellen von *Methylocystis* sp. GB 14 zeigen eine Möglichkeit der Optimierung der TCE-Abbauprozesse. Die in der FAL Braunschweig immobilisierten Zellen wuchsen innerhalb von 5 Tagen im Immobilisat bis zu einer Beladung von 2% und waren zur Expression von sMMO fähig. Die neue geometrische Form des Immobilisats machte einen besseren Stoffübergang möglich. Bei Abbauprozessen mittels immobilisierten Zellen von *Methylocystis* sp. GB 14 war ein Zyklus von Biodegradation und Regenerierung bis zu fünfmal nacheinander möglich. Die maximale TCE-Abbauraten waren bis zu 4mal höher als in Säulenversuchen und bis zu 1,8mal höher als in den Röhrchenversuchen. Die Halbwertszeiten der TCE-Abbauraten betrugen 2,7 h in den Immobilisatversuchen, 1,2 h in den Röhrchenversuchen und 0,2 h in den Säulenversuchen. Ein Vergleich zwischen mit der gleichen Methode immobilisierten nitrifizierenden Bakterien und freien nitrifizierenden

Bakterien ergab, daß die immobilisierten Bakterien 75 % der Aktivität freier Bakterien erreichten (JEKEL et al. 1998). Das Immobilisatmaterial hat damit eine Schutzfunktion für die Bakterien und macht ein langsames Absinken der TCE-Abbaurrate möglich. Untersuchungen an immobilisierten Zellen von *Methylocystis* sp. M ergaben für die Biodegradation von TCE in einem Wirbelschichtreaktor eine Degradationeffizienz von 80-90% (OKADA et al. 1995). Außerdem ist das "Handling" der LentiKats® hinsichtlich einer praktischen Anwendung wesentlich einfacher als bei freien Zellen. Der Einsatz in Bioreaktoren und Betrieb beispielsweise bei off-site oder on-site Sanierungen wäre denkbar.

Die Immobilisierung der Bakterien in einer permeablen Matrix erlaubt nicht nur die Berücksichtigung und Steuerung der die optimale Cooxidation beeinflussenden Faktoren, sondern eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, durch eine Pulsung von Methan die sMMO zu regenerieren und damit die Cooxidation zyklisch zu wiederholen.

5. Zusammenfassung

1. Unter den in der Sektion Sanierungsforschung des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH vorhandenen Reinkulturen gibt es sieben Stämme, die zur Expression der sMMO fähig sind. Das wurde sowohl mittels genetischer Methoden - grundsätzliche Fähigkeit zur Expression der sMMO - als auch mittels Naphthalinoxidation - momentanes Vorhandensein von sMMO unter den gegebenen Milieubedingungen - nachgewiesen. Fünf Isolate wurden auf Wachstum bei 30°C bzw. 38°C untersucht. Während des Wachstums wurde die sMMO-Aktivität bestimmt.
2. Das Isolat WI 14 wurde mit einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit von $0,067 \text{ h}^{-1}$ und einer maximalen sMMO-Aktivität von $132,9 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$, welche während der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert wurde, für die weiteren Untersuchungen der Biodegradation von TCE ausgewählt. Nach Hinterlegung in der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig wurde der Stamm als *Methylocystis* sp. GB 14 - DSM 12955 bezeichnet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen auf Grund der Anordnung der intrazellulären Membranen die Zuordnung zu den Typ II methanotrophen Bakterien zu.
3. Es wurde der Einfluß der Umgebungstemperatur auf Wachstum und sMMO Expression untersucht. Bei niedrigen Umgebungstemperaturen bis 12°C konnten noch 26% der bei 25°C vorhandenen sMMO-Aktivität festgestellt werden. Damit ist auch bei Grundwassertemperaturen ein Degradationspotential zu erwarten. Oxidative Aktivität in Form der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und sMMO-Aktivität korrelieren und sind identisch.
4. TCE wirkt inhibierend auf die Aktivität der sMMO und auf die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit der Zellen. Sowohl Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit als auch sMMO-Aktivität sinken in einem TCE-Konzentrationsbereich von 0-10 mg l^{-1} um 50%. Bei TCE-Konzentrationen größer 10 mg l^{-1} ist der inhibierende Einfluß schwächer, so daß bei TCE-Konzentrationen von 100 mg l^{-1} noch 40% der ursprünglichen sMMO-Aktivität bzw. Sauerstoffverbrauchs-geschwindigkeit vorhanden sind.

5. Die Biodegradation von TCE wurde in Röhrchen-, Säulen- und Immobilisatversuchen untersucht. Bedingt durch die technische Realisierung der Versuche war nur eine diskontinuierliche Methanversorgung möglich.
6. Mittels der Chloridbilanz konnte eine vollständige Dechlorierung bei Röhrchen-, Säulen- und Immobilisatversuchen nachgewiesen werden. Eine vollständige Mineralisierung des TCE war nicht abzuleiten. Die Kohlenstoffbilanzen ergaben kein quantitatives Wiederfinden des Kohlenstoffs als Kohlendioxid. Die Anreicherung von löslichen organischen Abbauprodukten wurde durch Anstieg des Wertes für den chemischen Sauerstoffbedarf belegt.
7. Die Kinetik des TCE-Abbaus in Abhängigkeit von der TCE-Anfangskonzentration und von der Methananfangskonzentration wurden untersucht. Mit einer Monod-Kinetik konnte die Abhängigkeit nicht hinreichend beschrieben werden. Für beide Kinetiken wurden Haldane-Anpassungen ermittelt.
8. Die Haldane-Kinetik für die Abhängigkeit der TCE-Abbaurrate von der TCE-Anfangskonzentration ergab folgende Konstanten: $q_{\max} = 92,06 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_s = 4,04 \text{ mg l}^{-1}$, $K_i = 14,46 \text{ mg l}^{-1}$ und $n = 2$. Die maximale TCE-Abbaurrate von $50,9 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde bei einer TCE-Anfangskonzentration von $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht.
9. Die Haldane-Kinetik für die Abhängigkeit der TCE-Abbaurrate von der Methananfangskonzentration ergab folgende Konstanten: $q_{\max} = 89,51 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0,43 \text{ mg l}^{-1}$, $K_i = 2,56 \text{ mg l}^{-1}$ und $n = 3$. Die maximale TCE-Abbaurrate von $61,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ wurde bei einer Methananfangskonzentration von $1,25 \text{ mg l}^{-1}$ erreicht.
10. Während des TCE-Abbaus sinkt die sMMO-Aktivität auf 50 % der ursprünglichen Aktivität und die TCE-Abbaurrate geht gegen Null. Es muß eine minimale sMMO-Aktivität von $27 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vorliegen, um überhaupt einen TCE-Abbau zu verzeichnen.
11. Intakte Zellen von *Methylocystis* sp. GB 14, welche sMMO exprimierten, wurden in einem PVAL-Hydrogel (10% PVAL und 90% Wasser) bei Zimmertemperatur immobilisiert. Dieses Verfahren ist markenrechtlich unter der Bezeichnung LentiKats[ ] gesch tzt. In LentiKats[ ] immobilisierte Zellen von *Methylocystis* sp. GB 14 sind zum Wachstum und zur Expressierung von sMMO fähig. Eine vollständige Dechlorierung des TCE mit den LentiKats[ ] wurde nachgewiesen. Die LentiKats[ ] konnten bis zu fünfmal durch Anregung

des Wachstums innerhalb von 2 Tagen regeneriert werden. Damit war eine zyklische Wiederholung der Biodegradation möglich.

12. Der Vergleich von maximalen Abbauraten in Immobilisat-, Röhrchen- bzw. Säulenversuchen zeigt die Vorteile der LentiKats®. Die TCE-Abbauraten waren 1,8mal höher als bei Röhrchenversuchen und 4mal höher als bei Säulenversuchen. Die Abbauraten sanken auf 50% nach 2,7 h in den Immobilisatversuchen, nach 1,2 h in den Röhrchenversuchen und bereits nach 0,2 h in den Säulenversuchen.

6. Literatur

Alvarez-Cohen, L.; McCarty, P.L.: Product Toxicity and Cometabolic Competitive Inhibition Modeling of Chloroform and Trichloroethylene Transformation by Methanotrophic Resting Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991), 1031-1037

Antony, C.: Bacterial Oxidation of Methane and Methanol. A.H. Rose, D.W. Tempest (ed.), *Adv. Microb. Physiol.*, 27 (1986), 113-210

Apel, W.A.; Dugan, P.R.: Clay Enhancement of Methane, Low Molecular Weight Hydrocarbon and Halocarbon Conversion by Methanotrophic Bacteria. US Statutory Invention Registration H1430, (1991)

Asche, W.: Oberflächentechnik unter Umweltstreß. Wässrige Systeme sind biologisch abbaubar. Anwender auf der Suche nach Reinigungsalternativen. *VDI-Nachrichten*, 44, (1990), 40

Aziz, C.E.; Fitch, M.W.; Linquist, L.K.; Pressman, J.G.; Georgiou, G.; Speitel, G.E.: Methanotrophic Biodegradation of Trichloroethylene in a Hollow Fiber Membrane Bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995), 2574-2583

Baldauf, G.: Removal of Volatile Halogenated Hydrocarbons by Stripping and/or activated Carbon Adsorption. *Water Supply*, 3, (1985), 187-196

Beck, M.; Wendlandt, K.-D.; Stottmeister, U.: Nutzung mikrobieller Co-Oxidationsreaktionen zum Schadstoffabbau. *Proceedings des Dresdner Grundwasserforschungszentrums e.V.*, Heft 13, ISSN 1430-0176 (1998), 71-78

Belkin, S.: Biodegradation of haloalkanes. *Biodegrad.*, 3 (1992), 299-313

- Bowman, J.P.; Sayler, G.S.: Optimization and maintenance of soluble methane monooxygenase activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biodegradat.* 5 (1994), 1-11
- Broholm, K.; Jensen, B.K.; Christensen, T.H.; Olsen, L.: Toxicity of 1,1,1-Trichlorethane and Trichlorethene on a Mixed Culture of Methane-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990), 2488-2493
- Brown, L.R.; Strawinski, R.J.; McCleskey, C.S.: The isolation and characterization of *Methanomonas methanooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 10 (1964), 791
- Brusseau, G.A.; Tsien, H.-Ch.; Hanson, R.S.; Wackett, L.P.: Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity. *Biodegradat.* 1 (1990), 19-29
- Burrows, K.J.; Cornish, A.; Scott, D.; Higgins, I.J.: Substrate Specificities of the Soluble and Particulate Methane Monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Gen. Microbiol.* 130 (1984), 3327-3333
- Carter, S.R.; Jewell, W.J.: Biotransformation of Tetrachloroethylene by Anaerobic Attached-Films at low Temperatures. *Wat. Res.*, 27 (1993), 607-615
- Chang, H.-L.; Alvarez-Cohen, L.: Transformation Capacities of Chlorinated Organics by Mixed Cultures Enriched on Methane, Propane, Toluene, or Phenol. *Biotechnol Bioeng.*, 45 (1995), 440-449
- Chang, H.-L.; Alvarez-Cohen, L.: Model for the Cometabolic Biodegradation of Chlorinated Organics. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995), 2357-2367
- Colby, J.; Stirling, D.I.; Dalton, H.: The Soluble Methane Monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochem. J.* 165 (1977), 395-402

Collins, M.L.P.; Buchholz, L.A.; Remsen, C.C.: Effect of Copper on *Methylobacterium* *alb* BG8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (1991), 1261-1264

Dalton, H.: Oxidation of Hydrocarbons by Methane Monooxygenases from a Variety of Microbes. *Adv. Appl. Microbiol.*, 26 (1980), 71-87

Dalton, H.: In: J.W. Kelley (ed.), *Applications of enzyme biotechnology*. Plenum Press, New York (1991), 55-68.

DiSpirito, A.A.; Gullledge, J.; Shiemke, A.K.; Murrell, J.C.; Lidstrom, M.E.; Krema, C.L.: Trichloroethylene oxidation by the membrane-associated methane monooxygenase in type I, type II and type X methanotrophs. *Biodegradat.*, 2 (1992), 151-164

DiStefano, T.D.; Gossett, J.M.; Zinder, S.H.: Reductive Dechlorination of High Concentrations of Tetrachloroethene to Ethene by an Anaerobic Enrichment Culture in the Absence of Methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (1991), 2287-2292

Dolfing, J.: Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. *Arch. Microbiol.*, 153 (1990), 264-266

Donaldson, T.L.; Wilson, J.H.: Method and Apparatus for Destroying Organic Contaminants in Aqueous Liquids. US Patent 5,246,584 (1992)

Dworkin, M.; Foster, J.W.: Studies on *Pseudomonas methanica* (Söhngen) nov. comb. *J. Bacteriol.* 72 (1956), 646

Environmental Protection Agency: Ambient Water Quality - Criteria for Trichloroethylene. Washington, DC, (1980)

Fathepure, B.Z.; Nengu, J.P.; Boyd, S.A.: Anaerobic Bacteria that Dechlorinate Perchloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (1987), 2671-2674

Fogel, M.M.; Taddeo, A.R.; Fogel, S.: Biodegradation of Chlorinated Ethenes by a Methane-Utilizing Mixed Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (1986), 720-724

Foster, J.W.; Davis, R.H.: A methane-dependent coccus, with notes on classification and nomenclature of obligate, methane-utilizing bacteria. *J. Bacteriol.* 91 (1966), 1924

Fritsche, W.: *Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, (1990)

Fritsche, W.: *Umweltmikrobiologie - Grundlagen und Anwendungen*. Gustav Fischer Verlag Jena, ISBN 3-437-35008-0, (1998)

Gemmler, A.; Bolch, T.; Mertz, K.; Keller, W.; Müller, K.-J.: Mit Elektrochemie gegen Chlorkohlenwasserstoffe (CKWs). *Metaloberfläche*, 44 (1990), 109-116

Georgiou, G.; Phelps, P.; Speitel, G.E.: Constitutive Soluble Methane Monooxygenase Mutants of Methanotrophic Bacteria such as *Methylosinus trichosporium* A.T.C.C. 55314. US Patent 5,316,940 (1992)

Gillham, R.W.: Abiotic Reductive Dehalogenation of Chlorinated Organic Contaminants by Zero Valent Metals. Workshop Passive Systeme zur in-situ Sanierung von Böden und Grundwasser, Extended Abstracts, Dresden, Germany (1996), 15-20

Graham, D.W.; Chaudhary, J.A.; Hanson, R.S.; Arnold, R.G.: Factors Affecting Competition Between Type I and Type II Methanotrophs in Two-organism, Continuous-flow Reactors. *Microb. Ecol.* 25 (1993), 1-17

Graham, D.W.; Korich, D.G.; LeBlanc, R.P.; Sinclair, N.A.; Arnold, R.G.: Applications of a Colorimetric Plate Assay for Soluble Methane Monooxygenase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992), 2231-2236

Große, S.: Methanmonooxygenase-Charakterisierung aus Typ II-Methanotrophen, Dissertation Universität Leipzig, (1998)

Hanert, H.H.: Kohlenwasserstoffe und chlorierte Kohlenwasserstoffe im Grundwasser. Schr.-Reihe Verein WaBoLu 80, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, (1988), 209 ff.

Hanson, R.S.; Lipscomb, J.D.: Method for degradation of halogenated hydrocarbons using a methaneoxidizing bacterium, which produces methane monooxygenase. Patent WO 90/05708, (1989)

Hanson, R.S., Hanson, T.E.: Methanotrophic bacteria. Microbiol. Rev., 60 (1996), 439-471

Hasegawa, T.; Shimomura, T.; Uchiyama, H.; Yagi, O.: Continuous Biodegradation of Trichloroethylene by Methylocystis sp. in a Membrane Bioreactor. Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium New Orleans, 5 (1997), 31-36

Hazen, T.C.; Dougherty, J.M.; Enzien, M.; Franck, M.M.; Fliermans, C.B.; Eddy, C.A.: In Situ Bioremediation of Soil and Groundwater at a Chlorinated Solvent Contaminated Site Using Horizontal Wells to Inject Air and Methane. In-Situ Bioremediation Symp.1992, Niagara, Ontario, Canada. Ed. S.Lesage, (1992), 22

Hazen, T.C.; Fliermans, C.B.: Bioremediation of Contaminated Groundwater. Patent US 5,384,048 (1994)

Hazen, T.C.; Lombard, K.H.; Looney, B.B.; Fliermans, C.B.; Eddy-Dilek, C.A.: In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvent With Natural Gas. SRTC Expertise, SRTC In Situ Bioremediation, (1997)

Hazen, T.C.; Lopez-De-Victoria, G.: Method of Degradang Pollulants in Soil. US Patent 5,326,703 (1992)

Henry, S.M.; Grbic-Galic, D.: Inhibition of Trichloroethylene Oxidation by the Transformation Intermediat Carbon Monoxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991), 1770-1776

Henry, S.M.; Grbic-Galic, D.: Biodegradation of Trichloroethylene in Methanotrophic Systems and Implications for Process Applications. *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*, Chaudhry, G.R. (ed), London (1994), 314-344

Herbst, B.: Biologischer Abbau von Dichlormethan und Dichlorethan durch Mischkulturen in Wirbelschichtreaktor. (1995), Dissertation TU Berlin

Higgins, I.J.; Best, D.J.; Hammond, R.C.; Scott, D.: Methane-Oxidizing Microorganisms. *Microbiol. Rev.* 45 (1981), 556-583

Hirvonen, A.; Tuhkanen, T.; Kalliokoski, P.: Removal of Chlorinated Ethylenes in Contaminated Ground Water by Hydrogen Peroxide Mediated Oxidation Processes. *Environ. Technol.*, 17 (1996), 263-272

Holliger, C.: Reductive dehalogenation by anaerobic bacteria. PhD Thesis (1992), Wageningen Agriculture University, Wageningen, The Netherlands

Holliger, C.; Schumacher, W.: Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66 (1994), 239-246

Hoppenheidt, K.; Hanert, H.H.: Dekontamination hochgradig Tetrachlorethen-verunreinigter Grundwässer mittels Biostimulation. *ECOINFORMA*, 2 (1993), 31-45

van Hylckama Vlieg, J.E.T.; de Koning, W.; Janssen, D.B.: Transformation Kinetics of Chlorinated Ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and Detection of Unstable Epoxides by On-Line Gas Chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996), 3304-3312

Isacoff, E.; Bittner, J.: Resin Absorbent takes on Chlororganics from Well Water. Water-Sewage-Works, 126, (1979), 41-42

Janssen, D.B.; Grobбен, G.; Witholt, B.: Toxicity of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons and Degradation by Methanotrophic Consortia. Proc. 4th European Congress on Biotechnology, Eds.: O.M. Neijassel et al. Amsterdam: Elsevier 3 (1987), 515-518

Jekel, M.; Buhr, A.; Willke, T.; Vorlop, K-D.: Neuartige Geleinschlusimmobilisate (LentiKats®) in der Biotechnologie. Chem. Ing. Tech. 70 (1998), 438-441

Jewell, W.J.; Nelson, Y.M.; Fennell, D.E.; Underhill, S.; Wilson, S.M.; White, T.E.: Methanotrophs for Biological Pollution Control: Feasibility of Developing an Attached Microbial Film Reactor and Kinetics of TCE Removal. EPA Report PB91-167536, (1990)

Jewell, W.J.; Fennell, D.E.; Nelson, Y.M.; Underhill, S.E.; White, T.E.; Wilson, M.S.: Methanotrophs and Methanogens for Pollution Control: PCE, TCE Removal from Groundwater and Macro Nutrient Removals from Wastewater. EPA Report PB92-123645, (1990)

Jewell, W.J.; Carter, S.R.; Fennell, D.E.; Hicks, E.E.; Nelson, Y.M.; Nock, T.D.; Richards, B.K.; Wilson, M.S.: Methanotrophs for Biological Pollution Control: TCE Removal and Nutrient Removal with the Expanded Bed. EPA Report PB94-186814, (1992)

Kästner, M: Anreicherung und Isolierung von Chlorkohlenwasserstoffe abbauenden Mikroorganismen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen - Abbaukinetiken und Test auf technische Nutzbarkeit zur Sanierung kontaminierter Grundwässer. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig (1988)

Kochetkova, R.; Kreich, Z.; Eppel, S.; Serebryakov, F.; et. al.: Removal of Vinyl Chloride and Dichloroethane from Waste Water by Adsorption Treatment. Sov. Chem. Ind., 16 (1984), 305-307

Koh, S.-C.; Bowman, J.P.; Sayler, G.S.: Soluble Methane Monooxygenase Production and Trichloroethylene Degradation by a Type I Methanotroph, *Methanomonas methanica* 68-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993), 960-967

Kohler, H.; Halbartschlager, S.: Aktivkohleadsorptionsanlage zur Abscheidung von Chlorkohlenwasserstoffen. *Staub*, 46, (1986), 50-55

Lanzarone, N.A.; Mayer, K.P.; Dolan, M.E.; Grbic-Galic, D.; McCarty, P.L.: Batch exchange soil column studies of biotransformation by methanotrophic bacteria. P.V. Roberts, L. Semprini, G.D. Hopkins, D. Grbic-Galic, P.L. McCarty, M. Reinhard (ed.), *In-situ aquifer restoration of chlorinated aliphatics by methanotrophic bacteria*. EPA Technical Report EPA/600/2-89/033. R.S. Kerr Environmental Research Laboratory, U.S. EPA, Ada, Okla. (1989), 126-146

Lanzarone, N.A.; McCarty, P.L.: Column Studies on methanotrophic degradation of trichloroethylene and 1,2-dichloroethane. *Ground Water* 28 (1990), 910-919

Leadbetter, E.R.; Foster, J.W.: Studies on some methane utilizing bacteria. *Archiv für Mikrobiologie* 30 (1958), 91

Little, C.D.: Microbiological Degradation of Halogenated Hydrocarbons in Water. Patent US 4,954,258 (1988)

Little, C.D.; Palumbo, A.V.; Herbes, S.E.; Lidstrom, M.E.; Tyndall, R.L.; Gilmer, P.J.: Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-Oxidizing Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (1988), 951-956

Lu, Ch.-J.; Chang, Ch.-Y.; Lee, Ch.-M.: Aerobic Biodegradation of Trichloroethylene by Microorganisms that Degrade Aromatic Compounds. *Bioremediation of Chlorinated Solvents. Papers Int. In Situ and On-Site Bioreclamation. 3rd Symposium*, Ed. R.E. Hincsee, Battelle Press, 3 (1995), 1-7

Matheson, L.J.; Tratnyek, P.G.: Reductive Dehalogenation of Chlorinated Methans by Iron Metal. *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994), 2045-2053

Meyer, O.; Refae, R.I.; Warrelmann, J.; Reis, H. von: Development of techniques for the bioremediation of soil, air and groundwater polluted with chlorinated hydrocarbons: the demonstration project at the model site in Eppelheim. *Microb Releases*, 2 (1993), 11-22

Meyer, O.; Warrelmann, J.; Reis, H. von: Pilot plants stage bioremediation of CKW- and BTEX-contaminated soil by in-situ infiltration in combination with on-site water and air treatment at the model site Eppelheim. Fifth Internation FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, 30 October - 3 November 1995, Maastricht (1995)

Moore, A.T.; Leahy, M.C.; Findlay, M.M.; Fogel, S.: Decomposition of Halogenated Aliphatic Hydrocarbons in a Bioreactor. Patent US 5196121, (1989)

Muftikan, R.; Fernando, Q.; Korte, N.: A Method for the Rapid Dechlorination of Low Molecular Weight Chlorinated Hydrocarbons in Water. *Wat. Res.*, 29 (1995), 2434-2439

Müller, R.; Lingens, F.: Mechanismen der mikrobiellen Dehalogenierung von Chlorkohlenwasserstoffen. *GIT Supplement* 5/87,(1987), 4-9

Nakajima, T.; Uchiyama, H.; Yagi, O.; Nakahara, T.: Novel metabolite of trichloroethylene in a methanotrophic bacterium, *Methylocystis* sp. M, and hypothetical degradation pathway. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992), 486-489

Nakajima, T.; Uchiyama, H.; Yagi, O.; Nakahara, T.: Purification and properties of soluble methane monooxygenase from *Methylocystis* sp. M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992), 736-740

Nelson, M.J.K.; Montgomery, S.O.; Mahaffey, W.R.; Pritchard, P.H.: Biodegradation of Trichloroethylene and Involvement of an Aromatic Biodegradative Pathway. Appl. Environ. Microbiol., 53 (1987), 949-954

Neumann, A.; Scholz-Muramatsu, H.; Diekert, G.: Tetrachloroethene dechlorination to cis-1,2-dichloroethene in cell suspensions and cell extracts of *Dehalospirillum multivorans* sp. nov. Abstr. P405 Frühjahrstagung der VAAM, March 1994, Hannover, Germany, BioEngineering 2/94, 82

Niederländische Ministerium für Wohnungswesen, Raumordnung und Umwelt: Leidraad bodemsanering ("Holländische Liste") (1988)

Okada, F.; Shimomura, T.; Uchiyama, H.; Yagi, O.: Performance of Prototype Bioreactor for Biodegradation of Trichloroethylene by *Methylocystis* sp. M. 3rd Int. Symp. on In-Situ Bioreclamation, San Diego, CA, USA, April 24-27, 1995, Ed. R. Hinchee, (1995)

Oldenhuis, R.; Oedzes, J.Y.; Der Waarde, J.J. van; Janssen, D.B.: Kinetics of Chlorinated Hydrocarbon Degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and Toxicity of Trichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991), 7-14

Oldenhuis, R.; Vink, R.L.J.M.; Janssen, D.B.; Witholt, B.: Degradation of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989), 2819-2826

Park, S.; Hanna, M.L.; Taylor, R.T.; Droegge, M.W.: Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. I: Production of soluble methane monooxygenase. Biotechnol. Bioeng. 38 (1991), 423-433

Parsons, J.S.; Seaman, W.; Woods, J.T.: Spectrophotometric Determination of 1-Naphthol in 2-Naphthol Utilizing Differences in Reaction Rates. Analyt. Chem. 27 (1955), 21-24

Phelps, P.A.; Agarwal, S.K.; Speitel Jr., G.E.; Georgiou, G.: *Methylosinus trichosporium* OB3b Mutants Having Constitutive Expression of Soluble Methane Monooxygenase in the Presence of High Levels of Copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992), 3701-3708

Rippen: *Handbuch Umweltchemikalien, Stoffdaten - Prüfverfahren - Vorschriften*. 14. erg. Auflage, 3/(1992)

Roberts, P.V.; Semprini, L.; Hopkins, G.D.; Grbic-Galic, D.; McCarty, P.L.; Reinhard, M.: *In-situ Aquifer Restoration of Chlorinated Aliphatics by Methanotrophic Bacteria*. EPA /600/2-89/033 (1989)

Rogge, G.: *Reisebericht zum Forschungsaufenthalt am BRI, Montreal, Kanada*. UFZ, (1996)

Semprini, L.; Hopkins, G.D.; Roberts, P.V.: *In-situ Aquifer Restoration of Chlorinated Aliphatics by Methanotrophic Bacteria: Results of Biostimulation and Biotransformation Experiments*. Report EPA 600/2-89/033, (1989), 65-90

Semprini, L.; Hopkins, G.D.; Roberts, P.V.; McCarty, P.L.: *Pilot scale field studies of in situ bioremediation of chlorinated solvents*. *J. Hazard. Mat.* 32 (1992), 145-162

Semprini, L.; Roberts, P.V.; Hopkins, G.D.; Mackay, D.M.: *A field evaluation of in-situ biodegradation methodologies for the restoration of aquifer contaminated with chlorinated aliphatic compounds: Results of a preliminary investigation*. Dept. of Civil Engineering, Stanford Univ. Technical Report No. 302, (1987)

Söhngen, N.L.: *Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen*. *Parasitenkd. Infektionskr.* 15 (1906), 513-517

Strand, S.E.; Bjelland, M.D.; Stensel, H.D.: *Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by suspended cultures of methane-oxidizing bacteria*. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.* 62 (1990), 124-129

Strand, S.E.; Shippert, L.: Oxidation of Chloroform in an Aerobic Soil Exposed to Natural Gas. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986), 203-205

Tartakovsky, B.; Miquez, C.; Petti, L.; Bourque, D.; Groleau, D.; Guiot, S.R.: Tetrachloroethylene dechlorination using a consortium of coimmobilized methanogenic and methanotrophic bacteria. *Enzyme and Microbial Technology.* 22 (1998), 255-260

Taylor, R.T.; Hanna, M.L.; Shah, N.N.; Shonnard, D.R.; Duba, A.G.; Durham, W.B.; Jackson, K.J.; Knapp, R.B.; Wijesinghe, A.M.; Knezovich, J.P.; Jovanovich, M.C.: In situ bioremediation of trichloroethylene-contaminated water by a resting-cell methanotrophic microbial filter. *Hydrol. Sci. J. (IAHS)* 38 (1993), 323-342

Tonge, G.M.; Harrison, D.E.F.; Higgins, I.J.: Purification and Properties of the Methane Monooxygenase Enzyme System from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem. J.*, 161 (1977), 333-344

TVO-BRD: Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe. *Bundesgesetzblatt*, 66 (1990), 2612-2629

Uchiyama, H.; Nakajima, T.; Yagi, O.; Tabuchi, T.: Aerobic Degradation of Trichloroethylene by a New Type II Methane-Utilizing Bacterium, Strain M. *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989), 2903-2907

Uchiyama, H.; Nakajima, T.; Yagi, O.; Nakahara, T.: Role of Heterotrophic Bacteria in Complete Mineralization of Trichloroethylene by *Methylocystis* sp. Strain M. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992), 3067-3071

Uchiyama, H.; Oguri, K.; Yagi, O.; Kokufuta, E.: Trichloroethylene Degradation by Resting-Cells of *Methylocystis* sp. M in a Gas-Solid Bioreactor. *Biotechnol. Letters* 14 (1992), 619-622

Vijgen, J.M.H.: In-situ-CKW-Abbau mit Phenolinjektion. In-situ-Sanierung von Böden, 11. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz, Frankfurt a.M., April (1996)

Wendlandt, K.-D.; Wandt, A.; Brühl, E.; Karbaum, K.; Schurig, K.-H.; Wagler, D.: Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen. Patent DD 283 738 A7, (1988)

Whittenbury, R.; Dalton, H.: The obligate methane-oxidizing bacteria and their biotechnological potential. In: Basic Biology of New Developments in Biotechnology, A. Hollaender, A.I. Laskin, P. Rogers (eds.), New York: Plenum Press, (1983), 439-460

Whittenbury, R.; Phillips, K.C.; Wilkinson, J.F.: Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. J. Gen. Microbiol. 61 (1970), 205-218

Wilson, J.T.; Fogel, S.; Roberts, P.V.: Biological treatment of trichloroethylene in-situ. Proc. Symposium on Groundwater Contamination, ASCE National Convention, Atlantic City, NJ., April 27-30, (1987), 168-178

Wilson, J.T.; Wilson, B.H.: Biotransformation of Trichloroethylene in Soil. Appl. Environ. Microbiol. 49 (1985), 242-243

Woodland, M.P.; Dalton, H.: Purification and characterization of component of the methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). J. Biol. Chem., 259 (1984), 53-60

Yamane, T.; Kishimoto, M.; Yoshida, F.: Semi-batch Culture of Methanol-assimilating Bacteria with Exponentially Increased Methanol Feed. J. Ferment. Technol. 54 (1976), 229-240

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Stottmeister und Frau Dr. Wendlandt für die Überlassung des Themas und für die sehr gute fachliche Betreuung sowie zahlreiche Anregungen und Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Kleber danke ich für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und für die konstruktiven Diskussionen.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Methanotrophe Bakterien des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH für die fachliche und experimentelle Unterstützung, insbesondere Frau Jana Helm und Frau Bettina Meißner für die wertvollen fachlichen Diskussionen.

Frau Jekel und Herrn Prof. Dr. Vorlop am Institut für Technologie der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig möchte ich für die Immobilisierung danken.

Weiterhin danke ich Herrn Rost und Herrn Halm, Sektion Sanierungsforschung, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH für die Unterstützung beim Aufbau und der Wartung meiner Versuchsanlagen, sowie für die Hilfen bei technischen Problemen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Stephan Große und Frau Gerlind Rogge, Universität Leipzig.

Abschließend möchte ich der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Unterstützung im Rahmen ihres Stipendienprogramms danken.

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