



UFZ-Bericht

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

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 26/1997

Dissertation

**Mineralölbelastetes Grundwasser
- Struktur, Dynamik,
biochemisches Abbaupotential
sowie Codierung und Verbreitung
degradativer Leistungen
in mikrobiellen Biozönosen
dieses Ökosystems**

Antje Birger

ISSN 0948-9452

**Mineralölbelastetes Grundwasser - Struktur, Dynamik,
biochemisches Abbaupotential sowie Codierung und Verbreitung
degradativer Leistungen in mikrobiellen Biozönosen dieses
Ökosystems**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Antje Birger
geb. am: 09.01.1969 in: Halberstadt

Gutachter:

1. Prof. Jan R. Andreesen
2. Prof. Wolfgang Babel
3. Prof. Walter Gläßer

Halle (Saale), im Oktober 1997

*Diese Arbeit ist meinem Mann gewidmet, der mich stets
unterstützte und mir mit seiner Geduld immer wieder
Kraft und Mut gab.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Veranlassung der Untersuchungen	1
1.2	Mikrobiologie des Grundwassers	2
1.3	Mikrobieller Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen	2
1.4	Einsatz molekularbiologischer Methoden für die Erforschung mikrobieller Biozönosen	5
1.5	Problemstellung und Zielsetzung	7
2	Regionale Standortbedingungen des Untersuchungsgebietes	9
2.1	Geographische Einordnung des Untersuchungsgebietes	9
2.1.1	Administrative und naturräumliche Einordnung	9
2.1.2	Klima	9
2.1.3	Boden	11
2.2	Geologische Verhältnisse im Untersuchungsgebiet	12
2.2.1	Grundwasserverhältnisse	14
2.3	Schadensanalyse	17
2.3.1	Kriterien für die Auswahl der Brunnen	17
2.3.2	Chemische und physikalische Parameter	18
2.3.2.1	Analysen organischer Bestandteile	18
2.3.2.2	Analysen anorganischer Bestandteile	20
2.3.2.3	Isotopenhydrologische Untersuchungen	20
2.3.2.4	Physikalische Parameter	21
3	Materialien und Methoden	22
3.1	Probenahme	22
3.1.1	Sediment im Schlammfang	22
3.1.2	Wasserproben	22
3.1.3	Probenahme mit Phasenschöpfer-Ölphase	22
3.2	Probentransport und Probenaufbereitung	22
3.2.1	Sedimente	22
3.2.2	Wasserproben	22
3.2.3	Ölproben	23
3.3	Mikrobiologische Charakterisierung	23
3.3.1	Bestimmung der Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE)	23
3.3.1.1	Medien, Inkubationsbedingungen und Auswerteziträume	23
3.3.2	Isolation und Stammhaltung von Bakterien	23
3.3.3	Mikrobiologische Charakterisierung der Gesamtproben	24
3.3.3.1	Bestimmung der MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen	24
3.4	Taxonomische Charakterisierung von Einzelisolaten	24
3.4.1	Mikroskopische und makroskopische Beschreibung der Bakterienisolate	24
3.4.2	Bestimmung der Gram-, Oxidase- und Katalase-Reaktion	25

Inhaltsverzeichnis		II
3.4.3	Identifizierung der Isolate mit Hilfe des kommerziellen Systems BIOLOG®	25
3.4.4	Identifizierung der Isolate mit Hilfe des kommerziellen Systems APILAB®	25
3.5	Ermittlung des biochemischen Abbaupotentials für aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe	26
3.5.1.1	Catechol-1,2-Dioxygenase Enzymtest (modifiziert nach NEIDLE et al., 1986)	26
3.5.1.2	Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitätstest (modifiziert nach MORGAN et al., 1989)	26
3.5.2	Modifizierter BIOLOG®-MT-Test zur Bestimmung des biochemischen Abbaupotentials für ausgewählte aliphatische Verbindungen	26
3.5.3	MPN-Bestimmung degradativer Mikroorganismen für ausgewählte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe in Gesamtproben	27
3.6	Molekularbiologische Methoden	27
3.6.1	PCR-Amplifikation, Transfer und Detektion von DNA-Sequenzen für ausgewählte Abbauleistungen in Umweltisolaten	27
3.6.1.1	Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten durch PCR	27
3.6.1.2	Southern-Transfer amplifizierter DNA-Fragmente	28
3.6.1.3	Nachweis der Amplifikationsprodukte durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotidsonden und immunologische Detektion	28
3.6.2	Nachweis und Lokalisierung von Genen, die Abbauleistungen codieren	28
3.6.2.1	Präparation von Gesamt-DNA aus Umweltisolaten (KIESEL, persönliche Mitteilung)	28
3.6.2.2	Reinigung plasmidaler DNA durch Dichtegradientenzentrifugation	29
3.6.2.3	Charakterisierung des Plasmides pAB 96 durch Restriktion und Hybridisierung mit Sonden für die Gene nah Ac, xyl E und alk B	29
3.6.2.4	Markierung des Plasmides pAB 96 und Hybridisierung mit der Plasmid-DNA aus Umweltisolaten	30
3.6.3	Charakterisierung von Mikroorganismen durch die Methode des Ribotyping	31
3.6.3.1	Isolation, Restriktion und Transfer der chromosomalen DNA	31
3.6.3.2	Hybridisierung und immunologischer Nachweis	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Mikrobiologische Charakterisierung der Biozönosen	32
4.1.1	Zahl der koloniebildenden Einheiten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92	32
4.1.2	Zahl der koloniebildenden Einheiten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	33
4.1.3	MPN- Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen	38
4.1.3.1	MPN-Werte ökophysiologischer Gruppen aus dem unbelasteten Grundwasserbereich (GWBR 21/92)	38
4.1.3.2	MPN-Werte ökophysiologischer Gruppen aus dem belasteten Grundwasserbereich (GWBR 6/91)	40
4.1.3.2.1	MPN-Werte ökophysiologischer Gruppen verschiedener Kompartimente zum gleichen Zeitpunkt (Kompartimentabhängige Verteilung)	42
4.2	Taxonomische Zusammensetzung der aeroben, mikrobiellen Biozönosen	46
4.2.1	Identitäten der Umweltisolate	46
4.2.1.1	Gram-Verhalten der Umweltisolate	46
4.2.1.2	Identitäten der Umweltisolate im BIOLOG-System	47
4.3	Biochemisches Abbaupotential für ausgewählte aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe in Isolaten und Gesamtproben	52

4.3.1	Biochemisches Degradationspotential für ausgewählte aromatische Verbindungen in Isolaten	52
4.3.1.1	Nachweis der <i>ortho</i> - und <i>meta</i> -Spaltung des Brenzcatechins in Isolaten aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches	52
4.3.1.2	Stabilität des Degradationspotentials - Untersuchungen der Isolate ausgewählter Biozönosen zu unterschiedlichen Zeitpunkten	55
4.3.1.3	Einfluß des ursprünglichen Isolationsmediums auf den Anteil degradativer Isolate in unterschiedlichen Biozönosen	57
4.3.2	Biochemisches Degradationspotential für ausgewählte aliphatische Verbindungen in Isolaten	59
4.3.2.1	Biochemisches Abbaupotential von Einzelisolaten für ausgewählte n-Alkane (Petrischalentest)	60
4.3.2.2	Biochemisches Abbaupotential von Einzelisolaten aus dem unbelasteten Grundwasserbereich (GWBR 21/92) für ausgewählte n-Alkane- (Modifizierter BIOLOG®-MT-Test)	61
4.3.2.3	Biochemisches Abbaupotential von Einzelisolaten aus dem belasteten Grundwasserbereich (GWBR 6/91) für ausgewählte n-Alkane- (Modifizierter BIOLOG®-MT-Test)	63
4.3.3	MPN-Werte degradativer Mikroorganismen für ausgewählte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe in Gesamtproben	69
4.4	Genverbreitung und Gentransfer degradativer Leistungen	71
4.4.1	Verbreitung von DNA-Sequenzen für die Codierung von Abbauleistungen in Isolaten mikrobieller Biozönosen	71
4.4.1.1	Naphthalendioxygenase nah Ac	72
4.4.1.2	Catechol-2,3-Dioxygenase xyl E	73
4.4.1.3	Alkanmonooxygenase alk B	74
4.4.1.4	Detektion durch Hybridisierung	75
4.4.2	Lokalisierung von DNA-Sequenzen für die Codierung von Abbauleistungen in Isolaten mikrobieller Biozönosen	78
4.4.2.1	Plasmidvorkommen in den untersuchten mikrobiellen Biozönosen	78
4.4.2.2	Zuordnung degradativer Leistungen zu genetischen Loci der Isolate	80
4.4.2.3	Charakterisierung des Plasmides pAB 96	83
4.4.2.3.1	Größe des Plasmides	83
4.4.2.3.2	Restriktionsanalysen	84
4.4.2.3.3	Lokalisierung abbaurelevanter Leistungen auf dem Plasmid pAB 96	85
4.4.2.4	Verbreitung des Plasmides pAB 96 in mikrobiellen Biozönosen des mineralölbelasteten Grundwassers	89
4.4.3	Vergleich von Mikroorganismen durch die molekularbiologische Methode des Ribotyping	94
5	Diskussion	97
5.1	Lebendkeimzahlen	98
5.1.1	Unbelasteter Grundwasserbereich (GWBR 21/92)	98
5.1.2	Belasteter Grundwasserbereich (GWBR 6/91)	100
5.2	MPN-Werte verschiedener Ökophysiotypen	101
5.3	Taxonomische Charakterisierung der Isolate mikrobieller Biozönosen	104
5.4	Biochemisches Abbaupotential der Isolate aus mikrobiellen Biozönosen für aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe	106

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>IV</u>
5.5 Molekularbiologische Charakterisierung abbauaktiver Isolate aus mikrobiellen Biozönosen	109
5.5.1 Nachweis von Gensequenzen für degradative Leistungen durch PCR-Amplifikation und Hybridisierung	110
5.5.2 Lokalisierung der Codierung degradativer Leistungen auf genetischen Loci	112
5.5.3 Charakterisierung extrachromosomaler DNA-Moleküle als Träger der Gensequenzen degradativer Leistungen	113
5.5.4 Verbreitung des Degradationspotentials in mikrobiellen Biozönosen des Mineralöl belasteten Grundwassers	115
5.5.4.1 Nachweis des Plasmides pAB 96 in mikrobiellen Biozönosen des Mineralöl belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches	115
6 Zusammenfassung	118
7 Literatur	123

Abb. 1: Lage des Untersuchungsgebietes	10
Abb. 2: Monatliche Niederschlagsverteilung in den Jahren 1993 bis 1996 im Vergleich zum langjährigen Mittel (Beobachtungsreihe 1896-1997)	11
Abb. 3: Normalprofil im südwestlichen Geiseltalbecken und in der Querfurt-Freyburger Muschelkalkmulde	13
Abb. 4: Lage der beprobten GWBR und Verlauf der Profillinie im Luftbild und in der topographischen Karte	15
Abb. 5: Geologisches Profil durch den Alt- und Neuwerksbereich des Mineralölwerkes Lützkendorf	16
Abb. 6: Konzentrationen polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt der Probenahmen	18
Abb. 7: IR-spektroskopisch ermittelte Kohlenwasserstoffgehalte verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt der Probenahmen	19
Abb. 8: Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt der Probenahmen	20
Abb. 9: KBE-Werte der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten	32
Abb. 10: Vergleich der KBE-Werte in verschiedenen Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) zu unterschiedlichen Zeitpunkten	33
Abb. 11: KBE-Werte der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten	34
Abb. 12: KBE-Werte der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten	34
Abb. 13: KBE-Werte der Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten	35
Abb. 14: KBE-Werte des Sedimentes des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten	35
Abb. 15: Grundwasserstände und Mächtigkeiten der Kompartimente im GWBR 6/91 zu den Zeitpunkten der Probenahmen	36
Abb. 16: Vergleich der KBE-Werte in verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91)	37
Abb. 17: MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92)	38
Abb. 18: MPN-Werte denitrifizierender Mikroorganismen in Abhängigkeit von DOC- und Nitratgehalt im unbelasteten Grundwasserbereich	39
Abb. 19: MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in den Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 (Frühjahr 1994)	40
Abb. 20: MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in den Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 (Herbst 1994)	40
Abb. 21: Vergleich der MPN-Werte denitrifizierender Mikroorganismen in den Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches zu unterschiedlichen Zeitpunkten	42
Abb. 22: Vergleich der MPN-Werte Sulfat reduzierender Mikroorganismen in den Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches zu unterschiedlichen Zeitpunkten	42
Abb. 23: MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 (Kompartimentabhängige Verteilung zu verschiedenen Zeitpunkten)	44
Abb. 24: MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 (Kompartimentabhängige Verteilung im Herbst 1996)	45

Abb. 25: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 im Frühjahr 1994	47
Abb. 26: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994	48
Abb. 27: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus dem Sediment des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994	48
Abb. 28: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994	49
Abb. 29: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus dem Sediment des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994	49
Abb. 30: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System und auf Pseudo F-Agar identifizierten Bakterienisolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994	50
Abb. 31: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Herbst 1994	51
Abb. 32: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	53
Abb. 33: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	53
Abb. 34: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92	54
Abb. 35: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Isolationsmedium: R2A-Agar)	55
Abb. 36: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Isolationsmedium: SMSÖ)	56
Abb. 37: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtheit der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches 21/92	61
Abb. 38: Prozentualer Anteil der Isolate unterschiedlicher Kompartimente des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 an den Alkan-Verwertungsklassen	62
Abb. 39: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtzahl der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereich 6/91	64
Abb. 40: Prozentualer Anteil degradativer Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) an den n-Alkanverwertungsklassen	65
Abb. 41: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtheit der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereich 6/91	67
Abb. 42: Prozentualer Anteil degradativer Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) an den n-Alkanverwertungsklassen (Isolationsmedium: SMSÖ)	68
Abb. 43: Vergleich der <i>MPN</i> -Werte degradativer Mikroorganismen aus der Gesamtprobe der Wasserphase des unbelasteten (GWBR 21/92) und der Interphase des belasteten (GWBR 6/91) Grundwasserbereiches im Herbst 1996	70
Abb. 44: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte des Naphthalendioxygenase-Genfragmentes aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	72

Abb. 45: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte des Catechol-2,3-Dioxygenase Genfragmentes aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 und <i>P. putida</i> mt-2 mit und ohne Stabilisierung der DNA durch Chelex 100	73
Abb. 46: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte des Alkanmonoxygenase-Genfragmentes aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	74
Abb. 47: Hybridisierung der PCR-Amplifikationsfragmente des Naphthalendioxygenase-Genfragmentes ausgewählter Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 mit der Digoxygenin endmarkierten Oligonukleotidsonde nah Ac2	76
Abb. 48: Hybridisierung der PCR-Amplifikationsprodukte des Alkanmonoxygenase-Genfragmentes ausgewählter abbauaktiver Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 mit der Digoxygenin endmarkierten Oligonukleotidsonde alk B (S)	77
Abb. 49: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	78
Abb. 50: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 108/94	79
Abb. 51: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91)	80
Abb. 52: Hybridisierung der Gesamt-DNA ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) mit dem Digoxygenin <i>random primed</i> markierten nah 7 PCR-Amplifikationsfragment (Naphthalendioxygenase)	81
Abb. 53: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsfragmente der Naphthalendioxygenase aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 (<i>template</i> -DNA - Plasmidpräparate)	82
Abb. 54: Hybridisierung der PCR-Amplifikationsfragmente der Naphthalendioxygenase aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 mit der Digoxygenin endmarkierten Oligonukleotidsonde nah Ac 2	82
Abb. 55: Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Präparationen des Plasmides pAB 96 und der Markerplasmide pWWO und RP4	83
Abb. 56: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente der Plasmide pWWO und pAB 96	84
Abb. 57: Hybridisierung der Restriktionsfragmente des Plasmides pAB 96 mit ausgewählten Gensonden	87
Abb. 58: Hybridisierung der Restriktionsfragmente der Plasmide pWWO und pAB 96 mit der Digoxygenin endmarkierten nah Ac 2-Oligonukleotidsonde	88
Abb. 59: Schematische Darstellung der Zuordnung von Abbauleistungen zu Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96	89
Abb. 60: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten (GWBR 6/91) und unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92)	90
Abb. 61: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate aus Mikroorganismen verschiedener Kompartimente belasteter Grundwasserbereiche (GWBR 6/91 und 108/94) zu unterschiedlichen Zeitpunkten	90
Abb. 62: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91)	91

Abb. 63: Hybridisierung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten (GWBR 6/91) und unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) mit dem Digoxigenin <i>random primed</i> markierten Plasmid pAB 96	92
Abb. 64: Hybridisierung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten verschiedener Kompartimente belasteter Grundwasserbereiche (GWBR 6/91 und 108/94) zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Digoxigenin <i>random primed</i> markierten Plasmid pAB 96	92
Abb. 65: Hybridisierung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) mit dem Digoxigenin <i>random primed</i> markierten Plasmid pAB 96	93
Abb. 66: Gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten chromosomalen DNA aus unterschiedlichen abbauaktiven Isolaten	95
Abb. 67: Hybridisierung der restringierten, chromosomalen DNA aus unterschiedlichen abbauaktiven Isolaten mit dem Digoxigenin <i>random primed</i> markierten PCR-Amplifikationsfragment des 16S rRNA-Genes aus <i>E. coli</i>	96

Tab. 1: Differenzen zum langjährigen jährlichen Mittel (Beobachtungsreihe 1896-1997) der Niederschlagssumme im Zeitraum der Untersuchungen	11
Tab. 2: Vergleich der Inkubationsbedingungen und Auswertungsintervalle für die verwendeten Medien	23
Tab. 3: Reaktionen zum Nachweis ökophysiologischer Gruppen	24
Tab. 4: Sondenspezifische Hybridisierungsbedingungen für die Detektion abbaurelevanter Leistungen auf Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96	30
Tab. 5: Prozentuale Verteilung des Gramverhaltens der Isolate aus Biozönosen verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches	46
Tab. 6: Prozentualer Anteil fluoreszierender <i>Pseudomonaden</i> in verschiedenen Proben unterschiedlicher Kompartimente und zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten	51
Tab. 7: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Interphase des GWBR 6/91)	56
Tab. 8: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Wasserphase des GWBR 21/92)	57
Tab. 9: Abhängigkeit des prozentualen Anteils degradativer Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 vom ursprünglichen Isolationsmedium	58
Tab. 10: Abhängigkeit des prozentualen Anteils degradativer Isolate aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 vom ursprünglichen Isolationsmedium	58
Tab. 11: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit Catechol-1,2-Dioxygenase- und Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität an der Gesamtzahl der Isolate	59
Tab. 12: Prozentualer Anteil degradativer Mikroorganismen an der Gesamtzahl der Isolate in verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches 6/91	60
Tab. 13: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtzahl der von unterschiedlichen Medien isolierten Mikroorganismen aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91	69
Tab. 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR-Amplifikationen ausgewählter Genfragmente in Isolaten unterschiedlicher Kompartimente	75
Tab. 15: Verbreitung und geschätztes Molekulargewicht isolierter Plasmide aus Mikroorganismen unterschiedlicher mikrobieller Biozönosen	80
Tab. 16: Molekulargewichte der Restriktionsfragmente des Plasmides pAB 96	85
Tab. 17: Charakteristika der Hybridisierungsbedingungen zum Nachweis degradativer Leistungen auf Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96	86
Tab. 18: Ergebnisse der Hybridisierung von pAB 96-Restriktionsfragmenten mit ausgewählten Sonden	88
Tab. 19: Ribotyping ausgewählter Isolate	96
Tab. 20: Vergleich der Gesamtzellzahlen und KBE-Werte aus Untersuchungen unbelasteter Grundwässer	99

1 Einleitung

Der Großraum Leipzig-Halle-Bitterfeld war und ist aufgrund seiner Geschichte durch umfangreiche Kontaminationen der Luft, des Bodens, der Oberflächengewässer und nicht zuletzt des Grundwassers stark beeinträchtigt. Wegen der reichen Braunkohlevorkommen kam es sowohl in diesem Bereich als auch in einer Reihe anderer isolierter Braunkohlegebiete wie beispielsweise dem Geiseltal westlich von Merseburg zu massiven Eingriffen in die Natur.

In diesen Revieren wurde der Bergbau bereits seit mehr als 150 Jahren betrieben (LMBV, 1996) und mit Weiterentwicklung der Fördertechnik auch zum Tagebaubetrieb ausgebaut.

Dies bedeutete einen extremen Eingriff in die geologischen und hydrogeologischen Verhältnisse, dessen Folgen auch künftig die Landschaft nachhaltig beeinflussen werden.

Die sprunghafte Entwicklung der Braunkohleförderung im Geiseltal führte in der Folge zur Ansiedlung einer Vielzahl von Betrieben der Montan- und chemischen Industrie, die Teerverarbeitungswerke, Brikettfabriken und Braunkohleveredlungsanlagen im Umfeld des Geiseltalbeckens errichteten.

Im Zuge dieser Industriensiedlung erfolgte der Bau des Mineralölwerkes Lützkendorf, dessen Werksgelände das Untersuchungsgebiet der vorliegenden Arbeit darstellt.

Die Geschichte des Mineralölwerkes Lützkendorf sei im folgenden in kurzen Stichpunkten zusammengefaßt:

1936	Bau des Mineralölwerkes Lützkendorf durch die Wintershall AG Kassel
1937-1938	Bau und Inbetriebnahme einer Schmierölfabrik im Nordosten des Werkes
1943	Verarbeitung von 115 000 Tonnen Rohöl /Jahr
1944-45	15 Luftangriffe der Alliierten Vernichtung der Produktionsanlagen und Vorratstanks bis zu 70% Freisetzung von 40 000 m ³ Mineralöl
1945-46	Demontage der noch intakten Produktionsanlagen durch die sowjetischen Besatzungstruppen
1946-47	Wiederaufbau des Werkes und Inbetriebnahme der Schmierölfabrik
1956	Errichtung des Neuwerkes im Südteil des Geländes, Produktion von Schmierölen
1986	Verarbeitung von Altölen
ab 1990	Rückbau vieler Produktionsanlagen im Altwerksbereich
ab 1991	Einstellung der Produktion pharmazeutischer Produkte (z. B. Weißöle), Produktion von Propan-/ Butangas

1.1 Veranlassung der Untersuchungen

Mit Beendigung der Kohleförderung ist für die Mehrzahl der Tagebaurestlöcher - so auch für das im Geiseltalbecken - eine Sanierung und Rekultivierung geplant. Nach der Durchführung der Maßnahmen zur Befestigung der Böschungen soll der Bereich des Tagebaurestloches im Geiseltalbecken geflutet werden. Der dabei entstehende Geiseltalsee wird mit 1,3 Mrd. m³ der zwölftgrößte See der BRD sein. Sein erwarteter Pegelstand wird bei 94 m ü HN liegen.

Der Untergrund des direkt an das Geiseltal angrenzenden Mineralölwerkes Addinol GmbH Lützkendorf, das, im Krieg zerstört, auch heute noch weiträumige Kontaminationen von Boden und Grundwasser mit Mineralöl aufweist, birgt bei der geplanten Nachnutzung der unmittelbaren Umgebung mit Entstehung des Geiseltalsees große Gefahren. Der Eintrag erheblicher Mengen Mineralöl in den See ist bei Kurzschluß des kontaminierten Grundwassers mit dem Oberflächenwasser möglich und würde eine Gefährdung dieser künftigen Kulturlandschaft darstellen. Die Planung der Nachnutzung als Erholungsgebiet ist nur unter Einbe-

ziehung des Territoriums des Mineralölwerkes in die Sanierungsmaßnahmen möglich (HPC, 1992).

Für die Sanierung kontaminierter Standorte liegen heute Erfahrungen mit physikalischen und chemischen (thermische Behandlung, Waschverfahren, Extraktion, Adsorption etc.) aber auch biologischen Verfahren vor. Das Vorhandensein mikrobieller Biozönosen, die fähig sind, die vorliegende Kontamination entweder als Energiequelle oder als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen und sie dabei degradativ aus ihrem Lebensraum zu entfernen, ist wichtigste Voraussetzung für eine biologische Sanierung. Dieses erfordert jedoch Kenntnisse über das Detoxifikationspotential der Biozönosen. Grundlage zur Beurteilung des Potentials sind Untersuchungen zur Besiedlungsstruktur und Dynamik sowie zum Degradationspotential in Abhängigkeit von Art und Grad der Belastung.

1.2 Mikrobiologie des Grundwassers

Der Bereich des Grundwassers wurde lange Zeit nicht als Lebensraum autochthoner mikrobieller Biozönosen erkannt, erst WOLTERS et al. (1956) beschrieben diesen oligotrophen Standort als Biotop für Mikroorganismen. Ging man zunächst von einer sehr geringen mikrobiellen Besiedlungsdichte des Grundwasserbereiches aus, so konnte in zahlreichen Arbeiten der vergangenen Jahre die sehr diverse Besiedlung des Grundwassers gezeigt werden. Anfänglich widmeten sich die Untersuchungen hauptsächlich dem Eintrag, der Verbreitung und dem Nachweis pathogener Mikroorganismen im Grundwasserbereich (MATTHEB et al., 1985; HIRSCH et al., 1983; KADDU-MULINDWA et al., 1986). Die verbesserte Probenahmetechnik ermöglichte die detaillierte Erforschung des Grundwassers als Lebensraum für Mikroorganismen (DOTT et al., 1981, 1984, 1986, 1988, 1989; JUNG et al., 1983; GEHLEN et al., 1985; KÖLBEL-BOELKE, 1988; MARXSEN, 1988; NEHRKORN, 1988). Es wurden die qualitative Zusammensetzung von natürlichen Grundwasserbiozönosen (HIRSCH et al., 1983), der Einfluß der Mikroorganismen auf die Beschaffenheit des Grundwassers (DOTT et al., 1986; 1988; 1989), Siedlungsdichte und Verteilung von Bakterien (NEHRKORN, 1988; PREUSS et al., 1988) und die Diversität heterotropher Bakteriengemeinschaften im Grundwasserleiter (KÖLBEL-BOELKE, 1988) untersucht. Auch anorganisch oder organisch kontaminierte Grundwässer wurden in die Untersuchungen einbezogen. DOTT et al. (1984) und BATTERMANN et al. (1984) ermittelten die Werte der koloniebildenden Einheiten (KBE), die Dichte verschiedener ökophysiologischer Gruppen („*most probable number*“-MPN-Methodik) und die taxonomische Zusammensetzung der Grundwasserbiozönosen in kontaminierten Bereichen bzw. die Möglichkeiten des mikrobiellen Abbaus von Kohlenwasserstoffen zur Beseitigung einer Untergrundkontamination. MIKESELL et al. (1993) untersuchten das Abbaupotential der mikrobiellen Biozönosen für aromatische Kohlenwasserstoffe in einem petroleumkontaminierten Grundwasser.

1.3 Mikrobieller Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen

Mineralöl ist der zusammenfassende Begriff für die aus mineralischen Rohstoffen gewonnenen flüssigen Destillationsprodukte, die u. a. aus Gemischen gesättigter Kohlenwasserstoffe bestehen. Mineralöle und Mineralölprodukte sind aus homologen Reihen von Alkanen, Alkenen, Cycloalkanen und Aromaten zusammengesetzt. Vergaserkraftstoffe, Mitteldestillate (Dieselkraftstoff, Heizöl) und Rohöle stellen die Mineralölproduktklassen dar. Sie unterscheiden sich in Zusammensetzung, Siedebereich, Viskosität und Dichte (HOPFSTOCK, 1994). Die Zusammensetzung der in den Untergrund gelangten Mineralölprodukte verändert sich durch den mikrobiellen Abbau der Mineralölkohlenwasserstoffe. Das Alter einer Kontamination kann aus dem Verhältnis der leicht abbaubaren Normalparaffine zu den schwer abbaubaren Isoparaffinen abgeleitet werden (HOPFSTOCK, 1994).

Mineralölkohlenwasserstoffe können Mikroorganismen als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen. Bereits zur Jahrhundertwende wurde über den mikrobiellen Abbau von Kohlenwas-

serstoffen petrochemischer Natur berichtet. Zunächst herrschte die Ansicht, daß lediglich Spezialisten unter den Mikroorganismen über diese Fähigkeit verfügen. Für die ubiquitäre Verbreitung von Mikroorganismen mit degradativen Eigenschaften und deren Nutzung der Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle ergeben sich bei ZOBELL (1946); FUHS (1961), ZAJIC (1974), ATLAS (1988); Gunkel (1988), POREMBA et al. (1989) und POREMBA et al. (1994) zahlreiche Hinweise.

Der Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen durch Mikroorganismen ist zumeist ein stark sauerstoffzehrender Prozeß. Die Oxidation von 1 kg Mineralölkohlenwasserstoffen benötigt nach GUNKEL (1988) eine Sauerstoffmenge von 3,0-3,5 kg, das entspricht dem in 400 m³ Meerwasser gelösten Sauerstoffgehalt. In letzter Zeit haben sich aus der Literatur verschiedene Hinweise ergeben, wonach eine vollständige anaerobe Oxidation von gesättigten Kohlenwasserstoffen bis zum CO₂ durch einen neuen Typ sulfatreduzierender Bakterien bzw. der mikrobielle Abbau monochlorierter und nicht chlorierter Aromaten unter eisenreduzierenden Bedingungen nachgewiesen wurde (AECKERSBERG et al., 1991; RUETER et al., 1994; KAZUMI et al., 1995). Das Vorliegen alternativer Elektronenakzeptoren, wie z. B. Nitrat, reicht häufig jedoch nicht für eine vollständige Oxidation aliphatischer Kohlenwasserstoffe aus, da die Alkanmonoxygenasen und Alkoholxygenasen auf molekularen Sauerstoff angewiesen sind (MÜLLER-HURTIG et al., 1990). Die Aufnahme eines Sauerstoffmoleküls in die organische Verbindung führt zur Bildung einer funktionellen Gruppe. Es erhöht sich die Löslichkeit der Verbindung in Wasser, sie wird dadurch leichter bioverfügbar und ist somit einer Mineralisation besser zugänglich. Dient die Kohlenwasserstoffverbindung neben der Energie- auch als Kohlenstoffquelle und damit zu Wachstum und Vermehrung der Mikroorganismen, so bestehen auch Abhängigkeiten von der Konzentration an anorganischen Phosphor- und Stickstoffsalzen [C:N und C:P- Verhältnis], an Spurenelementen und Cosubstraten (DIBBLE et al., 1979; GUNKEL, 1988). Der Einfluß verschiedener Milieuparameter wie Temperatur (DIBBLE et al., 1979; GUNKEL, 1988), Salinität (RHYKERD et al., 1995) und pH-Wert (DIBBLE et al., 1979) auf die mikrobiellen Abbauprozesse wurde ausführlich untersucht.

Über die taxonomische Einordnung isolierter Kohlenwasserstoffabbauer liegen zahlreiche Publikationen vor. So machen u. a. ZOBELL (1946), FUHS (1961), ZAJIC (1974), RIDGWAY et al. (1990), AUSTIN et al. (1977), GUNKEL (1988), POREMBA et al. (1994) und BOCK et al. (1994) Angaben über die Zusammensetzung degradativer mikrobieller Biozönosen. Danach sind über 200 kohlenwasserstoffabbauende Arten von Bakterien, Pilzen, einige Algen und Protozoen bekannt. Am häufigsten werden Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter* und *Nocardia* (POREMBA et al., 1994), aber auch *Micrococcus*, *Xanthomonas* und *Flavobacterium* (GUNKEL, 1988; BARTHA et al., 1977) genannt. Die Wirkung der Mineralölkohlenwasserstoffe auf die Diversität mikrobieller Biozönosen wird von verschiedenen Autoren untersucht.

Bei der Sichtung der Publikationen zur Struktur, Dynamik, taxonomischen Zusammensetzung sowie der Bestimmung des Detoxifikationspotentials der mikrobiellen Biozönosen wird deutlich, daß die Mehrzahl der Untersuchungen an Populationen aus Böden, Sedimenten, Ölschlammern oder des Meerwassers vorgenommen wurden (AUSTIN et al., 1977; BARTHA et al., 1977; DIBBLE et al., 1979; ROSENBERG, 1992; POREMBA et al., 1994; MIETHE et al., 1994). Wenige Arbeiten widmen sich den Untersuchungen im Grundwasser.

Die Mechanismen des Abbaus aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe sind weitgehend aufgeklärt. Aus einer Vielzahl von Publikationen, die die Reaktionsmechanismen, die beteiligten Enzyme, teilweise sogar die molekularbiologischen Voraussetzungen für die beschriebenen Abbauleistungen erläutern, wurden einige Grundregeln des Abbaus herausgearbeitet. Der mikrobielle Abbau des Kohlenwasserstoffmoleküls ist abhängig von strukturellen Eigenschaften der organischen Verbindung (ATLAS, 1988):

- Der Abbau von Alkanen mit 1-9 Kohlenstoffatomen erfolgt durch Spezialisten, die diese häufig in Verbindung mit energiereichen Substraten umsetzen (Cometabolismus). Die

Kohlenwasserstoffe werden selten assimiliert. Aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit sind kurzkettige Alkane biotoxisch.

- Alkane mit 10-20 Kohlenstoffatomen können als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen.
- Höhermolekulare Alkane werden bei zunehmender Kettenlänge kaum noch angegriffen.
- Unverzweigte werden im Vergleich zu verzweigten Alkanen bevorzugt abgebaut.
- Ungesättigte Kohlenwasserstoffe (Alkene) unterliegen im Vergleich zu gesättigten Verbindungen einem verminderten mikrobiellen Angriff.
- n-Alkane werden besser als aromatische Verbindungen abgebaut.
- Bei polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) nimmt mit höherer Zahl kondensierter Ringsysteme die Wasserlöslichkeit extrem ab, die Verfügbarkeit für den mikrobiellen Abbau sinkt damit signifikant.
- Substituenten scheinen die Aufnahme der Verbindung in die Zelle bzw. den Abbau zu behindern.
- Die Abbaubarkeit der Kohlenwasserstoffverbindung hängt entscheidend von deren Bioverfügbarkeit, d.h. ihrer Löslichkeit in Wasser ab.

Um die Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe in Wasser zu erhöhen, haben sich in der Natur interessante Mechanismen herausgebildet. Sie sind in der Literatur gut beschrieben und werden auch weiterhin erforscht. Vielfach wurde in Kohlenwasserstoff verwertenden Mikroorganismen die Bildung von sogenannten Biotensiden nachgewiesen (ROSENBERG et al., 1985; POREMBA et al., 1989; FRANCY et al., 1991; JAIN et al., 1992; ZHANG et al., 1992). WAGNER (1987) geht ausführlich auf die unterschiedlichen Strategien der Biotensidbildung ein, beschreibt die möglichen Bestandteile der hydrophoben und hydrophilen Anteile und postuliert die Regulationsmechanismen. Extrazelluläre und zellwandverbundene amphiphile Metabolite ermöglichen den Mikroorganismen die Anlagerung an die Interphase zwischen Wasser und Kohlenwasserstoff. Diese Komplexe können der gesamten Zelle hydrophobe Eigenschaften vermitteln und z. T. ein Eintauchen in den Ölfilm ermöglichen. Das Biotensid wirkt als Lösungsvermittler. Damit gerät die Mikroorganismenzelle in direkten Kontakt mit dem Substrat. Kleinere Öltröpfchen werden aus dem Film bzw. der Phase herausgelöst und gelangen in die Wasserphase. Eine andere Art von „biosurfactants“ wird von den Bakterien direkt in das Medium abgegeben und löst spontan kleinere Öltröpfchen aus der Phase heraus, die dann in die Wasserphase sinken. Somit wird die Angriffsoberfläche um ein Vielfaches erhöht und die bessere Bioverfügbarkeit als eine der wichtigsten Voraussetzungen der Abbaubarkeit gewährleistet (POREMBA et al., 1994). So beschrieben u. a. ZHANG et al. (1995), CHURCHILL et al. (1995) und PROVIDENTI et al. (1995) die Erhöhung der Abbauraten von Kohlenwasserstoffen wie n-Alkanen bzw. Phenanthren durch Rhamnolipide.

Wie bereits erwähnt, existieren seit Jahren gesicherte Erkenntnisse über die Reaktionsmechanismen des Aliphatenabbaus. In jedem Fall erfolgt in einem Sauerstoff abhängigen Initialschritt die Oxidation einer Methyl- oder Methylengruppe. Diese Reaktion kann eine randständige bzw. eine intramolekulare Gruppe aber auch beide randständigen Gruppen betreffen. Man unterscheidet daher die monoterminale, subterminale und diterminale Oxidation.

Der verbreitetste Abbaumechanismus, der durch die entsprechende Monooxygenasen katalysiert wird, ist der Angriff einer endständigen Methylgruppe. Der im Verlaufe der primären Oxidation entstandene Alkohol wird weiter in das Aldehyd und schließlich in die entsprechende Carbonsäure umgewandelt.

Bei der diterminalen Oxidation erfolgt ein beidseitiger Angriff der endständigen Kohlenstoffatome; im Ergebnis der subterminalen Oxidation wird eine intramolekulare Methylengruppe zur Ketogruppe umgewandelt.

Es erfolgt die Einschleusung in den Kreislauf der β -Oxidation mit einem vollständigen Abbau bis zum CO_2 oder nach Veresterung zu Phospholipiden, Glycolipiden u. a..

Auch über den Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe liegen mittlerweile gesicherte Erkenntnisse vor:

Dabei besteht das Prinzip des bakteriellen Abbaus zunächst in der Hydroxylierung des Ringsystems, Reaktionen, die enzymatisch durch Monooxygenasen oder Dioxygenasen katalysiert werden und vor allem in Bakterien wie in Vertretern der Gattungen *Pseudomonas*, *Flavobacterium* und *Rhodococcus*, aber auch in Pilzen und einigen Hefen exprimiert werden (KRUG et al., 1986; KÄLIN et al., 1992; SCHAUER et al., 1995). Somit weist das Molekül mindestens zwei Hydroxylgruppen auf, die die Bioverfügbarkeit des Ringsystems erhöhen und die wesentliche Voraussetzung für einen Abbau darstellen. Die oxidative Ringspaltung führt zur Bildung der für den Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen typischen zentralen Metabolite, dem Brenzcatechin bzw. Protocatechuat. Für die Degradation des Brenzcatechins existieren zwei Abbauewege, die in Mikroorganismen häufig exprimiert werden, die intradiolische Ringspaltung (*ortho*-Spaltung), die durch die Catechol 1,2-Dioxygenase katalysiert wird und zur Bildung der *cis*, *cis*- Muconsäure führt bzw. die extradiolische Spaltung des Brenzcatechins (*meta*-Spaltung) durch die Catechol 2,3-Dioxygenase, in deren Ergebnis das 2-Hydroxy-muconatsemialdehyd entsteht. Dieser in allen Organismen gebildete Metabolit kann weiter assimiliert werden. Wie bereits erwähnt, hängt die Abbaubarkeit polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe von der Anzahl der kondensierten Ringsysteme ab. Mit steigender Anzahl sinkt die Bioverfügbarkeit diese Verbindungen. Ein Abbau polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe durch Cometabolismus oder Oxidation wurde für verschiedene eukaryotische Mikroorganismen (Hefen und Pilze) beschrieben (MAJCHERCZYK et al., 1993). Die Autoren verweisen auf Arbeiten von HÜTTERMANN et al. (1988), die den Abbau höhermolekularer PAK unter der Voraussetzung des Zusatzes von Cosubstraten zeigen konnten.

1.4 Einsatz molekularbiologischer Methoden für die Erforschung mikrobieller Biozöosen

Durch die Einführung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden in die umweltmikrobiologische Forschung konnten große Fortschritte erzielt werden. Die Anwendung dieses Methodenspektrums verspricht ein neues Verständnis von der Struktur und Funktion mikrobieller Biozöosen (PAUL et al., 1995).

Anfänglich mußten die für Reinkulturen entwickelten Methoden zur Isolation von Nukleinsäuren den veränderten Bedingungen in Umweltproben angepaßt werden (SAYLER et al., 1985; OGRAM et al., 1987; FUHRMANN et al., 1988; STEFAN et al., 1988; SOMERVILLE et al., 1989; BEJ et al., 1991; TSAI et al., 1991 u. a.). Diese z. T. recht aufwendigen Verfahren wurden weiter vereinfacht und die Effektivität der Methoden zur Isolation von Nukleinsäuren erhöht (SELENSKA et al., 1992; TSAI et al., 1992; JEFFREY et al., 1994; VESCIO et al., 1995; OGRAM et al., 1995 u. a.). Die isolierten Nukleinsäuren bildeten die Voraussetzung für detaillierte Untersuchungen mikrobieller Biozöosen. Zunächst wurde der Nachweis pathogener Mikroorganismen oder gentechnisch veränderter Mikroorganismen (GEM) im Trinkwasser oder anderem Probenmaterial angestrebt (CHAUDHRY et al., 1989; HENSCHKE et al., 1991; HEUER et al., 1995). ATLAS et al. (1992) machen in einem Übersichtsartikel zahlreiche Angaben zum Einsatz molekularbiologischer Methoden für die Detektion bzw. Wiederfindung pathogener und gentechnisch veränderter Bakterien in Umweltproben bzw. unterschiedlichen Probenmaterialien.

Bald richtete sich die Anwendung molekularbiologischer Methoden auch auf die Charakterisierung mikrobieller Populationen aus kontaminierten Standorten. Durch Kombination verschiedener Verfahren gelang es, extrachromosomale DNA-Moleküle (Plasmide) in Umweltisolaten nachzuweisen und degradative Leistungen auf ihnen zu lokalisieren. Umfangreiche Angaben zu natürlich vorkommenden katabolischen Plasmiden wurden u. a. von PEMBERTON (1983), SAYLER et al. (1990) und CAMPBELL et al. (1995) gemacht.

WILLIAMS und MURRAY (1974) beschrieben den Archetypus des katabolischen TOL-Plasmides, pWWO. Auf diesem extrachromosomalen mobilen DNA-Molekül sind Enzyme codiert, die den Abbau von Toluol, *p*- und *m*-Toluat sowie *p*- und *m*-Xylen katalysieren (WORSEY et al., 1978). In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Plasmiden als Träger vergleichbarer Stoffwechselwege und Bereiche homologer DNA zu pWWO beschrieben (BURLAGE et al., 1989).

Als inzwischen gut charakterisiert gilt auch das von CHAKRABARTY et al. (1973) erstmals beschriebene OCT-Plasmid, auf dem ein katabolisches Operon für den Abbau aliphatischer Kohlenwasserstoffe lokalisiert werden konnte. Mittlerweile wurden einzelne Bestandteile dieses Operons hinsichtlich ihrer Organisation, DNA-Sequenz (KOK et al., 1989) und Regulation der Expression (KOK et al., 1989; EGGINK et al., 1988) untersucht. VAN BEILEN et al. (1994) analysieren die Substratspezifität und SHANKLIN et al. (1994) die Struktur der Alkanhydroxylase.

Besondere Bedeutung hatte die Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR). Sie erlaubt unter geeigneten Voraussetzungen in Kombination mit anderen Methoden den Nachweis von Mikroorganismen, die für andere Verfahren schwer zugänglich sind (lebend, aber nicht kultivierbar) bzw. nur in geringen Konzentrationen im Probenmaterial vorkommen (AMANN et al., 1991). Der außerordentlich vielseitiger Einsatz drückt sich auch in einer großen Anzahl von Publikationen zu umweltmikrobiologischen Fragestellungen (ROMANOWSKI et al., 1993; ERB et al., 1993; MC DONALD et al., 1995; FORSMANN et al., 1995; OGRAM et al., 1995 u. a.) aus.

Die Anwendung der PCR ermöglichte es auch, in Isolaten oder Gesamtproben Gene oder Genfragmente katabolischer Enzyme zu amplifizieren und damit nachweisbar zu machen. So ermittelten beispielsweise SOTSKY et al. (1994) in Sedimenten die Häufigkeit des Vorkommens von Genen aus Abbauwegen aliphatischer (alk B) und aromatischer (xyl E) Kohlenwasserstoffe in bakteriellen Populationen durch die Verwendung von PCR-Amplifikaten als Sonden. Der Vorteil der PCR-Technik ist darin zu sehen, daß auch ohne die phänotypische Ausprägung (verhindert durch fehlenden Sauerstoff oder alternative terminale Elektronenakzeptoren, geringe Bioverfügbarkeit) der Nachweis der molekularbiologischen Voraussetzungen von Abbauleistungen möglich ist. Somit konnte das Abbaupotential der mikrobiellen Biozönosen als eine wichtige Voraussetzung für die biologische Sanierung gezeigt werden. Als gleichermaßen bedeutende Methode stellte sich die Hybridisierung für die Anwendung in der umweltmikrobiologischen Forschung heraus, die u. a. sowohl den Nachweis von Gensequenzen katabolischer Enzyme als auch taxonomisch relevanter DNA-Bereiche ermöglichen. So bilden die Hybridisierungsverfahren in Kombination mit der PCR-Technik wichtige neue Methoden für die taxonomische Zuordnung von Mikroorganismen. Gemeinsamkeiten und Unterschiede variabler und konservierter Regionen im Bereich der 16S rRNA und 23S rRNA Gene wurden in den letzten Jahren in Kombination mit anderen Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen herangezogen (WALLNER et al., 1983; FESTL et al., 1986; AMANN et al., 1991; BARRY et al., 1991; SCHLEIFER et al., 1992; MANZ et al., 1993; JENSEN et al., 1993; CHRISTENSEN et al., 1994; RASKIN et al., 1994; VESCIO et al., 1995; LESER et al., 1995; BOURQUE et al., 1995).

Als besondere Anwendung hat sich die Methode des Ribotyping etabliert, die den Vergleich von Mikroorganismen auf Art- und Stammebene ermöglicht. Die Zuordnung zu einem Ribotyp deutet auf eine enge Verwandtschaft hin. Derartige Untersuchungen gestatten Aussagen zur Struktur und insbesondere zur Dynamik mikrobieller Biozönosen.

Die methodische Vielfalt molekularbiologischer Untersuchungen kann entscheidend zur Verbesserung der Qualität von Untersuchungsergebnissen verschiedener Biozönosen natürlicher Standorte beitragen. Sie ermöglicht es, Struktur und Funktion mikrobieller Biozönosen auch auf der Ebene der Nukleinsäuren und Enzyme verstehen zu lernen und Erkenntnisse

über die Mobilisierung degradativer Leistungen durch Genfluß innerhalb von Bakterienpopulationen zu gewinnen.

Aus diesem Grund wurden molekularbiologische Verfahren als wesentliche Ergänzung und Erweiterung der Untersuchungsmethoden mikrobieller Biozönosen des mineralölbelasteten Grundwassers angewandt.

1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Obwohl sich aus den einigen Arbeiten (HOLLEDERER et al., 1992; BREITUNG et al., 1995; PRADE, 1995; RIPPER, 1995; TEUTSCH et al., 1996; PREUSS et al., 1996; SWANNELL et al., 1996) zur biologischen Sanierung von petrochemisch kontaminierten Standorten Ergebnisse verallgemeinern lassen, setzt eine biologische Sanierung stets Untersuchungen am konkreten Standort und Schadensfall voraus. Dabei sind Kenntnisse über die mikrobiellen Biozönosen des belasteten Grundwassers eine wichtige Vorbedingung für die Festlegung von Sanierungsstrategien. Untersuchungen zur Struktur und insbesondere zum Degradationspotential der autochthonen Populationen des betrachteten Ökosystems in Abhängigkeit von den geologischen Verhältnissen sowie Grad und Art der chemischen Kontamination stellen die Grundlage dazu dar.

So war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die 1993 begonnen wurde, das Ökosystem „Mineralölbelastetes Grundwasser“ hinsichtlich der Struktur und Dynamik sowie des Detoxifikationspotentials seiner mikrobiellen Biozönosen im Vergleich zum unbelasteten Grundwasserbereich zu charakterisieren.

1. Sind in den untersuchten Grundwasserbereichen Mikroorganismen vorhanden?

Dazu sollte die Zahl der koloniebildenden heterotrophen Bakterien im belasteten und unbelasteten Grundwasserbereich bestimmt werden. Eine zufällige Auswahl der dabei kultivierten Bakterien war als Grundlage für weitere Untersuchungen zu isolieren.

2. Welche Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung weisen die aeroben Biozönosen des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches auf ?

Durch den Vergleich der taxonomischen Zuordnung der Isolate aus mikrobiellen Biozönosen beider Grundwasserbereiche war der Einfluß der chemischen Kontaminanten auf die Etablierung zymogener Indikatororganismen zu ermitteln.

3. Wie beeinflusst die Beschaffenheit des Grundwassers die mikrobiellen Biozönosen ?

Durch die Bestimmung der Dichten verschiedener Ökophysiotypen (Bestimmung der „*most probable number*“) im Ökosystem sollte das Potential abgeschätzt werden, ob die mikrobiellen Biozönosen zum Abbau der chemischen Kontaminanten auch in Abwesenheit von Sauerstoff unter Nutzung alternativer Elektronenakzeptoren befähigt sind.

4. Sind die Mikroorganismen potentiell zum Abbau der organischen Kontamination befähigt ?

Für Isolate aus repräsentativen Proben war das Abbaupotential für aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen durch biochemische Tests zu prüfen.

5. Lassen sich „klassische“ Wege für den Abbau bestimmter aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe molekularbiologisch nachweisen ?

Das Vorkommen und die Lokalisierung funktioneller Gene „klassischer“ Abbauewege (Naphthalendioxygenase - nah Ac; Catechol-2,3-Dioxygenase - xyl E; Alkanmonoxy-

genase - alk B) sollte für Isolate aus mikrobiellen Biozönosen unterschiedlicher Kompartimente untersucht werden.

6. Wo sind diese Abbauleistungen codiert und wie wird das Abbaupotential verbreitet ?

Durch den Nachweis und die Charakterisierung extrachromosomaler DNA-Moleküle in Isolaten verschiedener Biozönosen sollten sich Hinweise auf Möglichkeiten einer genetische Anpassung der Mikroorganismen und die Verbreitungsmechanismen des Abbaupotentials ergeben.

2 Regionale Standortbedingungen des Untersuchungsgebietes

Für die Planung und Durchführung der Analyse mikrobieller Biozönosen des Ökosystems Grundwasser und die Interpretation der Ergebnisse ist die Kenntnis regionaler Standortfaktoren des Untersuchungsraumes hinsichtlich seiner klimatischen Parameter, der geologischen Verhältnisse, der Beschaffenheit des Grundwasserleiters sowie Art und Grad einer chemischen Kontamination von grundlegender Bedeutung. Klimatische Faktoren wie beispielsweise die Niederschlagsmenge beeinflussen die Rate der Grundwasserneubildung ebenso wie die Eigenschaften der oberen Bodenhorizonte und der geologischen Schichten im Einzugsgebiet des Untersuchungsraumes. Art, Grad und Verbreitung der chemischen Belastung sowie die Grundwasserfließrichtung sind bei der Auswahl der für die Fragestellung repräsentativen Grundwasserbeobachtungsrohre besonders zu berücksichtigen. Ein durch die Auswertung von Bohrungen und Brunnendaten abgeleitetes geologisches Profil zeigt an, welche Grundwasserleiter beprobt werden, veranschaulicht die geologischen Verhältnisse im Untergrund des Untersuchungsraumes und erlaubt die Abschätzung der Verbreitung der chemischen Kontamination. Die Beschaffenheit des Grundwassers beeinflusst die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönosen und sollte daher stets parallel zu den mikrobiologischen Untersuchungen analysiert werden.

Im folgenden sind daher die für die Planung und Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen und für die Interpretation der Ergebnisse relevanten Standortfaktoren näher erläutert.

2.1 Geographische Einordnung des Untersuchungsgebietes

2.1.1 Administrative und naturräumliche Einordnung

Das Untersuchungsgebiet des Mineralölwerkes Lützkendorf liegt im Süden des Bundeslandes Sachsen-Anhalt. Es ist administrativ dem Landkreis Merseburg-Querfurt zuzuordnen (Abb. 1). Dabei ist das Bearbeitungsgebiet den Gemeinden Krumpa und Braunsbedra zugehörig.

Nach der naturräumlichen Gliederung Deutschlands von MEYNEN und SCHMITHÜSEN (1959) läßt sich der Untersuchungsraum dem „östlichen Harzvorland“ zuordnen. Südlich des Untersuchungsgebietes schließt sich der Naturraum „Querfurter Platte und Untere Unstrutplatten“ an (Abb. 1).

Die Reliefformen des Untersuchungsgebietes wurden in ihrer Genese durch Denudation geprägt. Es fand zusätzlich eine Reliefbeeinflussung durch Salzauslaugung statt, die die Bildung einer Senkenstruktur, des Geiseltalbeckens, förderte (BRAMER et al., 1981). Infolge des Braunkohleabbaus sind die Reliefformen heute stark anthropogen überprägt.

2.1.2 Klima

Da die Klimabedingungen unmittelbar die Grundwasserneubildung und das Abflußverhalten im Untersuchungsraum beeinflussen, werden sie im folgenden kurz umrissen.

Nach dem KLIMA-ATLAS für das Gebiet der DDR (1953) ist der Raum regionalklimatisch dem Börde- und Mitteldeutschen Binnenlandklima zugehörig. Klimabestimmend ist die Lage im Lee des Harzes (hercynisches Trockengebiet). Als Datenbasis für die Niederschlagsverhältnisse können die Daten der unmittelbar benachbart liegenden automatischen Klimastation des UFZ-Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH der Sektion Bodenforschung herangezogen werden.

Das langjährige Mittel der Niederschläge (Beobachtungsreihe 1896-1997) beträgt demnach 483 mm/Jahr. Nach Süden hin ist eine Zunahme der Niederschläge (in Weißenfels bereits über 500 mm/a) meßbar.



Satellitenbild (Landsat-TM-Szene vom 21.07.1994)
 Kanalkombination: 4/5/3 in r/g/b

Abb. 1: Lage des Untersuchungsgebietes

Datenbereitstellung:

UFZ-Umweltforschungszentrum
 Leipzig-Halle GmbH
 Bereich: Angewandte Landschaftsökologie
 Abteilung: Geofernerkundung

Bearbeitung und Gestaltung:

J. Birger und A. Birger

Aufgrund des Niederschlagsmaximums im Monat Juli (Abb. 2) ist das Untersuchungsgebiet dem Sommerregentyp zuzurechnen. Diese Tatsache weist auf eine kontinentale Beeinflussung des Klimas hin. Das langjährige Niederschlagsminimum liegt im Monat Februar (Abb. 2). Die sehr geringen Niederschläge im Winter werden durch größere Häufigkeiten ausgeglichen, die relativ großen Mengen des Sommers fallen hingegen bei wenigen Starkniederschlägen.

In diesem Zusammenhang muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Jahre des Untersuchungszeitraumes sehr niederschlagsreich waren und sich signifikante Abweichungen vom langjährigen jährlichen Mittel der Niederschlagssumme ergaben (Tab. 1, Abb. 2).

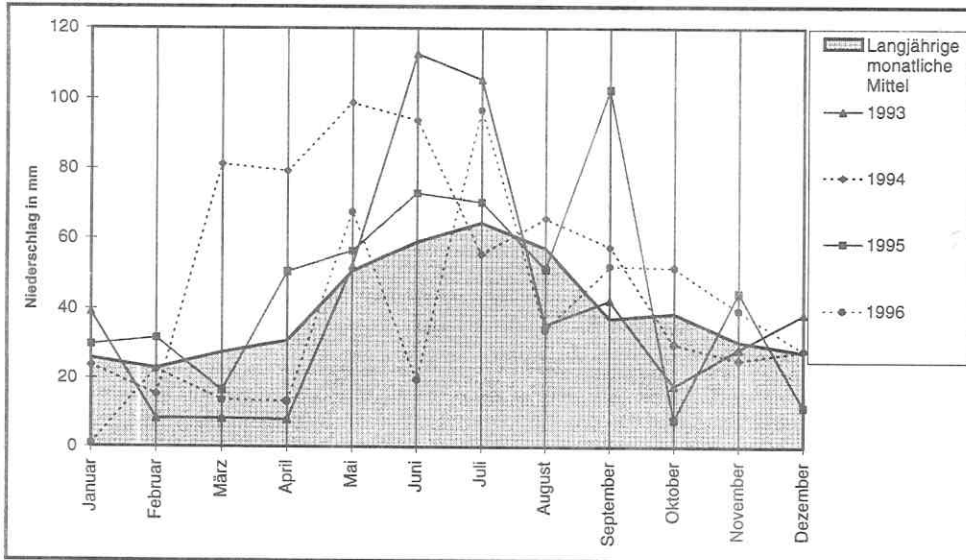


Abb. 2: Monatliche Niederschlagsverteilung in den Jahren 1993 bis 1996 im Vergleich zum langjährigen Mittel (Beobachtungsreihe 1896-1997)

Tab. 1: Differenzen zum langjährigen jährlichen Mittel (Beobachtungsreihe 1896-1997) der Niederschlagssumme im Zeitraum der Untersuchungen

Untersuchungsjahr	1993	1994	1995	1996
Differenz zum langjährigen jährlichen Mittel der Niederschlagssumme (in mm)	18,7	176,2	63,9	-43,3

2.1.3 Boden

Das Untersuchungsgebiet wird dem Bodenbildungsbereich der Böden der Löß- und Sandlößgebiete sowie der Lößhügelländer zugeordnet (GEOLOGISCHES LANDESAMT SACHSEN-ANHALT, 1994).

Als Ausgangssubstrate der Bodenbildung kommen demzufolge lehmiger Sand bis Schlufflehm (Löß) über sandigem Lehm (Geschiebemergel) oder Sand bis kiesiger Sand (Schmelzwassersand) in Frage. Der Löß weist dabei Mächtigkeiten bis maximal 5 m auf.

Infolge der vollständigen anthropogenen Überprägung des Untersuchungsraumes im Zuge der Errichtung, Zerstörung und Erweiterung des Mineralölwerkes dürften die ursprünglichen Bodenformen nur reliktiert vorhanden sein. Im engeren Untersuchungsraum überwogen die

Bodenformen der Löß-Rendzinen und im südöstlichsten Teil des Neuwerkes die der Löß-Schwarzerden (GEOLOGISCHES LANDESAMT SACHSEN-ANHALT, 1994). Bei den Rendzinen handelt es sich um durch Erosion gekappte Schwarzerden. Im nördlichen Bereich des Altwerkes waren holozäne Auelehme der Geiselaue in Form von Schluffen und Abschlammassen Ausgangssubstrat der Bodenbildung und demzufolge konnten sich Kolluvial-Schwarzerde oder Schwarzgleye herausbilden. Dieser ehemalige Auebereich ist dem Tagebau zum Opfer gefallen oder anthropogene Aufschüttungen mit Mächtigkeiten von bis zu 7 m (GWBR 6/91) sind prägend.

2.2 Geologische Verhältnisse im Untersuchungsgebiet

Das Mineralölwerk Lützkendorf liegt am Südrand des tertiären Geiseltalbeckens, welches im Süden von der Querfurt-Freyburger-Muschelkalkmulde und im Norden von der Merseburger Buntsandsteinplatte eingerahmt wird (Abb. 2).

Während das Altwerk noch im Bereich des Geiseltalbeckens liegt, befinden sich die Betriebsanlagen des Neuwerkes bereits auf den Schichten der Querfurt-Freyburger-Muschelkalkmulde. In der Abb. 3 sind die Normalprofile für das tertiäre Geiseltalbecken (Abb. 3a) und die Querfurt-Freyburger-Muschelkalkmulde (Abb. 3b) dargestellt.

Im folgenden werden die für die Arbeit relevanten Schichten erläutert. Die Normalprofile beginnen jeweils mit den dünnblättrigen, meist dunkelroten Tonen und den graugrünen Mergeln des oberen Buntsandsteines, des Röttes. In der Querfurt-Freyburger-Muschelkalkmulde werden diese von den dünnplattigen bis plattigen, stark geklüfteten Kalken des unteren Wellenkalkes überlagert (Abb. 3b). Im Geiseltalbecken (Abb. 3a) liegen die eozänen Tertiärschichten direkt auf dem oberen Buntsandstein. Die Liegendstufe besteht aus einer Wechselfolge von Sanden, Schluffen und Tonen (DOMMACK, 1992). Die darauf folgende Braunkohlestufe läßt sich im Bereich des Tagebaues Mücheln-Südfeld in Mittelkohle, oberes Hauptmittel und Oberkohle gliedern. In den Randbereichen des Geiseltalbeckens, so auch im Untersuchungsgebiet, treten Kohlediapire auf, die durch Permafrosteinwirkung während des Pleistozäns und isostatische Ausgleichsbewegungen entstanden sind (Molissoldiapirismus) (HPC, 1992). Die die Oberkohle überdeckende Hangendstufe besteht aus Kiesen, Sanden, Schluffen und Tonen eines obereozänen Flusses (EISSMANN, 1968 zitiert in DOMMACK, 1992).

In beiden Profilen folgen nun entsprechend die Schichten des Quartärs. Die Körbisdorfer Schotter stellen die älteste im Untersuchungsgebiet vorkommende Quartärschicht dar. Diese groben Schotter sind der maßgebliche Grundwasserleiter im Untersuchungsraum (Grundwasserleiter 1.5). Sie wurden am Ende der Holstein-Warmzeit und dem Beginn der Saale-Kaltzeit aufgeschottert. Die Hauptphase dieser Aufschotterung ist jedoch eindeutig der Früh-Saale-Kaltzeit zuzuordnen (RUSKE, 1961, 1965; EISSMANN, 1994). Die Körbisdorfer Schotter können durch periglazialen Kohlediapirismus größere Mächtigkeiten aufweisen, in den Randsenken der Kohlediapire wurden Schichtmächtigkeit bis zu 30 m nachgewiesen (HPC, 1992). Die Schotter können sowohl im Altwerks- als auch im Neuwerksbereich vom Kriechauer Bänderton überlagert werden, dessen Verbreitung jedoch nur lokal ausgeprägt ist.

Auf den ersten Vorstoß der Saalevereisung weist der durchgängig ausgeprägte, dunkelgraue bis braune, sandige und bis 12 m mächtige Geschiebemergel hin (Abb. 3a und 3b). Das Hangende bilden Geschiebesande, -kiese und Feinsande. Der diese Schicht überlagernde, jedoch nur lokal verbreitete Bruckdorfer Bänderton, der im Zuge der zweiten Saalevereisung gebildet wurde, erreicht im Untersuchungsgebiet Mächtigkeiten von 2,5 m (RUSKE, 1961).

Über dem Bruckdorfer Bänderton folgt die Grundmoräne des zweiten Vorstoßes der Saalevereisung.

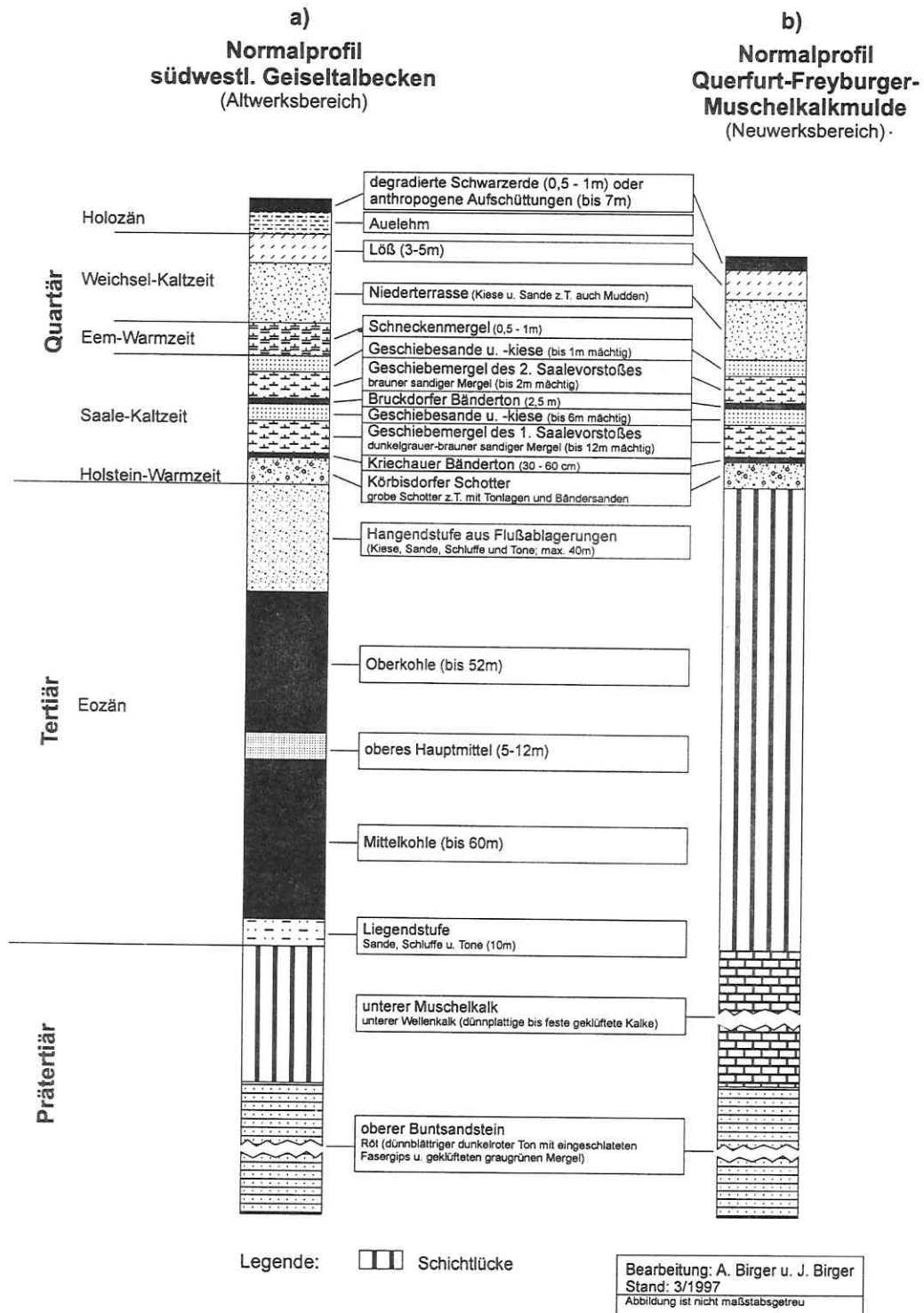


Abb. 3: Normalprofil im südwestlichen Geiseltalbecken und in der Ouerfurt-Freyburger Muschelkalkmulde

Es handelt sich dabei um braune und sandige Mergel mit nordischen Geschieben (Kristallin) und Kalk. Überlagert wird dieser Geschiebemergel von geringmächtigen Geschiebesanden und -kiesen (Abb. 3a und 3b) (RUSKE, 1961).

In der darauf folgenden Eem-Warmzeit wurde lokal der Schneckenmergel abgelagert (KRUMBIEGEL, 1962). In der Weichsel-Kaltzeit begann die Aufschotterung der Jüngeren Niederterrasse. Diese wird im unteren Teil aus grobsandigen Kiesen und im oberen Teil aus feinkörnigen Sanden mit eingeschalteten Schlufflagen gebildet (EISSMANN, 1994). Die jüngste Schicht des Pleistozäns ist der weichselkaltzeitlich angewehrte LÖB. Er kann Mächtigkeiten bis 5 m erreichen.

Im Altwerksbereich (Abb. 3a) sind holozäne Auelehme der Geiselaue in Form von Schluffen ausgeprägt.

Den natürlichen obersten Horizont bilden die degradierten Schwarzerden, die sich aus den mächtigen Lößablagerungen entwickelt haben, jedoch im gesamten Werksgelände infolge von Baumaßnahmen, Kriegseinwirkungen und anthropogenen Aufschüttungen nicht mehr anzutreffen sind. Die anthropogenen Aufschüttungen erreichen beachtliche Mächtigkeiten bis zu 7 m im Altwerksbereich (GWBR 6/91).

Die Abb. 5 zeigt die geologischen Verhältnisse im Werksbereich von Addinol entlang einer Profillinie vom Grundwasserbeobachtungsrohr GWBR 21/92 im Süden des Untersuchungsraumes (Neuwerksbereich) über das GWBR 6/91 im Altwerksbereich bis zur Tagebausohele im Bereich des Baufeldes Müheln-Süd (Bohrung 1841/59). Der Verlauf der Profillinie ist zur Orientierung im PAN-Luftbild und in der topographischen Karte dargestellt (Abb. 4).

Die Konstruktion des geologischen Schnittes war nötig, da zwar zahlreiche Untersuchungen über das Werksgelände vorlagen, aber keine Schnitte zur Verfügung standen, aus denen die geologischen Verhältnisse im Bereich der beprobten Brunnen ersichtlich waren. Insbesondere deren Einbindung in die geologische Schichtenfolge war für die Interpretation der Ergebnisse eine wichtige Voraussetzung. Entscheidender Gesichtspunkt bei der Konstruktion der Schnittlinie war ihr paralleler Verlauf zur Grundwasserfließrichtung, um eine Interpretation der Grundwasserverhältnisse zu erleichtern.

Die an den Normalprofilen (Abb. 3a und 3b) bereits erläuterten unterschiedlichen geologischen Verhältnisse zwischen Alt- und Neuwerksbereich werden im geologischen Schnitt (Abb. 5) deutlich wiedergegeben. Erkennbar ist die Lage des Untersuchungsgebietes am Südrand des tertiären Geiseltalbeckens. Während im Beckenbereich Tertiärschichten mit großen Mächtigkeiten vorhanden sind (Altwerk), liegt auf den Muschelkalkschichten der Querfurt-Freyburger Mulde geringmächtiges Pleistozän direkt auf. Insbesondere die als Grundwasserleiter fungierenden Körbisdorfer Schotter weisen in den Randsenken erhebliche Schichtdicken auf. Im dargestellten Profil (Abb. 5) werden keine der durch Molisoldiapirismus entstandenen Kohlediapire angeschnitten.

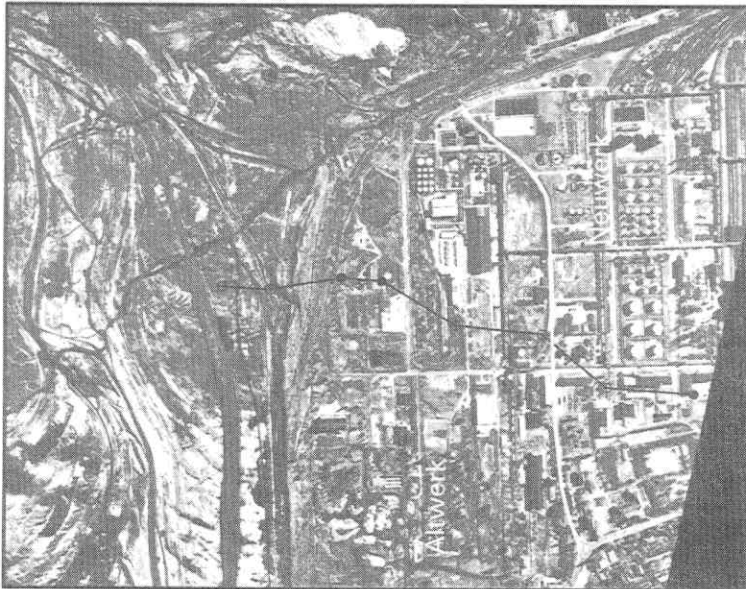
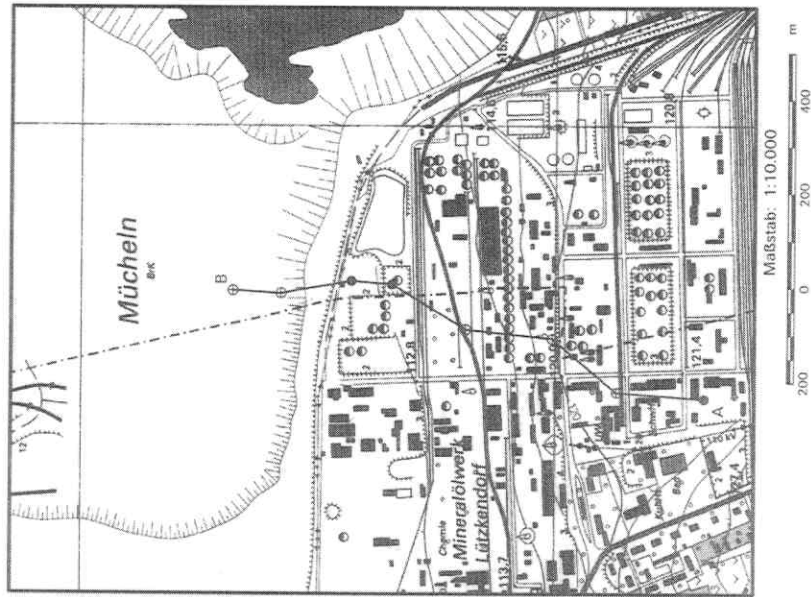
Im Altwerksbereich sind die durch Verfüllung von Bombentrichtern entstandenen anthropogenen Aufschüttungen mit Schichtdicken bis zu 7 m erkennbar.

Jenseits des GWBR 6/91 lagen für die Konstruktion des geologischen Schnittes keine gesicherten Daten in Form von Bohrprofilen vor, deshalb wurde dieser Bereich nur schematisch angedeutet. Am nördlichen Profilende sind Teile der schlecht durchlässigen Stützkippe sichtbar, welche die Tagebausohele überdeckt.

2.2.1 Grundwasserverhältnisse

Die umfangreichen Wasserhaltungsmaßnahmen infolge des Braunkohletagebaus im Geiseltal haben die natürlichen Grundwasserverhältnisse stark beeinflusst. Die Grundwasserströmungsrichtung im Untersuchungsgebiet verläuft von Süden nach Norden.

Damit strömt das Grundwasser aus dem Bereich des Neuwerkes in Richtung Altwerk und den Tagebau Müheln-Südfeld.



Legende: ● beprobte und im Profil berücksichtigte Brunnen
 ⊕ im Profil berücksichtigte Brunnen

Abb. 4: Lage der beprobten GWBR und Verlauf der Profilinie (Abb. 5) im Luftbild und in der topographischen Karte (Luftbild: 27.03.96; topographische Karte: M: 1: 10.000 (M:32-36-B-a-z) Ausgabe 1992)

Bearbeitung u. Gestaltung: A. Birger u. J. Birger

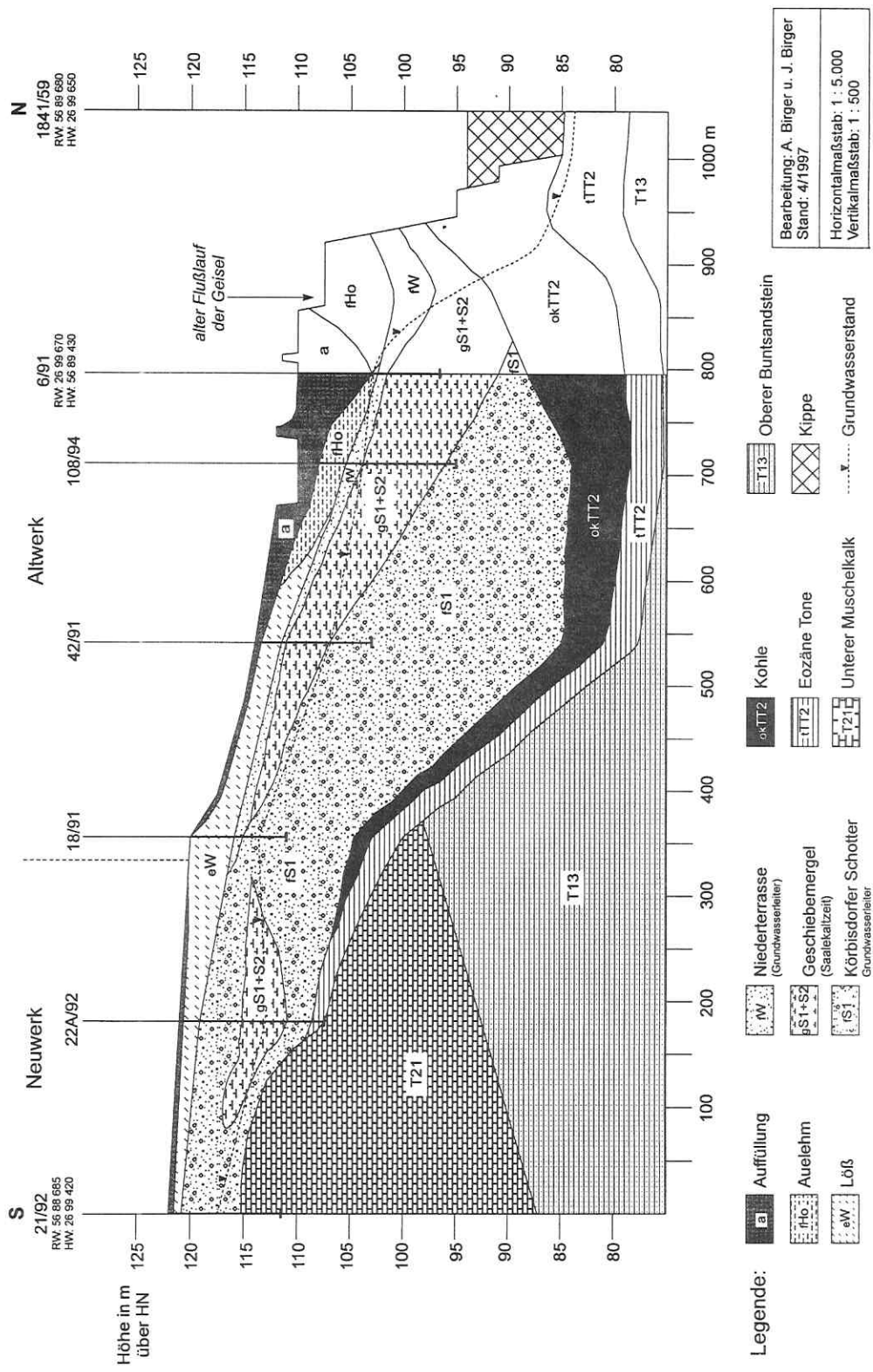


Abb. 5: Geologisches Profil durch den Alt- und Neuwerksbereich des Mineralölwerkes Lützkendorf

Die oben erwähnten Wasserhaltungsmaßnahmen in Form eines Brunnenriegels verhindern derzeit noch das Einströmen des Grundwassers und die Verfrachtung der Kontaminationen aus dem Altwerksbereich in den Tagebau.

Neben den Grundwasserleitern des Unteren Muschelkalkes sind die Körbisdorfer Schotter der wichtigste Grundwasserleiter im Untersuchungsgebiet. Die oberste grundwasserführende Schicht ist die weichselkaltzeitliche Niederterrasse. Dieser Grundwasserleiter weist den höchsten Grad der Kontamination im Untersuchungsgebiet auf. Im Altwerksbereich werden die Körbisdorfer Schotter durch Wechsellagerungen von Geschiebemergeln und Tonen (Grundwasserstauer) von den Sanden und Kiesen der kontaminierten Niederterrasse getrennt. Diese Trennung ist keinesfalls vollständig, denn es existieren hydraulische Fenster durch Schichtlücken und anthropogene Einflußnahme.

Erwähnenswert für die spätere Interpretation der Ergebnisse ist die Tatsache, daß das Grundwasser aus einem beachtlichen Einzugsgebiet von 15 km² gespeist wird, welches sich im Oberstrom des Werksgeländes auf der Muschelkalkhochfläche zwischen Freyburg und Mücheln befindet (DOMMACK, 1992) und damit bereits in einem Bereich höherer Niederschlagswerte liegt. Damit wird in einem Bereich sehr geringer jährlicher Niederschlagswerte ein höheres Grundwasserdargebot angetroffen als aus den örtlichen, klimatischen Gegebenheiten zu vermuten wäre.

2.3 Schadensanalyse

Die Zerstörungen während des 2. Weltkrieges, die Demontage der Produktionsanlagen, die Verfüllung der Bombentrichter mit Produktionsrückständen und letztlich auch die Produktion vor und nach dem Krieg führten zu einer weitreichenden Kontamination des Bodens und schließlich auch des Grundwassers mit Mineralölkohlenwasserstoffen. Nach Schätzungen der Fa. HPC umfassen die Kontaminationen des Bodens 615 000 m³. Im Bereich des Altwerkes sind umfangreiche Beeinträchtigungen des Grundwassers nachgewiesen worden. Dies ergab sich aus orientierenden Untersuchungen der Fa. HPC, die ab 1991 eine Gefährdungsabschätzung im Untersuchungsgebiet vornahm. Die Analysen der Grundwasserproben durch die Sektionen Hydrogeologie und Analytik des UFZ-Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit bestätigten diese umfangreichen Kontaminationen.

2.3.1 Kriterien für die Auswahl der Brunnen

Zu Beginn der Untersuchungen stand der Ergebnisbericht über die „Orientierenden Untersuchungen auf Verunreinigungen im Untergrund des Mineralölwerkes Lützkendorf“ der Fa. HPC zur Verfügung. Darin waren die Analyseergebnisse verschiedener Boden- und Grundwasserproben aus unterschiedlichen Bereichen des Werksgeländes zusammengefaßt. Dieser Bericht bildete die Grundlage für die Auswahl der Brunnen (GWBR).

Als Referenzbrunnen wurde der grundwasserstromaufwärts vom Kontaminationsbereich gelegene Brunnen GWBR 21/92 ausgewählt (Abb. 4 und Abb. 5). Dieser Brunnen befindet sich unweit des Sportplatzes in einem Areal, das zu keiner Zeit zum Bereich der Produktionsanlagen gehörte. Die Analyseergebnisse der Fa. HPC wiesen für Grundwasser und Boden keine organische Belastung auf.

Im Bereich des Nordrandes unweit des Tagebaus Mücheln-Südfeld wurde eine umfangreiche Kontamination des Bodens und Grundwassers mit Mineralölkohlenwasserstoffen nachgewiesen. Auf dem Areal der ehemaligen Schmierölfabrik und in unmittelbarer Nähe des im Krieg zerstörten Tanklagers wurde der zweite Brunnen GWBR 6/91 ausgewählt (Abb. 4 und Abb. 5). Zum Zeitpunkt der Bohrung des Brunnens 1991 wurde auf dem Grundwasser eine aufschwimmende organische Phase mit einer Schichtdicke von 17 cm festgestellt. Die Analysen der Fa. HPC zeigten für das Grundwasser extreme Grenzwertüberschreitungen besonders für IR-Kohlenwasserstoffe, Phenole und polycyclischen aromatischen Kohlenwas-

serstoffe. Ab dem Jahr 1995 wurde noch ein weiterer Brunnen GWBR 108/94 im belasteten Grundwasserbereich beprobt, der sich grundwasserstromaufwärts vom GWBR 6/91, jedoch noch im Bereich der weiträumigen Grundwasserkontamination befindet (Abb. 4). Der Brunnenausbau erfolgte bis in den Hauptgrundwasserleiter, die Körbisdorfer Schotter (Abb. 5).

2.3.2 Chemische und physikalische Parameter

Wie bereits erwähnt, können verschiedene Ursachen für die weiträumige Kontamination des Untergrundes des Werksgebietes angeführt werden. Während die Kontaminationen im Altwerksbereich hauptsächlich auf die Kriegseinwirkungen und die Verfüllung der Bombenrichter mit Produktionsrückständen zurückzuführen sind, wurde der Verlauf einer Fahne polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe aus dem Neuwerksbereich in nordöstlicher Richtung nachgewiesen (HPC, 1992), die vermutlich aus Leckagen neuerer Produktionsanlagen herrühren.

Die Proben des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches wurden umfangreichen Analysen der organischen und anorganischen Bestandteile unterzogen. Die Analysen wurden von Mitarbeitern der Sektionen Hydrogeologie und Analytik des UFZ-Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH durchgeführt.

2.3.2.1 Analysen organischer Bestandteile

Die Bestimmung der Konzentration polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe ergab eine extrem grenzwertüberschreitende Belastung der GWBR 6/91 und GWBR 108/94, bei denen eine aufschwimmende organische Phase nachweisbar war. Die Abb. 6 demonstriert die PAK-Summenkonzentrationen (PAK 1-16) in verschiedenen Proben zum Zeitpunkt der Beprobung.

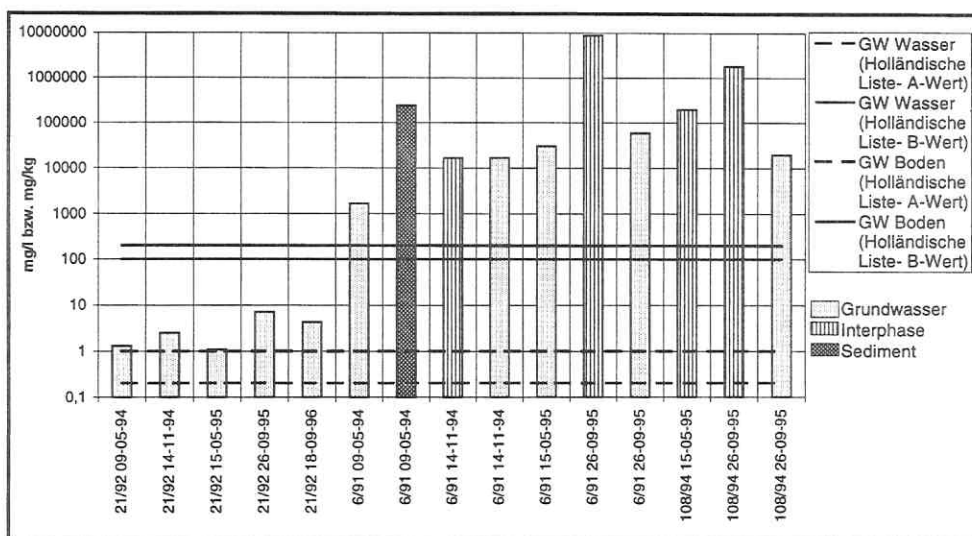


Abb. 6: Konzentrationen polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt der Probenahmen (GW-Grenzwert)

Die ermittelten PAK-Konzentrationen in den belasteten Grundwasserbereichen gehen weit über die Löslichkeit der PAK in Wasser hinaus (BIRGER et al., 1996). Dies kann jedoch nicht

so interpretiert werden, daß es sich um eine echte Lösung der polycyclischen Aromaten in Wasser handelt (DERMIETZEL, persönliche Mitteilung). Es ist davon auszugehen, daß - eventuell auch unter dem Einfluß von Mikroorganismen - die Wasserphase feine Tröpfchen organischer Phase enthielt, die diese Werte erklären.

Die Eignung der GWBR 21/92 als Referenzbrunnen konnte durch die Analysen bestätigt werden. Die B-Werte der Holländischen Liste wurden nicht erreicht.

Die IR-spektroskopisch ermittelten Kohlenwasserstoffgehalte der untersuchten Proben sind in der Abb. 7 gegenübergestellt. Die Abb. 7 zeigt im Bereich der GWBR 6/91 und GWBR 108/94 eine signifikante Überschreitungen des B-Wertes der Holländischen Liste. Hierbei muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den IR-spektroskopisch ermittelten Kohlenwasserstoffgehalten um einen Summenparameter handelt, der nicht für Proben entwickelt wurde, in denen der Anteil aromatischer Kohlenwasserstoffe überwiegt, so wie es im belasteten Grundwasser der Fall ist (DERMIETZEL, persönliche Mitteilung). Die im unbelasteten Grundwasserbereich IR- spektroskopisch ermittelten Kohlenwasserstoffgehalte können durch die natürlicherweise im Grundwasser vorkommenden oder aus der Bodenzone eingebrachten Kohlenwasserstoffe in Form von Huminstoffen und biogenem Material erklärt werden, da die Methode nicht zwischen diesen und anthropogenen Kontaminanten unterscheidet (HOPFSTOCK, 1994).

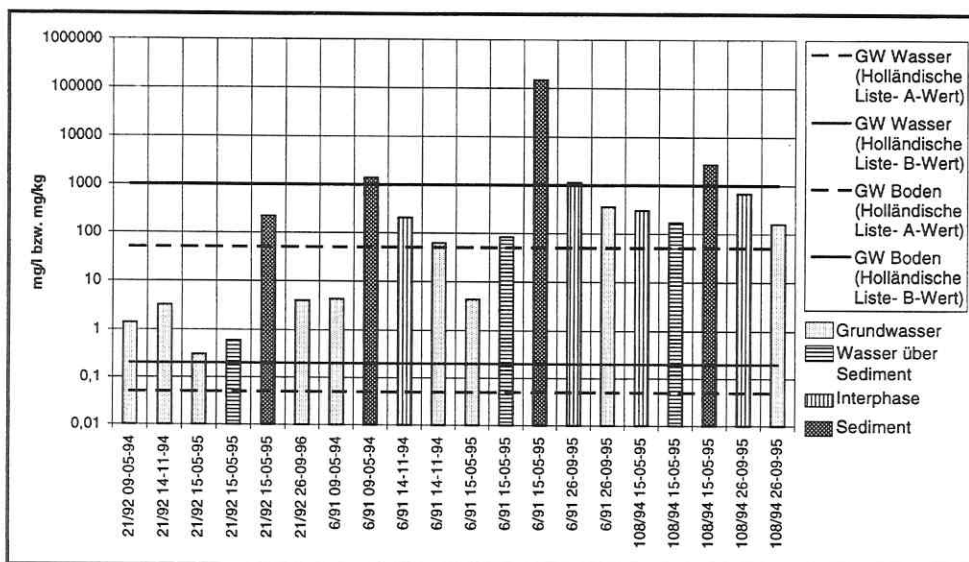


Abb. 7: IR-spektroskopisch ermittelte Kohlenwasserstoffgehalte verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt der Probenahmen (GW-Grenzwert)

Erste Anhaltspunkte für mikrobielle Aktivitäten ergeben sich aus den DOC-Werten der Grundwasser- und Interphasenproben. Der Gehalt des gelösten organischen Kohlenstoffs geht mit 150 mg/l weit über die Löslichkeit eines gealterten Mineralöls in Wasser von ca. 5-35 mg/l (HOPFSTOCK, 1994) hinaus. Infolge der von Mikroorganismen ausgeführten Reaktionen kann die Wasserlöslichkeit einzelner Bestandteile des Mineralölgemisches gesteigert werden. Eine Anhäufung dieser löslichen Metabolite kann somit die Erhöhung des DOC-Gehaltes bewirken.

Die Analyse der Ölphase aus dem belasteten Grundwasserbereich GWBR 6/91 mittels GC-MS ergab als Hauptkomponenten Mehrkernaromaten, ihre hydrierten Analoga sowie

methylsubstituierte PAK. Ebenso wurden Alkylbenzene, Alkane und Alkene nachgewiesen, deren Gehalt jedoch wesentlich geringer war als der polycyclischer Aromaten (MÖDER, persönliche Mitteilung). Der geringe Summenwert der Normalparaffine von 2,9 % (RIIS, persönliche Mitteilung) deutet darauf hin, daß es sich bei der Kontamination im Untergrund des Mineralölwerkes um eine echte Altlast handelt.

Im Bereich des GWBR 6/91 wurden Phenolgehalte von 172 µg/l nachgewiesen (HPC, 1992).

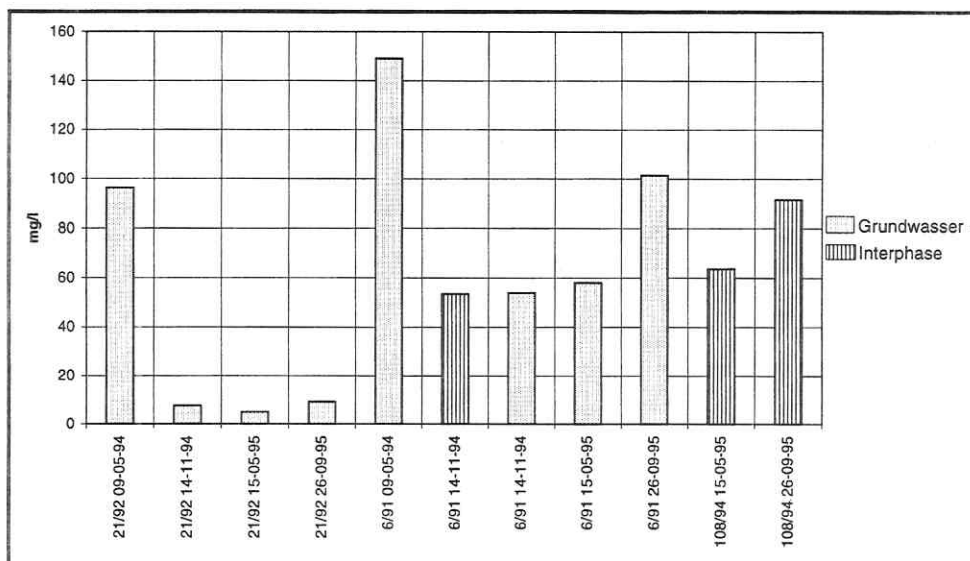


Abb. 8: Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt der Probenahmen

2.3.2.2 Analysen anorganischer Bestandteile

Die Analyse der Proben aus dem belasteten und unbelasteten Grundwasserbereich auf den Gehalt von Schwermetallen ergab Werte, die unterhalb des in der Holländischen Liste angegebenen A-Wertes lagen. Die Analyse der Hauptanionen ergab für den Bereich des unbelasteten Grundwassers folgende Ergebnisse: Ammoniumgehalt zwischen 0,01 und 0,1 mg/l; Nitratgehalt zwischen 8,6 und 18,1 mg/l; Sulfatgehalt zwischen 274 und 437 mg/l. Die im Bereich des belasteten Grundwassers GWBR 6/91 ermittelten Gehalte lagen für Nitrat und Sulfat wesentlich geringer als im unbelasteten Grundwasser: Ammoniumgehalt zwischen 0,14 und 1,75 mg/l, Nitratgehalt zwischen < 0,1 und < 0,5 mg/l, Sulfatgehalt zwischen 54 und 83 mg/l. Ein deutlicher Anstieg des Sulfatgehaltes auf 207 mg/l wurde im Frühjahr 1995 nachgewiesen.

2.3.2.3 Isotopenhydrologische Untersuchungen

Die wäßrigen Proben aus dem belasteten und unbelasteten Grundwasserbereich wurden isotopenhydrologisch mittels Massenspektrometrie (^{18}O und ^2H) untersucht, um Aussagen über die Herkunft und Genese des Grundwassers machen zu können. Für Grundwasser aus dem Bereich des Untersuchungsraumes ist langfristig eine Abweichung der $\delta^2\text{H}$ -Werte von -62 ‰ bis -63 ‰ vom Standard anzunehmen (KOWSKI, persönliche Mitteilung). Die positiven Analyseergebnisse von -58,8 ‰ bis -59,7 ‰ (GWBR 21/92) bzw. -60,5 ‰ (GWBR

6/91) weisen darauf hin, daß die Niederschläge des Jahres 1993 bzw. 1994 zur Bildung des 1994 und 1995 beprobten oberflächennahen Grundwassers beigetragen haben.

2.3.2.4 Physikalische Parameter

Die Grundwasserproben beider Bereiche wiesen jeweils pH-Werte um 7,0 auf. Die Temperaturen betragen im Grundwasserbereich unabhängig vom Zeitpunkt der Probenahme zwischen 11 und 14°C. Die Leitfähigkeit variierte in Abhängigkeit vom Zeitpunkt zwischen 1500 und 1800 μS (GWBR 21/92) bzw. 1900 μS (GWBR 6/91). Messungen des Sauerstoffgehaltes und des Redoxpotentials waren im GWBR 6/91 nicht vertretbar, im GWBR 21/92 wurden in Abhängigkeit von der Tiefe Werte zwischen 5,3 und 1,9 mg/l bzw. 370 mV ermittelt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Probenahme

Im Untersuchungsgebiet wurden 7 Probenahmen durchgeführt. Die Tab. A1 im Anhang der Arbeit gibt Auskunft über die Probenahmezeitpunkte, die beprobten Brunnen und Kompartimente sowie die Bestimmung der chemischen und mikrobiologischen Parameter.

3.1.1 Sediment im Schlammfang

Dieses z.T. nur wenige Zentimeter mächtige Kompartiment bildet sich durch die mit dem Grundwasser transportierten Schwebestoffe, die durch die Schlitze des Filterrohres in den Brunnen gelangen und dort sedimentieren, neu. Die Probenahme der Sedimente im Schlammfang der Grundwasserbeobachtungsrohre wurde mit einem mit 70%igem Ethanol desinfizierten V2A-Stechrohr durchgeführt, das sich beim Absenken in das Brunnenrohr in den Schlamm grub und dabei die Probe aufnahm.

3.1.2 Wasserproben

Die Wasserproben aus dem unbelasteten Bereich des Grundwassers wurden mit einem V2A-Stechrohr entnommen. Aus dem belasteten Grundwasserbereich wurden sie mit Hilfe des Phasenschöpfers genommen.

3.1.3 Probenahme mit Phasenschöpfer-Ölphase

Die Ölphase des belasteten Grundwassers wurde mit Hilfe eines Phasenschöpfers beprobt. Ein aus Plastik bestehender Zylinder konnte dabei auf die gewünschte Tiefe abgesenkt und in dieser verschlossen werden. Diese Vorrichtung ermöglichte eine phasengetrennte Beprobung der Ölphase, einer ca. 20 cm darunter liegenden Interphase und der Wasserphase. Das durchsichtige Material des Zylinders gestattete die Entnahme der gewünschten Phase mit Hilfe eines Abbläventils.

3.2 Probentransport und Probenaufbereitung

3.2.1 Sedimente

Die Sedimente wurden bei der Probenahme in sterile Glasflaschen abgefüllt, fest verschlossen und kühl gelagert. Sie wurden bis zur Bearbeitung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Sedimente aus dem Schlammfang des Brunnenrohres mußten zunächst aufgearbeitet werden. Zur weitestgehenden Ablösung der Bakterien von den Bodenpartikeln wurden 10 g Sediment mit 7.5 g sterilen Glasperlen versetzt, zu dem Ansatz wurden 100 ml sterile Natriumpyrophosphatlösung gegeben und für 1 h bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der pH-Wert wurde mit 1M Natriumdihydrogenphosphat-Lösung auf 7,0 reguliert. Der Überstand wurde dekadisch verdünnt und weiterverarbeitet. Als Bezugspunkt für Berechnungen mikrobiologischer Parameter von Sediment- und Bodenproben mußte zudem das Trockengewicht bestimmt werden. Dazu wurde die entsprechende Menge Sediment (10 g) für 24 h bei 105°C getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator wurde erneut das Gewicht der Probe bestimmt und die Differenz ermittelt.

3.2.2 Wasserproben

Die Wasserproben wurden vor Ort in sterile braune Glasflaschen abgefüllt, fest verschlossen und kühl gelagert. Sie wurden im Anschluß an die Probenahme aufgearbeitet. Von den wäßrigen Proben wurde eine Verdünnungsreihe in sterilem Leitungswasser hergestellt und für die Bestimmung der mikrobiologischen Parameter bereitgestellt.

3.2.3 Ölproben

Die Proben wurden vor Ort in sterile braune Glasflaschen abgefüllt und fest verschlossen. Die kühl gelagerten Proben wurden im Anschluß an die Probenahme aufgearbeitet. Die Ölproben bzw. ölhaltigen Proben wurden dekadisch verdünnt. Eine weitgehende Gleichverteilung der sich bildenden Öltröpfchen wurde durch ein mehrfaches Ansaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit mit einer großvolumigen Pipette (5 ml) und dem sofortigen Auftragen der Probe erreicht.

3.3 Mikrobiologische Charakterisierung

3.3.1 Bestimmung der Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Die Bestimmung der KBE-Werte wurde für alle untersuchten Proben vorgenommen. Jeweils 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe wurden auf eine Agarplatte pipettiert und auf der Oberfläche verteilt. Alle Verdünnungsstufen wurden mit drei Parallelen angelegt. Die Petrischalen wurden umgekehrt inkubiert und nach den im folgenden beschriebenen Zeiträumen ausgewertet. Die Werte wurden als KBE/ ml bzw. KBE/ g Trockengewicht berechnet.

3.3.1.1 Medien, Inkubationsbedingungen und Auswerteziträume

Die genaue Zusammensetzung der Medien ist im Anhang A 2 und A 3 gesondert aufgeführt (Abkürzungen: SM (SÖ)-Standardmedium mit 1% Spindelöl, SM (MÖ)-Standardmedium mit 1% Mineralöl).

Tab. 2: Vergleich der Inkubationsbedingungen und Auswertungsintervalle für die verwendeten Medien

	R2A-Agar (Merck)	SM (SÖ)	SM (MÖ)
Milieu	aerob	aerob	aerob
Inkubationstemperatur	14°C	14°C	14°C
Auswertungsintervalle	3 Tage	10 Tage	10 Tage
Endwertbestimmung der KBE	20. Tag	70. Tag	70. Tag

3.3.2 Isolation und Stammhaltung von Bakterien

Die Proben wurden hinsichtlich ihrer bakteriellen Zusammensetzung und ihres biochemischen Abbaupotentials charakterisiert. Dafür wurden von den Agarplatten zur KBE-Bestimmung nach Ablauf des Inkubationszeitraumes 50-70 Kolonien je Probe und Inkubationsmedium entnommen. Zur Vermeidung einer subjektiven Auswahl wurde eine solche Platte ausgewählt, auf der die gewünschte Anzahl vorhanden war, so daß alle Kolonien abgeimpft werden konnten. Die Kolonien wurden über mehrere Stufen durch wiederholtes Ausstreichen auf R2A-Agar gereinigt und unter dem Mikroskop beurteilt. Die erhaltenen Reinkulturen wurden auf Schrägagar (R2A) bei 4°C gelagert und nach jeweils 3 Monaten erneut umgesetzt.

3.3.3 Mikrobiologische Charakterisierung der Gesamtproben

3.3.3.1 Bestimmung der MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen

Das Vorkommen verschiedener Phisiotypen unterschiedlicher Stoffkreisläufe wurde mit Hilfe der MPN-Methodik bestimmt. Die Zusammensetzung der Medien ist der Tab. A 5 im Anhang zu entnehmen.

Die Parallelansätze verschiedener Verdünnungsstufen wurden in Mehrfachkulturschalen (Tecnomara) durchgeführt. Für die aeroben Ansätze wurden 2 ml Medium mit 200 µl Probe, bei den anaeroben Ansätzen 1,25 ml Medium mit 150 µl Probe beimpft und mit sterilem Paraffin überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 14°C. Die Auswertung wurde nach 50 bzw. 100 Tagen vorgenommen. Dazu wurden jeweils 100µl der wäßrigen Probe mit der gleichen Menge des entsprechenden Nachweisreagenz versetzt.

Die nachfolgende Tab. 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Nachweisreagenzien (Zusammensetzung im Anhang A 6), die dabei beobachteten Reaktionen sowie die Wertung dieser Reaktionen.

Tab. 3: Reaktionen zum Nachweis ökophysiologischer Gruppen

Ökophysiologische Gruppe (Autor)	Milieu	Nachweisreagenz	Reaktion	Ionen-Nachweis/ (Ergebnis)
Denitrifizierer (ALEF, 1991)	anaerob	GRIESS-ILOSVAY-REAGENZ	Rosafärbung	Nitrit-Ionen (negativ)
Ammoniumoxidierer (GODE et al., 1972)	aerob	1) GRIESS-ILOSVAY-REAGENZ 2) NEBLERS-Reagenz	1) Rosafärbung 2) Braunfärbung	1) Nitrit-Ionen (positiv) 2) Ammonium-Ionen (negativ)
Nitritoxidierer (GODE et al., 1972)	aerob	GRIESS-ILOSVAY-REAGENZ	Rosafärbung	Nitrit-Ionen (negativ)
Manganreduzierer (KRUMBEIN et al., 1973)	aerob	Benzidin-HCl-Reagenz	Blaufärbung	Mn(IV)-Ionen (negativ)
Manganoxidierer (KRUMBEIN et al., 1973)	aerob	Benzidin-HCl-Reagenz	Blaufärbung	Mn(IV)-Ionen (positiv)
Eisenreduzierer (OTTOW et al., 1970, modifiziert von PREUSS, 1991)	anaerob	Pyridin-Reagenz	Rotfärbung	Fe(II)-Ionen (positiv)
Eisenoxidierer (GHORSE et al., 1982, modifiziert von PREUSS, 1991)	aerob	Pyridin-Reagenz	1) Rotfärbung 2) rostroter Niederschlag	1) Fe(II)-Ionen (negativ) 2) Fe(III)-Ionen (positiv)
Desulfurikanten (POSTGATE 1963, modifiziert von PREUSS, 1991)	anaerob		schwarzblauer Niederschlag	S ²⁻ -Ionen (positiv)
Sulfurikanten (FJERDINGSTAD, 1969)	aerob		gelblich-weißer Niederschlag, gelbliche Beläge	S ^{+/-0} (positiv)

3.4 Taxonomische Charakterisierung von Einzelisolaten

3.4.1 Mikroskopische und makroskopische Beschreibung der Bakterienisolate

Von einer Einzelkolonie der als Reinkultur vorliegenden Isolate wurde auf einem gereinigten Objektträger in einem Tropfen sterilen Leitungswassers eine Suspension hergestellt und unter dem Routinemikroskop „Axioskop“ (Carl Zeiss Jena) mittels Phasenkontrast bei einer

Vergößerung von 1:1000 betrachtet. Dabei wurde an der Uniformität der Zellen die Reinheit der Kultur überprüft sowie Form und Mobilität der Einzelzellen bzw. Formen der Zellgruppen beschrieben und dokumentiert. Unter dem Stereomikroskop Stemi 2000 C (Carl Zeiss Jena) wurde die Reinheit der ausgestrichenen Kultur beurteilt. Außerdem wurden Farbe und Form der Kolonien sowie deren Wuchsformen beschrieben und dokumentiert.

3.4.2 Bestimmung der Gram-, Oxidase- und Katalase-Reaktion

Von einer Reinkultur wurde in *aqua bidest.* eine Suspension hergestellt. Die Bestimmung des Gramverhaltens wurde mit Hilfe des Aminopeptidasetests nach Vorschrift des Herstellers (Merck) ausgeführt. Bei starker Eigenfärbung der Kolonien wurde die klassische Gramfärbungsmethode angewandt (SÜßMUTH, 1987). Die entsprechenden Lösungen wurden von Merck Diagnostika bezogen. In Abwandlung der angegebenen Methode wurde der Objektträger zur Entfärbung in Ethanol geschwenkt bis sich keine Farbe mehr löste.

Die Oxidase-Reaktion der Isolate wurde unter Verwendung der von Merck angebotenen Teststreifen Bactident® Oxidase nach der abgegebenen Vorschrift bestimmt.

Die Fähigkeit der Bakterienisolate zur Bildung von Katalase wurde durch Auftropfen einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung auf eine gut gewachsene Kolonie nachgewiesen. Verfüggen die Mikroorganismen über das Enzym, so ist ein Schäumen an der Oberfläche der Kolonie zu beobachten, was auf die Bildung von Sauerstoff zurückzuführen ist.

3.4.3 Identifizierung der Isolate mit Hilfe des kommerziellen Systems BIOLOG®

Das BIOLOG-System ist ein standardisiertes und für die Identifizierung medizinisch relevanter Mikroorganismen entwickeltes System, dessen Datenbasis nach Angaben des Herstellers durch die Substratverwertungsmuster ökologisch bedeutender Mikroorganismen ergänzt wurde. Nach Angaben des Herstellers wurden die Reinkulturen über Nacht auf den entsprechenden Medien vorkultiviert. Von dem Zellmaterial wurde am darauffolgenden Tag eine Suspension in 0,85%iger Natriumchloridlösung hergestellt, deren Extinktion bei 590 nm auf folgende Wertebereiche eingestellt wurde:

grampositive Bakterien: 0,212- 0,259 gramnegative Bakterien: 0,146- 0,162.

Mit einer Mehrkanalpipette wurden 150 µl der Suspension in die Vertiefungen der dem Gram Verhalten des Isolates entsprechenden BIOLOG®-Mikrotiterplatte eingetragen. Die Platten wurden nach Vorschrift des Herstellers bei 30°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte bei grampositiven Bakterien erstmalig nach 4 Stunden und dann wie bei den gramnegativen Mikroorganismen nach der Inkubation über Nacht sowie nach 48 Stunden. Dabei wurde jeweils die Extinktion der Suspensionen bei 590 nm mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Microplate EL 340 (BIO-Trek™ Instruments) erfaßt. Die Daten wurden konvertiert und die Substratverwertungsmuster mit denen der BIOLOG®-Datenbank verglichen. Das System gibt die Identität des Mikroorganismus als Ergebnis an, mit dem der höchste Ähnlichkeitsindex ermittelt wurde. Liegt keine ausreichende Übereinstimmung mit einem in der Datenbank erfaßten Substratverwertungsmuster vor (Ähnlichkeitsindex nach 4 Stunden < 0,75 bzw. nach 24 Stunden < 0,5), so wird dies vom System als „No Identification“ angegeben.

3.4.4 Identifizierung der Isolate mit Hilfe des kommerziellen Systems APILAB®

Die Identifizierung der Isolate im BIOLOG®-System wurde durch die Reaktionen des APILAB®-Systems ergänzt. Das standardisierte System wurde für medizinische Zwecke entwickelt und erfaßt biochemische Reaktionen. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ergibt ein numerisches Profil, das durch Vergleich mit der internen Datenbank ausgewertet wird. Bei entsprechender Übereinstimmung wird ein Identifizierungsergebnis angegeben. Liegt keine ausreichende Übereinstimmung vor, so wird dies vom System unter Angabe der

abweichenden Ergebnisse angegeben. Von den zu testenden Isolaten wurden nach Überprüfung ihres Oxidase Verhaltens eine Suspension in 0,85%iger Kochsalzlösung hergestellt. Zumeist konnten die Suspensionen, die für das BIOLOG®-System verwendet wurden, auch für das APILAB®-System genutzt werden. Das Beimpfen der Teststreifen erfolgte in der vom Hersteller empfohlenen Weise.

3.5 Ermittlung des biochemischen Abbaupotentials für aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe

Die Umweltisolate wurden über Nacht bei 30°C auf R2A-Agar unter Zusatz der entsprechenden Induktoren mit der folgenden Endkonzentration kultiviert (KIESEL, persönliche Mitteilung).

Na-Benzoesäure	10 mM	Phenol	2,5 mM
m-Toluat	5 mM	Naphthalen	20 mM

Für die Suspendierung des Zellmaterials der induzierten Bakterien wurde LB-Medium (LURIA-BERTONI) verwendet (Zusammensetzung im Anhang A 4). Die Suspension (50 µl) wurde in Mikrotiterplattenmulden gegeben und dem Ansatz 150 µl Testlösung zugesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden mit einem Deckel verschlossen und im Dunkeln inkubiert.

3.5.1.1 Catechol-1,2-Dioxygenase Enzymtest (modifiziert nach NEIDLE et al., 1986)

Testlösung: 10mM Catechol; 0,004% Phenolrot; 1mM EDTA, einige Tropfen Toluol
Einstellung des pH-Wertes mit 0,5 M EDTA-Stammlösung (pH-Wert 8,0)

Mit diesem Test wurde der *ortho*-Weg der Brenzcatechinumsetzung nachgewiesen.

Die Auswertung erfolgte nach 2 Stunden. Dabei wurde die Reaktion der Catechol-1,2-Dioxygenase durch eine Farbänderung der Phenolrottestlösung von rot nach gelb nachgewiesen, da die Bildung der *cis,cis*-Muconsäure eine Ansäuerung der Suspension bewirkt. Die Beurteilung der Farbänderung wurde durch den Vergleich mit Positiv- und Negativkontrollen ermöglicht.

3.5.1.2 Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitätstest (modifiziert nach MORGAN et al., 1989)

Testlösung: 1% Catechol in 50mM Tris-Acetatpuffer, pH 7.5

Mit diesem Test wurde der *meta*-Weg der Brenzcatechinumsetzung nachgewiesen.

Die Auswertung erfolgte unmittelbar nach der Zugabe der Testlösung. Durch die Bildung des 2-Hydroxy-muconatsemialdehyds erfolgte eine grünlich-gelbliche Färbung der Suspension. Der Vergleich mit Negativ- und Positivkontrollen ermöglichte die Bewertung der Farb-reaktion.

3.5.2 Modifizierter BIOLOG®-MT-Test zur Bestimmung des biochemischen Abbaupotentials für ausgewählte aliphatische Verbindungen

Für die Bestimmung des Abbaupotential von Umweltisolaten für ausgewählte aliphatische Verbindungen wurde ein qualitativer, modifizierter BIOLOG®-MT-Plattentest entwickelt (BIRGER et al., 1996). Dieser Test nutzt BIOLOG®-Mikrotiterplatten, in denen zwar der Redoxfarbstoff, nicht jedoch die Kohlenstoffquelle vorgegeben ist. In Anlehnung an das BIOLOG®-System wurde die Nutzung der Kohlenstoffquelle durch Reduktion des Tetrazoliumsalzes unter Bildung von Formazan anhand einer Violett-färbung sichtbar und konnte bei 590 nm im Mikrotiterplattenleser gemessen werden.

Die Umweltisolate wurden zunächst für mindestens 24 Stunden auf R2A-Agar bei 30°C inkubiert bis ausreichend Zellmaterial vorhanden war. Das Zellmaterial wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß, das mit 700 µl steriler 0,85%iger Kochsalzlösung gefüllt war, aufgenommen. Die Suspension wurde bei 10000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet

wurde in 700 µl steriler 0,85%iger Kochsalzlösung resuspendiert. Von den Suspensionen wurden 20 µl in die Mulden von BIOLOG®-MT-Platten eingetragen, in denen bereits 100 µl steriler 0,85%iger Kochsalzlösung vorgelegt waren. Auf jeder Mikrotiterplatte wurden randständig und zentral mehrere Negativkontrollen mitgeführt. Nach Beimpfen mit den Suspensionen wurde der Extinktionswert bei 590 nm im Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Dieser Wert wurde als Nullwert geführt. Die flüchtigen, aliphatischen Kohlenwasserstoffe wurden über die Gasphase dosiert. Dazu erfolgte ein gleichmäßiges Auftropfen von 200 µl des getesteten Alkans auf ein steriles Filterpapier, das in der Größe der Mikrotiterplatte zugeschnitten worden war. Das Filterpapier wurde zwischen Mikrotiterplatte und Deckel plaziert. Die Mikrotiterplatte wurde im Anschluß mit Parafilm verschlossen und in einem Plastikbeutel untergebracht. Die Inkubation erfolgte bei Zimmertemperatur im Dunkeln. Die erste optische Bewertung wurde nach 24 Stunden vorgenommen. Die Messung der Extinktion der Suspensionen bei 590 nm erfolgte nach 48 Stunden und 7 Tagen. Durch den Vergleich der Nullwerte, der Negativkontrollen und der gemessenen Werte nach unterschiedlicher Inkubationsdauer wurden die Isolate mit einem Abbaupotential für die getesteten Alkane ermittelt. Als positiv wurden jene Isolate gewertet, die eine Zunahme des Extinktionswertes um mindestens 75% im Vergleich zum Nullwert aufwiesen. (Dieser Wert wird auch beim BIOLOG®-Identifizierungssystem als Richtwert für eine Substratverwertung angenommen.)

3.5.3 **MPN-Bestimmung degradativer Mikroorganismen für ausgewählte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe in Gesamtproben**

In Abwandlung des modifizierten BIOLOG®-Mikrotiterplatten-Tests wurde von einigen Gesamtproben die MPN degradativer Mikroorganismen für ausgewählte Aromaten und Aliphaten bestimmt. Dazu wurden BIOLOG®-MT-Platten mit dekadisch verdünnten Gesamtproben beimpft. Jede Verdünnungsstufe wurde mit 16 Parallelen aufgetragen. Als Kohlenstoffquelle wurden ausgewählte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe über die Gasphase dosiert. Dazu wurden jeweils 200 µl des flüchtigen Kohlenwasserstoffs gleichmäßig auf ein Filterpapier aufgetropft und zwischen Deckel und Mikrotiterplatte plaziert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und in einem Plastikbeutel untergebracht. Die Inkubation der Platten erfolgte im Dunkeln bei Zimmertemperatur. Die Auswertung wurde visuell nach 24 h, 48 h und nach 7 Tagen vorgenommen. Dabei wurde eine violette Färbung der Flüssigkeit bzw. des Sedimentes als positive Reaktion gewertet. Der Vergleich mit den auf jeder Platte mitgeführten Negativkontrollen erleichterte die Beurteilung. Die Bestimmung der MPN erfolgte mit Hilfe der Tabelle nach RODINA (1972). Die 16 Parallelansätze wurden zu 4 MPN-Werten zusammengefaßt und daraus der Durchschnittswert als MPN degradativer Mikroorganismen/ ml ermittelt.

3.6 **Molekularbiologische Methoden**

3.6.1 **PCR-Amplifikation, Transfer und Detektion von DNA-Sequenzen für ausgewählte Abbauleistungen in Umweltisolaten**

3.6.1.1 **Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten durch PCR**

Die DNA-Sequenzen für ausgewählte Abbauleistungen wurden mittels PCR-Technik amplifiziert. Dabei wurde der Thermocycler Mastercycler 5330 (Eppendorf) mit beheizbarem Deckel Eppendorf 5330 plus verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden sowohl mit DNA-Lösungen (Plasmidpräparationen) als auch mit Zell-Lysaten durchgeführt. Dazu wurde von einer Einzelkolonie eine Suspension in sterilem *aqua bidest.* hergestellt, für 10 min bei 100°C gekocht, sofort auf Eis abgekühlt und 10 min bei 4°C mit 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte direkt für die Amplifikation eingesetzt werden. Für die Ansätze wurde der PCR-Kit Primezyme (Biometra) nach den Vorschriften des Herstellers verwendet. Die PCR-Ansätze enthielten 1µl Zell-Lysat.

Die genspezifischen Besonderheiten der PCR-Amplifikationen sind der Tab. A 7 im Anhang zu entnehmen.

Die Detektion der PCR-Amplifikationsprodukte erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung eines Äquivalentes des PCR-Ansatzes. Dazu wurden jeweils 10 µl der Ansätze mit 1 µl Probenpuffer gemischt und in die Probenaschen eines 0,8%igen oder 1,5%igen Agarosegels eingetragen. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte bei 50 V für ca. 30 min. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 10 min im Ethidiumbromidbad (5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht bilddokumentarisch erfaßt (System E.A.S.Y. plus Rev. 4.07). Die Abschätzung der Größe des PCR-Amplifikates erfolgte durch den Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenden Molekulargewichtsmarker (z. B. Raoul™-Marker, Appligene).

3.6.1.2 Southern-Transfer amplifizierter DNA-Fragmente

Die DNA-Moleküle wurden durch Inkubation des Agarosegels für zweimal 15 min in frisch angesetzter 1,5 M NaCl-, 0,5 M NaOH-Lösung denaturiert. Die anschließende Neutralisierung erfolgte für 30 min und 15 min in 1 M Tris HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4. Die DNA-Moleküle wurden durch Vakuum-Blotting (PERFEROEN et al., 1982) auf positiv geladene Nylon-Membran (Boehringer Mannheim) übertragen. Der Southern-Transfer wurde bei 50 mbar für ca. 45 min mit Hilfe des Vakuumblotter (Appligene) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Membran wurde im feuchten Zustand 1 min unter einem UV-Transilluminator (GATC GmbH Konstanz) gebacken und damit die DNA-Moleküle fixiert.

3.6.1.3 Nachweis der Amplifikationsprodukte durch Hybridisierung mit Digoxigeninmarkierten Oligonukleotidsonden und immunologische Detektion

Der Nachweis der PCR-Amplifikation erfolgte durch die Hybridisierung der Fragmente mit DIG-endmarkierten zentralen Oligonukleotidsonden. Die genspezifischen Charakteristika der Hybridisierungsbedingungen sind der Tab. A 8 im Anhang zu entnehmen.

Die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung der Lösungen des Easy Hyb-Kits (Boehringer Mannheim). Bei der Prähybridisierung wurde die Nylonmembran für 30 min in ca. 20 ml/100cm² der auf die errechnete Hybridisierungstemperatur vorgewärmten DIG Easy Hyb-Lösung im Hybridisierungssofen Mini oven MKII Hybaid oder Micro 4 (MWG Biotech) inkubiert. 1-10 pMol der Digoxigenin endmarkierten Oligonukleotidsonde wurden für 10 min bei 95°C (Denaturierung) inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die vorbereitete Sonde wurde mit 2,5 ml/ 100cm² vorgewärmter DIG Easy Hyb-Lösung vorsichtig gemischt, die Prähybridisierungslösung abgegossen und die Hybridisierungslösung unter Vermeidung von Luftblasen in die Röhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei der berechneten Temperatur (Tab. A 8 im Anhang) über Nacht. Die Waschbedingungen am nächsten Tag sind der Tab. A 8 im Anhang zu entnehmen.

Die Detektion wurde unter Zuhilfenahme der Lösungen aus dem DIG Wash und Block Puffer Set (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist dem Anhang A 9 zu entnehmen. Die immunologische Detektion erfolgte unmittelbar nach den Waschschritten in der vom Hersteller empfohlenen Weise. Die entwickelte Nylonmembran wurde 10 min bei 55°C getrocknet. Unmittelbar nach der Trocknung des Filters wurde er mit Hilfe des Programmes Scanpack sp2 bilddokumentarisch archiviert, da die Signale verblassen.

3.6.2 Nachweis und Lokalisierung von Genen, die Abbauleistungen codieren

3.6.2.1 Präparation von Gesamt-DNA aus Umweltsolaten (KIESEL, persönliche Mitteilung)

Die Zusammensetzung der für die Präparation benötigten Lösungen und Puffer ist dem Anhang A 10 zu entnehmen.

0,5-1,5 ml einer Übernachtskultur wurden bei 4°C und 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 75 µl 25 mM Tris-HCl, pH 7,0 auf dem Vortexer resuspendiert. Der Suspension wurden 75 µl STET-Puffer hinzugegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 300 µl frisch bereiteter 0,2 N NaOH-Lösung und vorsichtigem Mischen wurde die Suspension für 15 min im Eisbad inkubiert, mit 300 µl 2M Tris-HCl; pH 7,0 versetzt und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 300 µl 10 M LiCl und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Klärungszentrifugation wurde bei 4°C und 15000 rpm für 15 min durchgeführt. Der Überstand wurde durch Dekantieren oder Pipettieren gewonnen. Die Plasmid-DNA wurde mit 600 µl Isopropanol 10 min bei Raumtemperatur ausgefällt und im Anschluß 10 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und mit 96% Ethanol entwässert. Nach dem Trocknen wurde die Plasmid-DNA in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.6.2.2 Reinigung plasmidaler DNA durch Dichtegradientenzentrifugation

Aus einer Übernachtskultur (500-800 ml) wurde die Gesamt-DNA präpariert. Das Pellet wurde in 400 µl TE-Puffer gelöst und diese Probe in 200 µl-Äquivalente geteilt. Jedem Röhrchen wurden 20 µl einer Ethidiumbromidstammllösung (10 mg/ ml) zugesetzt. Dem Gemisch wurden jeweils 0,139 g CsCl hinzugefügt. Die weiterhin benötigten Lösungen mit unterschiedlichen CsCl-Dichten wurden in folgender Weise hergestellt:

<i>Underlay:</i>	3,309 g CsCl in 3 ml TE-Puffer (Endvolumen)
<i>Overlay:</i>	3,829 g CsCl in 6 ml TE-Puffer (Endvolumen)

Die Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein Zentrifugenröhrchen geschichtet:

1. 0,67 ml *underlay*-Lösung
2. 0,2 ml Plasmid-DNA/ Ethidiumbromid-Gemisch
3. 1,33 ml *overlay*-Lösung

Die Dichtegradientenzentrifugation wurde in der Optima™ TLX Ultrazentrifuge (Beckmann) vorgenommen. Sie erfolgte für 18 Stunden bei 20°C in einem Ausschwingrotor bei 43000 rpm. Die von der chromosomalen DNA getrennte Plasmid-DNA wurde unter einem Ultraviolettstrahler NU-8KL -Wellenlänge 366 nm- (Konrad Bende Laborgeräte) mit einer Pipette entnommen. Sie wurde mit 300 µl sterilem *aqua bidest.* verdünnt. Die Entfernung des interkalierenden Ethidiumbromids erfolgte durch 4-6 malige Extraktion der wäßrigen Phase mit Isoamylalkohol (1:1). Die farblose, wäßrige Phase wurde in ein steriles Zentrifugenglas überführt und mit 1,5 ml sterilem *aqua bidest.* verdünnt. Die Ausfällung der plasmidalen DNA erfolgte nach Zugabe 1/10 Volumens 3M Na-Acetat (pH 5,0) und 2 Volumen eiskalten absoluten Ethanols bei -20°C über Nacht. Der Ansatz wurde bei 4°C für 10-15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde unter Vakuum (Vakuumpumpe Aquastop® [Van der Heijden]) im Exsikkator getrocknet und in einer entsprechenden Menge TE-Puffer über Nacht im Kühlschrank gelöst. Die Effizienz der Präparation und Separation wurde in der Gelelektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel überprüft.

3.6.2.3 Charakterisierung des Plasmides pAB 96 durch Restriktion und Hybridisierung mit Sonden für die Gene nah *Ac*, *xyl E* und *alk B*

Für die Abschätzung des Molekulargewichtes und die Charakterisierung des Plasmides pAB 96 war es notwendig, die plasmidale DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen zu spalten. Dazu wurden die Enzyme *Eco RI* und *Xho I* verwendet. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 µg Plasmid-DNA
 5 µl 10 x Restriktionspuffer
 1-10 U Restriktionsenzym

wurden auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit sterilem *aqua bidest.* aufgefüllt. Die gespaltene und gelelektrophoretisch aufgetrennte Plasmid-DNA wurde im Southern-Transfer auf positiv geladene Nylonmembran übertragen. Der Transfer erfolgte unter Anwendung der unter Abschnitt 3.6.1.2 beschriebenen Methodik. Den angegebenen Schritten wurde wegen der Größe der Restriktionsfragmente eine Depurinisierung vorangestellt. Dafür wurde das Agarosegel 10 min in einer 0,2 N HCl-Lösung inkubiert. Nach dem anschließenden Spülen in destilliertem Wasser wurde mit der Denaturierung der DNA fortgefahren.

Die Lokalisierung abbaurelevanter Leistungen wurde anhand der Hybridisierung der Restriktionsfragmente mit den in Tab. 4 beschriebenen Sonden vorgenommen. Die Tab. 4 enthält zudem die sondenspezifischen Hybridisierungsbedingungen.

Tab. 4: Sondenspezifische Hybridisierungsbedingungen für die Detektion abbaurelevanter Leistungen auf Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96

Sonde	xyl E	nah Ac	alk B
Herkunft der Sonde	xyl E PCR-Amplifikat aus pWWO (<i>P. putida</i> mt-2)	nah Ac PCR-Amplifikat aus NAH 7 (<i>P. putida</i> G7)	alk B interne Oligonukleotidsonde
Markierung der Sonde	Digoxygenin <i>random primed</i> markiert	Digoxygenin <i>random primed</i> markiert	Digoxygenin 5' endmarkiert
Hybridisierungsbedingungen			
Hybridisierungstemperatur [°C]	42	60	42
Hybridisierungsdauer [h]	12-14	12-14	12-14
Waschtemperatur [°C]	42	60	42

In Abänderung der in der Tab. 4 gemachten Angaben wurde zum Nachweis des nah Ac-Gens auf den Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96 auch das interne Digoxygenin 5' endmarkierte Oligonukleotid nah Ac 2 als Sonde verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden durch die Verringerung der Waschtemperatur auf 50°C geändert. Der Nachweis erfolgte analog der in Abschnitt 3.6.1.3 angegebenen Weise

3.6.2.4 Markierung des Plasmides pAB 96 und Hybridisierung mit der Plasmid-DNA aus Umweltisolaten

Die Markierung von Plasmid-DNA wurde in Anlehnung an die vom Hersteller (Boehringer Mannheim) empfohlenen Vorschriften durchgeführt. Soweit erforderlich wurde die DNA (3ng-10ng) zunächst linearisiert und durch 10 minütige Inkubation bei 95°C und Abkühlen auf Eis denaturiert. Die Komponenten des Reaktionsansatzes wurden in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen eingesetzt. Der Ansatz wurde über Nacht (mindestens jedoch 60 min) bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Die markierte DNA wurde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltem 96%igem Ethanol für 2 Stunden bei -20°C ausgefällt. Sie wurde 15 min bei 4°C und 15000 rpm sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, mit 96%igem Ethanol entwässert und getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Die markierte DNA wurde als Sonde zur Hybridisierung mit Plasmid-DNA aus Umweltsolaten verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Die Waschttemperatur am nächsten Tag betrug 42°C. Der immunologische Nachweis erfolgte wie im Abschnitt 3.6.1.3 beschrieben.

3.6.3 Charakterisierung von Mikroorganismen durch die Methode des Ribotyping

3.6.3.1 Isolation, Restriktion und Transfer der chromosomalen DNA

Die Methode des Ribotyping erlaubt die Differenzierung von Bakterien auf dem Niveau der Stämme (JORKS, 1996).

Dazu wurde die chromosomale DNA der Mikroorganismen mit Hilfe des Isolationskits NucleoSpin C+T (Macherey und Nagel) nach den Anweisungen des Herstellers präpariert und anschließend in einem 0,8%igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe des Computerprogramms PC/Gene wurden die für *P. fluorescens* publizierten, rDNA enthaltenden Sequenzen verglichen, um Restriktionsenzyme zu finden, für die keine Schnittstellen in diesen Genabschnitten vorhanden sind. Auf diese Weise wird zwar die chromosomale DNA fragmentiert, jedoch weitestgehend ausgeschlossen, daß dies im Bereich der rRNA-Gene geschieht.

Es wurde das Restriktionsenzym *Kpn* I ausgewählt. Die chromosomale DNA wurde in einem Restriktionsansatz mit diesem Enzym (10U) über Nacht bei 37°C inkubiert. Um zu gewährleisten, daß auch kleine Restriktionsfragmente in ausreichender Konzentration bei der Hybridisierung zur Verfügung stehen, mußte relativ viel chromosomale DNA (5µg) gespalten werden. Die Einengung des Ansatzvolumens erfolgte durch Ausfällen mit 1/10 Volumen 4M LiCl und 2,5 Volumen 96%igen Ethanol über Nacht bei -20°C. Die gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten und hitzedenaturierten chromosomalen DNA wurde in einem 0,8%igen Agarosegel über Nacht bei 30 V vorgenommen. Der Southern-Transfer der Restriktionsfragmente erfolgte nach der bilddokumentarischen Erfassung des Agarosegels wie im Abschnitt 3.6.1.2 beschrieben.

3.6.3.2 Hybridisierung und immunologischer Nachweis

Als Sonde für die Hybridisierung wurde das Digoxigenin *random primed* markierte PCR-Amplifikat der 16S rDNA aus *Escherichia coli* verwendet. Sie wurde freundlicherweise von Herrn Jorks zur Verfügung gestellt. Die Konzentration der Sonde in der Hybridisierungslösung betrug 200 ng/ml.

Hybridisierungs- und Waschttemperaturen betragen 60°C. Hybridisierung und Detektion erfolgten in der unter Abschnitt 3.6.1.2 und Abschnitt 3.6.1.3 angegebenen Weise. Die Hybridisierungsmuster wurden bilddokumentarisch erfaßt.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrobiologische Charakterisierung der Biozöosen

4.1.1 Zahl der koloniebildenden Einheiten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92

In der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) traten in der Zahl der koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar keine jahreszeitlichen Schwankungen auf. Diese Tendenz konnte auch auf Standardmedium mit 1% Spindelöl (SM[SÖ]) bestätigt werden. Auf diesem Medium wurden Lebendkeimzahlen in gleicher Größenordnung ermittelt wie auf R2A-Agar. Eine signifikante Zunahme der Bakterienzahlen wurde jedoch auf SMSÖ im Frühjahr 1995 nachgewiesen (Abb. 9).

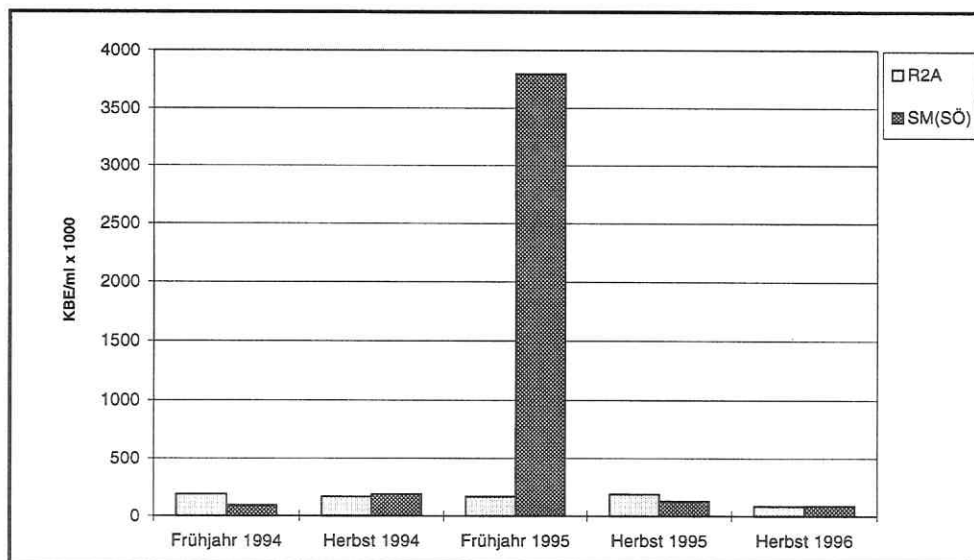


Abb. 9: KBE-Werte der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten (Abkürzungen : SMSÖ-Standardmedium mit 1% Spindelöl)

Für das Sediment des unbelasteten Brunnens wurden die KBE-Werte nur im Jahr 1994 bestimmt (Abb. 10). In Abhängigkeit vom Isolationsmedium konnte von Frühjahr bis Herbst 1994 eine deutliche Zunahme der Bakterienzahlen ermittelt werden, wobei auf R2A-Agar stets höhere Werte nachgewiesen wurden als auf SMSÖ.

Die Abb. 10 zeigt den Vergleich der KBE-Werte aus der Wasserphase und dem Sediment des GWBR 21/92 im Jahr 1994. Während die Lebendkeimzahlen beider Kompartimente im Frühjahr 1994 die gleiche Größenordnung aufwiesen, wurde im Herbst 1994 eine signifikante Ungleichverteilung durch die Zunahme der KBE-Werte im Sediment festgestellt.

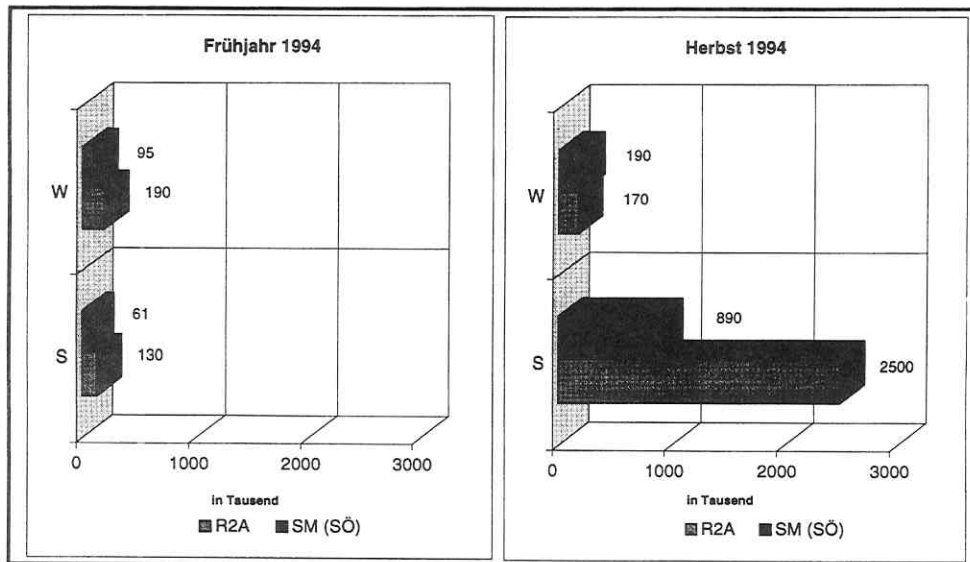


Abb. 10: Vergleich der KBE-Werte in verschiedenen Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abkürzungen: SMSÖ-Standardmedium mit 1% Spindelöl; W-Wasserphase; S-Sediment)

4.1.2 Zahl der koloniebildenden Einheiten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91

Für den mit Mineralöl stark belasteten Brunnen ergaben sich in Abhängigkeit vom beprobten Kompartiment signifikante Unterschiede in der Zahl der KBE.

In der Ölphase (GWBR 6/91) wurden starke jahreszeitliche Schwankungen der Lebendkeimzahlen festgestellt (Abb. 11). Im Frühjahr wurden deutlich höhere KBE-Werte ermittelt als im Herbst. Mögliche Ursachen werden im Abschnitt 5 (Diskussion) erläutert.

Diese Tendenzen konnten auf beiden Inkubationsmedien nachgewiesen werden. Erheblichen Einfluß auf die mikrobiellen Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches hatte das infolge einer Pumpenhavarie auftretende Ansteigen der Mineralölphase im Pegelrohr des GWBR 6/91 im Herbst 1995 (Abb. 15). Die extreme Zunahme der Schichtdicke führte vermutlich dazu, daß im Herbst 1996 in der Ölphase keine Lebendkeimzahlen auf den getesteten Medien mehr nachgewiesen werden konnten (Abb. 11).

In der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches traten im ersten Probenahmejahr keine jahreszeitlichen Schwankungen der KBE-Werte auf (Abb. 12). Auf beiden Inkubationsmedien wurden Bakterienzahlen in gleicher Größenordnung ermittelt. Eine deutliche Zunahme der Lebendkeimzahlen sowohl auf R2A-Agar als auch auf SMSÖ konnte im Frühjahr 1995 nachgewiesen werden, wobei auf R2A-Agar höhere Werte ermittelt wurden. Die Havarie und das Ansteigen der Schichtmächtigkeit der Ölphase (Abb. 15) beeinflusste vermutlich auch die mikrobiellen Biozönosen der Interphase. Zu diesem Zeitpunkt (Herbst 1995) wurde eine erneute Zunahme der KBE-Werte besonders auf R2A-Agar festgestellt. Im darauffolgenden Jahr (Herbst 1996) wurde ein signifikanter Rückgang der KBE-Werte auf R2A-Agar ermittelt, auf SMSÖ wurde hingegen eine Zunahme der Bakterienzahlen nachgewiesen.

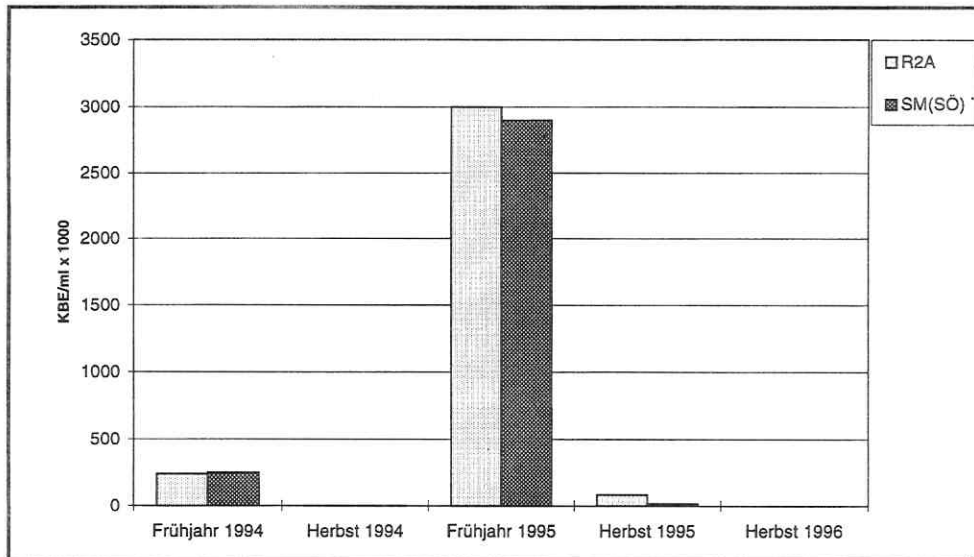


Abb. 11: KBE-Werte der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (Abkürzung: SMSÖ- Standardmedium mit 1% Spindelöl)

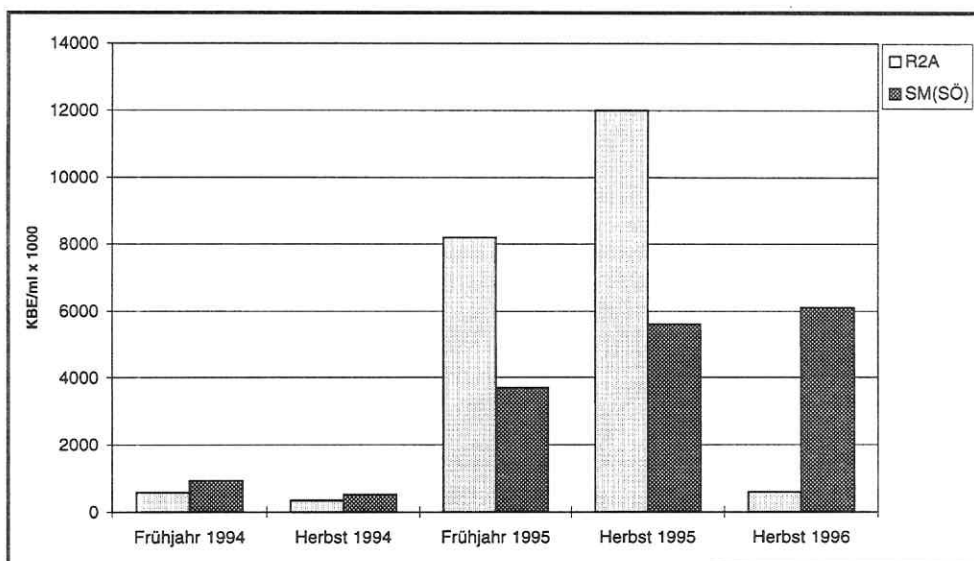


Abb. 12: KBE-Werte der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (Abkürzung: SMSÖ- Standardmedium mit 1% Spindelöl)

Im ersten Jahr der Beprobung des belasteten Grundwasserbereiches wurden in der Wasserphase auf beiden Inkubationsmedien KBE-Werte in gleicher Größenordnung ermittelt, wobei keine jahreszeitlichen Schwankungen festzustellen waren (Abb. 13). Eine signifikante Zunahme der Bakterienzahlen trat im Frühjahr 1995 auf. Die KBE-Werte auf R2A-Agar wa-

ren dabei deutlich höher als die auf SMSÖ. Durch die Havarie im Herbst 1995 konnte keine Wasserphase im Brunnenrohr mehr nachgewiesen und beprobt werden (Abb. 15).

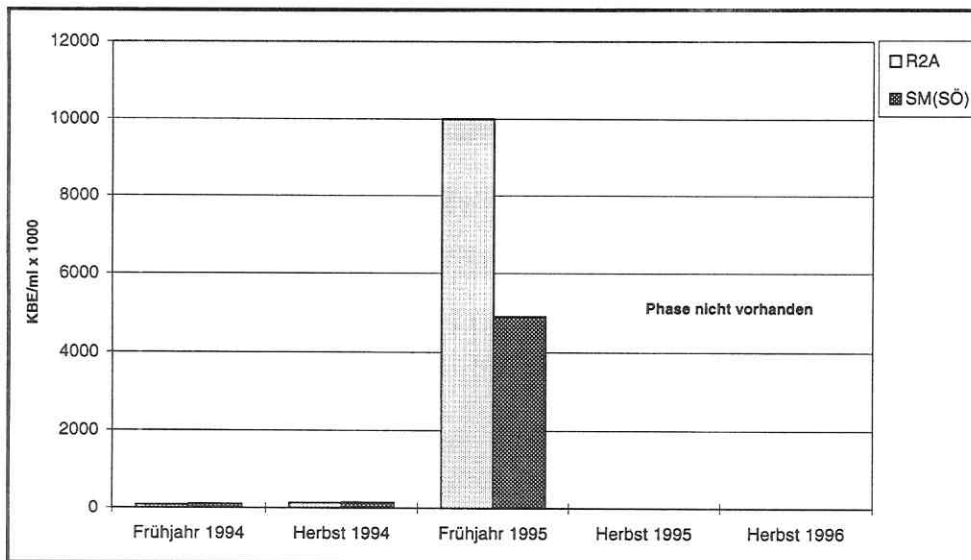


Abb. 13: KBE-Werte der Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (Abkürzung: SMSÖ- Standardmedium mit 1% Spindelöl)

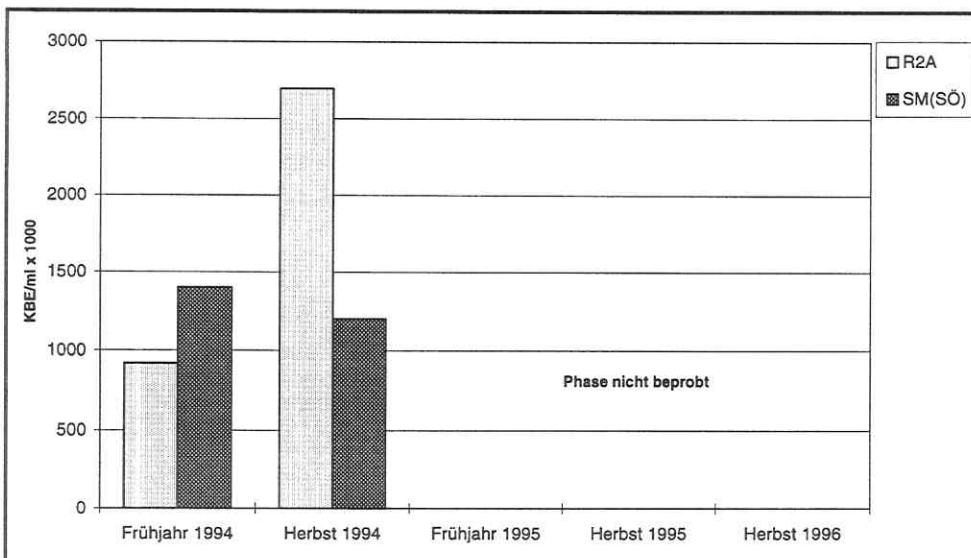


Abb. 14: KBE-Werte des Sedimentes des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten (Abkürzung: SMSÖ- Standardmedium mit 1% Spindelöl)

Im Sediment, das nur im Jahr 1994 beprobt wurde, zeigten sich in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium unterschiedliche jahreszeitliche Tendenzen (Abb. 14).

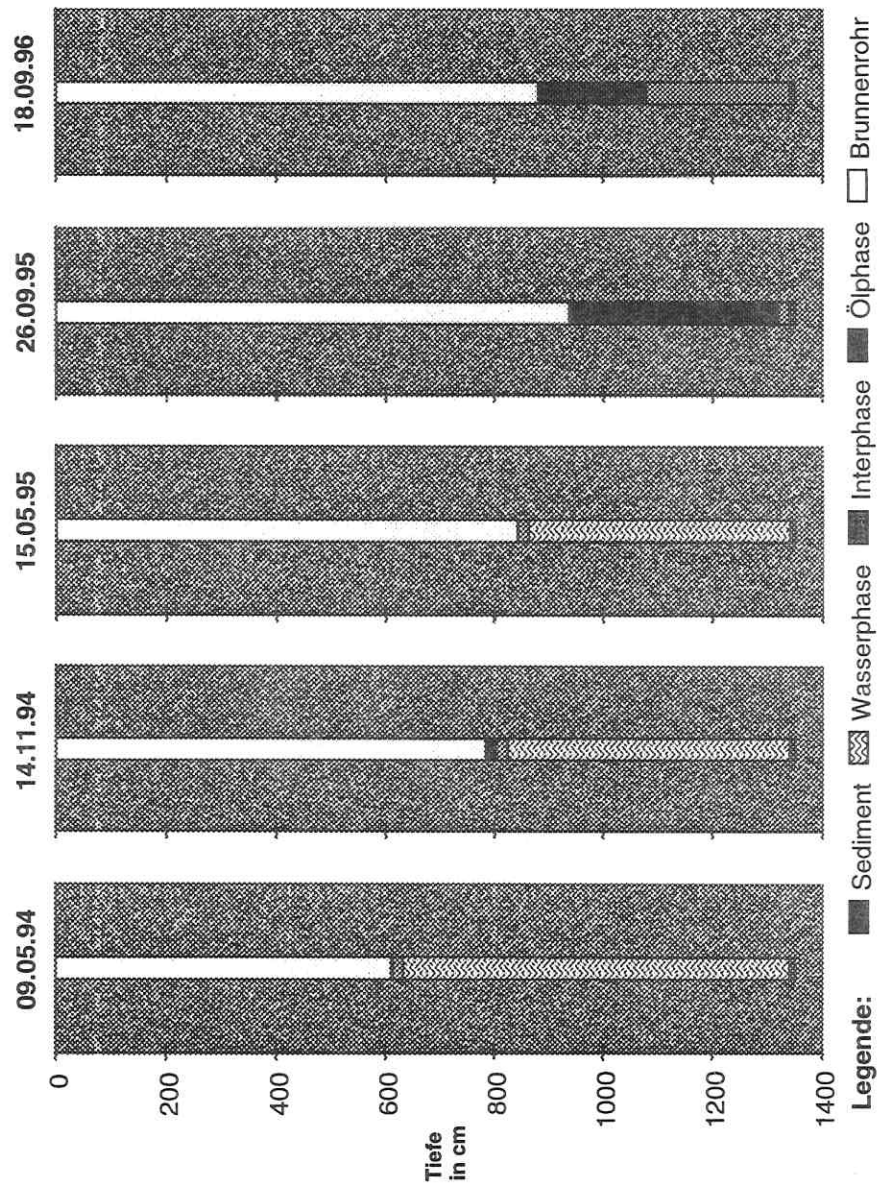


Abb. 15: Grundwasserstände und Mächtigkeiten der Kompartimente im GWBR 6/91 zu den Zeitpunkten der Probenahmen

Während bei der Bestimmung der Lebendkeimzahlen auf R2A-Agar eine signifikante Zunahme der Werte im Herbst nachgewiesen werden konnte, wurde auf SMSÖ eine gegenläufige Tendenz festgestellt.

Die Abb. 16 zeigt beispielhaft die kompartimentabhängige Verteilung der Bakterienzahlen im belasteten Grundwasserbereich zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dabei wiesen das Sediment jeweils die höchsten und Wasser- bzw. Ölphase die geringsten KBE-Werte auf. Die signifikante Zunahme der Lebendkeimzahlen von der Ölphase zur Interphase konnte auch bei späteren Beprobungen bestätigt werden. Ein deutlicher Anstieg der Bakterienzahlen war von der Wasserphase zum Sediment ausgeprägt.

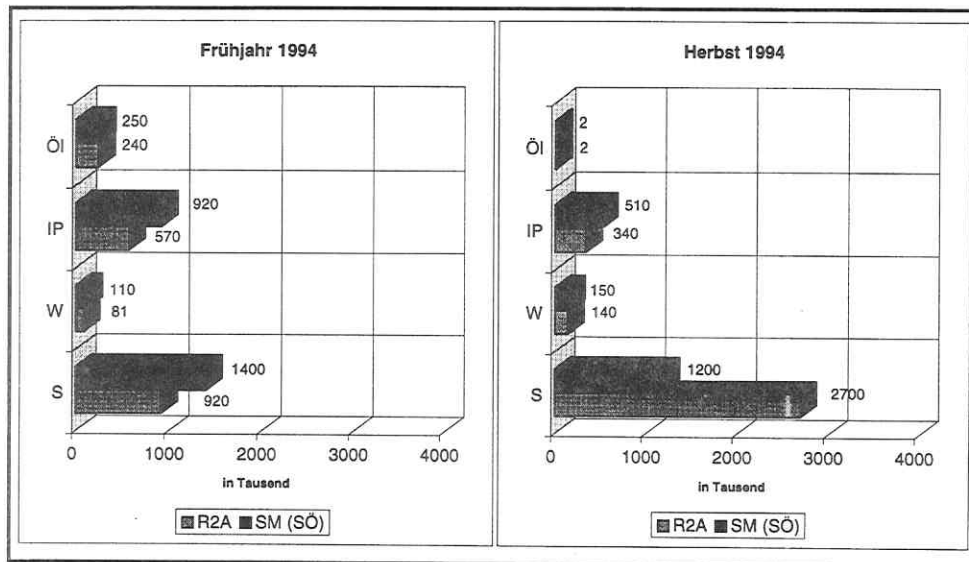


Abb. 16: Vergleich der KBE-Werte in verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91)
(Abkürzungen: SMSÖ-Standardmedium mit 1% Spindelöl; IP-Interphase; W-Wasserphase; S-Sediment)

4.1.3 MPN- Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen

Als funktionelles Charakteristikum wurde mit Hilfe des Quantifizierungsverfahrens *MPN* (*most probable number*) die Dichte der Bakterien abgeschätzt, die in ausgewählten Stoffkreisläufen die Beschaffenheit des Grundwassers beeinflussen können.

Von den Grundwasser- und Sedimentproben aus dem unbelasteten und belasteten Grundwasserbereich wurden die *MPN*-Werte der folgenden ökophysiologischen Gruppen ermittelt:

Denitrifizierer,	Manganoxidierer
Ammoniumoxidierer,	Eisenoxidierer
Nitritoxidierer,	Desulfurikanten
Manganreduzierer,	Schwefeloxidierer

4.1.3.1 *MPN*-Werte ökophysiologischer Gruppen aus dem unbelasteten Grundwasserbereich (GWBR 21/92)

Der Vergleich der *MPN*-Werte verschiedener Stoffkreisläufe zeigte für die Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Zahlen oxidierender und reduzierender Bakterien (Abb. 17). Auf Milieuveränderungen des Kompartimentes im Herbst deutete die Zunahme reduzierender Mikroorganismen der untersuchten Stoffkreisläufe hin. Gleichzeitig wurde ein Rückgang der Zahlen oxidierender Bakterien festgestellt. Im Frühjahr zeigten sich zumeist gegenläufige Tendenzen.

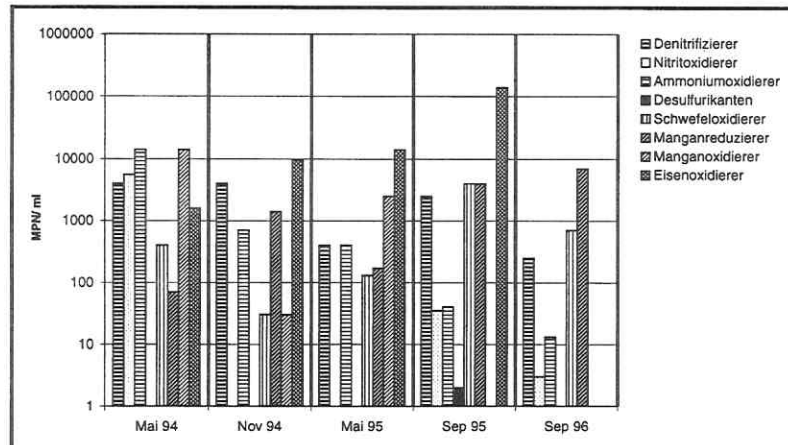


Abb. 17: *MPN*-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92)

In allen Wasserproben des GWBR 21/92 konnten denitrifizierende Mikroorganismen festgestellt werden (Abb. 17). Die Schwankungen der *MPN*-Werte sind vermutlich jedoch nicht durch Veränderungen der Nitratkonzentrationen im Grundwasser bedingt (diese lagen in jedem Fall oberhalb der für die Denitrifikation begrenzenden Nitratkonzentration). Für die Dichten denitrifizierender Bakterien deutete sich vielmehr eine Abhängigkeit von der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) an (Abb. 18). Dabei wurde ein Rückgang der Bakterienzahlen ermittelt, wenn die DOC-Konzentrationen im Grundwasser sanken (Frühjahr 1995 und Herbst 1996). Bei Anstieg des DOC-Gehaltes im Grundwasser konnte auch eine Zunahme der *MPN*-Werte denitrifizierender Bakterien festgestellt werden (Herbst 95).

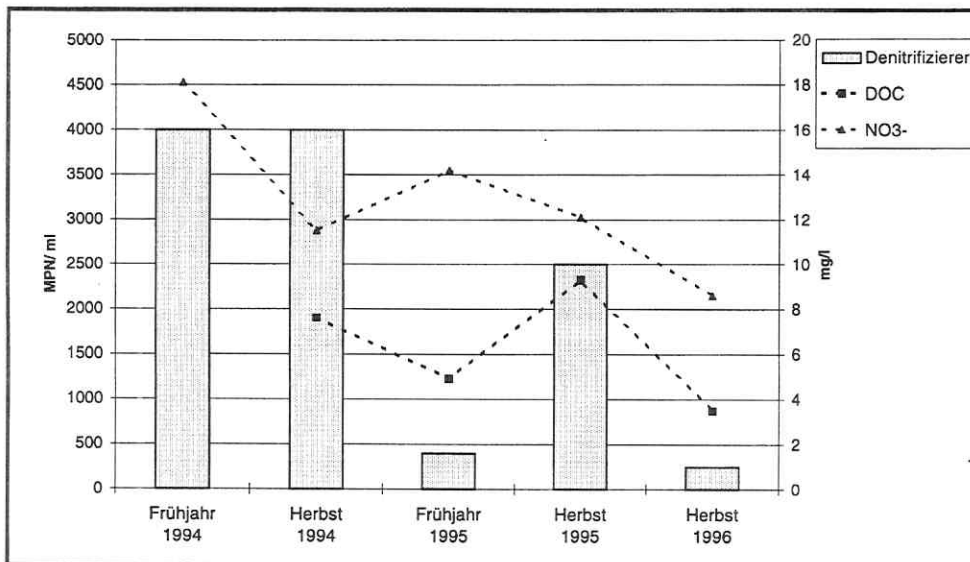


Abb. 18: *MPN*-Werte denitrifizierender Mikroorganismen in Abhängigkeit von DOC- und Nitratgehalt im unbelasteten Grundwasserbereich

Für die *MPN*-Werte Nitrat bildender Mikroorganismen wurde ab Frühjahr 1994 ein stetiger Rückgang nachgewiesen (Abb. 17). In allen Proben aus der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches konnten hohe Zahlen Eisen oxidierender Bakterien ermittelt werden. Im Herbst 1996 wurde im Vergleich zu den Vorjahren ein deutlicher Rückgang der *MPN*-Werte für die Mehrzahl der Ökophysiotypen festgestellt (Abb. 17).

Der Vergleich der *MPN*-Werte in Sedimentproben des unbelasteten Grundwasserbereiches zeigte wiederum eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Dichten reduzierender und oxidierender Bakterien (Abb. 19 und 20). Im Herbst war für die untersuchten Stoffkreisläufe zumeist ein Anstieg der *MPN*-Werte reduzierender Mikroorganismen bei gleichzeitigem Rückgang der Zahlen oxidierender Bakterien nachweisbar.

Im Sediment konnten denitrifizierende Bakterien in ähnlicher Größenordnung wie in der Wasserphase ermittelt werden (Abb. 19 und 20). Im Unterschied zur Wasserphase wurden in beiden Sedimentproben hohe *MPN*-Werte desulfurizierender Bakterien nachgewiesen, wobei im Herbst ein Rückgang der *MPN*-Werte dieser Gruppe festgestellt wurde (Abb. 20). Eine gleichzeitige Abnahme der *MPN*-Werte Schwefel oxidierender Mikroorganismen wurde beobachtet.

Die Abb. 19 und 20 zeigen den Vergleich der *MPN*-Werte beider Phasen des unbelasteten Grundwasserbereiches zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Für die Mehrzahl der untersuchten Ökophysiotypen wies das Sediment höhere *MPN*-Werte auf. In den Sedimentproben konnte zudem eine größere Vielfalt ökophysiologischer Gruppen nachgewiesen werden.

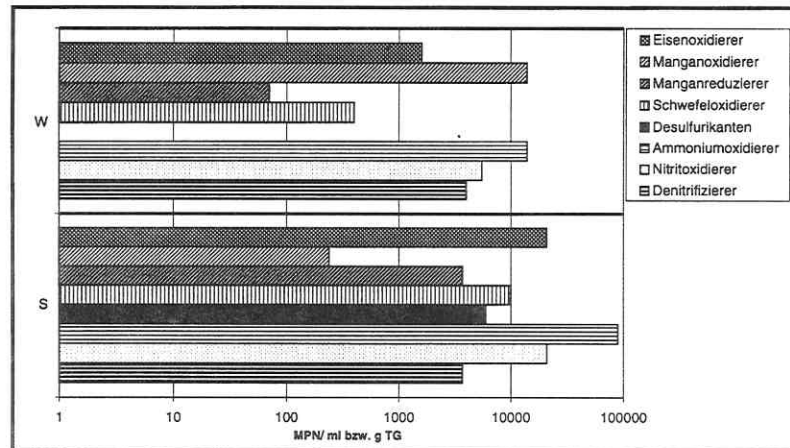


Abb. 19: *MPN*-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in den Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 (Frühjahr 1994) (Abkürzungen: W-Wasser; S-Sediment)

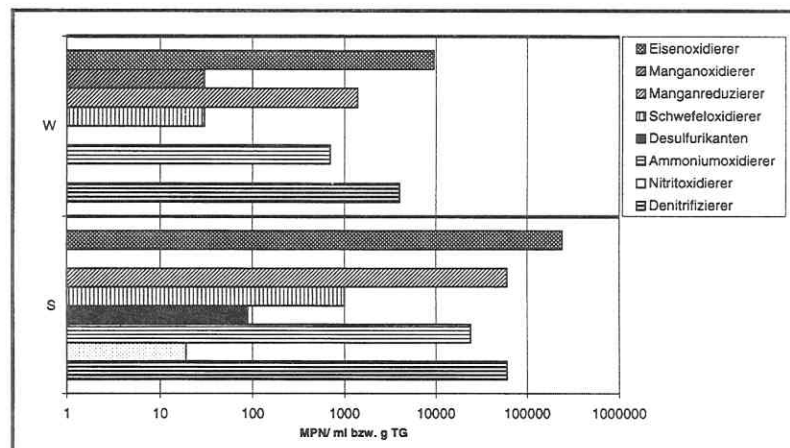


Abb. 20: *MPN*-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in den Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 (Herbst 1994) (Abkürzungen: W-Wasser; S-Sediment)

4.1.3.2 *MPN*-Werte ökophysiologischer Gruppen aus dem belasteten Grundwasserbereich (GWBR 6/91)

In Proben aus der Ölphase konnten im Frühjahr höhere *MPN*-Werte und eine größere Vielfalt ökophysiologischer Gruppen nachgewiesen werden als im Herbst (Abb. 23 und 24). Im Frühjahr waren die *MPN*-Werte denitrifizierender Bakterien jeweils höher als die Nitrat bildender Mikroorganismen (Abb. 21). Im Herbst kehrte sich diese Tendenz um, was hauptsächlich durch den Rückgang der Denitrifikanten erklärt werden kann. Schwefel oxidierende Bakterien konnten in allen Proben bestimmt werden und wiesen jeweils höhere *MPN*-Werte auf als die der Desulfurikanten. Manganreduzierer wurden in der Ölphase zu allen Probenahmezeitpunkten festgestellt. Eine gravierende Änderung der Besiedlung der Ölphase mit Mikroorganismen verschiedener ökophysiologischer Gruppen wurde im Herbst 1996 ermit-

telt. Zu diesem Zeitpunkt waren in der Ölphase lediglich Sulfatreduzierer nachweisbar (Abb. 24).

In Proben aus der Interphase wurden im Frühjahr deutlich mehr denitrifizierende Bakterien nachgewiesen als in den Herbstmonaten. Die Zahl der Desulfurikanten erreichte jeweils im Herbst ihr Maximum (Abb. 22). Schwefeloxidierer traten mit hohen *MPN*-Werten in allen Interphasenproben auf (Abb. 23 und 24). Manganreduzierer und Manganoxidierer konnten 1994 und 1995 in allen Proben bestimmt werden, wobei die Zahl der Manganreduzierer zumeist die der Oxidierer überstieg. Die Übersichtung der Interphase im Pegelrohr mit einer meterdicken Ölphase über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr (Herbst 1996) führte in der Interphase zu einem massiven Rückgang der *MPN*-Werte aller Ökophysiotypen. Erwartungsgemäß waren davon besonders oxidierende Bakterien betroffen.

Die *MPN*-Werte oxidierender und reduzierender Bakterien verschiedener ökophysiologischer Gruppen zeigten für die Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches im Frühjahr 1994 zumeist höhere Zahlen reduzierender als oxidierender Mikroorganismen. Dies konnte besonders für den Mangan- und Stickstoffkreislauf gezeigt werden (Abb. 21 und Abb. 23). Der Rückgang der *MPN*-Werte dieser ökophysiologischen Gruppen führte dazu, daß im Herbst 1994 in allen Kreisläufen die Zahlen oxidierender Bakterien überwogen. Im Frühjahr 1995 konnte wiederum eine Zunahme der *MPN*-Werte denitrifizierender und Mangan reduzierender Mikroorganismen nachgewiesen werden. Die Zahl der Desulfurikanten erreichte im Herbst 1994 ihren Höchstwert (Abb. 22). Sulfatreduzierer traten vergesellschaftet mit Schwefeloxidierern auf, die jedoch höhere *MPN*-Werte erreichten (Abb. 23).

Das Sediment des belasteten Grundwasserbereiches wurde nur 1994 untersucht. Dabei wurde ein leichter Rückgang der *MPN*-Werte denitrifizierender Bakterien von Frühjahr bis Herbst festgestellt (Abb. 21). Die Zahl der Desulfurikanten stieg im Herbst signifikant an (Abb. 22). Manganreduzierer wurden zu beiden Probenahmezeitpunkten nachgewiesen und zeigten eine Zunahme im Herbst.

In allen Kompartimenten des GWBR 6/91 konnten denitrifizierende Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 21).

Es wurde ersichtlich, daß die Dichte denitrifizierender Bakterien jahreszeitlichen Schwankungen unterlag. So wurden in allen Kompartimenten im Frühjahr höhere Werte ermittelt als im Herbst.

Aus den *MPN*-Werten denitrifizierender Bakterien ergab sich eine Schichtung der Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches. So konnten in der Ölphase im Frühjahr die höchsten Zahlen ermittelt werden, im Herbst wies das Sediment die größten Dichten Nitrat reduzierender Mikroorganismen auf. Die Zunahme die Mächtigkeit der Ölphase bewirkte einen starken Rückgang denitrifizierender Bakterien in der Ölphase (Herbst 1995 und 1996). Die Abb. 22 zeigt Verteilung und Dichte desulfurizierender Bakterien in verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches. Im ersten Jahr der Untersuchungen war anhand der *MPN*-Werte der Sulfatreduzierer zwischen den Kompartimenten eine Schichtung erkennbar, die im Herbst 1994 besonders signifikant ausgeprägt war. Mit zunehmender Tiefe stieg dabei die Zahl der Desulfurikanten an. Im Sediment konnte im Herbst 1994 eine deutliche Zunahme der *MPN*-Werte ermittelt werden. Für die Mehrzahl der Proben aus verschiedenen Kompartimenten wurden desulfurizierende Bakterien in Vergesellschaftung mit Schwefeloxidierern nachgewiesen (Abb. 23 und 24). Die Zunahme der *MPN*-Werte Sulfat reduzierender Mikroorganismen in der Ölphase im Frühjahr 1994 (Abb. 22) fiel mit einem erheblichen Anstieg der Zahlen Schwefel oxidierender Bakterien zusammen, die als weißlicher aufschwimmender Film bzw. Niederschlag nachgewiesen werden konnte.

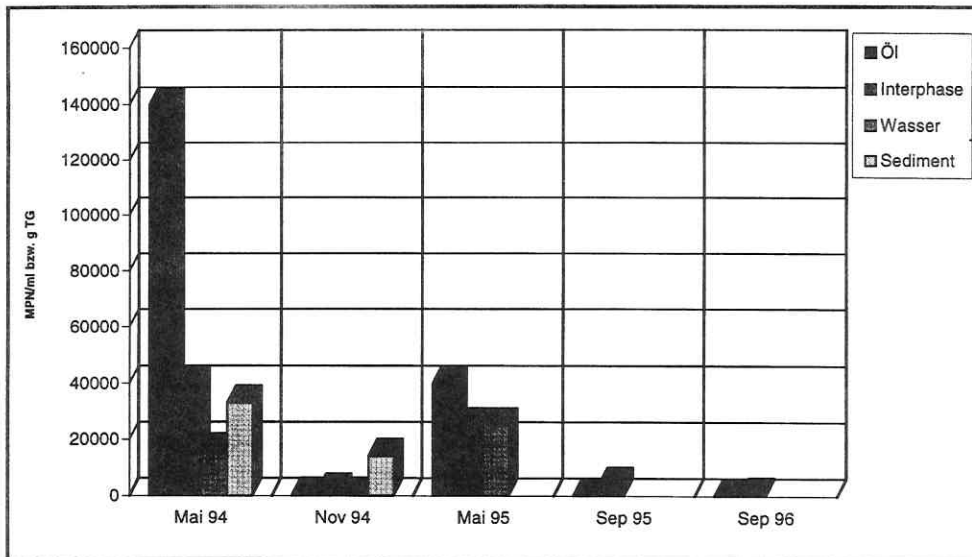


Abb. 21: Vergleich der *MPN*-Werte denitrifizierender Mikroorganismen in den Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches zu unterschiedlichen Zeitpunkten

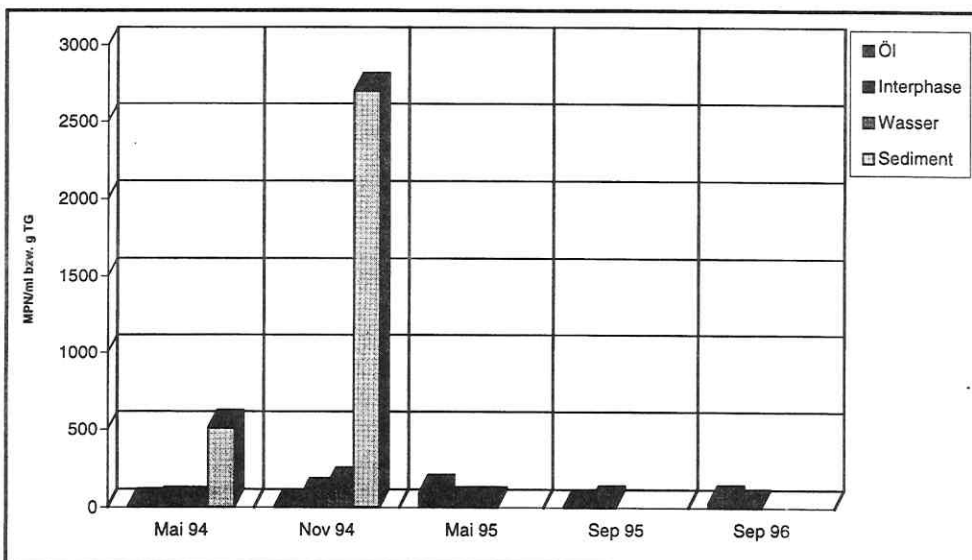


Abb. 22: Vergleich der *MPN*-Werte Sulfat reduzierender Mikroorganismen in den Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches zu unterschiedlichen Zeitpunkten

4.1.3.2.1 *MPN*-Werte ökophysiologischer Gruppen verschiedener Kompartimente zum gleichen Zeitpunkt (Kompartimentabhängige Verteilung)

Die folgende Abb. 23 vergleicht die *MPN*-Werte der unterschiedlichen Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches zum gleichen Probenahmezeitpunkt. Aufgrund der ermit-

telten Bakteriendichten verschiedener ökophysiologischer Gruppen ergibt sich eine deutliche Schichtung des Grundwassers.

Kompartimentabhängige Unterschiede spiegeln sich im Frühjahr 1994 besonders für die ökophysiologischen Gruppen der Nitritoxidierer, Ammoniumoxidierer, Desulfurikanten, Schwefeloxidierer, Manganoxidierer und Eisenoxidierer wider (Abb. 23). Die Gruppen der Denitrifizierer wurden in der Ölphase mit den höchsten *MPN*-Werten nachgewiesen. Im Sediment wurden die höchsten und in der Ölphase die geringsten *MPN*-Werte ermittelt. Die im Frühjahr 1994 nachgewiesenen kompartimentabhängigen Tendenzen konnten auch im Herbst 1994 bestätigt werden (Abb. 23).

Während wiederum die Bakteriendichten im Sediment und in der Interphase auf intensive mikrobielle Aktivitäten hinweisen, wurden in der Ölphase zu diesem Zeitpunkt sehr geringe *MPN*-Werte ermittelt. Deutlich ist die Zunahme desulfurizierender Bakterien von der Interphase zum Sediment, die mit einem Anstieg der *MPN*-Werte schwefeloxidierender Mikroorganismen parallel verläuft.

Auf eine Änderung der Milieubedingungen deutet die Zunahme der *MPN*-Werte in der Ölphase zum Zeitpunkt der Probenahme im Frühjahr 1995 hin (Abb. 23). Die Proben aus der Ölphase wiesen im Vergleich zu denen anderer Probenahmen im Frühjahr 1995 die höchsten *MPN*-Werte auf. Die Gruppe der Denitrifizierer zeigte kompartimentabhängig deutliche Unterschiede. Die Zahl der Schwefeloxidierer überstieg die Dichten der Desulfurikanten.

Die seit dem Herbst 1995 (Abb. 15) im Pegelrohr nachgewiesene meterdicke Ölschicht (Änderung der hydraulischen Verhältnisse infolge einer Pumpenhavarie unmittelbar vor der Probenahme im Herbst 1995) beeinflusste offensichtlich in sehr starkem Maße die Biozönosen der Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches.

Für alle untersuchten Phasen dieses Grundwasserbereiches wurde ein z. T. extremer Rückgang der *MPN*-Werte ökophysiologischer Gruppen nachgewiesen (ab diesem Zeitpunkt konnten nur noch Öl- und Interphase beprobt werden). Die neuen Milieubedingungen führten zum Ausfall einiger Ökophysiotypen.

Der Einfluß der meterdicken Ölphase im Pegelrohr auf die Biozönosen und insbesondere auf die Konzentration von Mikroorganismen verschiedener ökophysiologischer Gruppen konnte durch eine weitere Beprobung im Herbst 1996 gezeigt werden (Abb. 24).

Dabei wurde deutlich, daß es unter der Wirkung der Ölschicht zu einem weiteren Rückgang der *MPN*-Werte kam. In der Ölphase konnten nur noch wenige desulfurizierende Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Obwohl die Auswirkungen der geänderten Milieubedingungen auf die Populationen in der Ölphase offensichtlich am gravierendsten waren, so konnten auch in der Interphase nach einem Jahr deutlich weniger Aktivitäten verschiedener ökophysiologischer Gruppen nachgewiesen werden. Die *MPN*-Werte zeigten zumeist einen starken Rückgang. Erwartungsgemäß waren davon besonders oxidative Prozesse betroffen.

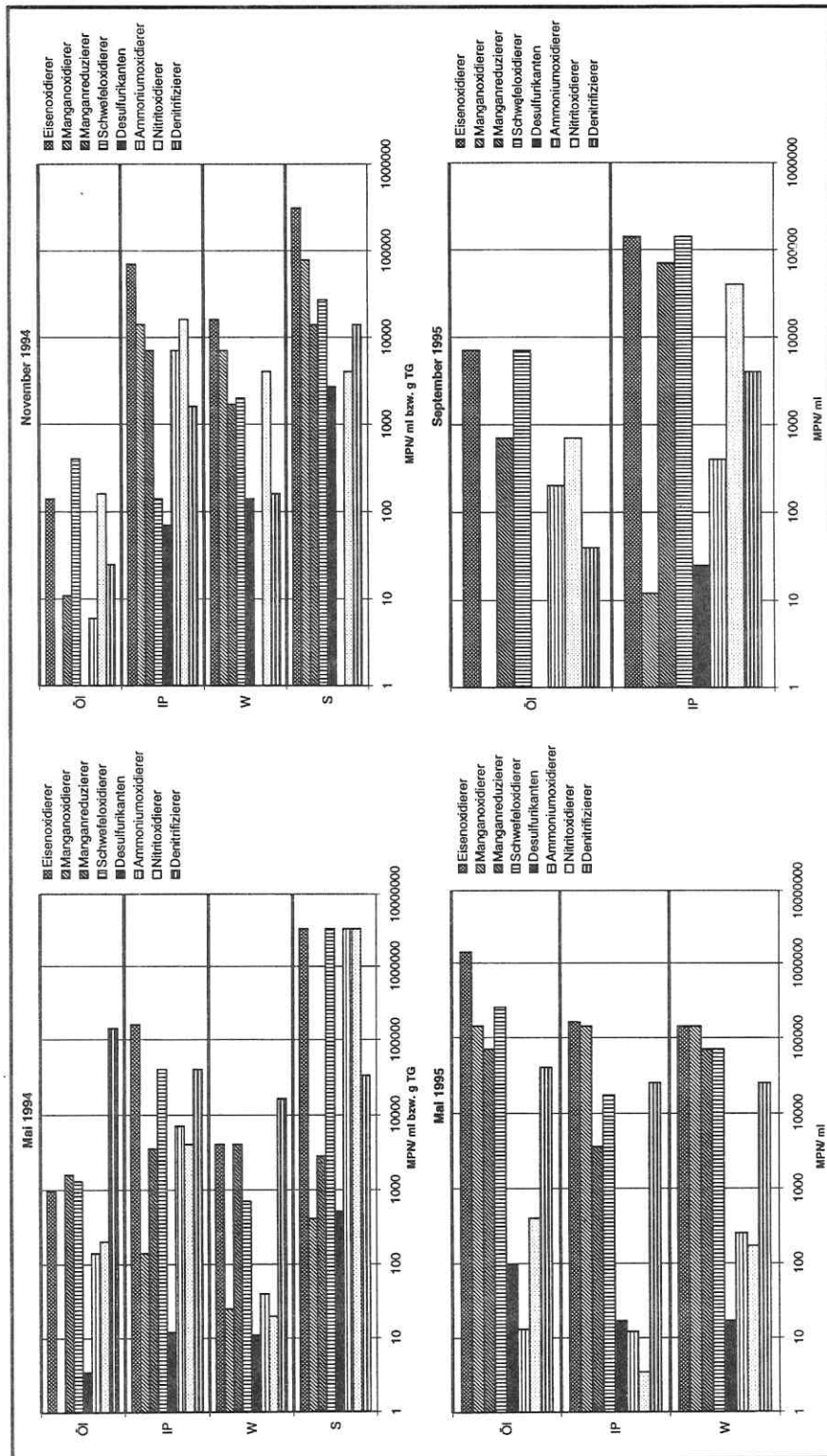


Abb. 23: MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 (Kompartimentabhängige Verteilung zu verschiedenen Zeitpunkten)

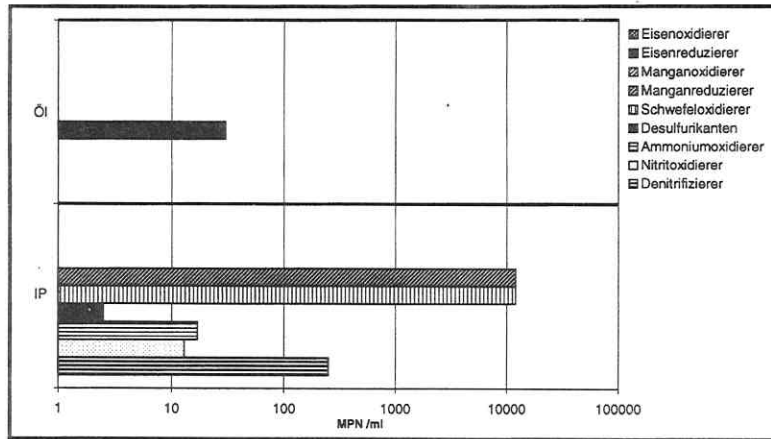


Abb. 24: *MPN*-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen in Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 (Kompartimentabhängige Verteilung im Herbst 1996)
Abkürzung: IP-Interphase

4.2 Taxonomische Zusammensetzung der aeroben, mikrobiellen Biozöosen

4.2.1 Identitäten der Umweltisolate

Die Beschreibung der Struktur mikrobieller Biozöosen beinhaltet eine Charakterisierung ihrer Zusammensetzung. Von jeweils ca. 70 Isolaten aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Bereiches des Grundwassers wurde die Zugehörigkeit zu Gattungen und Arten bestimmt. Dabei wurden sowohl Isolate von R2A-Agar als auch von SMSÖ getestet.

4.2.1.1 Gram, Oxidase- und Katalase Verhalten der Umweltisolate

Die Biozöosen wurden zunächst mit klassischen Methoden charakterisiert. Neben der Bestimmung des Gram-, Oxidase und Katalaseverhaltens wurden die Isolate auch hinsichtlich der morphologischen Eigenschaften der Einzelzellen und makroskopischen Merkmale der Kolonien beschrieben. Die Kenntnis dieser Charakteristika stellte zudem eine wesentliche Voraussetzung für die Verifizierung der Identifizierungsergebnisse dar.

Die Tab. 5 vergleicht die prozentuale Verteilung der grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen in verschiedenen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zum Zeitpunkt Frühjahr 1994. In Abhängigkeit von der beprobten Phase wurden erhebliche Unterschiede im Anteil gramnegativer Mikroorganismen festgestellt. Während die Isolate aus der Öl- und Interphase bzw. dem Sediment des belasteten Grundwasserbereiches mehrheitlich gramnegativ waren, wurde in der Wasserphase ein wesentlich höherer Anteil grampositiver Bakterien bestimmt. Die Verteilung konnte auf beiden Isolationsmedien bestätigt werden. Im Unterschied zum belasteten Grundwasserbereich wurde unter den Isolaten des Sedimentes im unbelasteten Grundwasserbereich ein höherer Anteil grampositiver Mikroorganismen ermittelt als in der Wasserphase.

Tab. 5: Prozentuale Verteilung des Gramverhaltens der Isolate aus Biozöosen verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches (Angaben in Prozent)

GWBR	Phase	Medium	Gram	
			positiv	negativ
unbelastet				
21/92	Wasser	R2A	11	89
21/92	Sediment	R2A	32	68
belastet				
6/91	Öl	R2A	5	95
6/91	Öl	SM (SÖ)	1	99
6/91	Interphase	R2A	4	96
6/91	Interphase	SM (SÖ)	7	93
6/91	Wasser	R2A	15	85
6/91	Wasser	SM (SÖ)	13	87
6/91	Sediment	R2A	0	100
6/91	Sediment	SM (SÖ)	1	99

4.2.1.2 Identitäten der Umweltisolate im BIOLOG-System

Für die Isolatidentifizierung standen die kommerziell erhältlichen Systeme BIOLOG® und APILAB zur Verfügung. Das BIOLOG®-System ermöglicht in einem metabolischen Fingerprinting über die Messung der Respirationsrate mit Tetrazoliumsalz als Indikator eine computergestützte Auswertung der Substratverwertungsmuster und die Ausgabe einer Identifizierung. Dieses System wurde stets in Kombination mit anderen Methoden angewandt, um eine Verifizierung der Identifizierungsergebnisse zu ermöglichen. Neben dem Nachweis der Oxidase und Katalase, der Bestimmung des Gram-Verhaltens und der makroskopisch und mikroskopischen Beschreibung wurden die Reaktionen im APILAB-System API 20 E, API 20 NE und API CH sowie das Verhalten auf Pseudo F- und Pseudo P-Agar für die Beurteilung der im BIOLOG®-System bestimmten taxonomischen Einordnung herangezogen.

Die Mikrotiterplatten des BIOLOG®-Systems wurden nach 24 und 48 Stunden ausgewertet. Identifizierungsergebnisse wurden in Abänderung der Herstellerempfehlung nur dann als zutreffend bewertet, wenn der Identitätsindex bei Zuweisung der Art über 0,6 und bei Bestimmung der Gattung ohne Artangabe über 0,45 lag und zudem die Auswertung nach 24 und 48 Stunden dieselbe Gattungszugehörigkeit ergeben hatte. Es trat häufiger auf, daß trotz Identitätsindex unter 0,5 (ansonsten „No Identification“) eine eindeutige Gattungszugehörigkeit zugewiesen wurde. Zudem wurden die Identifizierungsergebnisse des APILAB-Systems für eine Verifizierung herangezogen. Bei einer Übereinstimmung der Zuweisung der Gattung- jedoch nicht Artzugehörigkeit wurde dem Ergebnis des BIOLOG®-Systems mehr Bedeutung beigemessen, da hierbei für die Identifizierung 95 Substrate, beim APILAB-System nur 20 Eigenschaften herangezogen werden.

Die Abb. 25 bis 30 veranschaulichen beispielhaft den prozentualen Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus verschiedenen Biozönosen des unbelasteten und belasteten Grundwasserbereiches. Dabei repräsentiert die Kategorie „nicht bestimmt“ den Anteil der Mikroorganismen, die nicht mit dem BIOLOG®-System untersucht wurden, da eine Vorkultur auf den vom BIOLOG®-System vorgeschriebenen Medien bzw. bei den empfohlenen Temperaturen nicht möglich war. Als „nicht identifiziert“ werden Bakterien bezeichnet, für die die Identifizierungssysteme keine ausreichende Übereinstimmung mit den in den Datenbanken enthaltenen Substratverwertungsmustern feststellen konnten.

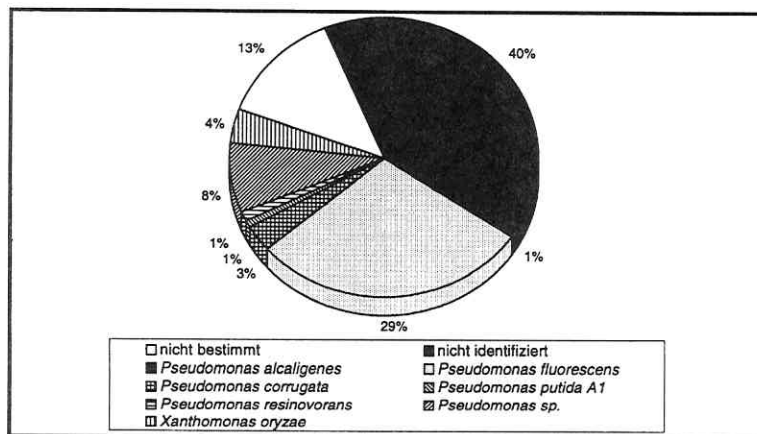


Abb. 25: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 im Frühjahr 1994 (Isolationsmedium: R2A-Agar)

In der Zusammensetzung isolierter Mikroorganismen verschiedener Bakteriengemeinschaften zeigten sich deutliche Unterschiede. Während sich in der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) eine mit mindestens sieben verschiedenen Arten höhere Diversität in der Zusammensetzung der Isolate aus mikrobiellen Biozönosen andeutete (Abb. 25), zeigte sich eine abnehmende Diversität in den verschiedenen Kompartimenten (Abb. 26 bis 31) des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 (genaue Aussagen bezüglich der Diversität jedoch erst nach Kenntnis der Identität der Isolate der Kategorie „nicht bestimmt“ möglich). Gleichzeitig wurde eine Zunahme von Isolatens festgestellt, deren Identifizierungsergebnis *Pseudomonas fluorescens* (künftig: *P. fluorescens*) lautete. In der Interphase (GWBR 6/91) wurden je nach Inkubationsmedium 47-58 % der Isolate, in der Wasserphase 59-63 % der Isolate (Abb. 26 und 28) und im Sediment sogar 78-88 % der Isolate (Abb. 27 und 29) als *P. fluorescens* identifiziert.

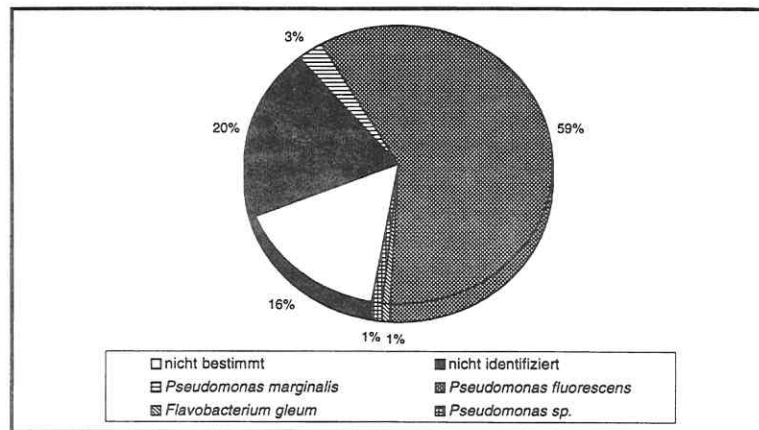


Abb. 26: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994 (Isolationsmedium: R2A-Agar)

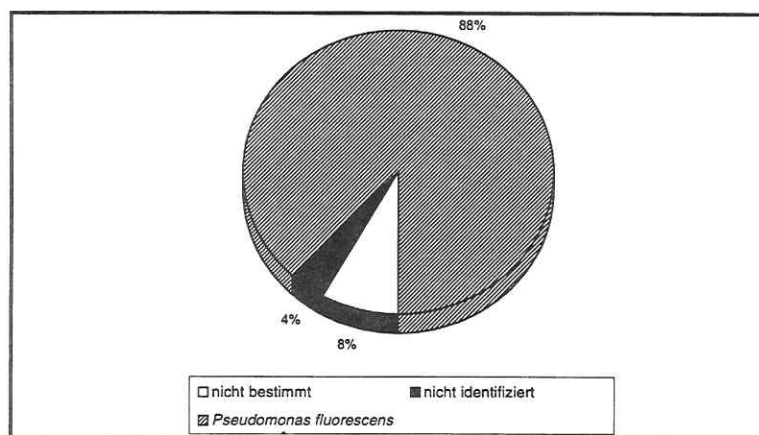


Abb. 27: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus dem Sediment des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994 (Isolationsmedium: R2A-Agar)

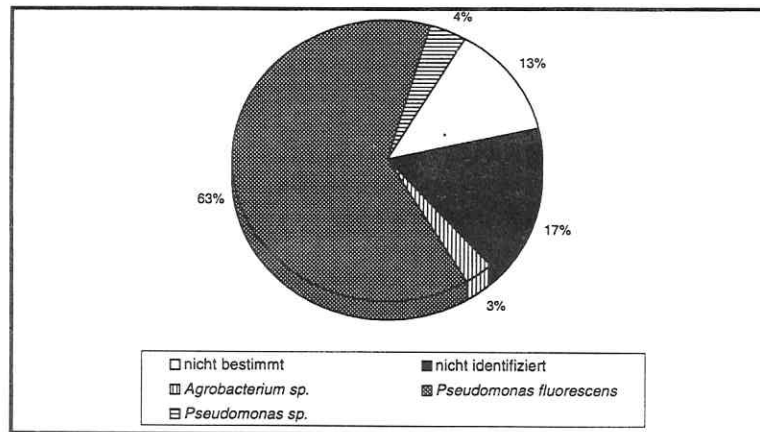


Abb. 28: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Wasserphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994 (Isolationsmedium: SMSÖ)

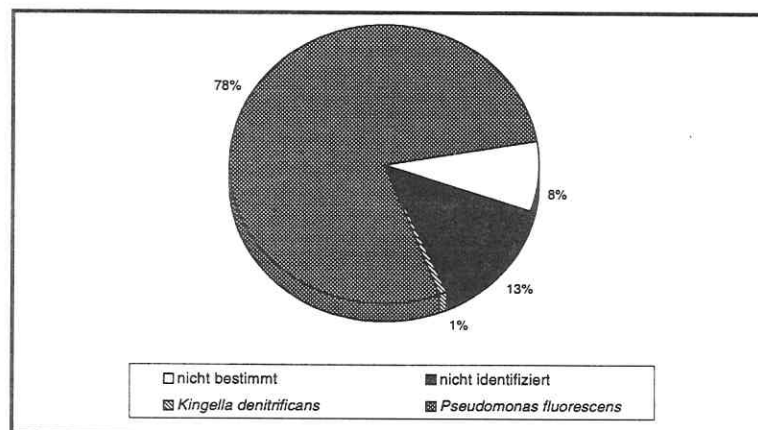


Abb. 29: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus dem Sediment des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994 (Isolationsmedium: SMSÖ)

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden hierbei die Reaktionen auf Pseudo F- und Pseudo P-Agar herangezogen. Dabei bestätigte sich, daß Isolate, die auf Pseudo F-Agar eine gelblich-grüne Färbung und Fluoreszenz bei UV-Licht aufwiesen, im BIOLOG®-System als *P. fluorescens* bestimmt wurden.

Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches wurden auf Pseudo F-Agar inkubiert und zeigten zu 95% die für *P. fluorescens* postulierten Merkmale. Für stichprobenhaft ausgewählte Isolate wurde die Identität *P. fluorescens* im BIOLOG®-System bestätigt (Abb. 31).

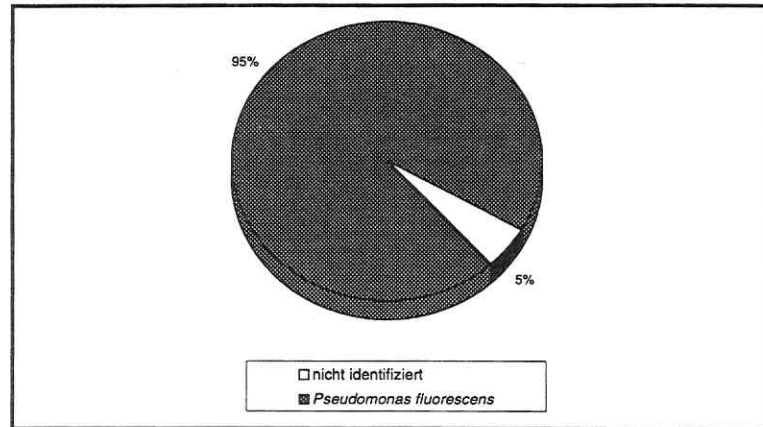


Abb. 30: Prozentualer Anteil der im BIOLOG®-System und auf Pseudo F-Agar identifizierten Bakterienisolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Frühjahr 1994 (Isolationsmedium: SMSÖ)

Der Nachweis von *Photobacterium phosphoreum* in der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches bzw. *Brucella canis* im Sediment des belasteten Grundwasserbereiches muß trotz hoher Ähnlichkeitsindices angezweifelt werden, da es sich dabei um ein marines Bakterium bzw. einen Krankheitserreger handelt, die in den untersuchten Biozönosen nicht vorkommen werden. Diese Isolate mußten daher der Kategorie „nicht identifiziert“ zugeordnet werden.

Aufgrund des für alle Proben sehr hohen Anteils an fluoreszierenden *Pseudomonaden* wurden die Isolate mikrobieller Biozönosen aus verschiedenen Kompartimenten bei späteren Probenahmen zunächst stets auf Pseudo F-Agar kultiviert und charakterisiert. Die Tab. 6 gibt eine Übersicht über die prozentualen Anteile fluoreszierender *Pseudomonaden* in Proben unterschiedlicher Probenahmezeitpunkte und Kompartimente. Sie zeigt den höchsten Anteil fluoreszierender *Pseudomonaden* zum Probenahmezeitpunkt Frühjahr 1994. Kompartimentabhängig sinkt er im Herbst 1994 extrem ab, im Sediment des belasteten Grundwasserbereiches beträgt er nur noch 1 % (Abnahme im Vergleich zu Mai 1994 um 98%), in der Wasserphase nahm er um 91% auf einen Anteil von 6 % ab.

Die im Herbst 1994 aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches isolierten Mikroorganismen wurden im BIOLOG®-System untersucht. Dabei wurden starke Veränderungen in der Zusammensetzung im Vergleich zum Frühjahr 1994 deutlich. Während der Anteil fluoreszierender *Pseudomonaden* im Frühjahr 1994 in der Interphase kompartimentabhängig zwischen 50 und 58 % betrug, wurden im Herbst keine fluoreszierenden *Pseudomonaden* mehr nachgewiesen.

Die Zusammensetzung der Biozönose der Interphase im Herbst 1994 zeigt die Abb. 31.

Tab. 6: Prozentualer Anteil fluoreszierender *Pseudomonaden* in verschiedenen Proben unterschiedlicher Kompartimente und zu unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten

GWBR	Kompartiment	Medium	Probenahmezeitpunkt	Prozentualer Anteil fluoreszierender <i>Pseudomonaden</i>
21/92	Wasser	SMSÖ	Frühjahr 1994	13
6/91	Ölphase	R2A	Frühjahr 1994	55
6/91	Interphase	R2A	Frühjahr 1994	50
6/91	Wasser	R2A	Frühjahr 1994	68
6/91	Sediment	R2A	Frühjahr 1994	86
6/91	Ölphase	SMSÖ	Frühjahr 1994	95
6/91	Interphase	SMSÖ	Frühjahr 1994	58
6/91	Wasser	SMSÖ	Frühjahr 1994	61
6/91	Sediment	SMSÖ	Frühjahr 1994	78
Nordrand	Boden	SMSÖ	Frühjahr 1994	3
21/92	Sediment	R2A	Herbst 1994	11
6/91	Wasser	R2A	Herbst 1994	6
6/91	Sediment	R2A	Herbst 1994	1
6/91	Ölphase	R2A	Frühjahr 1995	15
108/94	Ölphase	R2A	Frühjahr 1995	23
108/94	Interphase	R2A	Frühjahr 1995	15
108/94	Wasser	R2A	Frühjahr 1995	36
21/92	Wasser	R2A	Herbst 1995	0
19/92	Wasser	R2A	Herbst 1995	2
108/94	Interphase	R2A	Herbst 1995	21
108/94	Interphase	SM (SÖ)	Herbst 1995	40
108/94	Interphase	SM (MÖ)	Herbst 1995	69

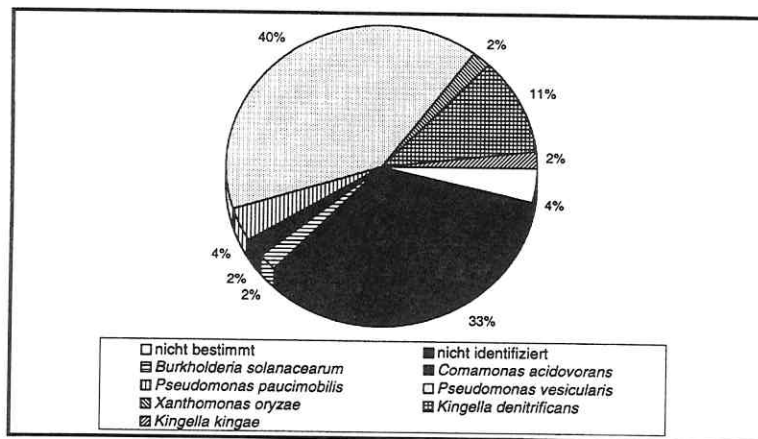


Abb. 31: Prozentualer Anteil der im BILOG®-System identifizierten Bakterienisolate aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 im Herbst 1994 (Isolationsmedium: SMSÖ)

Der Anteil fluoreszierender *Pseudomonaden* an der Gesamtzahl der Isolate ist abhängig vom verwendeten Isolationsmedium.

Bei dem direkten Vergleich dreier verschiedener Medien (R2A-Agar, SMSÖ und SMMÖ) wurden für die Beprobung der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 zum Probenahmezeitpunkt Herbst 1995 folgende Anteile fluoreszierender *Pseudomonaden* an der Gesamtzahl isolierter Bakterien ermittelt: auf SMMÖ 69%, auf SMSÖ 40% und auf R2A-Agar 21%.

Für die Ölphase des belasteten Brunnens (GWBR 6/91) betrug der Anteil fluoreszierender *Pseudomonaden* auf R2A-Agar 55%, auf SMSÖ 95%. Wenngleich die mikrobiellen Biozönosen der beprobten Kompartimente offensichtlich durch einen hohen Anteil an Isolaten geprägt sind, die der Gattung *Pseudomonas* zuzuordnen sind, so befanden sich unter den Isolaten in unterschiedlichen Anteilen Mikroorganismen, bei denen trotz der angewandten Methodenkombination kein Identifizierungsergebnis zu erzielen war. Dieser Anteil betrug in der Wasserphase des unbelasteten Brunnens (GWBR 21/92) 39%, in den verschiedenen Phasen des belasteten Brunnens (GWBR 6/91) 5 bis 17%.

4.3 Biochemisches Abbaupotential für ausgewählte aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe in Isolaten und Gesamtproben

Neben der taxonomischen (BIOLOG, APILAB, Pseudo F) und physiologischen Beschreibung der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönosen anhand von Isolaten stellte die Bestimmung des Degradationspotentials besonders im Hinblick auf die chemische Belastung des Grundwassers vor Ort einen wesentlichen Schwerpunkt der Untersuchungen dar.

Angesichts der extremen grenzwertüberschreitenden Kontamination des Grundwassers mit PAK und Alkanen wurde das Abbaupotential der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches für Mono- und Diaromaten, polycyclischen aromatischen sowie aliphatischen Kohlenwasserstoffen getestet.

4.3.1 Biochemisches Degradationspotential für ausgewählte aromatische Verbindungen in Isolaten

Die Isolate wurden auf das Vorhandensein der Catechol-1,2-Dioxygenase-Aktivität (C12O) und Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität (C23O) nach Inkubation über Nacht auf verschiedenen aromatischen Modellsubstanzen (Na-Benzolat, Phenol, m-Toluat, Naphthalen) untersucht.

4.3.1.1 Nachweis der *ortho*- und *meta*-Spaltung des Brenzcatechins in Isolaten aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches

Die Abb. 32 bis 34 veranschaulichen die prozentuale Verteilung von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten in verschiedenen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches im Frühjahr 1994.

Der höchste Anteil degradativer Mikroorganismen konnte unter Isolaten aus der Ölphase ermittelt werden. Diese Tendenz wurde auf beiden Isolationsmedien (R2A-Agar und SMSÖ) bestätigt (Abb. 32 und 33). Der Anteil der Bakterien, die Brenzcatechin durch *ortho*-Spaltung umsetzen, war stets höher als der Anteil von Mikroorganismen, die Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten aufwiesen. Das höchste Potential zur Umsetzung von Brenzcatechin sowohl über den *ortho*- als auch über den *meta*-Weg wurde nach Induktion auf Naphthalen festgestellt.

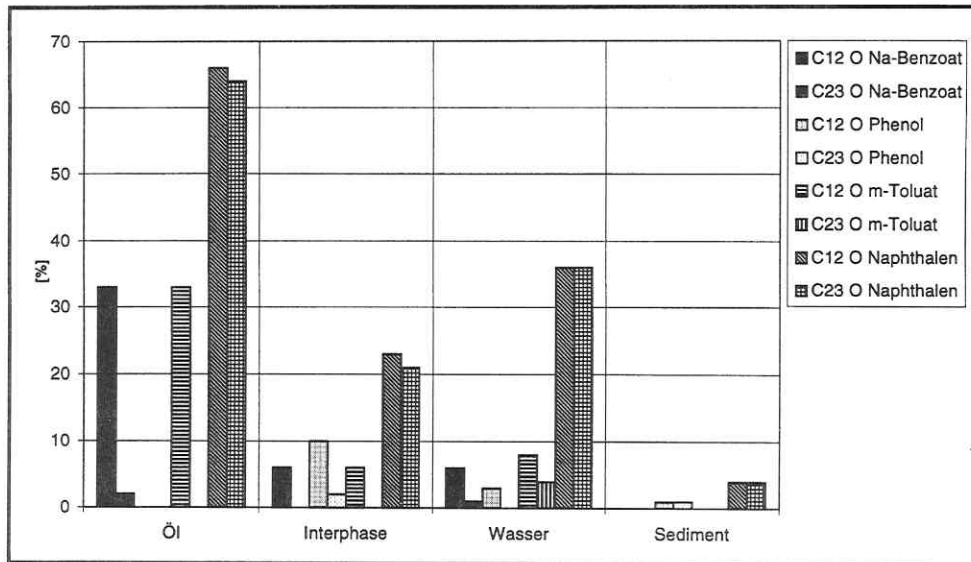


Abb. 32: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 (Isolation von R2A-Agar)

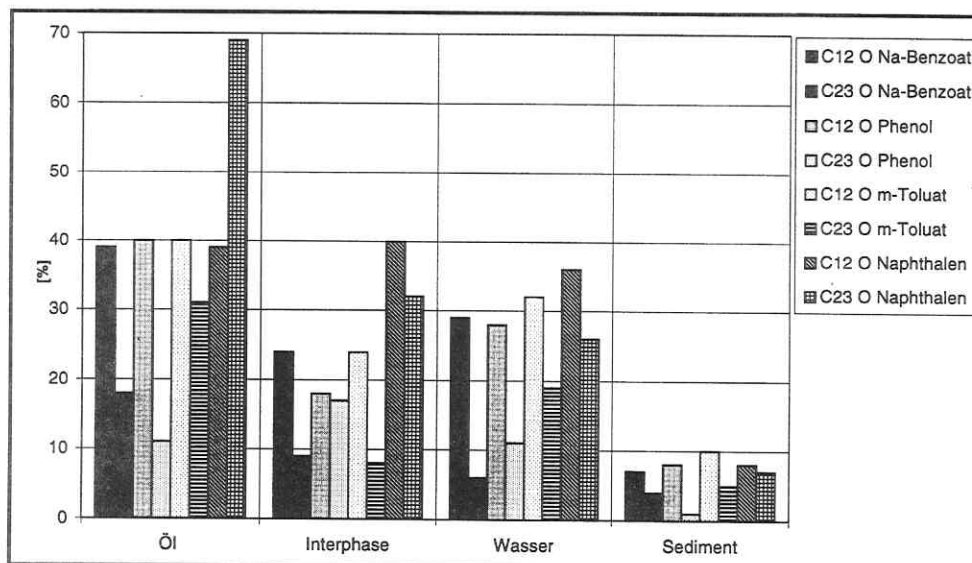


Abb. 33: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 (Isolation von SMSO)

Auch die Isolate aus der Interphase und dem Sediment des belasteten Grundwasserbereiches wiesen ein hohes Abbaupotential für aromatische Kohlenwasserstoffe auf (Abb. 32 und 33). Die Umsetzung des Brenzcatechins erfolgte vorzugsweise durch *ortho*-Spaltung. Wäh-

rend sowohl der *ortho*- als auch der *meta*-Weg in Isolaten aus der Interphase bevorzugt durch Naphthalen induziert wurden, führten *m*-Toluat bzw. Naphthalen in Isolaten aus dem Sediment am häufigsten zur Induktion der Catechol-1,2-Dioxygenase bzw. Catechol-2,3-Dioxygenase (Abb. 33). Der höchste prozentuale Anteil degradativer Mikroorganismen an der Gesamtzahl der Isolate aus der Wasserphase konnte für die Induktion der *ortho*- und *meta*-Spaltung durch Naphthalen nachgewiesen werden. In der Wasserphase wurden die geringsten absoluten Zahlen abbauaktiver Mikroorganismen festgestellt. (Dargestellte Ergebnisse -Abb. 33- beziehen sich auf Isolate aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen.)

Der Einfluß des ursprünglichen Inkubationsmedium auf den Anteil degradativer Mikroorganismen zeigt sich beim Vergleich der Abb. 32 und 33. Von R2A-Agar wurde zumeist ein wesentlich geringerer Anteil abbauaktiver Bakterien isoliert als von SMSÖ. Auch die Zahl der Bakterien, in denen der *meta*-Weg der Brenzcatechinumsetzung durch die getesteten Modellschubstanzen induziert werden konnte, war bei Isolaten von R2A-Agar wesentlich geringer. Die Isolate aus der Wasserphase und dem Sediment des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) zeigten auf R2A-Agar in Abhängigkeit vom Induktor deutliche Unterschiede in ihrem Anteil abbauaktiver Mikroorganismen (Abb. 34). Dabei wurde der *meta*-Weg der Brenzcatechinumsetzung in Isolaten aus der Wasserphase am häufigsten durch Na-Benzoesäure und *m*-Toluat induziert. Isolate mit Catechol-1,2-Dioxygenase-Aktivität konnten im Sediment bevorzugt nach Induktion durch Naphthalen festgestellt werden. Unter den Isolaten aus der Wasserphase (Isolation von R2A-Agar) wurden keine Mikroorganismen nachgewiesen, bei denen eine Induktion der Expression der Catechol-2,3-Dioxygenase durch Naphthalen möglich war (Abb. 34).

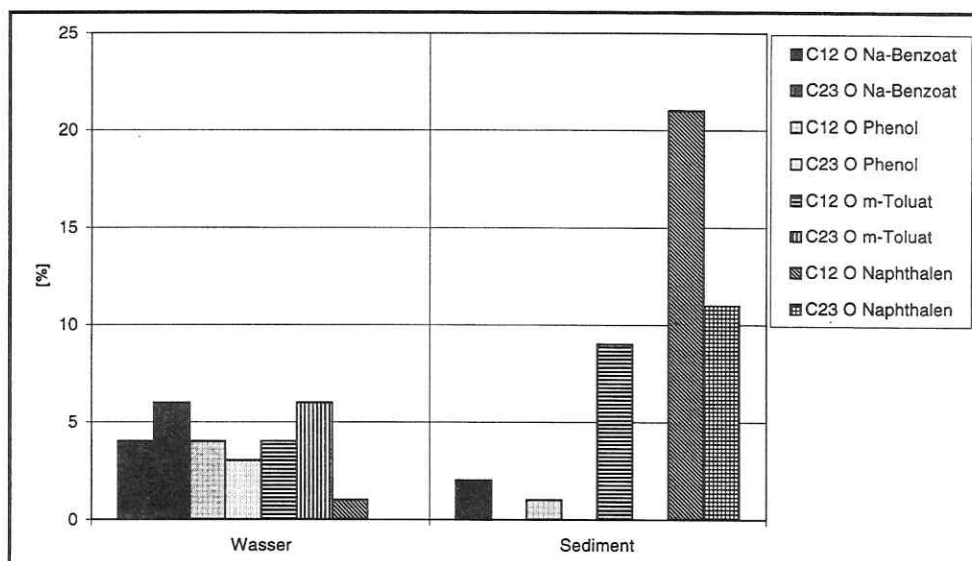


Abb. 34: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O-Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 (Isolation von R2A-Agar)

Bei keinem der untersuchten Mikroorganismen aus dem Sediment konnte eine durch Na-Benzoesäure, Phenol oder *m*-Toluat induzierbare Catechol-2,3-Dioxygenaseaktivität bestimmt werden. Isolate mit Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität wurden im Sediment am häufigsten nach Induktion durch Naphthalen nachgewiesen (Abb. 34).

4.3.1.2 Stabilität des Degradationspotentials - Untersuchungen der Isolate ausgewählter Biozönosen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Das Abbaupotential für aromatische Verbindungen wurde von Isolaten aus ausgewählten Biozönosen verschiedener Kompartimente des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zu späteren Probenahmezeitpunkten bestimmt, um zu überprüfen, ob der Anteil degradativer Mikroorganismen auch über einen längeren Zeitraum in den Biozönosen stabil bleibt. Die folgenden Abb. 35 und 36 stellen die ermittelten prozentualen Anteile abbauaktiver Isolate aus der Ölphase zu unterschiedlichen Zeitpunkten dar.

Die Abb. 35 zeigt in der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) eine kontinuierliche Zunahme des Anteils der für Na-Benzoesäure, Phenol und *m*-Toluol abbauaktiver Isolate von R2A-Agar, die über Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten verfügen. Lediglich bei der Induktion durch Naphthalen war von Frühjahr 1994 bis Frühjahr 1995 ein starker Rückgang zu beobachten. Im Herbst nahm der Anteil abbauaktiver Isolate mit Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten wieder zu. Die Zahl der Isolate, die über den *ortho*-Weg der Brenzcatechinumsetzung verfügten, ging (bis auf die Induktion durch Phenol) von Frühjahr 1994 bis Frühjahr 1995 zunächst stark zurück. Die im Frühjahr 1995 erreichten Werte stabilisierten sich (Naphthalen, Phenol) bzw. erhöhten sich um das Doppelte (*m*-Toluol) bis Dreifache (Na-Benzoesäure). Auffällig war ebenfalls, daß die Isolate aus mikrobiellen Biozönosen der Ölphase im Frühjahr 1995 und im Herbst 1995 hinsichtlich ihres Degradationspotential eine größere Diversität in ihrer Zusammensetzungen aufwiesen. Im Unterschied zum Frühjahr 1994 konnten in diesen Biozönosen in ähnlichen Anteilen Mikroorganismen nachgewiesen werden, in denen *ortho*- und *meta*-Spaltung des Brenzcatechins induzierbar waren.

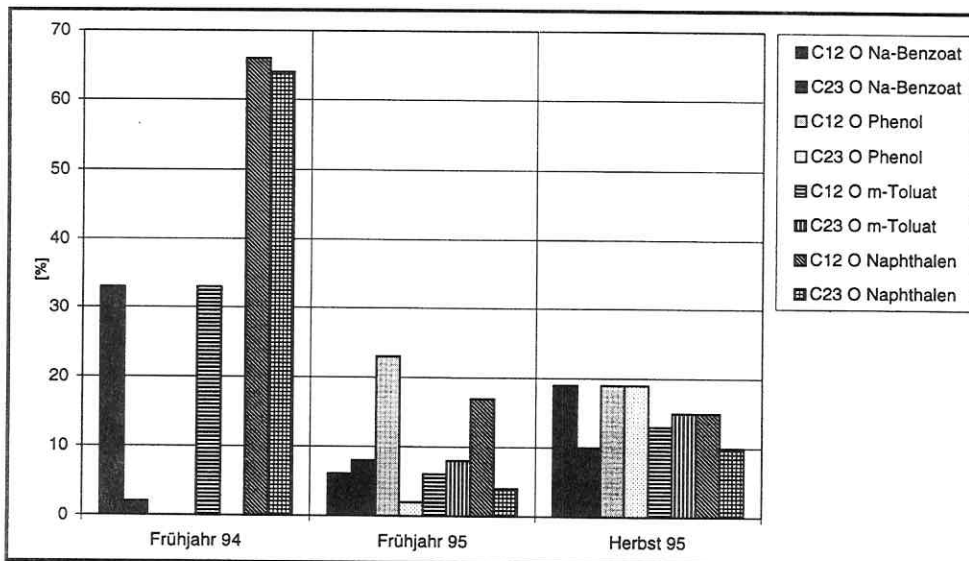


Abb. 35: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Isolationsmedium: R2A-Agar)

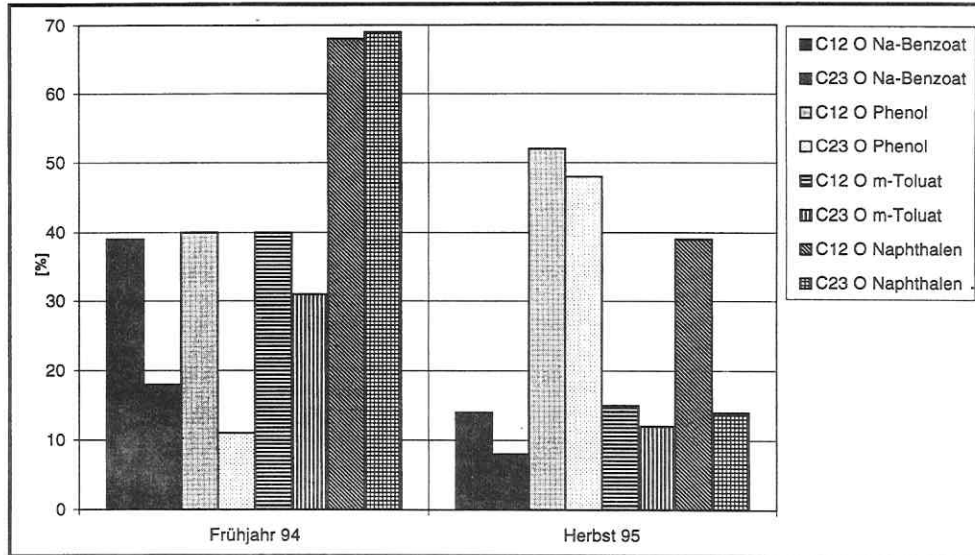


Abb. 36: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Isolationsmedium: SMSÖ)

Die Abb. 36 zeigt, daß das Degradationspotential der Bakterien (Isolation von SMSÖ) aus der Ölphase auch über einen längeren Zeitraum (Frühjahr 1994-Herbst 1995) stabil war. Die Diversität der Abbauleistungen (beide Enzymsysteme durch alle getesteten Modellsbstanzzen induzierbar) blieb erhalten. Unterschiede konnten lediglich im Anteil der für die einzelnen Substanzen degradativen Bakterien an der Gesamtzahl der Isolate nachgewiesen werden. Dabei war der Rückgang des Anteils *m*-Toluat und Naphthalen abbauender Mikroorganismen und die deutliche Zunahme Phenol abbauender Bakterien vom Frühjahr 1994 zum Herbst 1995 signifikant.

Verglichen wurde das Abbaupotential von Isolatzen aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) im Frühjahr und Herbst 1994. Induktorabhängig sind Schwankungen des prozentualen Anteils degradativer Isolate festzustellen (Tab. 7).

Tab. 7: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Interphase des GWBR 6/91)

Belasteter Grundwasserbereich (GWBR 6/91) Interphase (Standardmedium mit 1% Spindelöl)		
Enzym (Induktor)	Frühjahr 1994	Herbst 1994
C12O (Na-Benzoat)	24	19
C23O (Na-Benzoat)	9	9
C12O (Phenol)	18	23
C23O (Phenol)	17	11
C12O (<i>m</i> -Toluat)	24	4
C23O (<i>m</i> -Toluat)	8	2
C12O (Naphthalen)	40	21
C23O (Naphthalen)	32	9

Während für die durch Na-Benzoesäure, *m*-Toluat und Naphthalen induzierte Catechol-1,2-Dioxygenase-Aktivität eine deutliche Abnahme des prozentualen Anteils degradativer Mikroorganismen festzustellen war, konnte im Herbst 1994 in einer größeren Anzahl von Isolaten die durch Phenol induzierte Catechol-1,2-Dioxygenase Expression nachgewiesen werden. Ein unterschiedlich starker Rückgang des Anteils von Mikroorganismen mit Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität von Frühjahr zum Herbst wurde bei den Induktoren *m*-Toluat, Phenol und Naphthalen festgestellt. Das Abbaupotential für Na-Benzoesäure blieb hingegen stabil.

Die Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) wurde hinsichtlich ihres Potentials zum Abbau mono- und diaromatischer sowie polycyclischer aromatischer Substanzen im Frühjahr 1994 und Frühjahr 1995 untersucht (Tab. 8).

Tab. 8: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit C12O- und C23O- Aktivitäten an der Gesamtzahl der Isolate zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Wasserphase des GWBR 21/92)

Unbelasteter Grundwasserbereich 21/92 Wasserphase (R2A-Agar)		
Enzym (Induktor)	Frühjahr 1994	Frühjahr 1995
C12O (Na-Benzoesäure)	4	nicht nachweisbar
C23O (Na-Benzoesäure)	6	nicht nachweisbar
C12O (Phenol)	4	nicht nachweisbar
C23O (Phenol)	3	nicht nachweisbar
C12O (<i>m</i> -Toluat)	4	2
C23O (<i>m</i> -Toluat)	6	2
C12O (Naphthalen)	1	nicht nachweisbar
C23O (Naphthalen)	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

Der Anteil degradativer Isolate aus der Wasserphase zeigte im unbelasteten Grundwasserbereich innerhalb eines Jahres einen signifikanten Rückgang. Zudem konnten die Induktoren Na-Benzoesäure, Phenol und Naphthalen in keinem der Isolate die *ortho*- oder *meta*-Spaltung des Brenzcatechins induzieren.

4.3.1.3 Einfluß des ursprünglichen Isolationsmediums auf den Anteil degradativer Isolate in unterschiedlichen Biozönosen

Der Einfluß des Isolationsmediums auf den Anteil degradativer Bakterien wurde am Beispiel der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 und der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 108/94 untersucht. Dabei wurden die Anteile abbaubarer Mikroorganismen an der Gesamtzahl der Bakterien, die von unterschiedlichen Medien isoliert worden waren, bestimmt und verglichen. Es sollte getestet werden, ob das für Grundwasseruntersuchungen empfohlene R2A-Medium geeignet ist, eine Kultivierung vergleichbarer Anteile degradativer Mikroorganismen zu ermöglichen wie die Standardmedien mit Spindelöl (SMSÖ) bzw. Mineralölrestgemisch (SMMÖ).

Für die Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) ergab sich bei der Inkubation auf SMSÖ ein oftmals höherer Anteil degradativer Isolate als bei der Inkubation auf R2A-Agar (Tab. 9). Die Differenzen waren offensichtlich abhängig vom Induktor. Danach beeinflusste das ursprüngliche Isolationsmedium am stärksten die Etablierung Phenol und Naphthalen degradativer Mikroorganismen. Hierbei wurde ein geringerer Anteil auf R2A-Agar als auf SMSÖ nachgewiesen. Hingegen schien der Anteil *m*-Toluat und Na-Benzoesäure abbauender Bakterien unabhängig vom ursprünglichen Isolationsmedium der Mikroorganismen zu sein bzw. durch das Wachstum auf R2A-Agar erhöht zu werden.

Tab. 9: Abhängigkeit des prozentualen Anteils degradativer Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 vom ursprünglichen Isolationsmedium

Belasteter Grundwasserbereich 6/91 Ölphase (Herbst 1995)		
Enzym (Induktor)	R2A-Agar	SMSÖ
C12O (Na-Benzoesäure)	19	14
C23O (Na-Benzoesäure)	10	8
C12O (Phenol)	19	52
C23O (Phenol)	19	48
C12O (<i>m</i> -Toluol)	13	15
C23O (<i>m</i> -Toluol)	15	12
C12O (Naphthalen)	15	39
C23O (Naphthalen)	10	14

Für die Biozönose der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 bewirkte die Inkubation auf SMMÖ einen zumeist höheren Anteil degradativer Isolate mit Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität (Tab. 10). Am deutlichsten zeigte sich der Einfluß des ursprünglichen Isolationsmediums auf die Etablierung Naphthalen degradativer Mikroorganismen. Hierbei wurde auf SMMÖ ein mehr als zehnfach höherer Anteil abbaubarer Isolate nachgewiesen als auf SMSÖ.

Tab. 10: Abhängigkeit des prozentualen Anteils degradativer Isolate aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 vom ursprünglichen Isolationsmedium

Belasteter Grundwasserbereich 108/94 Interphase (Herbst 1995)		
Enzym (Induktor)	SMSÖ	SMMÖ
C12O (Na-Benzoesäure)	6	4
C23O (Na-Benzoesäure)	2	8
C12O (Phenol)	17	21
C23O (Phenol)	10	12
C12O (<i>m</i> -Toluol)	12	8
C23O (<i>m</i> -Toluol)	4	4
C12O (Naphthalen)	4	62
C23O (Naphthalen)	4	40

Für eine Vielzahl degradativer Isolate konnten Aktivitäten sowohl für die Catechol-1,2-Dioxygenase als auch für die Catechol-2,3-Dioxygenase ermittelt werden. Die folgende Tab. 11 vergleicht den prozentualen Anteil der Isolate, die über beide Enzymsysteme verfügen.

Aus der Tab. 11 wird ersichtlich, daß die mikrobiellen Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91 und GWBR 108/94) über eine Vielzahl abbaubarer Isolate verfügten, die sowohl die *ortho*- als auch die *meta*-Spaltung des Brenzcatechins katalysieren konnten. Die Aussage trifft insbesondere auf Bakterien aus der Öl-, Inter- und Wasserphase zu, die insgesamt durch ein hohes Abbaupotential für alle untersuchten Modellschubstanzen gekennzeichnet waren. Besonders hoch war der Anteil degradativer Isolate, in denen beide Enzymsysteme durch Naphthalen induziert werden konnten.

Tab. 11: Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit Catechol-1,2-Dioxygenase- und Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität an der Gesamtzahl der Isolate (Abkürzungen: W- Wasserphase, IP-Interphase; S-Sediment)

GWBR	Kompartiment	Datum	Medium	Prozentualer Anteil von Mikroorganismen mit Catechol-1,2-Dioxygenase- und Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität an der Gesamtzahl der Isolate			
				Na-Benzoesäure	Phenol	<i>m</i> -Toluat	Naphthalen
21/92	W	Frühjahr 1994	R2A	1		1	
21/92	S	Frühjahr 1994	R2A				10
6/91	Öl	Frühjahr 1994	R2A	2			63
6/91	Öl	Frühjahr 1994	SM (SÖ)	12	9	19	34
6/91	IP	Frühjahr 1994	R2A		2		21
6/91	IP	Frühjahr 1994	SM (SÖ)	8	6	6	28
6/91	W	Frühjahr 1994	R2A	1		1	26
6/91	W	Frühjahr 1994	SM (SÖ)	4	10	17	22
6/91	S	Frühjahr 1994	R2A		1		1
6/91	S	Frühjahr 1994	SM (SÖ)	4	1	5	6
6/91	IP	Herbst 1994	SM (SÖ)	9	11	2	9
21/92	W	Frühjahr 1995	R2A			2	
6/91	Öl	Frühjahr 1995	R2A	4	2	4	4
6/91	Öl	Herbst 1995	R2A	8	17	13	6
6/91	Öl	Herbst 1995	SM (SÖ)	8	48	11	11
108/94	IP	Herbst 1995	SM (SÖ)	2	8	4	4
108/94	IP	Herbst 1995	SM (MÖ)	2	10	2	37

4.3.2 Biochemisches Degradationspotential für ausgewählte aliphatische Verbindungen in Isolaten

Die Bestimmung des Abbaupotentials der Mikroorganismen erfolgte zunächst mit Hilfe des von BECKER (1993) beschriebenen Petrischalentests. Hierbei wurde einem Minimalmedium Tetrazoliumsalz zugesetzt. Die Mikroorganismen wurden entweder durch ein im Deckel befindliches Filterpapier, das mit dem entsprechenden n-Alkan befeuchtet war, mit Kohlenstoff

versorgt oder die Kohlenwasserstoffverbindung wurde in entsprechender Konzentration in das Medium eingemischt. Die durch die Oxidation der Kohlenwasserstoffverbindung freigesetzten Elektronen reduzierten das Tetrazoliumsalz, was zur Bildung von Formazan und zur Färbung der Kolonien führte.

Aus Kosten- und Zeitgründen wurde dieser Petrischalentest durch den als qualitativen Schnelltest entwickelten, modifizierten BIOLOG®-MT-Plattentest ersetzt (BIRGER et al., 1996).

Der modifizierte BIOLOG®-MT-Test macht sich das Prinzip des BIOLOG®-Systems zunutze. Die Oxidation einer beliebigen Kohlenstoffquelle bewirkt die Freisetzung von Reduktionsäquivalenten, die wiederum die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes zu Formazan bewirken. Die damit einhergehende Violett-färbung kann visuell oder durch Ermittlung des Extinktionswertes bei 590 nm bestimmt werden. Sie deutet direkt auf die Nutzung der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle hin. Für die Untersuchungen wurden die von der Fa. BIOLOG® zur Verfügung gestellten BIOLOG®-MT-Platten verwendet. Diese Mikrotiterplatten sind bereits mit Tetrazoliumchlorid beschickt, die Kohlenstoffquelle kann jedoch frei gewählt werden. Die Verwendung der Platten ermöglichten es, gleichzeitig von 96 Isolaten das Abbaupotential für n-Alkane zu bestimmen. Als Kohlenstoffquellen wurden n-Alkane mit der Kettenlänge C8-C16 berücksichtigt. Die Kohlenstoffverbindungen wurden den Mikroorganismen über die Gasphase zugeführt (Abschnitt 3 Materialien und Methoden).

Dieser Test wurde einerseits für die Bestimmung des Abbaupotentials für aliphatische Verbindungen von Einzelisolaten genutzt und andererseits zur Ermittlung des Degradationspotentials mikrobieller Biozönosen aus Originalproben angewandt. Das Potential der Gesamtprobe konnte über die Bestimmung der *MPN* abgeschätzt werden. Die einfache und schnelle Handhabung des Tests erlaubte zudem eine große Zahl von Parallelansätzen zur Absicherung der ermittelten *MPN*-Werte.

4.3.2.1 Biochemisches Abbaupotential von Einzelisolaten für ausgewählte n-Alkane (Petrischalentest)

Mit Hilfe des Petrischalentests wurden insgesamt 223 Isolate aus 3 Proben hinsichtlich ihres Abbaupotentials für aliphatische Kohlenwasserstoffe untersucht. Als Kohlenstoffquellen wurden Octan (Gasphase), Nonan und Undecan als ungeradzahlige Alkane (Zusatz zum Medium) und Decan als weiteres geradzahliges n-Alkan getestet (Zusatz zum Medium). Die Tab. 12 zeigt die ermittelten prozentualen Anteile degradativer Isolate.

Tab. 12: Prozentualer Anteil degradativer Mikroorganismen an der Gesamtzahl der Isolate in verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches 6/91

Kompartiment	Öl	Wasser
Isolationsmedium	R2A	R2A
Octan	23	33
Nonan+Undecan	17	32
Decan	16	29

Aus der Tab. 12 geht hervor, daß sich die Anteile degradativer Isolate zwischen den Kompartimenten unterschieden. So war der Anteil degradativer Mikroorganismen unter den Isolaten aus der Wasserphase höher als aus der Ölphase. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Bakterien aus verschiedenen Verdünnungsstufen isoliert wurden, ergeben sich in der Ölphase höher absolute Zahlen abbauaktiver Mikroorganismen.

4.3.2.2 Biochemisches Abbaupotential von Einzelisolaten aus dem unbelasteten Grundwasserbereich (GWBR 21/92) für ausgewählte n-Alkane- (Modifizierter BIOLOG®-MT-Test)

Die Abb. 37 zeigt die ermittelten prozentualen Anteile der n-Alkanverwerter an der Gesamtanzahl der Isolate aus der Wasserphase und dem Sediment des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92). Da vielfach eine gleichzeitige Nutzung verschiedener n-Alkane nachgewiesen wurde, kann die Summe 100% überschreiten.

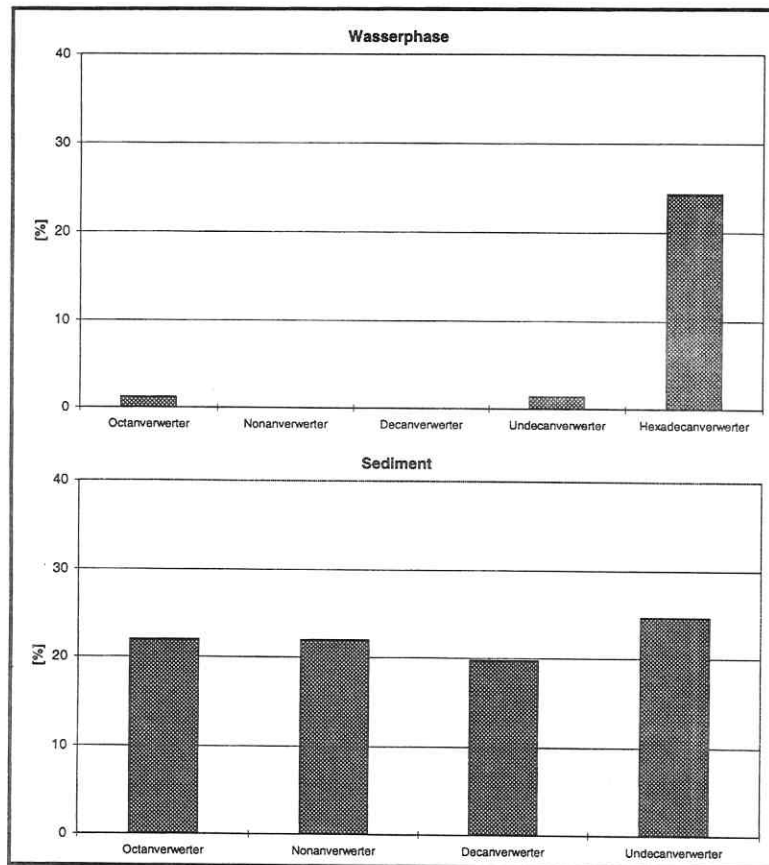


Abb. 37: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtheit der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des unbelasteten Grundwasserbereiches 21/92

Es wurde deutlich, daß ein gravierender Unterschied im Anteil degradativer Mikroorganismen zwischen den Biozönosen beider Phasen bestand. Während in der Wasserphase keine Verwerter von Nonan, Dekan und Undekan ermittelt werden konnten, zeigten zwischen 20 und 25% der Isolate des Sedimentes ein deutliches Abbaupotential für die genannten n-Alkane. Bei 24% der Isolate aus der Wasserphase wurden degradative Leistungen gegenüber Hexadecan festgestellt. Die prozentualen Anteile einzelner Alkanverwerter an der Gesamtzahl der Isolate (Abb. 37) wiesen im Sediment des unbelasteten Grundwasserbereiches keine großen Unterschiede auf. Die Summe der Undecanverwerter stellte zwar mit ca. 25% den größten Anteil dar, jedoch auch zwischen 20 und 22% der Isolate waren zum Abbau der n-Alkane mit 8 bis 10 Kohlenstoffatomen fähig.

Der prozentuale Anteil degradativer Isolate der Wasserphase und des Sedimentes an den Alkanverwertungsklassen wird in der Abb. 38 veranschaulicht.

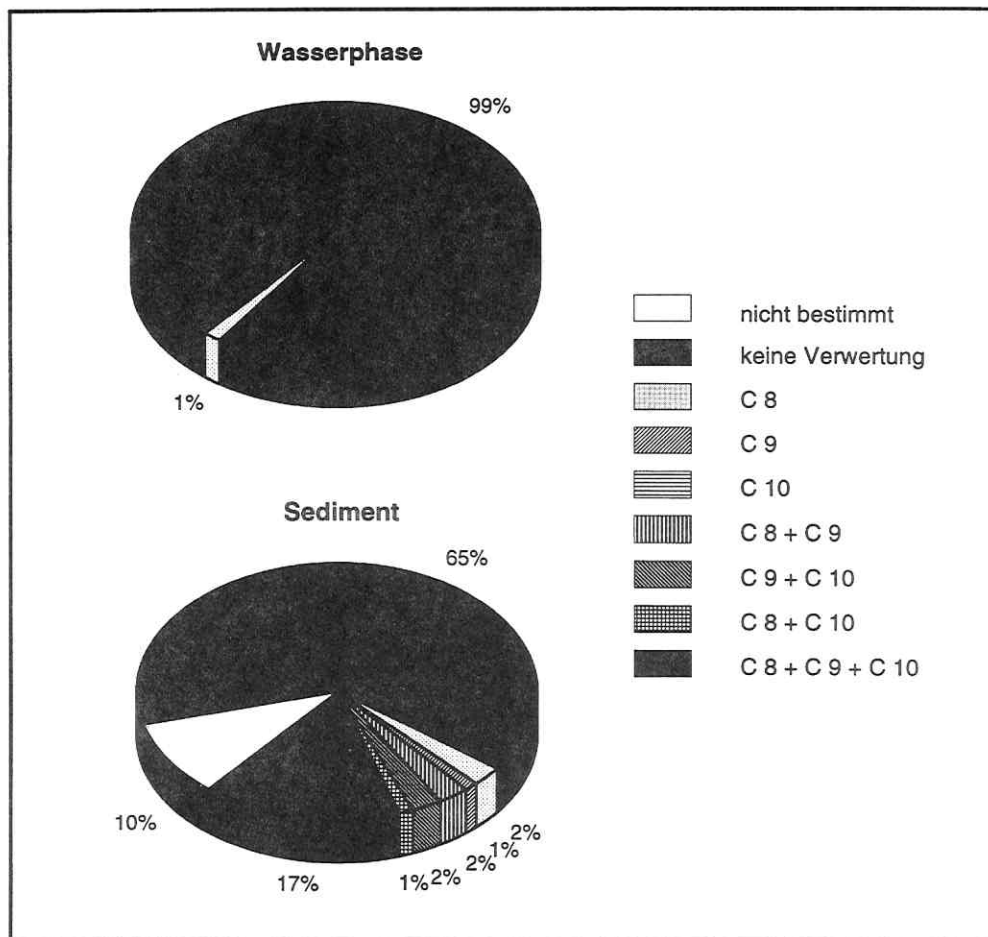


Abb. 38: Prozentualer Anteil der Isolate unterschiedlicher Kompartimente des unbelasteten Grundwasserbereiches GWBR 21/92 an den Alkan-Verwertungsklassen

Dabei wurde bei einer großen Anzahl von Isolate aus der Wasserphase keinerlei Verwertung der getesteten n-Alkane ermittelt. Die Alleinverwertung von Hexadecan bei ca. 96% der Isolate schien auf eine Spezialisierung der Mikroorganismen auf den Abbau von n-Alkanen dieser Kettenlänge hinzuweisen. Lediglich 1% aller abbauaktiven Isolate verwerteten neben Hexadecan auch n-Alkane mit geringerer Kettenlänge (Octan und Undecan).

Die Darstellung der prozentualen Anteile der Isolate an den n-Alkanverwertungsklassen (Abb. 38) zeigt, daß eine Vielzahl der Isolate des Sedimentes befähigt waren, mehr als die n-Alkane einer Kettenlänge zu nutzen. (In dieser Darstellung werden nur die n-Alkane berücksichtigt, die übereinstimmend in allen Biozönosen getestet wurden- Octan-, Nonan-, Decan-, um die Anteile degradativer Mikroorganismen der einzelnen Kompartimente untereinander vergleichen zu können.) Die Gruppe der C8-C10-Verwerter stellte mit 17% die größte Klasse der n-Alkanverwerter dar. Eine Alleinverwertung von Decan konnte bei keinem der Isolate festgestellt werden. (Abb. 38)

Der Anteil der Isolate, die keines der getesteten n-Alkane verwerten konnten, war im unbelasteten Grundwasserbereich in beiden Phasen (Wasser 99% und Sediment 65%) im Vergleich zur belasteten Biozönose relativ hoch.

4.3.2.3 Biochemisches Abbaupotential von Einzelisolaten aus dem belasteten Grundwasserbereich (GWBR 6/91) für ausgewählte n-Alkane- (Modifizierter BIOLOG®-MT-Test)

In der folgenden Abb. 39 sind vergleichend die prozentualen Anteile der Alkanverwerter an der Gesamtanzahl der Isolate aus verschiedenen Phasen des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) dargestellt. (In einigen Fällen wurden die Ergebnisse aus den Petrischalentests Abschnitt 4.3.2.1 einbezogen, um sie im Zusammenhang vergleichend darstellen zu können. Dies ist entsprechend im Text oder in den Tabellen gekennzeichnet.)

Aus der Abb. 39 wird ersichtlich, daß von der Ölphase zum Sediment der prozentuale Anteil der Octanverwerter an der Summe der Isolate kontinuierlich anstieg, sich beinahe verdreifachte. Eine ähnliche Tendenz ergab sich bei dem Vergleich der prozentualen Anteile der Nonan- und Decanverwerter in der Ölphase und im Sediment. Auch hierbei wurde das höchste Abbaupotential im Sediment und das geringste in der Ölphase bestimmt.

Für Isolate aus den Biozönosen der Ölphase (Ergebnisse aus Petrischalentests) und des Sedimentes wurde zudem eine Abnahme des Anteils degradativer Bakterien mit zunehmender Kettenlänge der getesteten n-Alkane festgestellt.

In der Ölphase waren ca. 23% der Isolate zur Octanverwertung befähigt, lediglich 16% wiesen degradative Aktivitäten für Decan auf. In der Interphase und in der Wasserphase traten hingegen die geringsten prozentualen Anteile Nonan verwertender Bakterien auf. Die geradzahigen n-Alkane werden von den Isolaten dieser Biozönosen offensichtlich bevorzugt abgebaut.

Eine deutliche Abnahme des Anteils von Isolaten, die keines der angebotenen n-Alkane verwerten konnten, wurde von der Ölphase zum Sediment festgestellt. Betrug dieser Anteil in der Ölphase 45%, so waren es im Sediment lediglich 11%.

Die Abb. 40 zeigt die prozentualen Anteile der degradativen Isolate an den n-Alkanverwertungsklassen für unterschiedliche Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) vom Isolationsmedium R2A-Agar. (In dieser Darstellung wurden nur die n-Alkane berücksichtigt, die übereinstimmend in allen Biozönosen getestet wurden: Octan, Nonan, Decan-, um die Anteile degradativer Mikroorganismen der einzelnen Kompartimente untereinander vergleichen zu können.)

Aus der Abb. 40 wird ersichtlich, daß die Isolate aus der Ölphase, die kein Degradationspotential aufwiesen, die größte Klasse darstellten. Der Anteil der Isolate, die alle angebotenen n-Alkane (C 8-C 10) verwerten konnten, betrug in der Ölphase 6%.

In der Interphase (Abb. 40) betrug der Anteil der Octan alleinverwertenden Mikroorganismen (10%) ca. ein Fünftel der Gesamtzahl der Octanverwerter. Besonders hoch war der Anteil derer (ca. 38%), die alle angebotenen n-Alkane verwerten konnten. Der Anteil der Isolate, die keines der getesteten n-Alkane nutzen konnten, war geringer als in der Ölphase.

Unter den Isolaten der Wasserphase (Abb. 40) des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) waren 31% der untersuchten Isolate fähig, alle der angebotenen n-Alkane zu verwerten. In der gleichen Größenordnung (ca. 27%) wurde auch der Anteil der Mikroorganismen ermittelt, die keine Abbauaktivitäten zeigten.

11% der Isolate des Sedimentes (Abb. 40) konnte keines der angebotenen n-Alkane nutzen. Die Mikroorganismen, die für alle getesteten n-Alkane degradative Aktivitäten zeigten, stellten mit ca. 37% den größten Anteil dar.

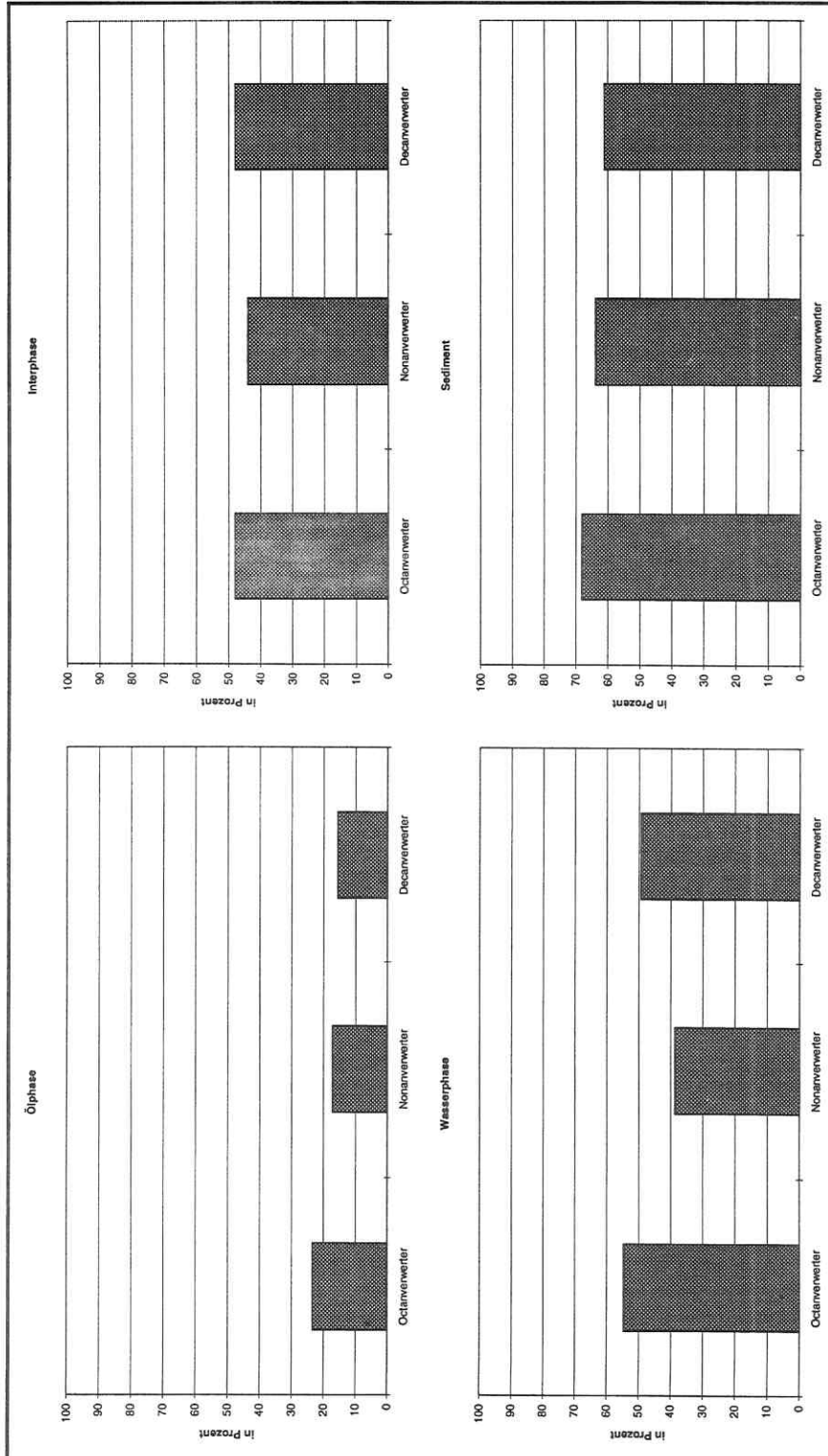


Abb. 39: Prozentualer Anteil der Alkanverweiter an der Gesamtheit der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereich 6/91 (F12A-Agar)

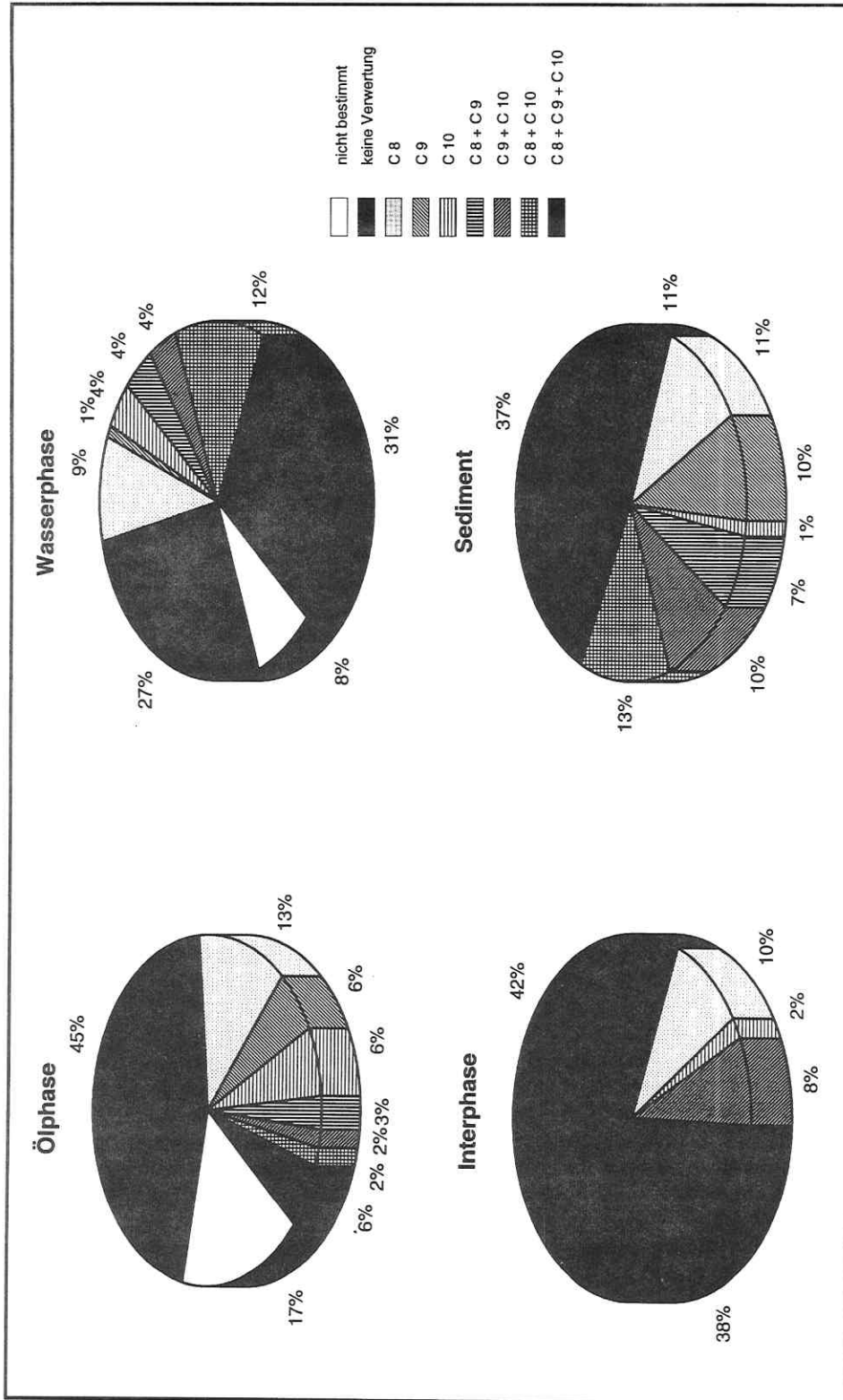


Abb: 40: · Prozentualer Anteil degradativer Isolate aus unterschiedlichen · Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) an den n-Alkanverwertungsklassen (Isolationsmedium RZA-Agar)

Für die von R2A-Agar isolierten Mikroorganismen ergeben sich damit folgende Tendenzen bei der Verteilung in unterschiedlichen Kompartimenten:

- von der Ölphase zum Sediment deutlicher Rückgang derer, die keines der getesteten n-Alkane verwerten konnten, Ölphase: 45%, Sediment: 11%
- von Ölphase zum Sediment Zunahme des Anteils derer, die alle der getesteten n-Alkane verwerten konnten, Ölphase: 6%, Sediment: 37%, deutliche Zunahme bereits von Ölphase zu Interphase
- konstanter Anteil der Octan alleinverwertenden Isolate in allen Phasen.

Neben den Bakterien von R2A-Agar wurden auch die Isolate der Biozönosen von Standardmedium mit 1% Spindelöl (SMSÖ) getestet.

Die Abb. 41 zeigt die prozentualen Anteile der n-Alkanverwerter an der Gesamtanzahl der Isolate für die einzelnen Kompartimente. Die Isolate der Öl- und Interphase wurden zusätzlich hinsichtlich ihres Abbaupotentials für Undecan und Hexadecan getestet.

Aus der Abb. 41 wird ersichtlich, daß besonders in der Ölphase die Summe der Nonan-, Decan und Undecanverwerter sehr hoch war. Am geringsten war der Anteil der Hexadecanverwerter.

Der prozentuale Anteil der Nonan-, Decan- bzw. Undecanverwerter an der Summe der Isolate war in der Interphase (Abb. 41) wesentlich geringer als in der Ölphase. Lediglich der prozentuale Anteil der Octanverwerter wies in beiden Kompartimenten ähnliche Werte auf. In der Wasserphase war die Hälfte aller Isolate zur Verwertung von Octan fähig, der Anteil der Decanverwerter lag höher als in der Interphase. Ein weiterer Rückgang des prozentualen Anteils Nonan verwertender Isolate war wiederum von der Interphase zur Wasserphase nachzuweisen, lediglich jedes dritte Isolat konnte dieses Alkan verwerten.

Im Sediment konnte mit steigender Zahl der Kohlenstoffatome eine Zunahme des Anteils degradativer Isolate nachgewiesen werden.

Durch den Vergleich der Abb. 40 und 42 wird der Einfluß der ursprünglichen Isolationsmedien auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Isolate aus mikrobiellen Biozönosen deutlich. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Isolate an den Alkan-Verwertungsklassen. (In diesen Darstellungen wurden nur die n-Alkane berücksichtigt, die übereinstimmend in allen Biozönosen getestet wurden- Octan, Nonan, Decan-, um die Anteile degradativer Mikroorganismen der einzelnen Kompartimente untereinander vergleichen zu können.)

Der Anteil der Isolate (Isolation von SMSÖ), die keines der angebotenen n-Alkane verwerten konnten, erreichte in der Ölphase (Abb. 42) mit ca. 3 % den niedrigsten Wert aller untersuchten Kompartimente. Die Klasse der Nonan und Decan verwertenden Mikroorganismen war in der Ölphase mit 60 % am größten. Etwa ein Fünftel der Bakterien aus der Ölphase waren in der Lage, alle der getesteten n-Alkane abzubauen.

In der Interphase wiesen 40 % der Isolate keinerlei Abbauaktivitäten gegenüber den getesteten n-Alkanen auf (Abb. 42). Am größten war die Klasse der Isolate, die Octan und Nonan gemeinsam verwerten konnten. Der Anteil der Isolate, die alle getesteten n-Alkane nutzen konnten, ging von der Öl- zur Interphase deutlich zurück.

Die Hälfte der von SMSÖ isolierten Mikroorganismen der Wasserphase konnten keines der angebotenen n-Alkane als Kohlenstoffquelle nutzen (Abb. 42). Die Isolate aus der Wasserphase wiesen damit den höchsten Anteil inaktiver Mikroorganismen auf. Ca. ein Drittel der Isolate zeigte Abbauaktivitäten gegenüber Octan, Nonan und Decan.

Der prozentuale Anteil der Octan bis Decan verwertenden Isolate beträgt im Sediment 40 % und stellt damit die größte Klasse dar (Abb. 42). Etwa ein Drittel der Isolate konnten keines der n-Alkane verwerten.

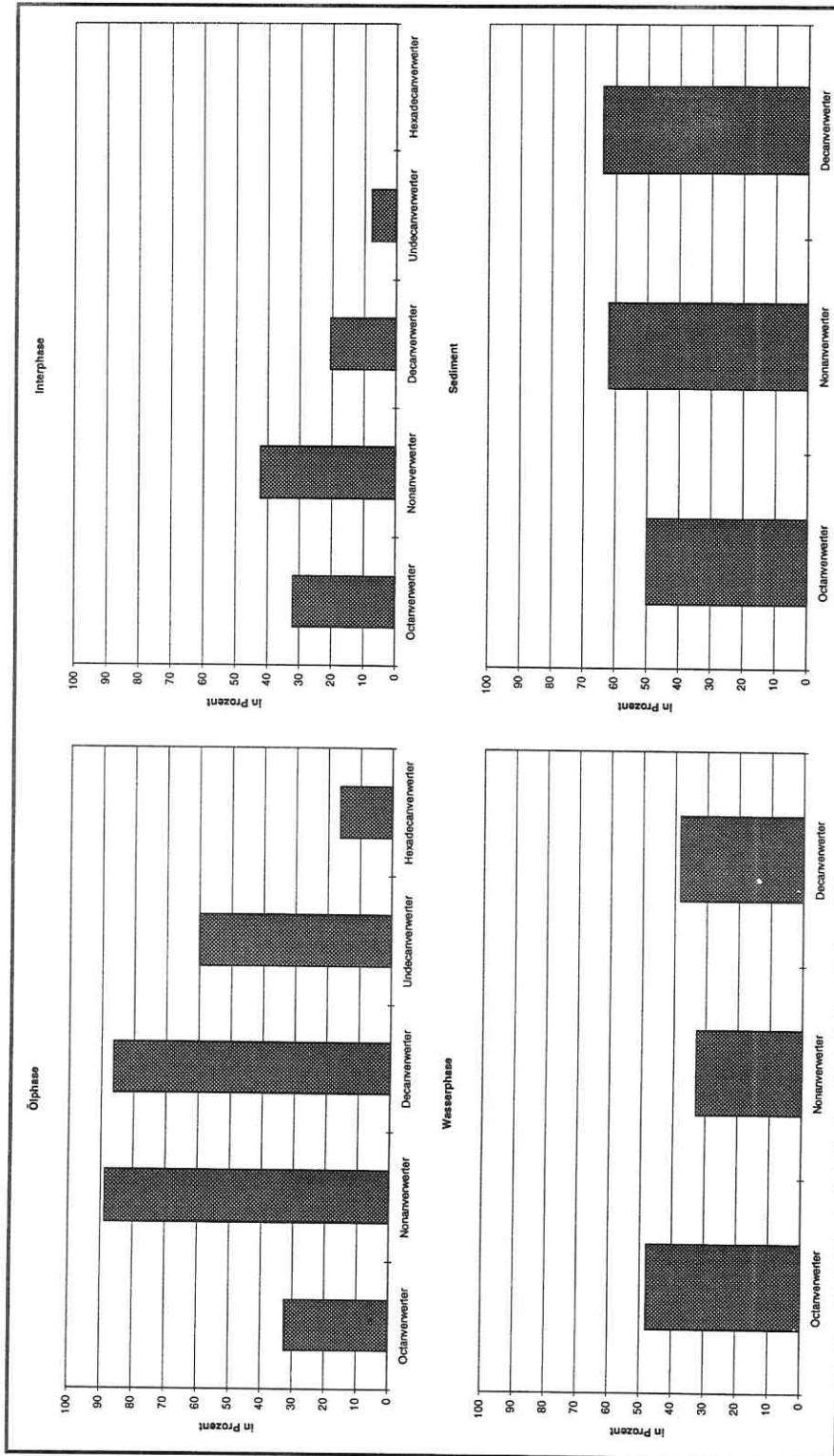


Abb. 41: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtheit der Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereich 6/91 (Standardmedium mit 1% Spindelöl)

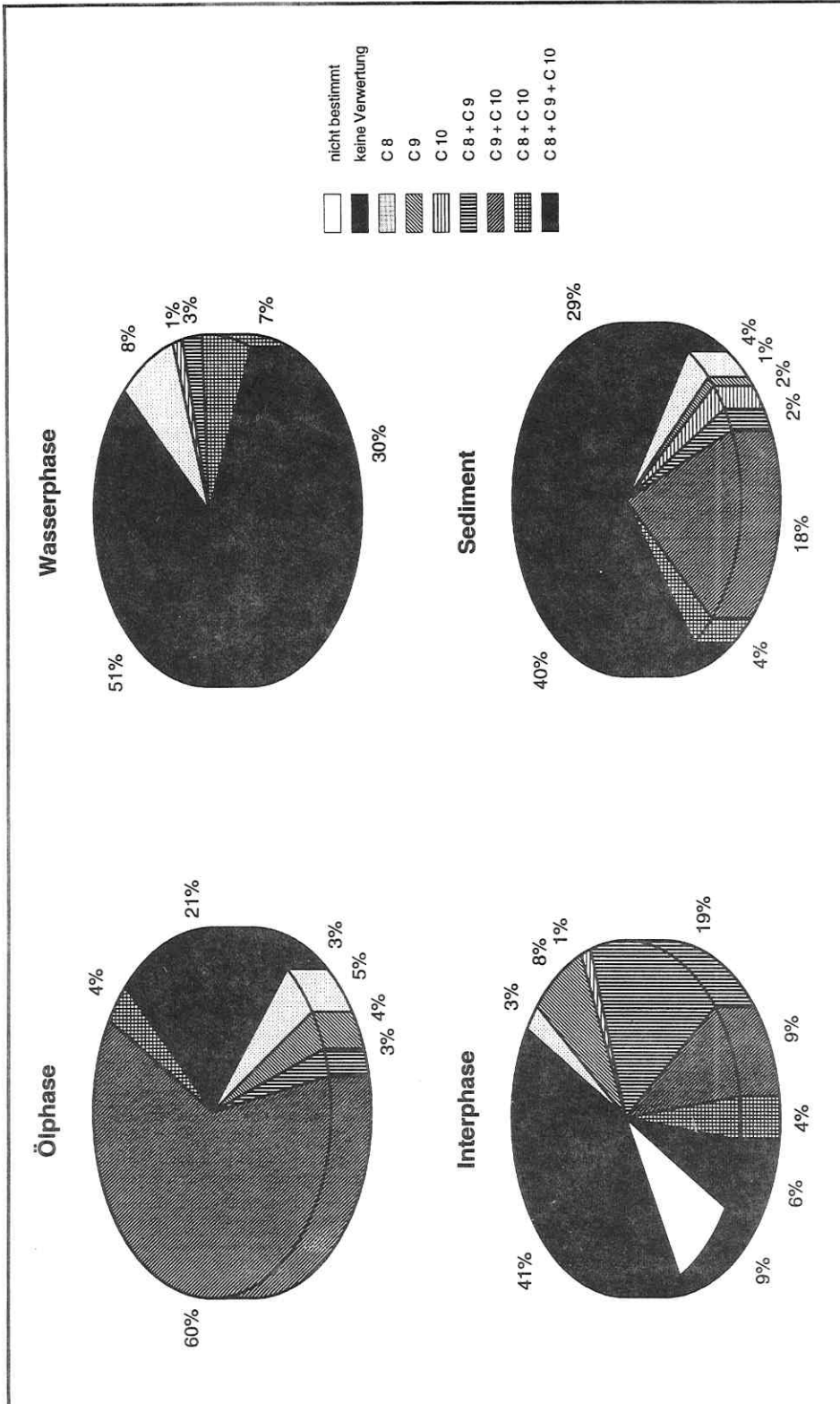


Abb. 42: Prozentualer Anteil degradativer Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) an den n-Alkanverwertungsklassen (Isolationsmedium Standardmedium mit 1 % Spindelöl)

Für die von SMSÖ isolierten Mikroorganismen ergeben sich damit folgende Tendenzen bei der Verteilung in unterschiedlichen Kompartimenten:

- höchster Anteil abbauaktiver Isolate in der Ölphase
- höchster Anteil inaktiver Isolate in der Wasserphase
- in der Interphase geringster Anteil an Isolaten, die alle angebotenen Alkane verwerten konnten, im Sediment höchster Anteil.

Die folgende Tab. 13 gibt die prozentualen Anteile der Alkanverwerter an der Gesamtzahl der Isolate aus der Ölphase in Abhängigkeit vom Isolationsmedium an.

Tab. 13: Prozentualer Anteil der Alkanverwerter an der Gesamtzahl der von unterschiedlichen Medien isolierten Mikroorganismen aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91

Belasteter Grundwasserbereich (GWBR 6/91)		
Ölphase (Frühjahr 1994)		
	R2A-Agar (Petrischalentest)	SMSÖ
Prozentualer Anteil der Octanverwerter an der Summe der isolierten Mikroorganismen, Werte gerundet	23	33
Prozentualer Anteil der Nonanverwerter an der Summe der isolierten Mikroorganismen, Werte gerundet	17	89
Prozentualer Anteil der Decanverwerter an der Summe der isolierten Mikroorganismen, Werte gerundet	16	86

Das Abbaupotential der Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches zeigte eine signifikante Abhängigkeit vom Isolationsmedium (Tab. 13). Die Inkubation auf SMSÖ führte zu einem wesentlich höheren Anteil degradativer Isolate als auf R2A-Agar. Ein wesentlich differenzierteres Bild zeigte sich beim Vergleich des Degradationspotentials der Isolate aus der Interphase, Wasserphase und dem Sediment von verschiedenen Inkubationsmedien.

Im Unterschied zur Ölphase wurde aus der Interphase, der Wasserphase und dem Sediment ein zumeist höherer Anteil abbauaktiver Mikroorganismen von R2A-Agar isoliert als von SMSÖ.

4.3.3 MPN-Werte degradativer Mikroorganismen für ausgewählte aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe in Gesamtproben

Von den Gesamtproben der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) sowie der Ölphase und der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) wurde im Herbst 1996 die MPN degradativer Mikroorganismen für ausgewählte aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe mit Hilfe des modifizierten BIOLOG®-MT-Tests ermittelt. Dabei sollte der Einfluß der meterdicken Ölschicht im Pegelrohr (GWBR 6/91) [seit Herbst 1995] auf das Degradationspotential der mikrobiellen Biozönosen im belasteten Grundwasserbereich bestimmt werden. Zudem sollte die Eignung des modifizierten BIOLOG®-MT-Tests für die Bestimmung des Abbaupotentials von Gesamtproben getestet werden.

Zwischen den Proben aus dem unbelasteten und belasteten Grundwasserbereich zeigten sich signifikante Unterschiede. Überraschenderweise wurden jedoch für die mikrobiellen Biozönosen der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereichs deutlich höhere *MPN*-Werte degradativer Mikroorganismen ermittelt als für die Bakteriengemeinschaften des belasteten Grundwasserbereiches. In Abhängigkeit von der getesteten Substanz betrug die Dichte degradativer Mikroorganismen in der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) zwischen 1 und 10^4 /ml. In der Interphase wurden hingegen zwischen 10^1 und 10^3 degradative Mikroorganismen /ml bestimmt. Auffällig war, daß die mikrobiellen Biozönosen aus der Ölphase für keines der getesteten Kohlenwasserstoffe ein Degradationspotential aufwiesen. Sie wurden daher nicht in der Abb. 43 berücksichtigt. Die Abb. 43 zeigt den Vergleich der *MPN*-Werte degradativer Mikroorganismen der untersuchten Gesamtproben.

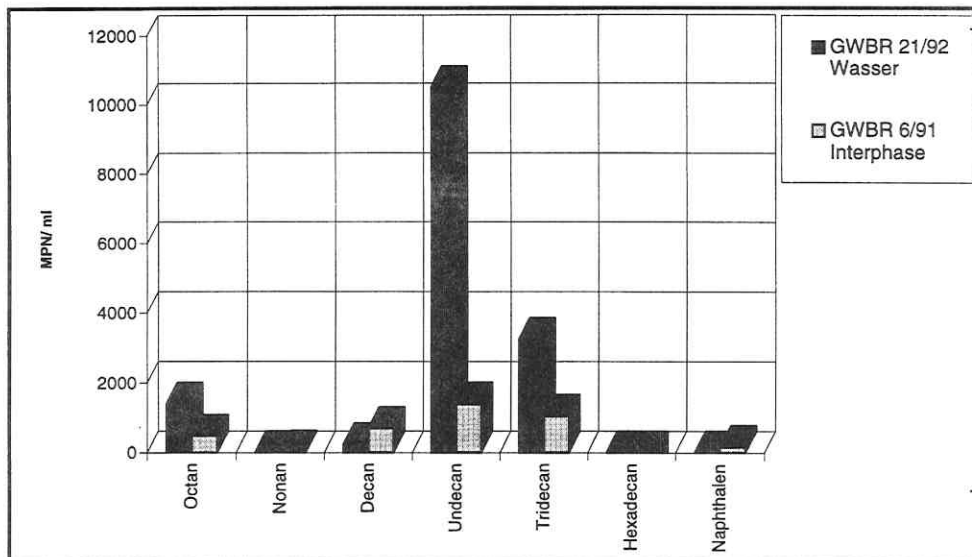


Abb. 43: Vergleich der *MPN*-Werte degradativer Mikroorganismen aus der Gesamtprobe der Wasserphase des unbelasteten (GWBR 21/92) und der Interphase des belasteten (GWBR 6/91) Grundwasserbereiches im Herbst 1996

Die Übersichtung des Grundwassers mit einer meterdicken Ölphase im Pegel (GWBR 6/91) über einen längeren Zeitraum bewirkte vermutlich eine starke Veränderung der Diversität mikrobieller Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches, die mit einem starken Rückgang degradativer Mikroorganismen einhergeht.

Es konnte gezeigt werden, daß der modifizierte BIOLOG®-MT-Test mit einem vertretbaren Zeitaufwand die Abschätzung des Abbaupotentials von Gesamtproben zuläßt und auf die Testung zusätzlicher Kohlenstoffquellen erweitert werden sollte.

4.4 Genverbreitung und Gentransfer degradativer Leistungen

Wie aus den bisher dargestellten Ergebnissen deutlich wurde, hatten die biochemischen Tests in einer Vielzahl der untersuchten Isolate aus Biozönosen unterschiedlicher Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches zum Nachweis eines Abbaupotentials für aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe geführt. Der Anteil der abbaubereitenden Mikroorganismen zeigte eine signifikante Abhängigkeit vom Isolationsmedium sowie der Herkunft der Biozönosen.

Überraschenderweise wurden in einigen Isolaten degradative Eigenschaften sowohl für die getesteten n-Alkane als auch für die Mono- und Diaromaten nachgewiesen.

In der Literatur sind Ergebnisse dokumentiert, aus denen geschlossen werden kann, daß unterschiedliche mikrobielle Populationen für den Abbau aliphatischer bzw. aromatischer Kohlenwasserstoffe verantwortlich sind (FOGHT et al., 1990, SOTSKY et al., 1994).

Angesichts des Abbaupotentials einiger Isolate für beide Kohlenwasserstoffklassen war es von besonderem Interesse, die genannte Hypothese am zur Verfügung stehenden Probenmaterial (Isolate aus Biozönosen belasteter Grundwasserbereiche) zu überprüfen. Dies erforderte die Anwendung molekularbiologischer Methoden. Diese Techniken gestatteten es zudem, die Ergebnisse aus den biochemischen Tests auf molekularbiologischer Ebene zu bestätigen und zu präzisieren.

Dabei stand zunächst im Mittelpunkt, Gene bzw. Genfragmente, die Enzyme „klassischer“ Wege des Aliphaten- und Aromatenabbaus codieren, in ausgewählten Isolaten nachzuweisen. Durch die Anwendung molekularbiologischer Techniken wurden auch Hinweise über die Dynamik der Verteilung des Abbaupotentials innerhalb der Populationen erwartet. Untersuchungen zum Vorkommen von Plasmiden in ausgewählten Isolaten bzw. zur Lokalisierung von Genen bzw. Genfragmenten degradativer Enzyme auf diesen Plasmiden waren vorgesehen.

Dabei wurden Gensequenzen von Enzymen mit initialer bzw. mit Bedeutung im weiteren Abbau aromatischer (Monoaromaten, PAK) und aliphatischer Kohlenwasserstoffe berücksichtigt:

xyl E

Diese Gensequenz codiert die Catechol-2,3-Dioxygenase im *lower pathway* der *meta*-Spaltung aromatischer Kohlenwasserstoffe. Das Produkt des xyl E-Genes wurde im Verlaufe der Bestimmung des biochemischen Abbaupotentials in einer Vielzahl von Umweltisolaten nachgewiesen (Abschnitt 4.3.1).

nah Ac

Diese Gensequenz ist Bestandteil des auf dem NAH 7-Plasmid lokalisierten nah-Operons aus *P. putida* G7. Es codiert die Naphthalendioxygenase, das Initialenzym des Naphthalenabbaus. Durch den Nachweis dieser Gensequenz sollte das Potential der untersuchten Biozönosen zum Abbau von Naphthalen molekularbiologisch bestätigt werden (Abschnitt 4.3.1).

alk B

Dieses Gen codiert im Zusammenwirken mit den Genen alk G und alk T die Alkanmonoxygenase, die als Initialenzym die Umwandlung aliphatischer Kohlenwasserstoffe zum entsprechenden Alkohol einleitet.

Aufgrund der Belastung des Grundwassers mit n-Alkanen und wegen der zahlreichen Hinweise auf ein Abbaupotential der Umweltisolate aus verschiedenen Proben (Abschnitt 4.3.2) wurde dieses Schlüsselgen in den molekularbiologischen Untersuchungen berücksichtigt.

4.4.1 Verbreitung von DNA-Sequenzen für die Codierung von Abbauleistungen in Isolaten mikrobieller Biozönosen

In Vorbereitung auf den Nachweis der Gensequenzen wurde zunächst aus degradativen Umweltisolaten verschiedener Bereiche des belasteten Grundwassers durch eine besonders für *Pseudomonaden* geeignete Methode die Gesamt-DNA isoliert. Die gelelektrophoretische

Auftrennung der DNA-Präparate erbrachte für eine Mehrzahl der abbauaktiven Isolate den Nachweis von Plasmiden, die aufgrund ihres Molekulargewichtes die Vermutung zuließen, daß es sich dabei um degradative Plasmide handelt (SCHUMANN, 1990).

Die DNA-Präparationen, die sowohl plasmidale als auch fragmentierte chromosomale DNA enthielten, wurden zunächst für PCR-Amplifikationen eingesetzt. Die PCR-Amplifikationsbedingungen wurden der Literatur entnommen und teilweise hinsichtlich der Annealingtemperatur modifiziert (Abschnitt 3 Material und Methoden).

Im Fall der Amplifikation des nah Ac B Genfragmentes wurde das in der Literatur vorgeschlagene Reaktionsregime (Abschnitt 3.6.1) modifiziert.

4.4.1.1 Naphthalendioxygenase nah Ac

Die Abb. 44 zeigt beispielhaft die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten der Amplifikation des Naphthalendioxygenase-Genfragmentes in Umweltisolaten.

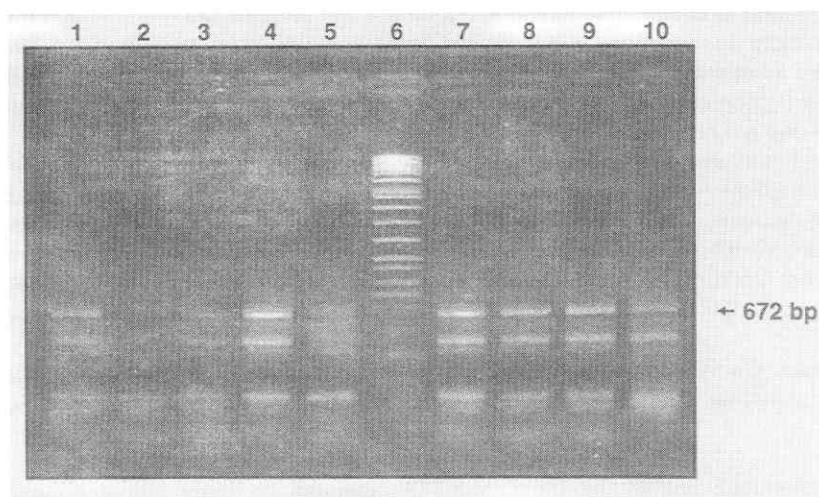


Abb. 44: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte des Naphthalendioxygenase-Genfragmentes aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91
 Bahn 1: Isolat aus der Wasserphase
 Bahnen 2-5 und 7-9: Isolate aus der Ölphase
 Bahn 8: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahn 10: Plasmid NAH 7 aus *P. putida* G7 (Positivkontrolle)

Aus der Abb. 44 wird ersichtlich, daß die aufgrund ihres biochemischen Abbaupotentials für Naphthalen ausgewählten Isolate Amplifikationsprodukte mit dem gleichen Molekulargewicht aufwiesen wie aus dem NAH 7-Plasmid, das als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Neben dem erwarteten Amplifikationsprodukt mit einem Molekulargewicht von 672 bp wurden jedoch weitere Banden im Agarosegel sichtbar, deren Molekulargewicht vom berechneten des Genfragmentes abweicht. Deshalb wurde in einem veränderten Reaktionsregime mit wechselnden Annealingtemperaturen versucht, die Amplifikationsprodukte auf das erwartete Fragment zu reduzieren. Es wurde jedoch deutlich, daß auch die veränderten Reaktionsbedingungen die Anzahl der Produkte nicht änderte, so daß wieder auf das publizierte Reaktionsregime zurückgegriffen wurde.

Eine eindeutige Identifizierung des amplifizierten nah Ac- Genfragmentes war jedoch durch die Hybridisierung mit der internen Oligonukleotidsonde nah Ac 2 möglich.

Die Amplifikation mehrerer Fragmente weist auf die Möglichkeit des Vorhandenseins nicht-homologer, paralleler katabolischer Operonen hin (wie sie im Plasmid pJP 4 und einigen TOL-Plasmiden nachgewiesen wurden), die zwar die Primererkennungsregionen aufweisen, aber durch Deletion oder Insertion von DNA-Fragmenten unterschiedlich große Amplifikationsprodukte ergeben.

4.4.1.2 Catechol-2,3-Dioxygenase xyl E

Mit der Verwendung von Lysatüberständen, die direkt für die PCR eingesetzt wurden, konnte eine Vereinfachung der Methode erreicht und gleichzeitig die Möglichkeit geschaffen werden, eine größere Anzahl von Isolaten zu testen und damit die Gesamtheit der degradativen Isolate einer Probe zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde auch getestet, ob eine Stabilisierung der Nukleinsäuren durch CHELEX 100 bei der Lysierung durch Hitze die Effektivität der PCR erhöhen kann.

Die Abb. 45 zeigt neben einer modellhaften Amplifikation des xyl E Genfragmentes den Vergleich der Effektivität der PCR-Amplifikation mit und ohne Stabilisierung der Nukleinsäuren durch CHELEX 100.

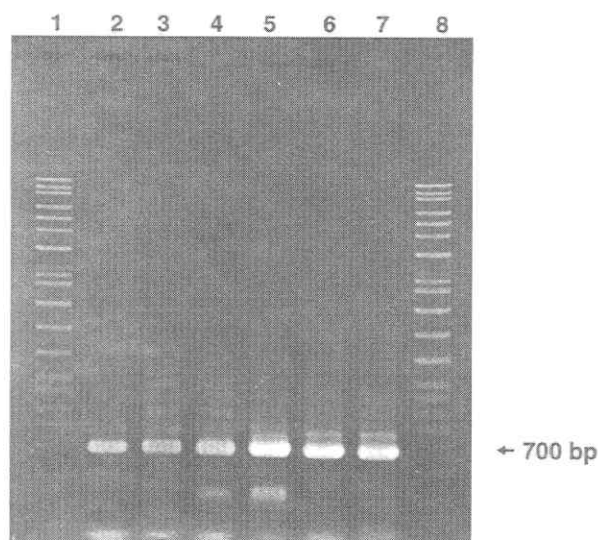


Abb. 45: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte des Catechol-2,3-Dioxygenase Genfragmentes aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 und *P. putida* mt-2 mit und ohne Stabilisierung der DNA durch Chelex 100
 Bahnen 1 und 8: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahnen 2 und 6: Isolate aus der Ölphase mit Stabilisierung der DNA durch Chelex 100
 Bahnen 3 und 7: Isolate aus 2 und 6 ohne Stabilisierung der DNA
 Bahnen 4 und 5: *P. putida* mt-2 mit bzw. ohne Stabilisierung der DNA durch Chelex 100

Die Abb. 45 veranschaulicht, daß sich in den ausgewählten Umweltisolaten Genfragmente amplifizieren ließen. Die PCR-Produkte aus den getesteten Isolaten und dem als Positivkontrolle mitgeführten Plasmid pWWO wiesen das gleiche Molekulargewicht auf. Sie entsprechen den errechneten Fragmentgrößen von 700 bp. Zudem wird erkennbar, daß eine Stabilisierung der DNA durch CHELEX 100 während der Lysierung offensichtlich nicht erforderlich ist. Die Effektivität der PCR zeigt keine Unterschiede, was an einer vergleichbaren

DNA-Konzentration sichtbar wird. Entscheidend scheint hingegen zu sein, daß die Lyse der Suspensionen in kochendem Wasser durchgeführt wird; eine Inkubation im Thermoblock bei 95°C führte zu einer deutlich geringeren Effektivität.

4.4.1.3 Alkanmonooxygenase alk B

Aufgrund des im biochemischen Test ermittelten Abbaupotentials für aliphatische Kohlenwasserstoffe bei einer großen Anzahl von Isolaten aus verschiedenen Phasen des belasteten Grundwasserbereiches wurde versucht, das alk B-Genfragment über PCR zu amplifizieren.

Modellhaft dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung einiger ausgewählter PCR-Ansätze in der Abb. 46.

Die Darstellung zeigt, daß mit den in der Literatur empfohlenen Primern in einigen Umweltisolaten mehr als ein Fragment amplifiziert wurde (Bahn 1, 2, 3, 5, 6, 8), während in anderen (Bahn 4, 7, 11, 12) nur ein Fragment angereichert wurde. In einigen Umweltisolaten (Bahn 14, 15, 16) ließen sich keine Fragmente darstellen. Der Vergleich der Molekulargewichte der amplifizierten Fragmente mit den errechneten Molekulargewichten (870 bp) macht deutlich, daß die jeweils obere Bande (Bahn 1, 2, 3, 8) das erwartete Fragment repräsentiert. Die z. T. zusätzlich auftretenden kleineren Fragmente (Bahn 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12) weisen ein deutlich geringeres Molekulargewicht auf und können somit keinen vollständigen alk B-Genabschnitt darstellen. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen ca. 500 - 600 bp.

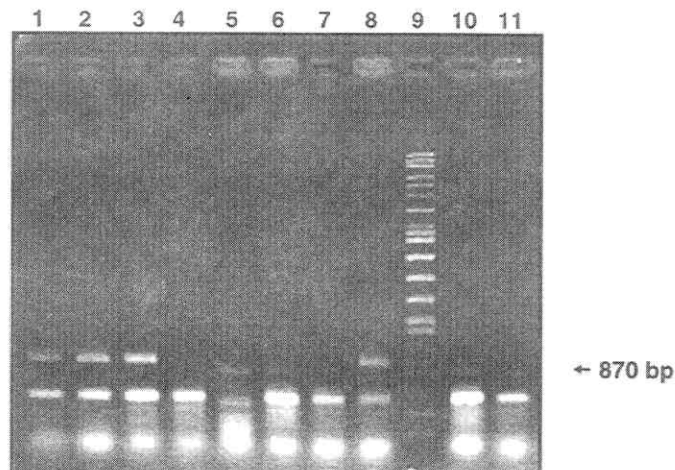


Abb. 46: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsprodukte des Alkanmonooxygenase-Genfragmentes aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91
Bahnen 1 bis 8 sowie 10: Isolate aus der Wasserphase
Bahn 11: Isolat aus der Ölphase
Bahn 9: Raoul™-Molekulargewichtsmarker

In der nachfolgenden Tab. 14 wird eine Übersicht über die Anzahl und die Ergebnisse der PCR-Amplifikationen gegeben.

Tab. 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR-Amplifikationen ausgewählter Genfragmente in Isolaten unterschiedlicher Kompartimente

Brunnen	6/91	6/91
Kompartiment	Ölphase	Wasserphase
Isolationsmedium	Standardmedium mit 1% Spindelöl	Standardmedium mit 1% Spindelöl
Anzahl der getesteten Isolate alk B	27	33
Prozentualer Anteil der Isolate mit erwarteter Fragmentgröße (alk B)	19	6
Anzahl der getesteten Isolate nah Ac	18	20
Prozentualer Anteil der Isolate mit erwarteter Fragmentgröße (nah AC)	100	75
Anzahl der getesteten Isolate xyl E	4	25
Prozentualer Anteil der Isolate mit erwarteter Fragmentgröße (xyl E)	100	48

- Aus der Tab. 14 geht hervor, daß die PCR-Amplifikation des nah Ac-Genfragmentes in einem deutlich höheren Anteil der Umweltisolate erfolgreich war und zum PCR-Produkt in der erwarteten Größe führte.
- Die Amplifikation des alk B-Genfragmentes gelang hingegen nur in einem geringen Teil der Umweltisolate (19 bzw. 6%). Offensichtlich ist, daß trotz hohem biochemischen Abbaupotential die Alkanmonooxygenase nur in wenigen Isolaten codiert ist oder daß die DNA keine den Primern komplementären Erkennungssequenzen aufweist. Dies könnte durch Insertionen, Punktmutationen oder Deletionen der entsprechenden DNA-Bereiche möglich sein.

4.4.1.4 Detektion durch Hybridisierung

Obwohl durch den Vergleich der errechneten Fragmentgröße mit dem amplifizierten PCR-Produkt das Vorhandensein des entsprechenden Gens in den Umweltisolaten sehr wahrscheinlich gemacht werden konnte, ist ein endgültige Nachweis nur durch Hybridisierung möglich.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmente wurden auf positiv geladene Nylonmembran übertragen und fixiert. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe Digoxigenin markierter interner Oligonukleotidsonden bei der anhand der Nukleotidsequenz errechneten Hybridisierungstemperatur.

Die folgenden Abb. 47 und 48 zeigen die mit Hilfe des Computerprogramms Scan-Pack bearbeiteten Fotografien verschiedener Hybridisierungsfiler.

Die Abb. 47 stellt die auf positiver Nylonmembran fixierten PCR-Amplifikationsfragmente dar, die mit der internen endmarkierten Digoxigenin Oligonukleotidsonde nah Ac 2 hybridisierten.

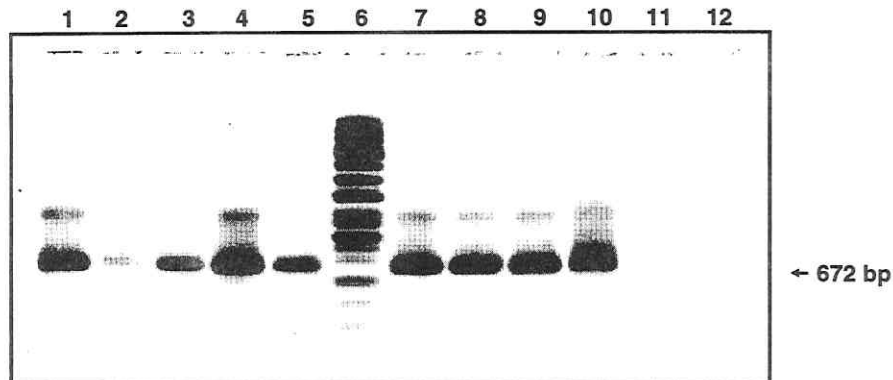


Abb. 47: Hybridisierung der PCR-Amplifikationsfragmente des Naphthalendioxygenase-Genfragmentes ausgewählter Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 mit der Digoxygenin endmarkierten Oligonukleotidsonde nah Ac2

Bahn 1:	Isolat aus der Wasserphase
Bahnen 2-5 und 7-9:	Isolate aus der Ölphase
Bahn 8:	Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahn 10:	Plasmid NAH 7 aus <i>P. putida</i> G7 (Positivkontrolle)
Bahnen 11 und 12:	frei

Die erwarteten Hybridisierungssignale zeigen sich als Banden im Größenbereich zwischen 600 und 700 bp (Raoul™-Molekulargewichtsmarker Bahn 6). Die unterschiedliche Effektivität der PCR-Amplifikationen spiegelt sich in der Stärke des Signales wider (Bahn 2 und 4). Wenngleich im Agarosegel für das Isolat (Bahn 2) keine Bande im erwarteten Größenbereich festgestellt werden konnte, so ist auf dem HybridisierungsfILTER ein schwaches Signal zu erkennen. Es kann davon ausgegangen werden, daß sich auch in diesem Umweltisolat das nah Ac-Genfragment amplifizieren (geringe Effektivität) und nachweisen ließ, eine Beobachtung, die sich zudem mit dem für das Isolat biochemisch ermittelten Abbaupotential deckt.

Die Abb. 48 stellt den HybridisierungsfILTER mit dem Nachweis des Alkanmonoxygenase-Genfragmentes dar.

Beim Vergleich mit dem entsprechenden Agarosegel (Abb. 46) wird deutlich, daß die obere Bande ein Hybridisierungssignal mit der internen endmarkierten Digoxygenin Oligonukleotidsonden alk B (S) ergab.

Die unteren Banden im Größenbereich zwischen 500 und 600 bp enthielten nicht die zur alk B-Sonde komplementäre Sequenz.

Deutliche Hybridisierungssignale im Größenbereich von 700 bp wurden beim Nachweis des xyl E-Genfragmentes in ausgewählten Umweltisolaten festgestellt.

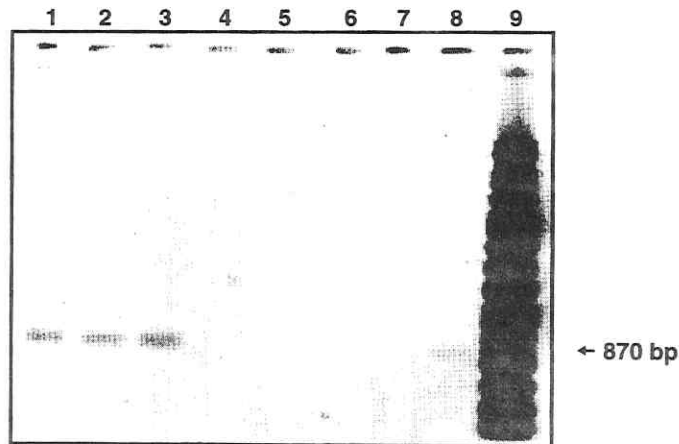


Abb. 48: Hybridisierung der PCR-Amplifikationsprodukte des Alkanmonooxygenase-Genfragmentes ausgewählter abbauaktiver Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 mit der Digoxigenin endmarkierten Oligonukleotidsonde alk B (S)
 Bahnen 1 bis 8: Isolate aus der Wasserphase
 Bahn 9: Raoul™-Molekulargewichtsmarker

Aus den Ausführungen lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

1. Durch die gezielte PCR-Amplifikation ausgewählter Genfragmente, die bekannte Schlüsselenzyme codieren, ergaben sich deutliche Hinweise auf das Vorhandensein ausgewählter Abbaupotentiale in den untersuchten Isolaten. Die allgemeinen Informationen zum biochemisch ermittelten Abbaupotential konnten somit verifiziert und ergänzt werden.
2. Die anschließende Hybridisierung mit internen genspezifischen Oligonukleotidsonden führte zum Nachweis der entsprechenden Gensequenzen und bestätigte, daß in den Umweltisolaten die klassischen Abbaupotentiale codiert sind.
3. Eine Vereinfachung der Methodik konnte durch die Verwendung von Lysatüberständen anstelle von DNA-Präparaten erreicht werden und schaffte die Möglichkeit, die Gesamtheit der Isolate einer Probe mit einem vertretbaren Zeitaufwand zu testen.
4. Es zeigte sich für die untersuchten Proben des belasteten Grundwasserbereiches 6/91 (Ölphase und Wasserphase), daß der Anteil der degradativen Isolate, deren Potential auch auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden konnte, in der Wasserphase höher war als in der Ölphase.
5. Am häufigsten konnte dabei das nah Ac-Genfragment amplifiziert und nachgewiesen werden (Wasserphase 100%, Ölphase 75%).
6. Im Fall des xyl E-Genfragmentes war ein Nachweis in Isolaten der Ölphase zu 48% möglich, in denen der Wasserphase zu 100%. Berücksichtigt werden muß jedoch, daß lediglich 4 Isolate aus der Wasserphase getestet wurden.
7. Das alk B-Genfragment ließ sich in beiden Proben nur in jedem 5. Isolat (Wasserphase) bzw. nur in jedem 17. Isolat (Ölphase) amplifizieren und nachweisen.

4.4.2 Lokalisierung von DNA-Sequenzen für die Codierung von Abbauleistungen in Isolaten mikrobieller Biozöosen

Wie bereits anfänglich erwähnt, wurden von einer Vielzahl degradativer Umweltisolate DNA-Präparationen vorgenommen. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, daß das breite Spektrum der Abbauleistungen von *Pseudomonaden* mit dem Vorhandensein von Plasmiden korreliert (PEMBERTON, 1983; SAYLER et al., 1990; SCHUMANN, 1990). Die z. T. sehr gut charakterisierten Plasmide (NAH 7, pWWO, CAM u. a.) weisen zumeist ein sehr hohes Molekulargewicht auf. Unter der Voraussetzung des Nachweises degradativer Leistungen ist es als wahrscheinlich anzusehen, daß die Plasmide, die aus Umweltisolaten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches präpariert wurden und ein entsprechendes Molekulargewicht aufwiesen, auch Abbauleistungen codieren.

4.4.2.1 Plasmidvorkommen in mikrobiellen Biozöosen

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Präparate zeigten für den überwiegenden Teil degradativer Umweltisolate das Vorkommen von Plasmiden.

Die Abb. 49 und 50 zeigen dies beispielhaft für einige ausgewählte Isolate aus verschiedenen Bereichen des belasteten und unbelasteten Grundwassers.

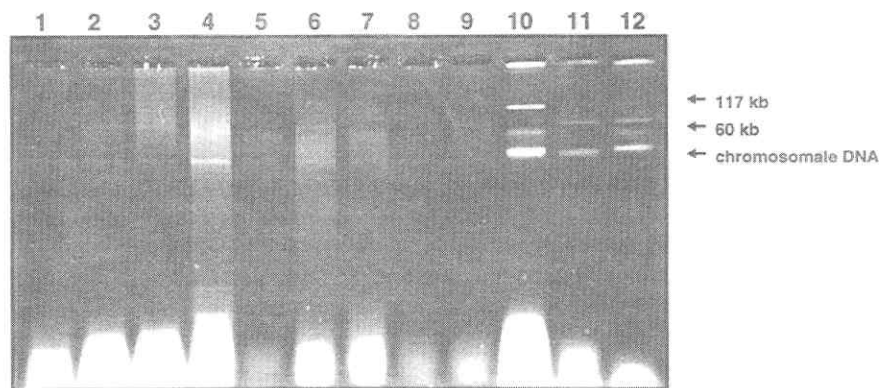


Abb. 49: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91
 Bahnen 1-9: Isolate aus der Ölphase
 Bahn 10: *P. putida* mt-2 mit Plasmid pWWO (117 kb)
 Bahn 11: *P. fluorescens* mit Plasmid pAB 96
 Bahn 12: *E. coli* HB 101 mit Plasmid RP 4

Dabei wurden in der Abb. 49 hauptsächlich Plasmide mit einem vergleichbaren Molekulargewicht dargestellt. Die Abb. 50 zeigt hingegen, daß in einigen Isolaten mehrere Plasmide nachweisbar sind. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurden vergleichend Markerplasmide aufgetragen, die gut charakterisiert sind und deren Molekulargewicht bekannt ist. Die aus Umweltisolaten präparierten Plasmide wiesen ein geringeres Molekulargewicht auf als das Plasmid pWWO [117 kb] (Bahn 10) aus *P. putida* mt-2. Für die Mehrzahl der Plasmide wurde ein ähnliches Molekulargewicht nachgewiesen wie das des Plasmides RP 4 aus *Escherichia coli* HB 101, das mit 60 kb angegeben wird (Bahn 12).

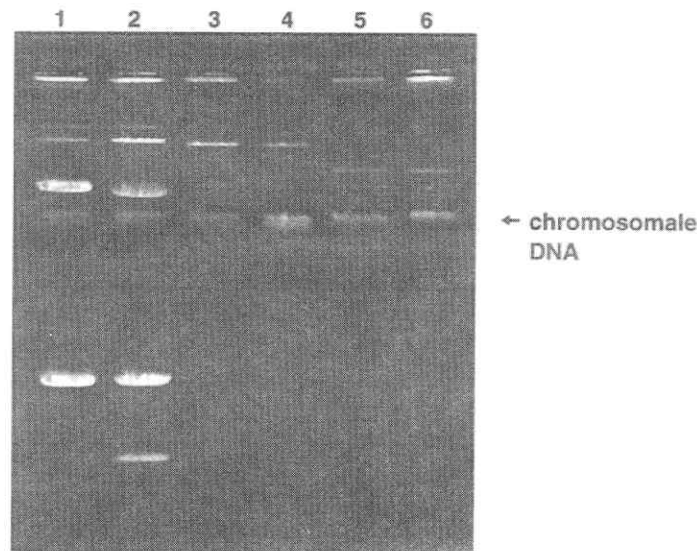


Abb. 50: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 108/94
 Bahnen 1-3: Isolate aus der Interphase
 Bahn 4: *P. putida* mt-2 mit Plasmid pWWO (117 kb)
 Bahn 5: *P. fluorescens* mit Plasmid pAB 96
 Bahn 6: *E. coli* HB 101 mit Plasmid RP 4

Aus der Abb. 50 wird hingegen ersichtlich, daß in einem Isolat (z. B. Bahn 1) sowohl größere Plasmide als das Markerplasmid pWWO (Bahn 4) als auch kleinere als das Plasmid RP 4 (Bahn 6) auftreten. Zum Vergleich wurde auf der Bahn 5 eine Plasmidpräparation aufgetragen, die ein Plasmid in vergleichbarer Größe wie jene in der Abb. 49 enthält. Der Größenunterschied zu den Plasmiden in Bahn 1, 2 und 3 wird somit deutlich erkennbar.

Die Tab. 15 gibt eine Übersicht über die Anzahl der Isolate aus verschiedenen Phasen des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches, in denen Plasmide gelelektrophoretisch nachgewiesen wurden. Berücksichtigt wurde eine z. T. stichprobenartige Auswahl von Umweltisolaten, bei denen mit Hilfe der biochemischen Tests degradative Leistungen ermittelt wurden.

Aus der Tab. 15 wird ersichtlich, daß in allen Phasen der überwiegende Teil der Isolate Träger von Plasmiden ist. Innerhalb der Phasen des belasteten Grundwasserbereiches sind dabei vergleichbare prozentuale Anteile plasmidtragender Isolate festzustellen. Auffällig ist lediglich der mit 22 % geringe Anteil in der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 6/91. Einschränkend sollte jedoch nochmals darauf hingewiesen werden, daß teilweise nur stichprobenhaft untersucht wurde. Zudem sei an dieser Stelle bemerkt, daß der Anteil plasmidtragender Isolate wahrscheinlich über den genannten Werten liegt. Das Unterschreiten der Nachweisgrenze für plasmidale DNA im Agarosegel bewirkt, daß solche Isolate nicht berücksichtigt werden konnten.

Es ist jedoch festzustellen, daß das biochemisch ermittelte degradative Potential im engen Zusammenhang mit dem hohen Anteil plasmidtragender Isolate steht.

Tab. 15: Verbreitung und geschätztes Molekulargewicht isolierter Plasmide aus Mikroorganismen unterschiedlicher mikrobieller Biozönosen

Brunnen	Phase	Isolationsmedium	Anzahl der getesteten Isolate	Anteil plasmidtragender Isolate [%]	Anzahl der Isolate mit einem geschätztem Molekulargewicht			
					<117 kb	= 60 kb	< 60 kb	> 117 kb
Frühjahr 1994								
21/92	Wasser	R2A	3	100	3	3	3	
6/91	Wasser	R2A	3	67	2	2		
6/91	Öl	SMSÖ	20	75	15	15	3	
6/91	Interphase	SMSÖ	9	22	2	2	1	
6/91	Wasser	SMSÖ	25	68	17	17	2	6
6/91	Sediment	SMSÖ	6	67	3	3		2
Frühjahr 1995								
6/91	Öl	R2A	3	100	3	3	3	

4.4.2.2 Zuordnung degradativer Leistungen zu genetischen Loci der Isolate

Aus der Tab. 15 geht hervor, daß ein Großteil abbauaktiver Isolate über Plasmide verfügt. Im folgenden Schritt wurde versucht, Abbauleistungen anhand ausgewählter Gensequenzen nachzuweisen und sie bestimmten genetischen Loci zuzuordnen (Plasmid, Chromosom). Dabei erwies es sich als sehr vorteilhaft, daß bei der angewandten Isolationsmethode für Plasmid-DNA aus *Pseudomonaden* auch fragmentierte chromosomale DNA mit präpariert wird.

In der Abb. 51 wird dies veranschaulicht.

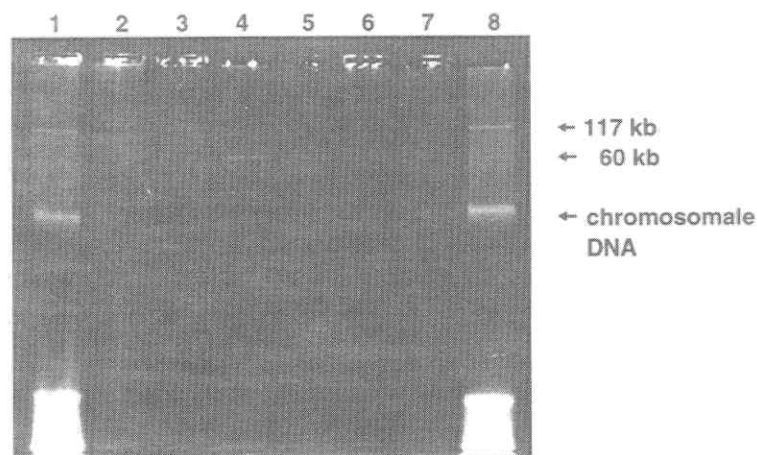


Abb. 51: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91)
 Bahn 1 und 8: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahnen 2 bis 7: Isolate aus der Ölphase

Die jeweils obere Bande repräsentiert die Plasmid-DNA als ccc-Form (*covalent closed circles*), darunter ist die fragmentierte chromosomale DNA zu erkennen.

Als Größenvergleich wurden auf Bahn 1 und 8 eine DNA-Präparation aus *P. putida* mt-2 mit dem Plasmid pWVO aufgetragen. Die auf Nylonmembran fixierte Plasmid-DNA wurde mit dem PCR-Amplifikationsfragment des Naphthalen-Dioxygenase-Gens nah Ac des NAH 7-Plasmids aus *P. putida* G7 hybridisiert. Dieses Fragment wurde vorher *random primed* mit Digoxigenin markiert. Die Hybridisierung des Filters erfolgte bei 42°C über Nacht.

Die Abb. 52 zeigt den entwickelten Filter. Man erkennt, daß die Plasmide der Isolate in den Bahnen 3, 4, 5 und 6 offensichtlich Zielsequenzen für die nah Ac-Sonde enthalten. Die oberen Banden weisen deutlich Hybridisierungssignale auf.

Obwohl für die Plasmidpräparationen der Isolate in den Bahnen 2 und 7 der gelelektrophoretische Nachweis von Plasmid-DNA mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie in den anderen Präparationen (Bahnen 3-6) erbracht wurde, enthielten sie nicht den zur nah Ac-Sonde komplementären DNA-Bereich. In diesen Bahnen war kein Hybridisierungssignal nachweisbar.

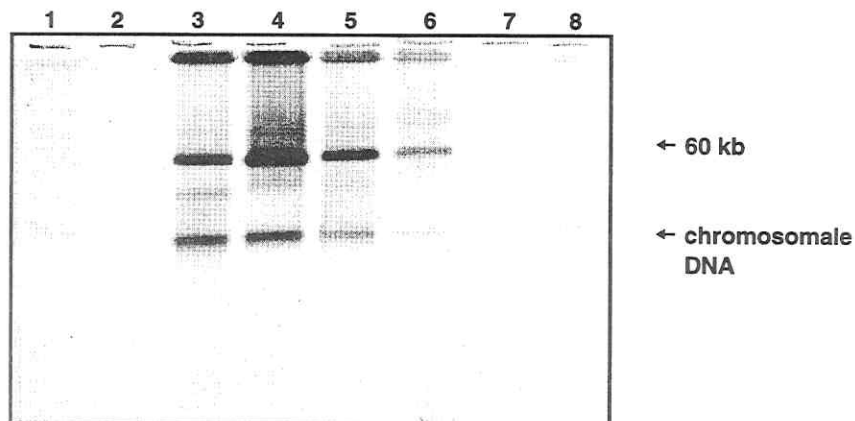


Abb. 52: Hybridisierung der Gesamt-DNA ausgewählter abbauaktiver Isolate aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) mit dem Digoxigenin *random primed* markierten nah 7 PCR-Amplifikationsfragment (Naphthalendioxygenase)
 Bahn 1 und 8: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahnen 2 bis 7: Isolate aus der Ölphase

Diese Beobachtung stimmt für das Isolat auf Bahn 2 mit den biochemischen Untersuchungen überein, wonach es keine degradative Aktivität für Naphthalen aufwies. Das Isolat in der Bahn 7 zeigte hingegen ein degradatives Potential gegenüber Naphthalen. Für beide Isolate (Bahn 2 und 7) konnte weder aus Lysatüberständen noch aus Plasmidpräparationen das nah Ac-Genfragment amplifiziert werden. Dies ist aus den Abb. 53 und Abb. 54 ersichtlich. Dargestellt sind die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationen des nah Ac-Genfragmentes aus Plasmidpräparationen für ausgewählte Umweltisolate und der Filter der Hybridisierung mit der internen Oligonukleotidsonde nah Ac 2.

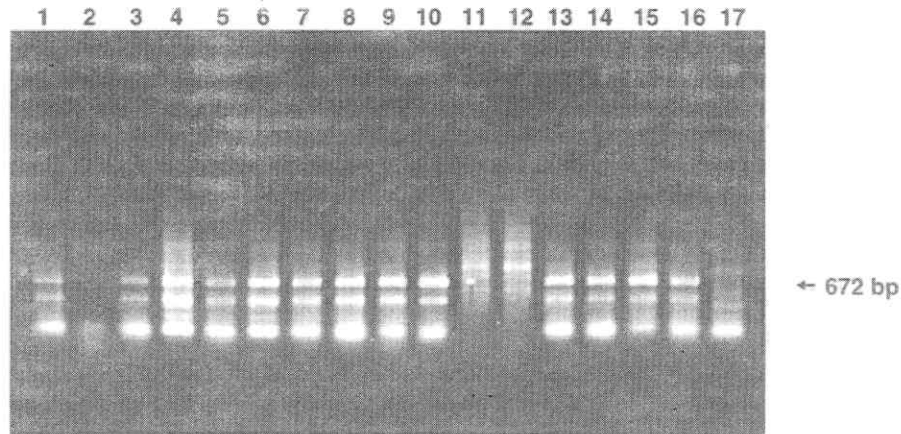


Abb. 53: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikationsfragmente der Naphthalendioxygenase aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 (*template*-DNA - Plasmidpräparate)

Bahnen 1 bis 7:	Isolate aus der Wasserphase
Bahnen 8, 9, 11 bis 17:	Isolate aus der Ölphase
Bahn 10:	nah 7-Plasmid aus <i>P. putida</i> G7

Man erkennt auf den Bahnen 12 und 17 eine unspezifische Amplifikation von DNA für die Isolate der Bahnen 2 bzw. 7 aus den Abb. 51 und 52.

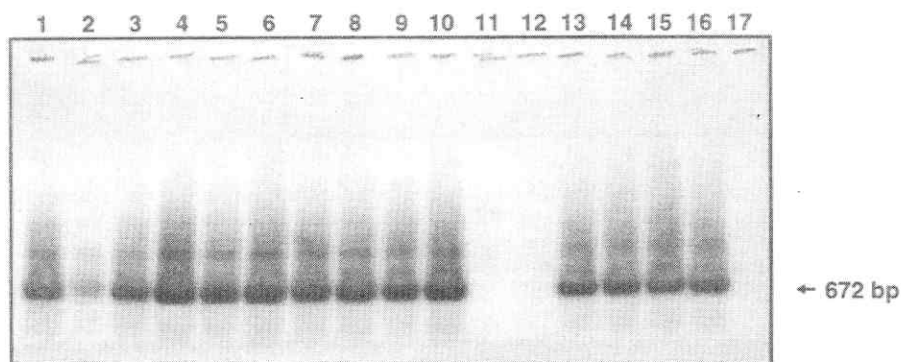


Abb. 54: Hybridisierung der PCR-Amplifikationsfragmente der Naphthalendioxygenase aus ausgewählten abbauaktiven Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches GWBR 6/91 mit der Digoxigenin endmarkierten Oligonukleotidsonde nah Ac 2

Bahnen 1 bis 7:	Isolate aus der Wasserphase
Bahnen 8, 9, 11 bis 17:	Isolate aus der Ölphase
Bahn 10:	nah 7-Plasmid aus <i>P. putida</i> G7

Auf dem Hybridisierungsfiler (Abb. 54) sind u. a. in den Bahnen 12 und 17 keine Signale erkennbar. Das verdeutlicht, daß eine fehlende Abbauaktivität des Isolates auf Bahn 12 (entspricht Bahn 2 in den Abb. 51 und 52) gegenüber Naphthalen auch molekularbiologisch nachgewiesen werden konnte. Das Fehlen von Zielsequenzen für die nah Ac-Sonde (Amplifikat aus NAH 7-Plasmid) im Isolat auf Bahn 17 (entspricht Bahn 7 in den Abb. 51 und

52) bei gleichzeitig nachgewiesener Abbauaktivität gegenüber Naphthalen deutet an, daß die Initiierung des Abbaus von Naphthalen über andere Stoffwechselwege erfolgen könnte oder das Enzym durch heterologe Gensequenzen codiert wird.

Erwartungsgemäß zeigten sich in den Bahnen 1 und 8 (DNA-Präparat aus *P. putida* mt-2 mit Plasmid pWWO) der Abb. 52 keine Hybridisierungssignale, so daß unspezifische Bindungen der nah Ac-Fragment Gensonde (Amplifikat aus NAH 7-Plasmid) ausgeschlossen werden konnten.

Neben den Hybridisierungssignalen im Bereich der plasmidalen DNA waren diese auch auf der Höhe der fragmentierten chromosomalen DNA nachweisbar. Diese Tatsache widerspricht jedoch der bisherigen Auffassung, wonach das nah-Operon, das die Enzyme des Naphthalenabbaus codiert, stets auf plasmidaler DNA lokalisiert sei (SANSEVERINO et al., 1993).

4.4.2.3 Charakterisierung des Plasmides pAB 96

Aus den biochemischen Tests hatten sich bei einigen Isolaten Hinweise eines Abbaupotentials sowohl für Aromaten als auch für n-Alkane ergeben. Diese Befunde sollten auf molekularbiologischer Ebene näher untersucht werden. Unter den für mehrere Substanzen abbaubaktiven Mikroorganismen aus der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) wurde die plasmidale DNA eines dieser Isolate mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert, um sie hinsichtlich ihres Molekulargewichtes näher zu charakterisieren und Aussagen über die Lokalisierung degradativer Leistungen abzuleiten.

4.4.2.3.1 Größe des Plasmides

Das Plasmid, das künftig als pAB 96 bezeichnet wird, wurde zunächst hinsichtlich seines Molekulargewichtes mit gut charakterisierten Plasmiden (pWWO, RP4) verglichen.

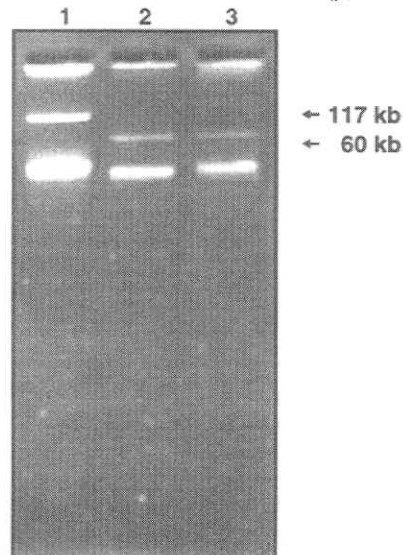


Abb. 55: Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Präparationen des Plasmides pAB 96 und der Markerplasmide pWWO und RP4
Bahn 1: *P. putida* mt-2 pWWO,
Bahn 2: *P. fluorescens* pAB 96,
Bahn 3: *E. coli* HB 101 RP4

Die Abb. 55 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA des Plasmides pAB 96 im Vergleich zu den Markerplasmiden pWWO aus *P. putida* mt-2 und RP4 aus *Escherichia coli* HB 101. Man erkennt, daß das Plasmid pAB 96 etwas kleiner ist als 60 kb (RP 4).

4.4.2.3:2 Restriktionsanalysen

In den folgenden Schritten sollte das Plasmid pAB 96 aus *P. fluorescens* näher charakterisiert werden. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe ausgewählter Restriktionsenzyme fragmentiert. Dafür wurden die Restriktionsendonucleasen *Eco* RI und *Xho* I angewandt.

Die Abb. 56 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der entstandenen Fragmente wurde in den Bahnen 1 und 6 der Raoul™-Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Bahnen 2 und 3 repräsentieren die Restriktionsmuster der DNA des Plasmides pWWO aus *P. putida* mt-2.

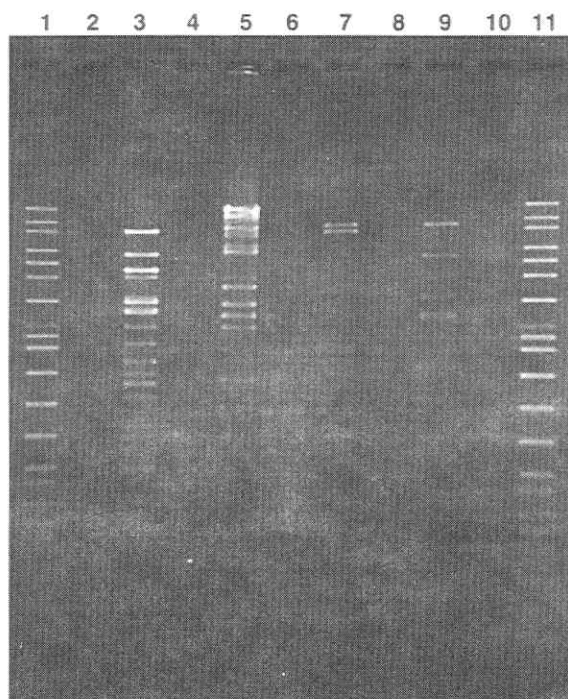


Abb. 56: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente der Plasmide pWWO und pAB 96
Bahnen 1 und 11: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahn 2: pWWO x *Eco* RI
Bahn 3: pWWO x *Xho* I
Bahn 4: pAB 96 x *Eco* RI
Bahn 5: pAB 96 x *Xho* I

Die Abb. 56 veranschaulicht, daß sich die Restriktionsmuster beider Plasmide deutlich unterscheiden. Anhand des Vergleiches der Restriktionsfragmente des pAB 96 mit den bekannten Fragmentgrößen des Raoul™-Molekulargewichtsmarker war es nach einer Aufsummierung möglich, das Molekulargewicht des Gesamtmoleküls zu ermitteln. Wenngleich eine eindeutige Differenzierung der Restriktionsfragmente mit geringem Molekulargewicht aufgrund der verringerten Konzentration relativ schwierig ist, läßt sich dennoch das Moleku-

largewicht des Plasmides grob abschätzen. Danach ergibt die Summe der Fragmente im Fall der *Eco RI*-Spaltung ein Molekulargewicht von ca. 54,4 kb und für das Enzym *Xho I* ca. 53,7 kb. Die aus dem Vergleich mit gut charakterisierten Plasmiden vorgenommene Abschätzung des Molekulargewichtes von pAB 96 konnte somit bestätigt bzw. konkretisiert werden.

Die Tab. 16 gibt eine Auflistung der durch die genannten Restriktionsenzyme entstandenen Fragmente hinsichtlich ihrer durch den Vergleich mit dem Raoul™-Molekulargewichtsmarker abgeleiteten Größen und nennt die möglichen Ergebnisse der Aufsummierung.

Tab. 16: Molekulargewichte der Restriktionsfragmente des Plasmides pAB 96

pAB 96 x <i>Eco RI</i>			pAB 96 x <i>Xho I</i>		
Fragmentnummer	M _G der Fragmente [bp]	Bemerkung	Fragmentnummer	M _G der Fragmente [bp]	Bemerkung
1	17		1	17	
2	15		2	10	
3	3,8		3	6	
4	3,6		4	5	evtl. 3 Banden
5	3,4		5	2,6	
6	3,1		6	2,3	Summe 6,7 kb
7	2,7		7	1,8	
8	2,3	evtl. Doppelbande	8	1,4	
9	1,7				
10	1,0				
11	0,9				
Summe der Fragmente [kb]	54,5			53,7	
Summe der Fragmente [kb] incl. Doppelbanden etc.	56,8	Fragment 8 als Doppelbande gewertet		58,7	Fragment 4 als Dreifachbande gewertet

4.4.2.3.3 Lokalisierung abbaurelevanter Leistungen auf dem Plasmid pAB 96

Aufgrund des biochemisch nachgewiesenen Abbaupotentials des Trägerorganismus für das Plasmid pAB 96 war es von besonderem Interesse nachzuprüfen, ob auf dem Plasmid ausgewählte Abbauenzyme codiert sind. Dazu wurde versucht, die aus den vorangegangenen Untersuchungen bekannten Fragmente der Gensequenzen von xyl E, nah Ac und alk B auf diesem Plasmid nachzuweisen. Die mit den Restriktionsendonukleasen *Eco RI* und *Xho I* verdaute Plasmid-DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf positiv geladene Nylonmembran übertragen, fixiert und hybridisiert. Die sich aus der Sequenz der Sonden ergebenden Hybridisierungsbedingungen sind in der Tab. 17 zusammengefaßt.

Tab. 17: Charakteristika der Hybridisierungsbedingungen zum Nachweis degradativer Leistungen auf Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96

Sonde	xyl E	nah Ac	alk B
Herkunft der Sonde	xyl E PCR-Amplifikat aus pWWO (<i>P. putida</i> mt-2)	nah Ac PCR-Amplifikat aus NAH 7 (<i>P. putida</i> G7)	alk B interne Oligo- nukleotidsonde
Markierung der Sonde	Digoxygenin <i>random primed</i> markiert	Digoxygenin <i>random primed</i> markiert	Digoxygenin 5' endmarkiert
Hybridisierungsbedingungen			
Hybridisierungstemperatur [°C]	42	60	42
Hybridisierungsdauer [h]	12-14	12-14	12-14
Waschtemperatur [°C]	42	60	42

Um eine ausreichende Stärke des Nachweissignals für die Hybridisierung mit der alk B-Oligonukleotidsonde zu erreichen (wegen der Endmarkierung nur jeweils ein Digoxygeninmolekül je gebundenem Oligonukleotid), wurde in der Hybridisierungslösung ein Überschuß des alk B-Oligonukleotides (0,3 nmol/ml) eingestellt. Diese Konzentration erwies sich für die Detektion der Hybridisierungssignale als ausreichend. Homologien der alk B-Oligonukleotidsonde konnten mit einer 2,5 kb großen Bande im Muster der *Xho* I Spaltung des Plasmides pAB 96 (Bahn 2), im Fall der *Eco* RI Spaltung mit einer 15 kb (Bahn 3) großen Bande nachgewiesen werden.

In den Bahnen 7 und 8 der Abb. 57 ist die Hybridisierung der pAB 96 Restriktionsfragmente mit dem xyl E PCR-Amplifikat aus pWWO (*P. putida* mt-2) dargestellt. Dabei erkennt man, daß jeweils eine Bande in beiden Restriktionsmustern mit der xyl E-Sonde hybridisiert. Der auf Bahn 1 aufgetragene Raoul™-Molekulargewichtsmarker (Hybridisierung mit Digoxygenin *random primed* markiertem Plasmid pUC) ermöglichte eine Orientierung über die Größe der hybridisierenden Banden. Im Muster der Restriktion des Plasmides pAB 96 mit *Xho* I hybridisierte eine Bande im Größenbereich um 5 kb (Bahn 7), für das Restriktionsmuster mit *Eco* RI war eine Hybridisierungssignal bei 18,5 kb nachweisbar (Bahn 8).

Die Hybridisierung mit dem Digoxygenin *random primed* markierten nah Ac PCR-Amplifikationsfragment aus *P. putida* G7 als Sonde ergab eine Vielzahl von Hybridisierungssignalen (Abb. 57). Im Fragmentmuster der *Xho* I-Restriktion des Plasmides pAB 96 wurden im Größenbereich von 5 kb und 2,5 kb starke Hybridisierungssignale festgestellt. Schwache Banden waren im Größenbereich von 17,8 kb, 10,6 kb und 6,1 kb sichtbar (Bahn 5). Für die Fragmente der Spaltung mit dem Enzym *Eco* RI wurden 2 unterschiedlich starke Signale mit einem Molekulargewicht der Restriktionsfragmente von 16,5 kb (starkes Signal) und 17,8 kb (schwaches Signal) nachgewiesen (Bahn 6).

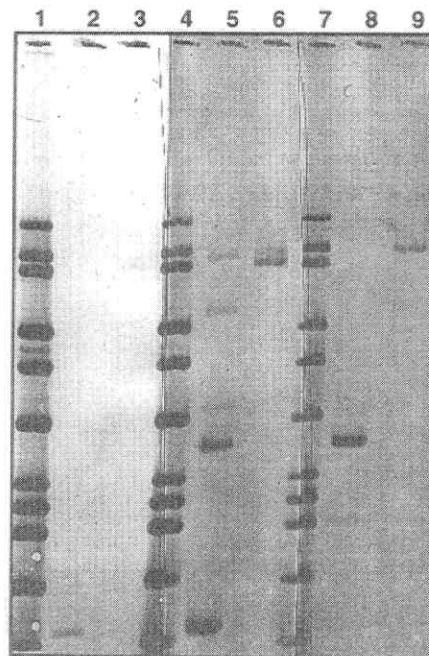


Abb. 57: Hybridisierung der Restriktionsfragmente des Plasmides pAB 96 mit ausgewählten Sonden

Bahnen 1, 4 und 7:	Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahnen 2, 5 und 8:	pAB 96 x <i>Xho</i> I
Bahnen 3, 6 und 9:	pAB 96 x <i>Eco</i> RI
Bahnen 1, 2 und 3:	Hybridisierung mit der Digoxigenin endmarkierten alk B Oligonukleotidsonde
Bahnen 4, 5 und 6:	Hybridisierung mit dem <i>random primed</i> Digoxigenin markierten nah Ac PCR-Amplifikat aus NAH 7 (<i>P. putida</i> G7)
Bahnen 7, 8 und 9:	Hybridisierung mit dem <i>random primed</i> Digoxigenin markierten xyl E PCR-Amplifikat aus pWVO (<i>P. putida</i> mt-2)

Wegen der Vielzahl der Hybridisierungssignale mit dem vollständig Digoxigenin *random primed* markierten Amplifikationsfragment aus dem Plasmid NAH 7 lag die Vermutung nahe, daß die Sonde zusätzlich zum nah Ac Gen auch noch unspezifische Bindungen mit anderen Bereichen des Plasmides pAB 96 einging. Deshalb wurden die Restriktionsfragmente in einem nächsten Schritt statt mit dem PCR-Amplifikat mit der nah Ac 2-Oligonukleotidsonde aus dem internen Bereich des nah Ac Genes hybridisiert. Wegen der nur am 5' Ende des Oligonukleotids vorliegenden Markierung wurde das Sondenmolekül in der Hybridisierung im Überschuß eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C. Die Waschschrte wurden bei 50°C ausgeführt. Die stringenten Hybridisierungsbedingungen erlaubten die Zuordnung des nah Ac Genes zu bestimmten Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96 (Abb. 58).

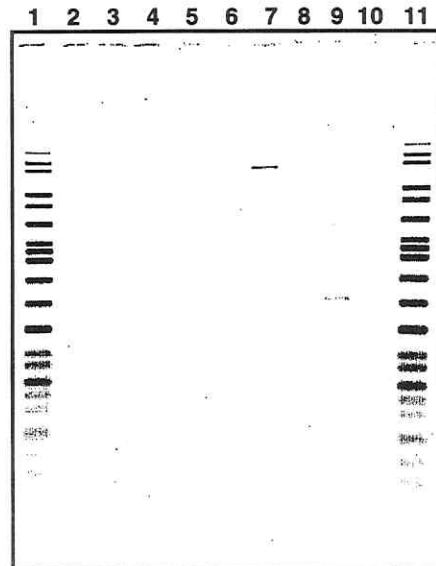


Abb. 58: Hybridisierung der Restriktionsfragmente der Plasmide pWWO und pAB 96 mit der Digoxigenin endmarkierten nah Ac 2-Oligonukleotidsonde
 Bahnen 1 und 11: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahn 3: pWWO x *Eco* RI Bahn 7: pAB 96 x *Eco* RI
 Bahn 5: pWWO x *Xho* I Bahn 9: pAB 96 x *Xho* I

In der Bahn 7 wurde ein Hybridisierungssignal im Größenbereich von ca. 15 kb sichtbar. Die in der Bahn 9 aufgetragene Restriktion des Plasmides pAB 96 mit dem Enzym *Xho* I ergab ein Hybridisierungssignal mit einem Fragment der Größe von ca. 2,5 kb.

Erwartungsgemäß wurden bei der Hybridisierung des Filters mit der nah Ac 2-Oligonukleotidsonde keine Signale auf den Bahnen 3 und 5 nachgewiesen; hier wurde das mit *Eco* RI und *Xho* I gespaltene Plasmid pWWO aus *P. putida* mt-2 als Negativkontrolle aufgetragen.

Eine Auswertung der Hybridisierungsergebnisse gibt die Tab. 18.

Tab. 18: Ergebnisse der Hybridisierung von pAB 96-Restriktionsfragmenten mit ausgewählten Gensonden

Sonde	Herkunft der Sonde	<i>Xho</i> I		<i>Eco</i> RI	
		starkes Signal	schwaches Signal	starkes Signal	schwaches Signal
xyl E	PCR-Amplifikationsfragment	5 kb		18,5 kb	
nah Ac	PCR-Amplifikationsfragment	5 kb 2,5 kb	17,8 kb 10,6 kb 6,1 kb	16,5 kb	17,8 kb
nah Ac 2	Oligonukleotid	2,5 kb		15 kb	
alk B	Oligonukleotid	2,5 kb		15 kb	

Die mit Hilfe des HEROLAB-Auswertungsprogramms ermittelten Molekulargewichte der Fragmente, die Hybridisierungssignale ergaben, erlaubten eine erste Zuordnung der Abbauleistungen zu Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96 (Abb. 59).

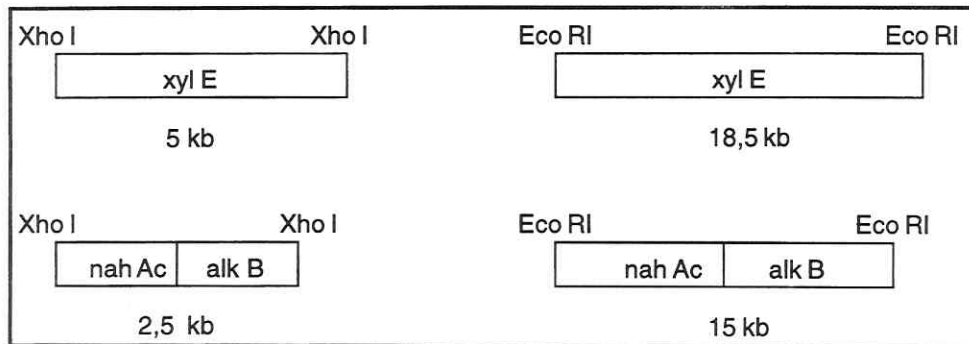


Abb. 59: Schematische Darstellung der Zuordnung von Abbauleistungen zu Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96

4.4.2.4 Verbreitung des Plasmides pAB 96 in mikrobiellen Biozönosen des mineralölbelasteten Grundwassers

Im Verlaufe der Untersuchungen abbauaktiver Isolate hatten sich vielfach Hinweise auf einen hohen prozentualen Anteil plasmidtragender Mikroorganismen ergeben (Tab. 15). Anhand der Untersuchungen eines dieser Plasmide (pAB 96) waren die geschätzten Größenangaben von ca. 60 kb auf 56 kb konkretisiert worden. Ausgewählte degradative Leistungen konnten bestimmten Restriktionsfragmenten zugeordnet werden.

Bei dem Vergleich der isolierten Plasmide aus unterschiedlichen degradativen Mikroorganismen verschiedener belasteter Grundwasserbereiche hatte sich gezeigt, daß in einer Vielzahl der untersuchten Isolate Plasmide mit einem ähnlichen Molekulargewicht nachgewiesen werden konnten wie das des Plasmides pAB 96. Es war daher von besonderem Interesse aufzuzeigen, ob das Plasmid pAB 96 innerhalb der Biozönosen verbreitet ist.

Die im folgenden vorgestellten Untersuchungen sollten Hinweise auf einen möglichen Verbreitungsmechanismus des Abbaupotentials innerhalb der belasteten Biozönosen geben.

Die Abb. 60, 61 und 62 stellen die gelelektrophoretische Auftrennung der plasmidalen DNA verschiedener degradativer Isolate dar.

Die Abb. 60 repräsentiert eine Zusammenstellung der Gesamt-DNA aus Isolaten des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) und verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91). Berücksichtigt wurden somit Isolate aus unterschiedlichen Biozönosen zum gleichen Zeitpunkt.

Im Agarosegel in der Abb. 61 wurden sowohl Isolate der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) als auch der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 aufgetragen, die bei unterschiedlichen Probenahmen gewonnen wurden. Damit sollten sich Hinweise ergeben, ob sich das degradative Potential (repräsentiert durch das Plasmid pAB 96) auch in Biozönosen räumlich voneinander entfernt liegender Grundwasserbereiche (6/91; 108/94) nachweisen läßt. Andererseits sollte die zeitliche Stabilität des degradativen Plasmides pAB 96 innerhalb der Biozönosen der Ölphase (GWBR 6/91) und Interphase (108/94) untersucht werden.

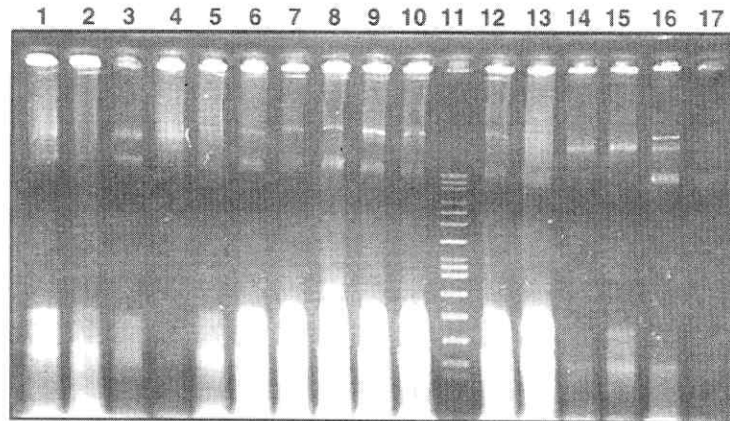


Abb. 60: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten (GWBR 6/91) und unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92)

Bahnen 1 bis 3:	Isolate aus der Wasserphase des GWBR 21/92
Bahn 4:	Isolate aus der Interphase GWBR 6/91
Bahnen 5-10 und 12-15:	Isolate aus der Wasserphase des GWBR 6/91
Bahn 11:	Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahn 16:	<i>P. fluorescens</i> mit Plasmid pAB 96
Bahn 17:	<i>P. putida</i> mt-2 mit Plasmid pWVO

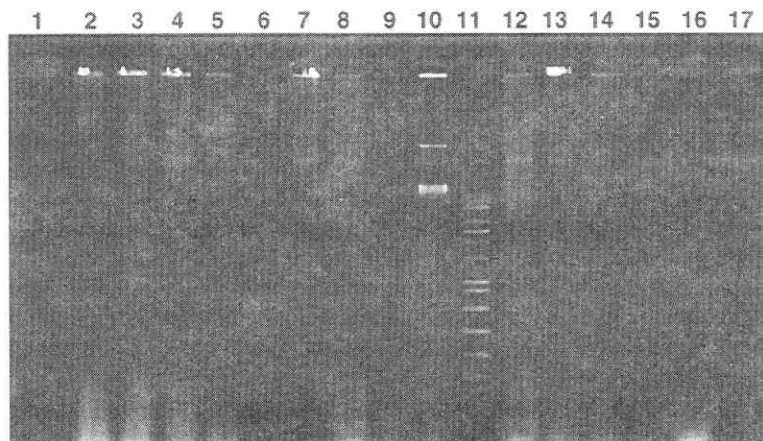


Abb. 61: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate aus Mikroorganismen verschiedener Kompartimente belasteter Grundwasserbereiche (GWBR 6/91 und 108/94) zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Bahnen 1-6:	Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 (Frühjahr 1994)
Bahn 7:	Isolat aus der Interphase GWBR 6/91 (Frühjahr 1994)
Bahnen 8, 9 und 12:	Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 (Frühjahr 1995)
Bahn 10:	<i>P. fluorescens</i> mit Plasmid pAB 96
Bahn 11:	Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahn 13:	Isolat aus der Interphase GWBR 108/94 (Frühjahr 1995)
Bahn 14-17:	Isolate aus der Interphase GWBR 108/94 (Herbst 1995)

Die Abb. 62 repräsentiert ergänzend zu den in der Abb. 61 berücksichtigten Isolaten eine Zusammenstellung von Plasmidpräparaten aus der Ölphase (6/91). Dabei wurde auf der

Bahn 4 ein Isolat ausgewählt, bei dem in den biochemischen Tests zur Bestimmung des Abbaupotentials für aromatischen Kohlenwasserstoffen keine Abbauleistungen nachgewiesen werden konnten. Die in den Bahnen 10, 11 und 12 aufgetragenen Plasmide pWWO aus *P. putida* mt-2, pAB 96 aus *P. fluorescens* bzw. RP4 aus *E. coli* HB101 dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen.

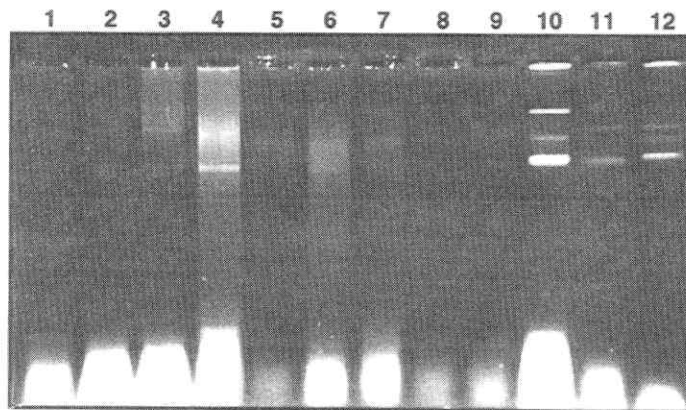


Abb. 62: Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91)
 Bahnen 1-9: Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91
 Bahn 10: *P. putida* mt-2 mit Plasmid pWWO
 Bahn 11: *P. fluorescens* mit Plasmid pAB 96
 Bahn 12: *E. coli* HB 101 mit Plasmid RP4

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-DNA-Präparate wurde diese im Southern-Transfer auf positiv geladene Nylonmembran übertragen und fixiert. Die Filter wurden über Nacht bei 42°C mit dem Digoxigenin *random primed* markierten Plasmid pAB 96 hybridisiert. Die Filter wurden bei 42°C gewaschen und entwickelt.

Die Abb. 63, 64 und 65 stellen die entwickelten Hybridisierungfilter dar.

Die Abb. 63 veranschaulicht, daß die Mehrzahl der Isolate (Bahnen 1, 4-10, 12) komplementäre Abschnitte zur Sonde pAB 96 aufweist und im Größenbereich der Plasmid-DNA Hybridisierungssignale nachweisbar sind.

Aus der Abb. 64 wird ersichtlich, daß das Plasmid pAB 96 oder ihm ähnliche Plasmide in den aus der Ölphase (6/91) isolierten Mikroorganismen verbreitet waren (Bahnen 2-5). In den Bahnen 8, 9 und 12 sind als deutlich schwächere Banden Hybridisierungssignale erkennbar, deren Molekulargewicht geringer als das des Plasmides pAB 96 (Bahn 10) ist. Der Vergleich der Plasmide aus Isolaten der Ölphase (Abb. 64) zu unterschiedlichen Zeiten (Bahnen 2-5 bzw. 8, 9 und 12) macht deutlich, daß sich die zeitliche Stabilität des Plasmides pAB 96 nicht nachweisen ließ. Vielmehr trat ein Plasmid mit geringerem Molekulargewicht auf, das jedoch offensichtlich Homologien mit der Sonde pAB 96 aufwies; eine Verwandtschaft der Plasmide ist daher wahrscheinlich. Hybridisierungssignale im Bereich der plasmidalen DNA treten auch in den Bahnen 13-17 auf (Abb. 64). Dabei wurde deutlich, daß die Plasmide in den Isolaten der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 ebenfalls ein geringeres Molekulargewicht aufwiesen als das des pAB 96. Unterschiede zeigten sich jedoch nicht beim Vergleich der Plasmide aus Mikroorganismen, die zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert wurden.

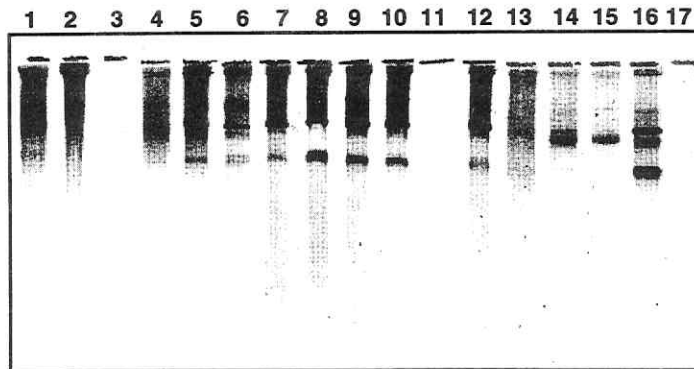


Abb. 63: Hybridisierung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten verschiedener Kompartimente des belasteten (GWBR 6/91) und unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) mit dem Digoxigenin *random primed* markierten Plasmid pAB 96

Bahnen 1 bis 3:	Isolate aus der Wasserphase des GWBR 21/92
Bahn 4:	Isolate aus der Interphase GWBR 6/91
Bahnen 5-10 und 12-15:	Isolate aus der Wasserphase des GWBR 6/91
Bahn 11:	Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahn 16:	<i>P. fluorescens</i> mit Plasmid pAB 96
Bahn 17:	<i>P. putida</i> mt-2 mit Plasmid pWWO

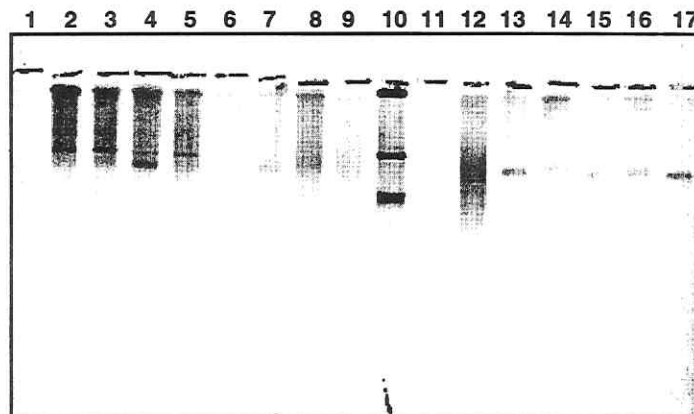


Abb. 64: Hybridisierung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten verschiedener Kompartimente belasteter Grundwasserbereiche (GWBR 6/91 und 108/94) zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Digoxigenin *random primed* markierten Plasmid pAB 96

Bahnen 1-6:	Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 (Frühjahr 1995)
Bahn 7:	Isolat aus der Interphase GWBR 6/91 (Frühjahr 1995)
Bahnen 8, 9 und 12:	Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91 (Frühjahr 1995)
Bahn 10:	<i>P. fluorescens</i> mit Plasmid pAB 96
Bahn 11:	Raoul™-Molekulargewichtsmarker
Bahn 13:	Isolat aus der Interphase GWBR 108/94 (Frühjahr 1995)
Bahn 14-17:	Isolate aus der Interphase GWBR 108/94 (Herbst 1995)

Die Abb. 65 zeigt für die Isolate der Ölphase unterschiedlich starke Hybridisierungssignale im Größenbereich der plasmidalen DNA. Bei der Hybridisierung des Plasmides pWWO mit der pAB 96 Sonde wurden schwache Signale im Bereich der Plasmid-DNA nachgewiesen. Das Vorkommen des *xyl E* Genes sowohl auf dem Plasmid pWWO als auch auf dem Plasmid pAB 96 erklärt dieses Signal.

Erwartungsgemäß waren bei der Hybridisierung des Plasmides pAB 96 mit der genannten Sonde signifikante Signale (Positivkontrolle) nachweisbar (Abb. 65).

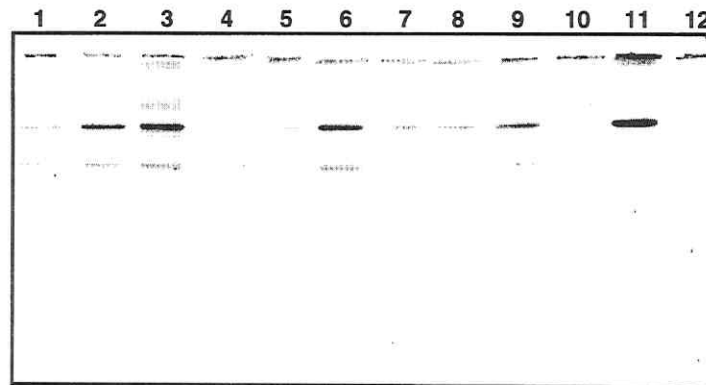


Abb. 65: Hybridisierung der Gesamt-DNA-Präparate aus Isolaten der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) mit dem Digoxigenin *random primed* markierten Plasmid pAB 96
 Bahnen 1-9: Isolate aus der Ölphase des GWBR 6/91
 Bahn 10: *P. putida* mt-2 mit Plasmid pWVO
 Bahn 11: *P. fluorescens* mit Plasmid pAB 96
 Bahn 12: *E. coli* HB 101 mit Plasmid RP4

Aus den bisher präsentierten Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen kann folgendes zusammengefaßt werden:

1. In einer Vielzahl der Isolate konnten PCR-Fragmente aus ausgewählten Genen (xyl E, alk B, nah Ac), die Enzyme des Aliphaten- und Aromatenabbaus codieren, amplifiziert werden, womit die Ergebnisse der biochemischen Tests zum Degradationspotential für die genannten Kohlenwasserstoffklassen bestätigt wurden.
2. Der Nachweis der Gene erfolgte durch Hybridisierung ihrer Amplifikationsfragmente mit internen Oligonukleotidsonden.
3. In einer Vielzahl abbauaktiver Isolate konnten Plasmide nachgewiesen werden.
4. Die Molekulargewichte dieser Plasmide geben zu der Vermutung Anlaß, daß es sich dabei um degradative Plasmide handelt.
5. Eine Zuordnung degradativer Leistungen zu genetischen Loci der Isolate war möglich. Das Vorhandensein der molekularbiologischen Grundlage für Abbauleistungen konnte am Beispiel der Gensequenzen der Naphthalendioxygenase sowohl auf plasmidaler als auch auf chromosomaler DNA durch Hybridisierung (nah Ac-Amplifikationsfragment als Sonde) nachgewiesen werden.
6. Die Charakterisierung eines der Plasmide (pAB 96) zeigte das Vorhandensein mehrerer degradativer Leistungen auf ein und demselben Plasmid.
7. Das Vorhandensein dieses Plasmides oder eines ihm ähnlichen konnte in einer Vielzahl abbauaktiver Isolate durch Hybridisierung gezeigt werden.

4.4.3 Vergleich von Mikroorganismen durch die molekularbiologische Methode des Ribotyping

Die Ergebnisse der Identifizierung von Mikroorganismen aus verschiedenen Biozönosen des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches (Abschnitt 4.2) sowie der Bestimmung ihres biochemischen Abbaupotentials für ausgewählte aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe (Abschnitt 4.3) hatten folgendes gezeigt:

1. In Abhängigkeit vom Isolationsmedium war besonders im belasteten Grundwasserbereich ein hoher Anteil von *Pseudomonaden* festgestellt worden.
2. Diese Isolate wurden in Kombination mit verschiedenen Methoden im BIOLOG®-System zumeist als *P. fluorescens* identifiziert.
3. In zahlreichen Isolaten mit diesem Identifizierungsergebnis konnte ein biochemisches Abbaupotential nachgewiesen werden.
4. Einige Isolate wiesen ein degradatives Potential sowohl für aliphatische als auch für aromatische Kohlenwasserstoffe auf.

Aus diesen Untersuchungen ergab sich die Frage nach dem Mechanismus der Zunahme des Anteils und der Verteilung von Mikroorganismen mit degradativen Leistungen.

- Wurde das auf extrachromosomalen mobilen Elementen (Plasmide) lokalisierte Abbaupotential durch vertikalen und/ oder horizontalen Gentransfer innerhalb der Population verbreitet ?
- Oder war es unter den Bedingungen vor Ort im Laufe der Zeit zu einer selektiven Vermehrung von Mikroorganismen gekommen, die auf diese geänderten Umweltbedingungen spezialisiert sind und zum Hauptbestandteil der mikrobiellen Biozönose werden konnten ?

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen zeigten, daß Mechanismen des Gentransfers zur Verbreitung des degradativen Potentials innerhalb der Biozönose beitragen.

Aber auch eine Kombination beider Möglichkeiten ist denkbar und wahrscheinlich. Es wurde daher versucht, Isolate aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwassers mit nachgewiesenem Degradationspotential durch die Methode des Ribotypings zu vergleichen.

Aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwassers wurden degradative Isolate nach folgenden Kriterien ausgewählt und aus ihnen die chromosomale DNA präpariert:

- Identifizierungsergebnis *P. fluorescens* im BIOLOG®-System oder mit anderen verwendeten Methoden (Pseudo F)
- Abbaupotential für eine oder beide Kohlenwasserstoffklassen (Aromaten und Aliphaten).

Die chromosomale DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Kpn I* gespalten. Dieses Enzym wurde anhand des Computerprogramms PC Gene ermittelt, da es für die dort enthaltenen Nukleinsäuresequenzen von *P. fluorescens* keine Schnittstellen in den 16S rRNA- und 23S rRNA-Genen aufwies. Die fragmentierte chromosomale DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. In der Abb. 66 wird dies modellhaft gezeigt. Der gleichmäßige „Schmier“ weist auf eine vollständige Spaltung und Auftrennung hin.

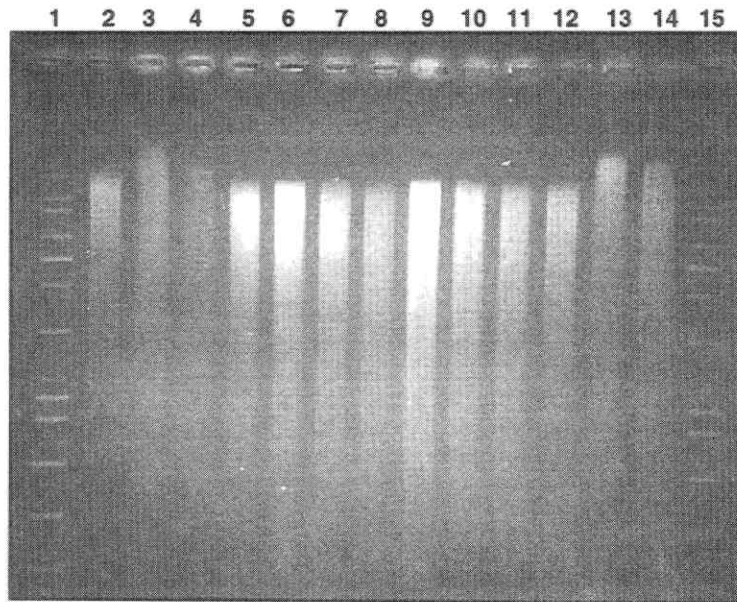


Abb. 66: Gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten chromosomalen DNA aus unterschiedlichen abbauaktiven Isolaten
 Bahnen 1 und 15: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahn 2: Isolat aus der Interphase
 Bahn 3, 6 bis 9: Isolate aus der Wasserphase
 Bahnen 4 und 5: Isolate aus dem Sediment
 Bahnen 10 bis 14: Isolate aus der Ölphase

Die fragmentierte chromosomale DNA wurde geblottet, fixiert und hybridisiert.

Die Abb. 67 zeigt beispielhaft einen entwickelten und gescannten Hybridisierungsfilm. Man erkennt in den Bahnen 2, 6, 7, 8 sowie 9 bis 12 ähnliche Hybridisierungsmuster. Die Hybridisierungsmuster in den Bahnen 3, 4 und 5 sowie 13 und 14 zeigen keine signifikanten Hybridisierungssignale, unterschieden sich von den anderen und wiesen auch untereinander keine Ähnlichkeiten auf.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Ribotypings gibt Tab. 19.

Isolate aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches konnten einem Ribotyp zugeordnet werden. Darunter waren sowohl Bakterien, die Modellsubstanzen aus beiden als auch aus einer der getesteten Kohlenwasserstoffklassen abbauen konnten. Andererseits wurden aus verschiedenen Kompartimenten auch Mikroorganismen nachgewiesen, die alle angebotenen Kohlenwasserstoffverbindungen abbauen konnten und die für *P. fluorescens* typischen Eigenschaften aufwiesen, jedoch keine Ähnlichkeiten mit dem Hybridisierungsmuster des Ribotyps I zeigten (Isolatnummer: 718, 772 und 786). Der Nachweis des Ribotyps I konnte auch in räumlich getrennten Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches erbracht werden (Isolatnummer: 31/49).

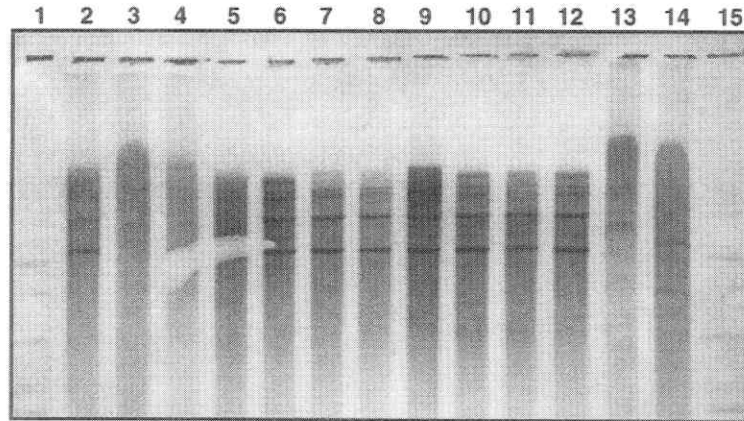


Abb. 67: Hybridisierung der restringierten, chromosomalen DNA aus unterschiedlichen abbauaktiven Isolaten mit dem Digoxigenin *random primed* markierten PCR-Amplifikationsfragment des 16S rRNA-Genes aus *E. coli*
 Bahnen 1 und 15: Raoul™-Molekulargewichtsmarker
 Bahn 2: Isolat aus der Interphase
 Bahn 3, 6 bis 9: Isolate aus der Wasserphase
 Bahnen 4 und 5: Isolate aus dem Sediment
 Bahnen 10 bis 14: Isolate aus der Ölphase

Tab. 19: Ribotyping ausgewählter Isolate
 (IP-Interphase; W-Wasser; C12O-Catechol-1,2-Dioxygenase; C23O-Catechol-2,3-Dioxygenase; NI-nicht identifiziert; n.b.-nicht bestimmt; Ps.fl.-*P. fluorescens*; Ps.au.-*P. au-rofaciens*)

Isolat	GWBR	Phase	Abbaupotential			Identifizierungsergebnis			Ribotyp I
			C 12 O	C 23 O	Alkane	BIOLOG	APILAB	Pseudo F	
89	6/91	IP	+	+	-	<i>Ps fl.</i>	NI	<i>Ps fl.</i>	+
706	6/91	W	+	-	-	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+
708	6/91	W	+	-	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+
713	6/91	W	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+
714	6/91	W	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+
718	6/91	W	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	-
724	6/91	W	-	-	+	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps au.</i>	<i>Ps fl.</i>	+
725	6/91	W	-	-	+	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps au.</i>	<i>Ps fl.</i>	+
726	6/91	W	-	-	+	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps au.</i>	<i>Ps fl.</i>	+
739	6/91	Öl	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+
744	6/91	Öl	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+
757	6/91	Öl	+	+	+	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps fl.</i>	+
759	6/91	Öl	+	+	+	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps fl.</i>	<i>Ps fl.</i>	+
772	6/91	Öl	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	-
786	6/91	Öl	+	+	+	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	-
31/49	108/94	IP	+	+	-	n.b.	n.b.	<i>Ps fl.</i>	+

5 Diskussion

Für die Analyse von Biozönosen aus Ökosystemen des Grundwassers, Bodens u. a. hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaften, der mikrobiellen Beeinflussung der Beschaffenheit der Lebensräume und des biodegradativen Potentials ergeben sich derzeit grundsätzlich verschiedene methodische Ansätze. Die Komplexität der mikrobiellen Lebensgemeinschaften erfordert die Anwendung einer Vielzahl unterschiedlicher Methoden und Verfahren. Gegenwärtig existieren wenig Möglichkeiten, mikrobielle Biozönosen, insbesondere aus Grundwässern, *in situ* zu erforschen.

Ein methodischer Ansatz besteht darin, die mikrobiellen Biozönosen in ihrer Gesamtheit zu belassen und ihre Aktivitäten als Konsortium zu analysieren. Daraus ergibt sich der Vorteil, daß die Mikroorganismengemeinschaften in ihrer Zusammensetzung und dem Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander bestehen bleiben. Die vielfach beschriebenen synergistischen Wirkungen der Mikroorganismen bei der Aktivierung von Xenobiotica oder dem Abbau komplexer organischer Verbindungen bleiben erhalten. Für die Entwicklung von Konzepten zur biologischen Sanierung kontaminierter Standorte stellt die Untersuchung der komplexen Biozönose als Gesamtheit eine wichtige Voraussetzung dar. Diese Methodik ist jedoch hinsichtlich ihrer Möglichkeiten zur Analyse der Struktur und dynamischen Entwicklungen sowie Stoffwechselleistungen einzelner Komponenten der Biozönose stark eingeschränkt.

Einen anderen methodischen Ansatz stellen die Untersuchungen von Biozönosen auf der Grundlage indirekter Kulturverfahren dar. Dabei werden durch Kultivierungs- und Anreicherungsverfahren Voraussetzungen geschaffen, Teile der mikrobiellen Biozönose zu isolieren. Anhand dieser Mikroorganismen, die in Abhängigkeit von den Isolationsbedingungen einen repräsentativen Anteil der Gesamtbiozönose darstellen, lassen sich u. a. Aussagen und Zusammenhänge über die Struktur und Dynamik der mikrobiellen Biozönose in Abhängigkeit von Art und Grad der Kontamination, gegebenenfalls auch über Prinzipien der Degradation sowie die genetische Codierung und Lokalisierung des biodegradativen Potentials in der Biozönose ableiten.

Einen besonderen Einfluß auf die qualitative Zusammensetzung des isolierten Anteiles von Mikroorganismen aus Biozönosen haben die Kultivierungsbedingungen. Dabei muß das Inkubationsmedium besonders berücksichtigt werden (WERNICKE, 1990). In der Vergangenheit wurden sehr häufig nährstoffreiche Medien verwendet, die jedoch zunehmend durch nährstoffarme, den Verhältnissen des unbelasteten Grundwassers besser entsprechende Medien ersetzt werden. Als Beispiele sind der von REASONER et al. (1985) beschriebene R2A-Agar und der von NEHRKORN (1968) entwickelte P-Agar zu nennen. Die Isolation oligocarbophiler, aber auch copiotropher Bakterien von R2A-Agar konnte nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu beachten, daß der Anteil dormanter (d.h. lebender, aber nichtkultivierbarer Mikroorganismen) in Abhängigkeit von der untersuchten Biozönose weit über 90 % betragen kann (DOTT et al., 1989; GEHLEN et al., 1985; MARXSEN et al., 1988). Zudem ist zu berücksichtigen, daß es unmöglich ist, alle für einen Standort charakteristischen und kultivierbaren Bakterien auf einem Medium zu isolieren. Durch die Kombination mehrerer Medien kann das Spektrum der isolierten Mikroorganismen einer Biozönose jedoch erweitert werden. Auch die Temperatur während der Inkubation der Biozönose hat einen entscheidenden Einfluß auf die Zusammensetzung des isolierten Anteils. Angesichts der Tatsache, daß im Grundwasserbereich Temperaturen von 4-16°C typisch sind, sollte die Inkubationstemperatur auch das Wachstum der für diesen Lebensraum typischen psychrophilen Bakterien ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde weitestgehend der zweiten Strategie (Kulturverfahren) gefolgt, da eine Vielzahl der klassischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen ausschließlich an isolierten Mikroorganismen vorgenommen werden konnten. Die

Ergebnisse wurden jedoch durch die Kombination mit Verfahren und Methoden, die die Biozönose einer Gesamtprobe betrachten, ergänzt.

Ein großer methodischer Vorteil für die Untersuchungen des belasteten Grundwasserbereiches wurde durch die phasengetrennte Probeentnahme mit Hilfe des Phasenschöpfers erzielt. In Publikationen zu vergleichbaren Standorten (mit Kohlenwasserstoffen kontaminierte Grundwässer) werden hinsichtlich der Entnahme von Probenmaterial entweder keine Angaben gemacht (z. B. DOTT et al., 1984) oder die Proben wurden durch Pumpen gefördert (z. B. RIDGWAY et al., 1990), was zu einer Durchmischung der Phasen und der in ihnen etablierten und möglicherweise sehr unterschiedlichen Biozönosen führt. Eine getrennte Entnahme der sich ausbildenden Phasen wird in der Literatur nicht erwähnt.

Die phasengetrennte Beprobung schuf die Voraussetzungen für eine differenzierte Charakterisierung der mikrobiellen Biozönosen aus der Ölphase, der Interphase, der Wasserphase und dem Sediment anhand von Originalproben und isolierten Mikroorganismen. Dabei konnten signifikante Unterschiede im Bestand und den mikrobiellen Aktivitäten in Abhängigkeit von der phasenspezifischen Konzentration der Kontaminanten ermittelt werden, worauf in den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen wird.

5.1 Lebendkeimzahlen

Die Werte der koloniebildenden Einheiten (KBE) der mikrobiellen Biozönosen wurden auf unterschiedlichen Medien ermittelt.

Zur Isolation der besonders an die Milieubedingungen im Grundwasser angepaßten oligocarbophilen Bakterien wurde der für Grundwasseruntersuchungen empfohlene R2A-Agar verwendet. Als oligocarbophile Bakterien gelten solche, die an geringe Substratkonzentrationen (*DOC- dissolved organic carbon*) von ca. 1-3 mg C / l adaptiert sind (FRITSCH, 1990). Dabei wird ein durchschnittlicher DOC-Gehalt von 2 mg/l in allen Grundwässern durch das Herauslösen von organischem Material aus den Sedimentgesteinen des Grundwasserleiters oder durch Zufuhr aus organischem Material von der Oberfläche angenommen (AUTORENKOLLEKTIV, 1988).

Die an höhere Kohlenstoffkonzentrationen angepaßten mesocarbophilen- copiotrophen Mikroorganismen wurden von Standardmedium mit 1% Spindelöl oder 1% Mineralöl isoliert. Nach FRITSCH (1990) sind besonders Vertreter der Gattungen *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* und *Chromobacterium* an Kohlenstoffkonzentrationen um 10 mg C / l adaptiert.

5.1.1 Unbelasteter Grundwasserbereich (GWBR 21/92)

Die auf R2A-Agar ermittelten KBE-Werte oligotropher Bakterien für die Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches wiesen erwartungsgemäß keine jahreszeitlichen Schwankungen auf, es konnten stets etwa $2,5 \times 10^5$ KBE/ml ermittelt werden. Die Eignung des für den Grund- und Trinkwasserbereich empfohlenen Inkubationsmediums R2A-Agar konnte bestätigt werden.

Jahreszeitliche Schwankungen mit einem Maximum im Frühjahr 1995 ergeben sich auf Standardmedium mit 1% Spindelöl (mesocarbophile bis copiotrophe Bakterien). Diese Zunahme der KBE-Werte läßt sich u. a. durch den Eintrag allochthoner Mikroorganismen aus der Bodenzone in den Grundwasserbereich infolge überdurchschnittlich starker Regenfälle im Frühjahr 1995 erklären (Abschnitt 2.1.2).

In der nachfolgenden Tab. 20 werden die in der Wasserphase des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) ermittelten KBE-Werte mit Ergebnissen verglichen, die mehrheitlich aus Untersuchungen vergleichbarer Standorte stammen und teilweise aus der DVWK-Schrift 80 (AUTORENKOLLEKTIV, 1988) „Bedeutung biologischer Vorgänge für die Beschaffenheit des Grundwassers“ entnommen wurden (gekennzeichnet mit*).

Tab. 20: Vergleich der Gesamtzellzahlen und KBE-Werte aus Untersuchungen unbelasteter Grundwässer

Autor (Jahr)	Gesamtzellzahl der Bakterien/ ml (mikroskopisch ermittelt)	Anzahl der Kolonien/ml
SPINEDI und WUHRMANN (1978)*	4×10^5 - $1,7 \times 10^7$	4×10^0 - 2×10^2
MARXSEN (1981)*	2×10^6 - $4,8 \times 10^6$	$5,6 \times 10^2$ - $2,2 \times 10^3$
MARXSEN (1981)*	$1,2 \times 10^6$ - $3,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^3$ - $1,1 \times 10^5$
DANIELOPOL (1983)*	$3,7 \times 10^7$ - $6,9 \times 10^8$	6×10^2 - $1,6 \times 10^4$
BELLIN (1985)*	$1,6 \times 10^5$ - $1,2 \times 10^6$	4×10^0 - $9,6 \times 10^2$
NEHRKORN (unpubliziert)*	$6,5 \times 10^2$ - 2×10^6	5×10^0 - $5,4 \times 10^3$
KÖLBEL-BOELKE (1987)		0 - $< 10^2$
BIRGER (1997) vorliegende Arbeit	$8,5 \times 10^5$ (einmalige Bestimmung)	$9,5 \times 10^4$ - $3,8 \times 10^6$

Es wird ersichtlich, daß aus den Wasserproben des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) eine wesentlich höhere Zahl koloniebildender Einheiten isoliert werden konnte als bei hinsichtlich DOC-Gehalt, Entnahmetiefe und Temperatur vergleichbaren Untersuchungen.

Der Vergleich zeigt zudem, daß auch der Anteil der isolierten Mikroorganismen an der Gesamtbiozönose wesentlich höher ist. Etwa 22% der mikrobiellen Gesamtbiozönose der Wasserphase konnten auf den entsprechenden Inkubationsmedien isoliert werden. Dieser Wert übersteigt den in der Literatur angegebenen Maximalanteil, wonach 0,1-10% der Gesamtbiozönose mit der Methode der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten erfaßt werden können (DOTT et al., 1989). Zudem muß erwähnt werden, daß der prozentuale Anteil der stoffwechselaktiven Mikroorganismen wahrscheinlich noch höher ist, da bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl auch tote Bakterien erfaßt werden.

Im Sediment des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) konnte von Frühjahr bis Herbst 1994 eine Zunahme der koloniebildenden Einheiten für beide Inkubationsmedien festgestellt werden. Dabei wurden auf R2A-Agar jeweils höhere KBE-Werte ermittelt.

Die Zahlen der von R2A-Agar isolierten Bakterien in der Wasserphase bzw. im Sediment unterscheiden sich nicht wesentlich. Diese Ergebnisse weichen von denen WOLTERS et al. (1956) sowie MARXSEN (1982) ab (zitiert von AUTORENKOLLEKTIV, 1988), die für die Mehrzahl der Mikroorganismen im Grundwasserbereich (in Abhängigkeit vom Grundwasserleiter 80 bzw. 99%) eine Adsorption an Partikeloberflächen postulieren. Demnach müßten im Sediment deutlich höhere KBE-Werte als in der Wasserphase nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, daß die Wasserphase aus dem unbelasteten Grundwasserbereich jeweils eine deutliche milchige Trübung aufwies und flockige, meist rostrote Schwebebestandteile enthielt. Die milchige Trübung ist durch die Tatsache zu erklären, daß der Brunnen (GWBR 21/92) bis in die Schichten des Unteren Muschelkalkes ausgebaut ist (Abb. 5). Dieser besteht im Bereich des GWBR 21/92 aus dünnplattigen, geklüfteten Kalken mit Tonlagen, die vom Grundwasser durchströmt werden, wobei sich feine Bestandteile als Schwebeteilchen herauslösen (Abschnitt 2.2). Es ist anzunehmen, daß eine Vielzahl der Mikroorganismen an diesen Schwebeteilchen und Flocken adsorbiert waren. Mikroskopische Untersuchungen bestätigen diese Vermutung. Dabei waren im Bereich der Flocken zahlreiche Einzelzellen aber auch Kolonien sichtbar. Da die Wasserphase mit den darin enthaltenen Flocken aufgearbeitet wurde, erscheinen die geringen Unterschiede der KBE-Werte von Wasser und Sediment erklärlich.

Während für die Wasserphase deutlich höhere KBE-Werte ermittelt werden konnten, wies das Sediment des unbelasteten Grundwasserbereiches (GWBR 21/92) KBE-Werte auf, die den Ergebnissen anderer Untersuchungen ähnlich waren.

5.1.2 Belasteter Grundwasserbereich (GWBR 6/91)

Die phasengetrennte Entnahme von Probenmaterial aus dem belasteten Grundwasserbereich ermöglichte eine differenzierte Analyse der mikrobiellen Biozönosen der unterschiedlichen Kompartimente des Grundwasserleiters.

Dabei zeigten sich die jeweils höchsten KBE-Werte im Sediment, die geringsten wurden zumelst in der Ölphase ermittelt. Im belasteten Grundwasserbereich war demnach die Mehrzahl der Bakterien an Sedimentoberflächen adsorbiert.

Offensichtlich waren die in verstärktem Maße auftretenden jahreszeitlichen Schwankungen der KBE-Werte in den unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches. So wurden im Frühjahr zumeist wesentlich höhere KBE-Werte aerober Mikroorganismen ermittelt als in den Herbstmonaten.

Wie bereits angedeutet, können derartige jahreszeitliche Unterschiede mit der in den Frühjahrsmonaten einsetzenden Grundwasserneubildung erklärt werden. Dieser Prozeß setzt nach MATTHEB (1983) „in Mitteleuropa in den Herbstmonaten zwischen Oktober und Dezember allmählich ein und dauert bis März/ April an“. In dieser Zeit, in der die Verluste durch Pflanzenbewuchs und Verdunstungsvorgänge noch relativ gering sind, kommt es in Abhängigkeit von der Beschaffenheit des Bodens zur Versickerung der Winter- und Frühjahrsniederschläge.

Aus den Klimadaten (Abschnitt 2.1.2) geht deutlich hervor, daß die Jahre 1993, 1994 und 1995 durch erhöhte Niederschlagsmengen gekennzeichnet waren. So wuch die Niederschlagssumme im Jahr 1993 um 18,7 mm, im Jahr 1994 um 176,2 mm und im Jahr 1995 um 63,9 mm vom langjährigen Mittel der jährlichen Niederschlagssummen ab (Abb. 2 und Tab. 1). Besonders die Monate März, April und Frühjahr des Jahres 1994 sowie Januar, Februar, April und Frühjahr des Jahres 1995 wiesen positive Differenzen zum langjährigen monatlichen Mittel der Niederschlagssummen des jeweiligen Monats auf. Unter Berücksichtigung der o.g. Werte liegt die Vermutung nahe, daß es aufgrund der erhöhten Niederschlagsmengen während der für die Grundwasserneubildung entscheidenden Monate zu einer verstärkten Versickerung der Niederschläge kam. Es ist anzunehmen, daß dies im Grundwasserbereich zu einer verbesserten Sauerstoff- (infolge des Wasserzustroms- erhöhte Fließgeschwindigkeit) und/ oder Nährstoffversorgung sowie zum Abtransport toxischer Metabolite führte, wodurch sich insgesamt die Milieubedingungen für die organotrophen Biozönosen verbesserten.

Dies wurde besonders an den Biozönosen der Ölphase sichtbar, deren Zahl kultivierbarer Mikroorganismen im Frühjahr (besonders 1995) stets deutlich höher war als im Herbst. Aufgrund der geringmächtigen Ölphase im Frühjahr und infolge der höheren Fließgeschwindigkeiten durch die starken Frühjahrsniederschläge ist es denkbar, daß es durch Verwirbelungen zur Vermischung der Öl- und Interphase kam. Die in der Ölphase vorkommenden oder an den Öltröpfchen adsorbierten Mikroorganismen gelangten verstärkt in die darunterliegende Interphase, in der Kohlenstoff- und Energiequellen leichter bioverfügbar waren als in der Ölphase. Die Annahme einer Durchmischung der Phasen im Frühjahr wurde auch durch den Anstieg der KBE-Werte in der Interphase unterstrichen.

In der DVWK-Schrift 80 (AUTORENKOLLEKTIV, 1988) wird darauf hingewiesen, daß die Besiedlungsdichte neben der Nährstoffkonzentration auch von der Fließgeschwindigkeit des Grundwassers abhängt.

Den Einfluß sich ändernder Umweltbedingungen auf die an Oberflächen des Grundwasserleiters in porösen Materialien anhaftenden Biofilme untersuchten CLEMENT et al. (1997). Die Autoren wiesen darauf hin, daß sich unter der Wirkung zunehmender Scherkräfte, Fließgeschwindigkeiten oder des sich abrupt ändernden Grundwasserspiegels Ablösungsprozesse von Biofilmen im Grundwasserleiter vollziehen. Sie konnten zeigen, daß die Ablösungsrate unter aeroben Verhältnissen wesentlich höher war als unter anaeroben (denitrifizierenden) Bedingungen. Die Ursache dafür wurde in der Abhängigkeit der Ablösungsrate vom

Wachstum der Mikroorganismen in den Biofilmen gesehen. Unter denitrifizierenden Bedingungen waren Wachstum und Vermehrung der Bakterien gegenüber aeroben Verhältnissen deutlich geringer. Mit dem verstärkten Zuwachs der Biofilme unter aeroben Verhältnissen steigt die Möglichkeit, daß diese unter dem Einfluß der Scherkräfte abgerissen werden, da den äußeren Schichten des Biofilmes auch zunehmend der Kontakt zur Besiedlungsoberfläche fehlt.

Angesichts der starken Regenfälle im Frühjahr 1995 ist es denkbar, daß es im Grundwasserleiter, der aus Sanden und Kiesen besteht (Abschnitt 2.2), und der darüber befindlichen Bodenzone zur verstärkten Ablösung von Biofilmen infolge erhöhter Fließgeschwindigkeiten und der daraus resultierenden Scherkräfte bzw. der veränderten Redoxbedingungen kam. Diese Ablösungsprozesse führten möglicherweise zum verstärkten Eintrag konzentrierter Biomasse in den Grundwasserbereich und können zur Erklärung der Steigerung der KBE-Werte sowohl im belasteten als auch im unbelasteten Grundwasserbereich herangezogen werden.

Auf die Abhängigkeit der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung mikrobieller Biozönosen von der Grundwasserneubildung durch Niederschläge wurde auch von DOTT et al. (1984) hingewiesen. Die Autoren begründeten das Auftreten bestimmter ökophysiologischer Gruppen mit Einspülungseffekten dieser Bakteriengruppen aus der Bodenluftzone in den Grundwasserbereich infolge starker Niederschläge.

Der Vergleich der auf beiden Inkubationsmedien ermittelten KBE-Werte ergab im ersten Jahr der Untersuchungen zumeist höhere Werte auf SMSÖ als auf R2A-Agar. Unter dem Einfluß der starken Frühjahrsniederschläge (1995) überstieg die Zahl der auf R2A-Agar kultivierbaren Bakterien deutlich die KBE-Werte auf SMSÖ. Diese Zunahme der Bakterienzahlen auf R2A-Agar ging mit einem signifikanten Rückgang des prozentualen Anteils degradativer Isolate einher. Dies läßt vermuten, daß durch Einspüleeffekte zumeist Mikroorganismen (allochthone) in die Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches gelangten, die (noch) nicht über die notwendigen Enzymsysteme zum Abbau der chemischen Kontaminationen verfügten.

Angesichts der starken Belastung des Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) mit Mineralölkohlenwasserstoffen, die, wie sich aus der Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) ergibt, über die Löslichkeit der Mineralölkohlenwasserstoffe in Wasser hinausgeht, können in diesem Grundwasserbereich zumeist nur copiotrophe Bakterien existieren. Das Angebot von Kohlenstoffquellen, die denen im belasteten Grundwasserleiter chemisch ähnlich sind (Spindelöl bzw. Mineralölrestgemisch), trägt entscheidend dazu bei, den abbauaktiven Anteil der untersuchten Biozönosen zu kultivieren. Werden Kohlenwasserstoffe als alleinige Kohlenstoffquelle angeboten, so haben diejenigen Mikroorganismen einen Selektionsvorteil, die Träger entsprechender Enzyme sind. Zudem ist zu berücksichtigen, daß die genetische Stabilität mikrobieller Abbauleistungen durch das Isolationsmedium beeinflusst werden kann. Abbauleistungen sind sehr häufig auf mobilen extrachromosomalen DNA-Molekülen codiert, Instabilitäten wurden mehrfach nachgewiesen. BRINKMANN et al. (1994) beschrieben für das TOL-Plasmid nach Inkubation auf Benzoat haltigem Medium den Verlust des Gesamtplasmides bzw. die Deletion des Transposons, welches den *upper-* und *lower-*Weg des Aromatenabbaus codiert. FOGHT et al. (1996) weisen den Spontanverlust eines Plasmides aus *P. fluorescens* mit degradativen Eigenschaften nach Inkubation auf Benzoat haltigem Medium nach.

5.2 MPN-Werte verschiedener Ökophysiotypen

Die Redoxbedingungen im Grundwasserleiter regulieren die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönosen. Andererseits greifen Mikroorganismen auf vielfältige Weise in den Kreislauf der Elemente ein, verändern durch zahlreiche chemische Reaktionen deren Oxidationszustand und beeinflussen auf diese Weise entscheidend die Beschaffenheit des Öko-

systems Grundwasser. Aus diesen Redoxreaktionen erfolgt die Energiegewinnung. Als Elektronendonatoren können sowohl organische Substanzen als auch oxidierbare, anorganische Verbindungen wie reduzierte Schwefelverbindungen, Ammonium, Nitrit oder Eisen dienen, wobei Sauerstoff, Nitrat, Sulfat, CO_2 oder reduzierbare organische Substanzen als Elektronenakzeptoren fungieren.

Obwohl das Verfahren der *MPN*-Bestimmung nicht unumstritten ist, so wird die Eignung dieser Methodik für Felduntersuchungen (HAMER et al., 1993) daran deutlich, daß sie die Erfassung von 20% der kultivierbaren Mikroorganismen ermöglicht (KÄMPFER et al., 1988).

Nach DOTT et al. (1986) beeinflussen unterschiedliche mikrobielle Prozesse die Grundwasserbeschaffenheit in sauerstoffhaltigen und organisch belasteten Grundwässern. Während im ersten Fall der Energiegewinn für die Mikroorganismen aus der Oxidation von Eisen- und Mangan-Ionen mit anschließender Nitrifikation erfolgt, werden im organisch belasteten Grundwasser Atmung und Nitrifikation sehr bald durch anaerobe Prozesse wie Denitrifikation, Mangan- und Eisenreduktion, Desulfurifikation und Methanbildung abgelöst.

Angesichts des vermuteten Sauerstoffmangels im organisch belasteten Grundwasserbereich des Untersuchungsgebietes ist eine Abschätzung des Potentials der mikrobiellen Biozöosen zur anaeroben Atmung für die Wahl und Planung von Sanierungsprozessen von großer Bedeutung.

Das Auftreten denitrifizierender Mikroorganismen im Zusammenhang mit Kontaminationen des Bodens oder Grundwassers mit Kohlenwasserstoffen wurde vielfach beschrieben (DOTT et al., 1984; KÄMPFER et al., 1988; MIKESSELL et al., 1993; HESS et al., 1996) und konnte auch in allen Proben aus dem belasteten und unbelasteten Grundwasserbereich nachgewiesen werden. Dabei wurden im Vergleich zur Literatur zumeist höhere *MPN*-Werte ermittelt. Eine jahreszeitliche Abhängigkeit zeigte sich in erhöhten *MPN*-Werten in allen Phasen des belasteten Grundwasserbereiches im Frühjahr und abnehmenden Werten im Herbst. Diese Tendenzen wurden für beide Probenahmen bestätigt.

Die wichtigste Voraussetzung der Denitrifikation ist das Vorhandensein von verfügbarem organischen Kohlenstoff, was angesichts der ermittelten DOC-Werte der wäßrigen Proben erfüllt ist. SMITH et al. (1994) weisen darauf hin, daß die Denitrifikationsprozesse in oberflächennahen Grundwässern zumeist durch die Konzentration an verfügbarem Kohlenstoff limitiert sind, während sie in tieferen Grundwässern Nitrat limitiert zu sein scheinen.

Die chemischen Analysen der Wasserproben des belasteten Grundwasserbereiches im Untersuchungsgebiet ergaben zu allen Zeitpunkten Nitrat-Konzentrationen, die unterhalb der Nachweisgrenze ($<100 \mu\text{g/l}$) lagen. Damit wäre auch die erforderliche Grenzkonzentration der Denitrifikation von $50 \mu\text{g/l}$ (AUTORENKOLLEKTIV, 1988) erreicht. Da im unbelasteten Grundwasser die Nitrat-Konzentrationen stets um ein Vielfaches höher lagen, ist davon auszugehen, daß aufgrund der hohen Dichten denitrifizierender Bakterien im belasteten Grundwasserbereich eine schnelle Umsetzung der mit dem Grundwasserstrom transportierten Nitrat-Ionen erfolgt. Der starke Rückgang des Nitratgehaltes ist demnach als Folge der Wirkung dieser Bakteriengruppe anzusehen. Eine weitere Steigerung der Denitrifikation ist im belasteten Grundwasser vermutlich durch den Mangel an Nitrat-Ionen begrenzt.

Auch hierbei kann die Ursache der jahreszeitlichen Schwankungen der Zahlen denitrifizierender Bakterien in den verstärkten Frühjahresniederschlägen vermutet werden. In deren Folge kam es vermutlich im Bereich des Einzugsgebietes für die Grundwasserneubildung des Untersuchungsraumes zu einem verstärkten Eintrag von Nitrat aus den intensiv landwirtschaftlich genutzten Böden in das Grundwasser.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit für die im *MPN*-Verfahren angereicherten Denitrifizierer kein direkter Nachweis eines Degradationspotentials erbracht wurde, ergaben sich deutliche Hinweise auf einen Beitrag denitrifizierender Bakterien zum Abbau der chemischen Kontaminanten. Für eine Vielzahl der Isolate aus allen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches konnte im APILAB-System die Fähigkeit zur Denitrifika-

tion nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Bakterien wiesen zudem sehr häufig ein Abbaupotential für aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, in manchen Fällen auch für beide Substanzklassen auf. Es ist daher davon auszugehen, daß Denitrifikanten, die in allen Kompartimenten nachweisbar waren, im Grundwasserbereich des Untersuchungsgebietes auch zum Abbau der chemischen Kontaminanten beitragen.

Denitrifizierende Bakterien leben fakultativ anaerob, der produktive Abbau von Kohlenwasserstoffverbindungen ist wegen der Notwendigkeit der Aktivierung der Substrate abhängig vom Vorhandensein molekularen Sauerstoffs. Von RABUS et al. (1995) wurden jedoch denitrifizierende Mikroorganismen isoliert, die zur anaeroben Degradation aromatischer Kohlenwasserstoffe fähig waren und diese auch als Wachstumssubstrat nutzen konnten. Die Adaptation denitrifizierender Mikroorganismen an microaerophile Bedingungen konnte von KUKOR et al. (1996) auch auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. So zeigten die Autoren, daß *Pseudomonas sp.*-Isolate dann auf Toluol wachsen konnten, wenn Nitrat vorhanden war. Die Untersuchung der Catechol-2,3-Dioxygenase zeigte eine größere Affinität des Enzyms zu Sauerstoff als ähnliche Enzyme. Auf DNA-Ebene wurden Sequenzen identifiziert, die Ähnlichkeiten mit Sauerstoff abhängigen Regulationselementen aufwiesen. Traten diese Sequenzen in *cis*-Stellung mit den DNA-Bereichen auf, die die Catechol-2,3-Dioxygenase codieren, so konnte eine Erhöhung der Expression dieses Gens festgestellt werden. Die Induktion der Expression des Enzyms erfolgte also bereits bei sehr viel geringeren als den üblichen Sauerstoffkonzentrationen.

Die Abhängigkeit denitrifizierender Bakterien von molekularem Sauerstoff zeigte sich auch bei der Probe aus der Ölphase, die das Grundwasser im Pegelrohr aus genannten Gründen zum Zeitpunkt Herbst 1996 bereits seit einem Jahr meterdick überschichtete. In dieser Probe konnte bei gleichzeitiger Zunahme desulfurizierender Mikroorganismen der Rückgang der MPN-Werte denitrifizierender Bakterien unter die Nachweisgrenze (5/ml) gezeigt werden. Da in der Ölphase stets denitrifizierende Mikroorganismen vorhanden waren, ist der Verlust der Denitrifizierer zu diesem Zeitpunkt offensichtlich auf den permanenten Sauerstoffmangel zurückzuführen.

Als Zeichen sich ändernder Milieuverhältnisse können die MPN-Werte desulfurizierender Mikroorganismen in den Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches angesehen werden. Diese zumeist strikt anaeroben Bakterien wurden vielfach in ölhaltigen Gewässern nachgewiesen. In Proben aus Kompartimenten des Grundwassers des Mineralölwerkes Lützkendorf zeigte sich in ihrem Auftreten eine jahreszeitliche Abhängigkeit. Im Herbst wurden zumeist höhere MPN-Werte bestimmt als im Frühjahr. Eine kompartimentabhängige Schichtung konnte durch das vermehrte Vorkommen der Desulfurikanten in den Sedimenten gezeigt werden. Phasen, in denen geringe Konzentrationen an Sauerstoff zu vermuten waren, enthielten erwartungsgemäß höhere MPN-Werte desulfurizierender Bakterien. Lag die Ölphase in größeren Mächtigkeiten vor (Herbst 1994 im Vergleich zum Frühjahr 1994), so waren die Zahlen der Desulfurikanten deutlich höher. Unter dem Einfluß der Frühjahresniederschläge und der dabei verstärkt auftretenden Vermischung der Phasen führte der Eintrag von Sauerstoff zur fast vollständigen Verdrängung Sulfat reduzierender Bakterien in den Biozönosen der oberen Phasen. Eine Dissoziation von Sauerstoff in das Sediment ist aufgrund seiner kompakten Struktur weitestgehend unmöglich, wodurch in dem Kompartiment diese Ökophysiotypen bestimmt werden konnten. Der Nachweis desulfurizierender Mikroorganismen fiel zumeist mit dem Auftreten Schwefel oxidierender Bakterien zusammen. Der Rückgang der Sulfatkonzentrationen vom unbelasteten zum belasteten Grundwasserbereich ist vermutlich bereits als Folge der Wirkung desulfurizierender Bakterien anzusehen.

Auf die Bedeutung desulfurizierender Mikroorganismen beim Abbau von Kohlenwasserstoffen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde, wiesen AECKERSBERG et al. (1991) und RUETER et al. (1994) hin. Die Autoren isolierten sulfatreduzierende Bakterien, die aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe unter anoxischen Bedingungen als Elek-

tronendonatoren nutzen konnten und bis zum Kohlendioxid abbauten. Unbekannt ist jedoch derzeit noch, wie das Substrat unter diesen Bedingungen aktiviert werden kann (RUETER et al., 1994).

Von GOTTFREUND et al. (1983) [zitiert von AUTORENKOLLEKTIV, 1988] wurde zur Abschätzung der Milieubedingungen im Grundwasserbereich empfohlen, die *MPN*-Werte oxidierender und reduzierender Mikroorganismen eines Stoffkreislaufes zu vergleichen. Für die Gesamtproben aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches wurde deutlich, daß die Zahl der oxidierenden Mikroorganismen zumeist überwiegt. Auch wenn berücksichtigt wird, daß dieser Vergleich nur eine grobe Abschätzung zuläßt, so zeigt er doch, daß die Biozönosen nicht, wie vermutet, unter ständigem Sauerstoffabschluß existieren. Vielmehr werden die Milieubedingungen in diesem oberflächennahen Grundwasserleiter (Abschnitt 2.2) stark durch die Niederschläge in den Frühjahresmonaten (Abschnitt 2.1.2), das Heben und Senken des Grundwasserspiegels, die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit infolge der Wasserhaushaltsmaßnahmen (Pumpen) u. a. beeinflusst, so daß sie die Existenz strikt aerober Mikroorganismen ermöglichen. Eine Änderung im belasteten Grundwasserbereich tritt durch die Übersichtungung des Grundwassers mit einer meterdicken Ölschicht ein. Erwartungsgemäß konnten in der Ölphase danach nur noch reduzierende Mikroorganismen nachgewiesen werden. Erstaunlich war jedoch, daß auch nach einjähriger Übersichtung mit Öl in der Interphase wieder oxidierende Mikroorganismen ermittelt werden konnten. Es ist daher zu vermuten, daß eine Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen aus der die Ölschicht unterströmenden wäßrigen Phase möglich war, wobei das Öl im Pegelrohr, das wie ein Ölsammler wirkt, durch die Strömung nicht mitgerissen werden kann. Eine Sukzession der Biozönosen wie sie von DOTT et al. (1988) in Mineralöl belasteten Grundwässern postuliert wurde, scheint demnach lediglich in der Ölphase des belasteten Grundwasserbereiches nach der „erneuten Havarie“ nachvollziehbar. Die Sauerstoffkonzentrationen in den anderen Kompartimenten sind offensichtlich ausreichend, um eine Existenz oxidierender Mikroorganismen zu ermöglichen.

5.3 Taxonomische Charakterisierung der Isolate mikrobieller Biozönosen

Die Beschreibung der Struktur mikrobieller Biozönosen kann durch die Charakterisierung ihrer taxonomischen Zusammensetzung wesentlich ergänzt werden. Durch den Vergleich der Bakteriengemeinschaften aus Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches wurden Informationen über den Einfluß von Art und Grad der chemischen Kontamination auf die taxonomische Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften erwartet.

Verschiedene Autoren verweisen darauf, daß die Anzahl der untersuchten Isolate Rückschlüsse auf die Diversität und Physiologie der Standortbiozönosen erlauben muß. BIANCHI et al. (1982) erachten eine Anzahl von 20-30 Isolaten für die Bestimmung der Diversitäten mikrobieller Biozönosen für ausreichend. KÖLBEL-BOELKE et al. (1988) konnten natürliche heterotrophe Bakteriengemeinschaften anhand der Untersuchungen von 40-60 Isolaten charakterisieren, die hinsichtlich physiologischer und morphologischer Merkmale getestet wurden. KÄMPFER et al. (1991) erstellen anhand von 48 Isolaten ein repräsentatives Artenspektrum der Biozönosen Kohlenwasserstoff kontaminierter Standorte.

Die vorliegenden Untersuchungen orientierten sich an diesen Angaben. Im übrigen wurde angestrebt, möglichst die Gesamtheit aller Isolate einer der drei Parallelen einer Verdünnungsstufe zu erfassen, um die Subjektivität bei der Auswahl der Isolate zu vermeiden. Dieser Schritt war von besonderer Bedeutung, da die isolierten Mikroorganismen die Grundlage aller weiteren Untersuchungen darstellten.

Die taxonomische Charakterisierung von Biozönosen anhand von Isolaten stellt auch bei der Beschränkung auf einen repräsentativen Stichprobenumfang ein sehr zeitaufwendiges Verfahren dar. Neben der physiologischen Charakterisierung der mikrobiellen Biozönosen werden in vielen Arbeiten aber auch Angaben über die taxonomische Zuordnung der untersuchten Umweltisolate gemacht.

AUSTIN et al. (1977) beschreiben durch numerische Taxonomie anhand von 98 Isolaten die mikrobiellen Biozönosen Petroleum kontaminierter Wässer. Durch die Untersuchungen biochemischer, morphologischer und physiologischer Merkmale wurde eine Clusterung der Bakteriengemeinschaften vorgenommen. Die dabei ausgegliederten Cluster wurden als *Pseudomonaden*, *Actinomyceten*, *Micrococcen* und *Nocardia* identifiziert. RIDGWAY et al. (1990) bestimmen in durch Benzinkohlenwasserstoffe kontaminierten Gewässern vier Hauptgattungen mittels klassischer Methoden. Dabei stellten die *Pseudomonaden* mit ca. 87 % den überwiegenden Anteil der untersuchten Isolate. Als weitere Gattungen wurden *Alcaligenes*, *Nocardia* und *Micrococcus* identifiziert.

Miniaturisierte Testsysteme konnten in den vergangenen Jahren eine große Zeitersparnis bringen und wurden bei der taxonomischen Charakterisierung von mikrobiellen Biozönosen aus Umweltproben angewandt. So beschreiben DOTT et al. (1984) und KÄMPFER et al. (1991) die Bakterienpopulationen aus Kohlenwasserstoff belasteten Grundwässern. JOHNSEN et al. (1996) identifizieren Phenanthren abbauende Bakterien mit Hilfe der Systeme BIOLOG® und APILAB®.

Die Identifikation der Isolate aus dem Grundwasser des Mineralölwerkes Lützkendorf erfolgte mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Identifizierungssysteme BIOLOG® und APILAB®. Während in diesen Systemen ursprünglich hauptsächlich medizinisch relevante Mikroorganismen erfaßt waren, sollten durch die Ergänzung der Datenbanken mit Substratverwertungsmustern umweltrelevanter Mikroorganismen eine bessere Eignung dieser Systeme zur Identifizierung von Mikroorganismen aus Umweltproben erreicht werden. Die Untersuchungen der isolierten Bakterien aus unterschiedlichen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches machten jedoch deutlich, daß dieser Anspruch des Herstellers nur bedingt erfüllt wurde. Besonders grampositive Mikroorganismen konnten selten sicher identifiziert werden. Häufig wurde bereits bei der Vorkultivierung ein schlechteres Wachstum festgestellt als auf dem entsprechenden Isolationsmedium, was zum einen durch das BIOLOG®-Inkubationsmedium selbst, zum anderen aber auch durch die vorgeschriebene Temperatur bedingt sein kann, die mit 30°C für Bakterien aus dem Grundwassermilieu eher ungeeignet erscheint. Für eine Vielzahl isolierter Mikroorganismen, besonders grampositiver, ergaben sich nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 Stunden weniger als 4 positive Reaktionen, so daß ein für die Identifizierung notwendiger Vergleich mit den Substratverwertungsmustern der Datenbank nicht möglich war. Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu keiner Identifizierung. Zudem wurden bei zahlreichen Mikroorganismen Diskrepanzen zwischen der ermittelten Identität und den daraus resultierenden und in der Bestimmungsliteratur, z. B. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1993), angegebenen Eigenschaften festgestellt, so daß die Mikroorganismen als „nicht identifiziert“ erfaßt wurden. Als Mangel des Systems erwies sich die Tatsache, daß beispielsweise *Actinomyceten*, deren Vorkommen gerade in mit Kohlenwasserstoffen kontaminierten Ökosystemen sehr wahrscheinlich ist und vielfach nachgewiesen wurde (z. B. RIDGWAY et al., 1990), nicht in der Datenbasis des BIOLOG®-Systems berücksichtigt wurden.

Für eine Autorisierung des BIOLOG®-Systems zur Identifizierung von Umweltisolaten muß die Datenbasis um weitere umweltrelevante Mikroorganismen, so beispielsweise um Arten der *Actinomyceten*, erweitert werden. Zudem sollte es dem Nutzer leichter möglich sein, die Datenbasis durch Substratverwertungsmuster von Mikroorganismen zu ergänzen, die sich in den jeweiligen Untersuchungen als relevant herausgestellt haben. Auch wenn die Identität

dieser Mikroorganismen zunächst nicht bekannt ist, so könnten dennoch Angaben über die Häufigkeit ihres Vorkommens in den untersuchten Biozönosen ermöglicht werden.

In Abhängigkeit von der Probe konnten unterschiedliche Anteile der Mikroorganismen taxonomisch bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß der relativ hohe Anteil gramnegativer Isolate in allen untersuchten Biozönosen offensichtlich von Vorteil war, da die Identifizierung dieser Organismen im BIOLOG®-System aufgrund der größeren Datenbasis häufiger erfolgreich war als im Fall der grampositiven Mikroorganismen.

Die dabei ermittelte taxonomische Zusammensetzung entspricht den Literaturdaten. Für Bereiche Kohlenwasserstoff kontaminierter Ökosysteme konnte zumeist ein hoher Anteil von *Pseudomonaden* nachgewiesen werden (FUHS, 1961; AUSTIN et al., 1977; POREMBA et al., 1994; BOCK et al., 1994). VENKATESWARAN et al. (1995) konnten mit Mineralöl eine Biozönose anreichern, die ebenfalls hauptsächlich aus *Pseudomonaden* bestand. RIDGWAY et al. (1990) identifizieren von den 244 Isolaten aus verschiedenen Kohlenwasserstoff kontaminierten Wasser- und Kernbohrungsproben ca. 87% als *Pseudomonaden*. Die Auswirkungen des Einflusses von Mineralölkohlenwasserstoffen auf die taxonomische Diversität mikrobieller Biozönosen werden von BARTHA et al. (1977) in einem Review zusammengefaßt. Die Verfasser führen an, daß die zunächst angenommene Abnahme der Diversität mikrobieller Biozönosen bei Kontamination des Lebensraumes mit Kohlenwasserstoffen in zahlreichen späteren Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte. Danach ergaben sich mehrheitlich Befunde, daß die Diversität davon abhängig ist, ob es sich um eine einmalige oder chronische Kontamination des Standortes handelte. Bei einer einmaligen Kontamination wurde eine geringere Diversität beobachtet, lag ein permanenter Eintrag vor, nahm die Diversität der Biozönose zu. Der Autor verweist auf eine Arbeit von ATLAS und SCHOFIELD von 1975 hin, wonach eine selektive Erhöhung des Anteils von Organismen der Gattung *Pseudomonas* nach einer Kontamination mit Mineralölkohlenwasserstoffen ermittelt wurde.

Angesichts des Potentials dieser Mikroorganismen für die Degradation zahlreicher organischer Verbindungen lassen die Ergebnisse eine besondere Rolle dieser Gattung bei der Dekontamination von Mineralölkohlenwasserstoffen im belasteten Grundwasserbereich des Mineralölwerkes Lützkendorf vermuten. Wenngleich unter den Isolaten der untersuchten Biozönosen sowohl von R2A-Agar als auch von SMSÖ stets ein hoher Anteil von *Pseudomonaden* nachgewiesen wurde, so zeigt sich ein differenzierteres Bild der Populationen anhand ihrer biochemischen Diversität.

5.4 Biochemisches Abbaupotential der Isolate aus mikrobiellen Biozönosen für aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe

Kenntnisse über das Detoxifikationspotential mikrobieller Biozönosen aus anthropogen belasteten Grundwässern stellen eine wichtige Voraussetzung für die Festlegung von Sanierungsstrategien dar. Der Nachweis abbauaktiver Mikroorganismen eröffnet die Möglichkeiten einer biologischen Sanierung dieser Ökosysteme.

Es war daher von großem Interesse zu bestimmen, ob die mikrobiellen Biozönosen aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches über ein Degradationspotential für die vorliegenden chemischen Kontaminanten verfügen und wie hoch der prozentuale Anteil abbauaktiver Mikroorganismen an der Gesamtheit der Isolate war.

Nach Auswertung der chemischen Analysen wäßriger Proben aus dem belasteten Grundwasserbereich (GWBR 6/91) des Mineralölwerkes Lützkendorf wurden Modellsubstanzen aus verschiedenen Klassen der Kohlenwasserstoffe ausgewählt, die Bestandteile des Mineralölrestgemisches darstellten.

Der prozentuale Anteil degradativer Mikroorganismen war von der Herkunft der Biozönose, dem Isolationsmedium, den Testsubstanzen sowie dem Zeitpunkt der Probenentnahme abhängig.

Der Vergleich der mikrobiellen Biozönosen der unterschiedlichen Kompartimente des belasteten Grundwasserbereiches (GWBR 6/91) zeigte eine deutliche Ungleichverteilung des degradativen Potentials für die getesteten aromatischen Modellsubstanzen. In der Ölphase wurde der höchste prozentuale Anteil abbauaktiver Isolate nachgewiesen, im Sediment und in der Wasserphase der geringste.

Diese räumliche Verteilung des Degradationspotentials steht vermutlich in engem Zusammenhang mit den Konzentrationen verfügbarer und abbaubarer Kohlenwasserstoffe in den einzelnen Phasen des Grundwassers. So ist anzunehmen, daß im Bereich der Sedimentbiozönosen die Konzentration relativ leicht abbaubarer Kohlenwasserstoffe wie die Testsubstanzen nach der Passage durch die darüberliegenden Kompartimente wahrscheinlich sehr gering war. Mikroorganismen, die für diese Substanzen abbauaktiv waren, konnten sich offensichtlich nur in sehr geringer Zahl etablieren. Für den Bereich des Sedimentes war zudem zu vermuten, daß eine geringe Konzentration an gelöstem Sauerstoff vorlag, der Anteil reduzierender abbauaktiver Mikroorganismen wurde jedoch in diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Der hohe prozentuale Anteil degradativer Isolate in der Ölphase weist auf das Vorliegen verfügbarer Substanzen hin, die den Modellverbindungen chemisch ähnlich sind, so daß sich zu diesem Zeitpunkt eine entsprechende abbauaktive Biozönose ansiedeln konnte. Der ständige Kontakt der Mikroorganismen mit der Mineralölphase ermöglicht eine vermutlich optimale Versorgung der Bakterien mit Elektronendonatoren. Die Geringmächtigkeit der Ölphase im Frühjahr 1994 läßt zudem die ausreichende Versorgung der Biozönosen mit Elektronenakzeptoren vermuten.

Der Kontakt der Mikroorganismen mit der organischen Phase wird wahrscheinlich durch die Bildung von Biotensiden begünstigt. Hinweise dazu ergaben sich aus Untersuchungen der Ölphase. In Ansätzen zur Bestimmung der MPN-Werte Mangan oxidierender Bakterien wurde nach einer Inkubationszeit von ca. zwei Wochen die beinahe vollständige Zerstörung der im Original aufschwimmenden Ölschicht festgestellt. In weiterführenden mikroskopischen Untersuchungen wurde die Sukzession der Besiedlung von Öltröpfchen gezeigt, in deren Endstadium eine vollständige mikrobielle Besiedlung der verbleibenden Ölfetzen nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Mikroorganismen aus Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches bevorzugten den durch die Catechol-1,2-Dioxygenase katalysierten Abbauweg, der Anteil der mit Catechol-2,3-Dioxygenase ausgestatteten Bakterien war zumeist geringer, zeigte jedoch eine jahreszeitliche Abhängigkeit. Besonders unter den Isolaten aus der Interphase war der Anteil der Mikroorganismen, die den *meta*-Weg der Brenzcatechinumsetzung katalysieren, im Frühjahr höher als im Herbst. Unter der Annahme einer Vermischung der geringmächtigen Ölphase und der Interphase ist es denkbar, daß es zum Zeitpunkt der Frühjahresniederschläge zum verstärkten Eintrag degradativer Bakterien aus der Ölphase in die Interphase kam. Dadurch kann es zusätzlich zu einer Verbreitung des in *Pseudomonaden* zumeist auf extrachromosomalen DNA-Molekülen lokalisierten Abbauweges (*meta*-Spaltung) durch horizontalen Gentransfer gekommen sein. Für die Proben aus der Interphase wurde gleichzeitig ein starker Rückgang des Anteils degradativer Isolate und der als fluoreszierende *Pseudomonaden* identifizierten Bakterien von Frühjahr bis Herbst beobachtet. Ähnliche Hinweise ergaben sich aus dem Vergleich der Isolate aus der Interphase des GWBR 108/94, die von SMSÖ bzw. SMMÖ isoliert wurden. Dabei wurden von beiden Medien ähnliche Anteile abbauaktiver Mikroorganismen isoliert, die als fluoreszierende *Pseudomonaden* identifiziert werden konnten. Dies macht deutlich, daß das Potential zum Abbau der chemischen Kontamination im belasteten Grundwasserbereich an das Vorkommen fluoreszierender *Pseudomonaden* gebunden ist, die offensichtlich als Donor und Rezipient des Degradationspotentials fungieren. Der prozentuale Anteil degradativer Bakterien aus mikrobiellen Biozönosen des belasteten Grundwasserbereiches wies zudem eine deutliche Abhängigkeit vom getesteten Induktor

auf. Dabei zeigte sich, daß in allen Biozönosen die Induktion sowohl der Catechol-1,2-Dioxygenase als auch der Catechol-2,3-Dioxygenase durch Naphthalen bei dem prozentual größten Anteil der Isolate möglich war.

Aus der Literatur ist bekannt, daß unterschiedliche Substrate unterschiedliche Stoffwechselwege (*meta*- oder *ortho*-Spaltung des Catechols) induzieren (BURLAGE et al., 1989). Während Na-Benzolat die Expression der Catechol-2,3-Dioxygenase bewirkt, induziert Catechol die Synthese der Catechol-1,2-Dioxygenase, obwohl es Zwischenprodukt des Toluenaabbaus ist, das ansonsten die *meta*-Spaltung des Catechols bewirkt (BURLAGE et al., 1989). KIVISAAR et al. (1989) weisen die *ortho*-Spaltung des Catechols bei Bakterien nach, die auf Phenol wuchsen, während das Wachstum auf *m*-Toluat zur *meta*-Spaltung des Catechols führte. Salicylat konnte beide Stoffwechselwege des Catechols induzieren. JANKE et al. (1990) konnten nachweisen, daß bei Vorliegen beider Stoffwechselwege die *meta*-Spaltung des Catechols nach Inkubation auf Phenol bevorzugt induziert wurde. Die Autoren verweisen auf Arbeiten von WILLIAMS et al. (1974), die zeigen konnten, daß die Inkubation auf Benzolat in *P. putida* mt-2 (TOL), das sowohl über die Gensequenzen der Catechol-1,2-Dioxygenase als auch der Catechol-2,3-Dioxygenase verfügt, die Induktion der Expression der Catechol-2,3-Dioxygenase bewirkt. Erst nach Verlust des *meta*-Weges, der zumeist plasmidal lokalisiert ist, wurde die Catechol-1,2-Dioxygenase exprimiert. Die Struktur der Substrate bewirkt offensichtlich den Stoffwechselweg seiner Umsetzung. Während für die *ortho*-Spaltung eine sequentielle Induktion der Expression durch das Stoffwechselprodukt *cis,cis*-Muconsäure nachgewiesen wurde (STAMER et al., 1973, zitiert in JANKE et al., 1990), erfolgt die Induktion des *meta*-Weges zumeist spontan bei Auftreten der Substrate.

Die Literaturdaten (KIVISAAR et al., 1989, JANKE et al., 1990, BURLAGE et al., 1989) konnten in den vorliegenden Untersuchungen jedoch nur bedingt bestätigt werden. Durch die Induktion auf Na-Benzolat wurde bei der Mehrzahl der Isolate eine Expression der Catechol-1,2-Dioxygenase nachgewiesen. Der Anteil der Mikroorganismen mit Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten war hingegen geringer. Zudem waren in Isolaten mit Enzymaktivitäten des *meta*-Weges stets auch Catechol-1,2-Dioxygenase-Aktivitäten nachweisbar. Abhängig vom Kompartiment wiesen die Biozönosen unterschiedliche Anteile von Bakterien auf, die über beide Stoffwechselwege verfügten. Am häufigsten wurden solche Mikroorganismen aus der Ölphase isoliert. In Kenntnis der Tatsache, daß die Catechol-2,3-Dioxygenase in *Pseudomonaden* plasmidal codiert ist und daß in den untersuchten mikrobiellen Biozönosen ein großer Anteil der Isolate dieser Gattung zuzuordnen war, kann die vielfach nachgewiesene Instabilität degradativer Plasmide nach Inkubation auf Benzolat haltigem Medium als Erklärung für den deutlich geringeren Anteil Catechol-2,3-Dioxygenase exprimierender Bakterien angeführt werden. Im Unterschied zu den von BURLAGE et al. (1989) gemachten Angaben wurde auch nach Inkubation der Mikroorganismen auf *m*-Toluat ein deutlich geringerer Anteil Catechol-2,3-Dioxygenase als Catechol-1,2-Dioxygenase aktiver Isolate nachgewiesen. Die Catechol-2,3-Dioxygenase Aktivität trat zudem stets in Verbindung mit einer Catechol-1,2-Dioxygenase Expression auf. Der Anteil der Isolate mit beiden Stoffwechselwegen war wiederum in der Öl- und Wasserphase am höchsten. Für die Mehrzahl der für Phenol abbauaktiven Isolate konnte eine Expression der Catechol-1,2-Dioxygenase ermittelt werden, ein Teil dieser Bakterien verfügte wiederum über beide Stoffwechselwege. Die Ergebnisse ließen jedoch nicht erkennen, daß eine Induktion der Expression der Catechol-1,2-Dioxygenase erst nach Verlust der Catechol-2,3-Dioxygenase erfolgte wie es von JANKE et al. (1990) für *P. putida* beschrieben wurde. Die Induktion der Expression des *meta*- und des *ortho*-Weges konnte in der Mehrzahl der Isolate aus allen Biozönosen durch Naphthalen erfolgen. Dies weist auf ein hohes Potential der mikrobiellen Populationen zum Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen hin.

Die anhand der chemischen Analysen von Grundwasser- und Sedimentproben aus dem belasteten Bereich nachgewiesene Kontamination des Werksgeländes und seines Unter-

grundes mit Mineralölkohlenwasserstoffen deutete auf eine hohe Konzentration an aliphatischen Verbindungen hin, die einen Hauptbestandteil von Mineralölen darstellen. Von besonderem Interesse war es festzustellen, ob sich in den Biozönosen auch für diese Verbindungen ein autochthones Degradationspotential etabliert hatten. Hinweise auf Abbaureaktionen hatten sich aufgrund der in den Wasserproben ermittelten DOC-Gehalte ergeben (Abschnitt 2.3.2.1). Offensichtlich laufen vor Ort Reaktionen ab, in deren Folge leichter wasserlösliche Metabolite gebildet werden, die zum Anstieg des DOC-Gehaltes führen.

In Abhängigkeit vom ursprünglichen Isolationsmedium der Mikroorganismen konnte ein deutliches Degradationspotential in allen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches ermittelt werden. Die Ölphase wies mit 97% den prozentual größten Anteil degradativer Mikroorganismen auf.

Der Anteil der für aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe abbauaktiven Isolate zeigte eine signifikante Abhängigkeit vom ursprünglichen Isolationsmedium. Der Zusatz von Spindelöl bzw. Mineralölrestgemisch als einzige Kohlenstoffquelle führte erwartungsgemäß zur Isolation einer größeren Anzahl von Mikroorganismen, die über entsprechende Enzymsysteme verfügen, den Abbau dieser Kohlenstoffquellen zu katalysieren. Es zeigte sich, daß die Stabilität degradativer Leistungen in Mikroorganismen auch nach mehrfachen Passagen der Isolate auf R2A-Agar nicht beeinträchtigt wurde. Der direkte Vergleich der Anteile degradativer Isolate, die von SMSÖ isoliert und danach auf demselben Medium bzw. auf R2A-Agar weiterkultiviert wurden, zeigte, daß das Degradationspotential nach mehreren Passagen auf R2A-Agar unbeeinträchtigt war, auf SMSÖ wurde jedoch ein deutlicher Rückgang des Anteils abbauaktiver Isolate festgestellt. Die Verwendung von Medien mit Zusatz des aus dem belasteten Grundwasser entnommenen Mineralölrestgemisches führte zur Kultivierung des vergleichsweise höchsten Anteils degradativer Mikroorganismen. Eine Weiterkultivierung bzw. Stammhaltung der Isolate auf SMSÖ bzw. SMMÖ bewirkte hingegen in einigen Isolaten den Verlust degradativer Eigenschaften, während diese auf R2A-Agar erhalten blieben. Daher ist eine Stammhaltung auf R2A-Agar durchaus empfehlenswert.

5.5 Molekularbiologische Charakterisierung abbauaktiver Isolate aus mikrobiellen Biozönosen

Durch die Einführung molekularbiologischer Methoden in die umweltmikrobiologische Forschung stehen umfangreiche Techniken zur Verfügung, die große Fortschritte im Verständnis der Struktur, Dynamik und Funktion mikrobieller Biozönosen ermöglichen. Diese Methoden führen zumeist zu einer relativen Unabhängigkeit der Untersuchungen von Kultivierungsverfahren (HUGENHOLTZ et al., 1996). Sie bieten u. a. den großen Vorteil, daß durch die Kombination geeigneter Techniken sowohl eine Identifizierung als auch eine Abschätzung des Einflusses der Mikroorganismen auf die Beschaffenheit ihres Lebensraumes möglich ist. Mit molekularbiologischen Methoden kann auf genotypischer Ebene der Nachweis eines degradativen Leistungspotentials der Mikroorganismen erfolgen, ohne daß eine phänotypische Ausprägung- beeinflusst durch Milieu oder Kultivierung- erforderlich ist. So gelang es OGRAM et al. (1995), die mRNA des Toluol-4-Monooxygenase-Genes in Tiefseesedimenten nachzuweisen. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, die *in situ*-Aktivität von Organismen mit bestimmten Abbauleistungen unter ökologisch relevanten Umweltbedingungen zu bestimmen. In den nächsten Jahren wird es von besonderem Interesse sein, Methoden zu entwickeln, die eine effiziente Isolation der RNA-Spezies aus Mikroorganismen erlauben, um derartige Untersuchungen fortzusetzen und auf andere Standorte und Zielsequenzen zu erweitern.

Die Anwendung der PCR-Techniken ermöglicht es, Gensequenzen, die, bezogen auf die Gesamtheit der Biozönose, in nur sehr geringen Konzentrationen vorkommen, zu amplifizieren und damit nachzuweisen oder sie weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen. Durch die zur Verfügung stehenden Hybridisierungstechniken gelingt heute mit unterschied-

licher Sensitivität der *in situ*-Nachweis von Genen oder Genfragmenten mit Hilfe von Sonden. SAYLER et al. (1985) weisen durch DNA-DNA-Hybridisierung unter 10^6 Kolonien eine Kolonie nach, deren Bakterien Träger des TOL-Plasmides sind.

Aus den Ausführungen wird deutlich, daß das molekularbiologische Methodenrepertoire eine umfangreichere, präzisere und um wesentliche Aussagen erweiterte Charakterisierung mikrobieller Populationen ermöglicht. Dabei werden die Untersuchungen sowohl anhand von Gesamt-DNA aus der Probenmatrix als auch mittels isolierter Mikroorganismen aus den Biozönosen vorgenommen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden anhand von Isolaten aus Biozönosen insbesondere des belasteten Grundwasserbereiches durchgeführt. Die Untersuchungen sollten die Ergebnisse zum biochemischen Degradationspotential hinsichtlich des Nachweises der für die Kontaminanten klassischen Abbauewege ergänzen und erweitern. Zudem wurden Hinweise über das Vorkommen von extrachromosomalen DNA-Molekülen als mobile Träger des Degradationspotentials in den Biozönosen erwartet. Von besonderem Interesse waren Ergebnisse, die Anhaltspunkte zum Verbreitungsmechanismus degradativer Leistungen ergaben.

Das Vorhandensein von Einzelisolaten aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches war für diese Fragestellungen von großem Vorteil. Das für die Einzelisolate biochemisch ermittelte Degradationspotential konnte somit genotypisch bestätigt werden. Zudem war es möglich, einen prozentualen Anteil degradativer Mikroorganismen mit funktionellen Genen, die katabolische Enzyme codieren, an der Gesamtzahl der Isolate zu bestimmen und damit die mikrobiellen Biozönosen zu charakterisieren.

5.5.1 Nachweis von Gensequenzen für geradative Leistungen durch PCR-Amplifikation und Hybridisierung

Unter Berücksichtigung der chemischen Zusammensetzung der Kontamination im belasteten Grundwasserbereich wurde im Verlauf der molekularbiologischen Untersuchungen zunächst mit Hilfe von PCR-Amplifikationen und nachfolgender Hybridisierung der Nachweis von Genen, die Enzyme mit initialer (alk B bzw. nah Ac) bzw. zentraler Bedeutung im Stoffwechsel aliphatischer (alk B), aromatischer (xyl E) und polycyclischer aromatischer (nah Ac) Kohlenwasserstoffe codieren, angestrebt.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die prozentualen Anteile der Isolate, in denen die genannten Gensequenzen amplifiziert werden konnten, in Abhängigkeit vom Kompartiment unterscheiden. So wurden die drei ausgewählten Genfragmente in Isolaten aus der Ölphase häufiger amplifiziert als in Isolaten aus der Wasserphase. Am häufigsten konnte das Genfragment der Naphthalendioxygenase amplifiziert werden, während trotz hohem Abbaupotential für aliphatische Kohlenwasserstoffe nur in einem geringen Anteil der Isolate die Amplifikation der Alkanmonooxygenase nachgewiesen werden konnte. Es wurden in den meisten Isolaten PCR-Produkte mit einer geringeren als der errechneten Fragmentgröße gelelektrophoretisch nachgewiesen. Die Hybridisierung mit der internen Oligonukleotidsonde alk B (S) zeigte jedoch nur mit einer geringen Anzahl der Isolate Homologien.

Ähnliche Ergebnisse werden von WHYTE et al. (1996) beschrieben. Die Autoren amplifizierten in 135 psychrophilen Isolaten unterschiedlicher Ökosysteme Fragmente katabolischer Gene des Stoffwechsels aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe. Sie wiesen in einer Vielzahl der Isolate alk B-PCR-Fragmente nach. Die anschließende Hybridisierung mit einer aus dem Herkunftsorganismus (*Pseudomonas oleovorans*) amplifizierten internen Gensonde ergab nur für wenige alk B-Amplifikate der Isolate entsprechende Hybridisierungssignale (13%). Wurde hingegen das entsprechende alk B-Amplifikationsfragment eines der psychrophilen Isolate als Genprobe eingesetzt, konnten in der Mehrzahl der untersuchten Mikroorganismen Hybridisierungssignale nachgewiesen werden (63%). Die Autoren diskutierten die Möglichkeit, daß sich unter den Milieubedingungen vor Ort Veränderungen in

der Primärstruktur des alk B-Genes in Umweltisolaten ergaben. Somit konnte zwar eine Amplifikation stattfinden, eine Hybridisierung war jedoch aufgrund einer zu geringen Homologie zwischen Amplifikationsfragment und Gensonde (aus *Pseudomonas oleovorans*) nicht möglich. Die Veränderung der Primärstruktur wurde als Adaptation der Mikroorganismen diskutiert, die in einer Erweiterung des Substratspektrums auf länger-kettige aliphatische Kohlenwasserstoffe bestand. Das breite Substratspektrum (aliphatische Komponenten und Alkylbenzene) des Alkanhydroxylasesystems wurde ausführlich von VAN BEILEN et al. (1994) beschrieben.

In gleicher Weise lassen sich die Untersuchungsergebnisse an Biozönosen des Grundwassers im Bereich des Mineralölwerkes Lützkendorf interpretieren. Die Primersequenzen zur Amplifikation des alk B-Genes wurden der Arbeit von WHYTE et al. (1996) entnommen. Sie orientierten sich an der Primärstruktur des alk B-Genes aus dem Herkunftsorganismus *Pseudomonas oleovorans*. Es wäre denkbar, daß es in den psychrophilen Mikroorganismen des Grundwasserbereiches durch Mutationen im Gen der Alkanmonooxygenase zu einer Adaptation an die Milieubedingungen vor Ort gekommen ist, was sich in einer geänderten Primärstruktur des Genes widerspiegelt. Daher war eine Hybridisierung der Amplifikationsfragmente aus den Isolaten mit der anhand der Nukleotidsequenz des alk B-Genes aus *Pseudomonas oleovorans* abgeleiteten Oligonukleotidsonde nur in wenigen Fällen möglich. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus den Arbeiten von KOK et al. (1989). Die Autoren analysierten die Primärstruktur des alk B-Genes aus *Pseudomonas oleovorans* und stellten fest, daß die Zusammensetzung der Codons dieses Genes sich auffällig von der anderer *Pseudomonaden*, aber auch *E. coli* unterscheiden. Häufiger als es bisher für die Gruppe der *Pseudomonaden* nachgewiesen wurde, ist die *wobble* Position des Triplets mit Guanin oder Cytosin besetzt. Diese Abweichung von der für *Pseudomonaden* üblichen Codonzusammensetzung ist ein wichtiger Hinweis, daß das katabolische Operon aus verwandtschaftlich weit entfernten Mikroorganismen stammen könnte und beispielsweise durch horizontalen Gentransfer in die Gruppe der *Pseudomonaden* gelangt ist.

Wegen dieser Differenzen war eine Amplifikation des alk B-Genes nur in wenigen Isolaten des belasteten Grundwassers möglich, da sich sowohl Primer- als auch Oligonukleotidsequenz der Sonde aus der Primärstruktur des Herkunftsorganismus *Pseudomonas oleovorans* ableiteten. Obwohl sich die Primärstruktur der alk B-Gene zwischen Herkunftsorganismus und Umweltisolaten unterscheidet, ist die Funktionalität des abgeleiteten Enzyms nicht unbedingt betroffen. Dies wurde von KOK et al. (1989) nachgewiesen. Die Autoren konnten zeigen, daß das alk B-Gen von *Pseudomonas oleovorans* in *P. putida* und *E. coli* exprimiert wurde und die unterschiedliche Codonzusammensetzung die Translation nicht beeinflusst. Zudem ist auch das Vorhandensein alternativer Abbauege für die Degradation aliphatischer Kohlenwasserstoffe in den entsprechenden Isolaten denkbar, wurde jedoch nicht untersucht.

Deutlich höher war der Anteil der Isolate aus dem belasteten Grundwasserbereich, in denen durch Amplifikation und Hybridisierung die Sequenzen der xyl E- und nah Ac-Gene nachgewiesen werden konnten. KOK et al. (1989) präsentieren ähnliche Ergebnisse. Die Autoren konnten bei 33% der Isolate die Existenz des xyl E-Genes nachweisen.

Der Nachweis des Naphthalendioxygenase-Genfragmentes in beinahe allen untersuchten Isolaten bestätigt die Abschätzung des Degradationspotentials durch biochemische Tests. Das Vorkommen von Isolaten mit deutlichem Degradationspotential für Naphthalen, in denen das nah Ac-Fragment nicht amplifiziert bzw. durch Hybridisierung nachgewiesen werden konnte, gibt zu der auch von HERRICK et al. (1993) geäußerten Vermutung Anlaß, daß solche Bakterien entweder Gene enthalten, die zwar die Naphthalendioxygenase codieren, jedoch keinerlei verwandte Sequenzen zum nah Ac-Gen aufweisen (heterologe Gene) oder, daß sie Träger alternativer Stoffwechselwege der Naphthalenmineralisierung sein können. Solche Isolate bieten damit ein interessantes Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen,

die Aufschluß über derartige alternative Stoffwechselwege des Naphthalenabbaus geben könnten.

- Ähnliche Schlußfolgerungen ziehen ALLEN et al. (1997). Sie weisen beispielsweise Unterschiede in der Regulation der Degradation des Naphthalens zwischen *P. putida* und *Rhodococcus sp.* nach. Ebenso konnte gezeigt werden, daß zwischen den Naphthalendioxygenasen aus grampositiven und gramnegativen Bakterien nur noch entfernte Ähnlichkeiten bestehen.
- PELLIZARI et al. (1996) wiesen nach, daß in einigen der aus verschiedenen Böden isolierten Mikroorganismen, die auf Naphthalen wuchsen, offensichtlich keine komplementären Gensequenzen zu dem als Gensonde verwendeten nahA3-Fragment vorhanden waren. Die Autoren vermuten ebenfalls, daß sich die Gensequenzen in der Natur veränderten und zu den als Gensonde verwendeten Fragmenten beträchtliche Unterschiede in der Primärstruktur aufweisen.
- MORE et al. (1994) ermittelten signifikante Restriktionsfragmentpolymorphismen (RFLP) des nah Ac-Genes zwischen Herkunftsorganismus *P. putida* G-7 und der isolierten DNA aus verschiedenen Böden.

Die Ergebnisse zeigten, daß das in den biochemischen Tests belegte Abbaupotential auch auf genotypischer Ebene in Mikroorganismen aus belasteten Grundwasserkompartimenten nachgewiesen wurde. Ausgewählte Genfragmente, die bekannte katabolische Enzyme codieren, konnten amplifiziert und durch Hybridisierung nachgewiesen werden. Die Resultate lassen vermuten, daß in einigen Bakterien die aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffe über andere als die bekannten „klassischen“ Abbauege metabolisiert werden oder durch Adaptationsmechanismen an die Milieubedingungen eine Veränderung der Primärstruktur entsprechender Gensequenzen zu einer Optimierung der Enzyme führte.

5.5.2 Lokalisierung der Codierung degradativer Leistungen auf genetischen Loci

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, insbesondere der *Pseudomonaden*, zum Abbau von Problemstoffen korreliert sehr häufig mit dem Vorkommen extrachromosomaler DNA-Moleküle in diesen Bakterien. Diese degradativen Plasmide sind gut untersucht und ihre katabolischen Operone charakterisiert. Großes Interesse gilt der Abschätzung der Bedeutung dieser DNA-Moleküle für die Verbreitung degradativer Leistungen innerhalb mikrobieller Biozönosen bzw. der Adaptation der Mikroorganismen an sich ständig ändernde Umweltbedingungen.

Die Isolation der plasmidalen DNA aus zahlreichen Umweltisolaten sowohl des belasteten als auch unbelasteten Grundwasserbereiches erbrachte für die Mehrzahl dieser Mikroorganismen das Vorhandensein extrachromosomaler DNA-Moleküle. Die Mehrheit der Isolate wies Plasmide einer Größe auf, deren Molekulargewicht nach dem Vergleich mit bereits bekannten Plasmiden auf ca. 56 kb geschätzt werden kann. Einige Mikroorganismen trugen zusätzlich auch größere Plasmide. Die ermittelten Molekulargewichte sind ein deutlicher Hinweis dafür, daß es sich um degradative Plasmide handeln könnte. PEMBERTON (1983); SAYLER et al. (1985 und 1990) sowie SCHUMANN (1990) geben eine Übersicht über die Molekulargewichte verschiedener Plasmide mit degradativen Eigenschaften. Dabei werden u. a. das TOL-Plasmid (117 kb) und das NAH-7-Plasmid (83 kb) aus *P. putida* genannt, ebenso degradative Plasmide aus *Alcaligenes*-Stämmen, deren Molekulargewichte zwischen 52 und 87 kb betragen. In *Acinetobacter spec.* wurden degradative Plasmide mit einer Größe von ca. 81 kb nachgewiesen.

Angesichts der zentralen Bedeutung plasmidaler DNA für Vorgänge des Gentransfers und der damit verbundenen Verbreitung degradativer Leistungen innerhalb mikrobieller Populationen war es zunächst von großem Interesse, das biochemische Abbaupotential bestimmten genetischen Loci zuzuordnen. Dabei konnte gezeigt werden, daß für das als Gensonde eingesetzte PCR-Amplifikationsfragment der Naphthalendioxygenase aus *P. putida* G7 offensichtlich Zielsequenzen in der Plasmid-DNA unterschiedlicher Isolate vorhanden sind.

Interessanterweise ergaben sich jedoch auch deutliche Hybridisierungssignale mit der ebenfalls in der Präparation enthaltenen chromosomalen DNA. Dies kann als Hinweis für die Codierung des nah-Ac-Genes sowohl im Chromosom als auch auf extrachromosomalen DNA-Molekülen gewertet werden. Das katabolische Operon, dessen Größe mit 25 kb bestimmt wurde (SANSEVERINO et al., 1993), könnte durch Transpositionsprozesse vom Chromosom auf plasmidale DNA oder umgekehrt übertragen worden sein. Derartige Vorgänge haben eine große Bedeutung für die Anpassung einer Bakterienpopulation an veränderte Umweltbedingungen. FAVARO et al. (1996) charakterisieren ein Operon (tmb-Operon), in dem Gene zum Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe organisiert sind. Weitestgehende funktionelle und genetische Homologien zu den xyl-Genen des Plasmides pWWO konnten gezeigt werden. Im Unterschied zu den xyl-Genen auf dem Plasmid pWWO sind die Gene des tmb-Operons chromosomal codiert. Die Autoren schließen aus dem Vergleich beider Operonen, daß auch das xyl-Operon einst chromosomal lokalisiert war und im Zuge von Transpositionsvorgängen auf extrachromosomale DNA-Moleküle gelangte.

Derartige Mechanismen sind für unterschiedliche degradative Leistungen möglich. Eine Codierung degradativer Enzyme auf beiden genetischen Loci bietet dem Organismus den Vorteil, das Abbaupotential auch bei Segregationsverlusten des Plasmides beizubehalten (soweit das Potential auf dem Chromosom produktiv genutzt werden kann).

Dies erscheint vor dem Hintergrund der von SANSEVERINO et al. (1993) beschriebenen Ergebnisse sehr interessant. Die Autoren konnten nachweisen, daß das nah-Enzymsystem nicht nur die Degradation von Naphthalen bewirkt, sondern auch andere Mehrkernaromaten angreifen und abbauen kann. KIYOHARA et al. (1994) bestätigen, daß das Plasmid NAH 7 die Oxidation verschiedener polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe zu Phenol vermitteln kann und postulieren aufgrund seiner Homologien mit dem pah-Operon die Lokalisierung gleicher degradativer Leistungen auf dem Chromosom.

5.5.3 Charakterisierung extrachromosomaler DNA-Moleküle als Träger der Gensequenzen degradativer Leistungen

In einer Vielzahl von Bakterien aus dem belasteten Grundwasserbereich waren Plasmide isoliert worden, die aufgrund ihres Molekulargewichtes als Träger degradativer Leistungen eingeordnet werden können. Das Vorkommen dieser Plasmide mit einer Größe von ca. 56 kb korrelierte mit der Eigenschaft der Mikroorganismen, sowohl aliphatische als auch aromatische Kohlenwasserstoffe abbauen zu können. Aus diesem Grunde war es von besonderem Interesse, diese Plasmide näher zu charakterisieren. Nachdem die Aufsummierung der Restriktionsfragmente der plasmidalen DNA eine Bestätigung des abgeschätzten Molekulargewichtes erbracht hatte, konnte durch Hybridisierungsreaktionen der Nachweis von Gensequenzen degradativer Enzyme auf einzelnen Restriktionsfragmenten erfolgen. Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß alle getesteten Gensequenzen Hybridisierungssignale mit Restriktionsfragmenten der Plasmid-DNA ergaben, d.h. daß gleichzeitig Gensequenzen degradativer Enzyme des Aliphaten-, Aromaten- und PAK-Abbaus auf einem Plasmid codiert sind.

Lange Zeit herrschte die Auffassung, daß die Fähigkeiten eines Organismus, sowohl aromatische als auch aliphatische Kohlenwasserstoffe abbauen zu können, sich einander ausschließende Eigenschaften sind, da diese als Leistungen unterschiedlicher mikrobieller Biozönosen nachgewiesen wurden (SOTSKY et al., 1994). Es wurde die Hypothese entwickelt, daß Plasmide als Träger dieser degradativen Leistungen nicht in einem Organismus coexistieren können, da sie der gleichen Inkompatibilitätsgruppe angehören wie es auch für das TOL-Plasmid und das NAH-Plasmid (SOTSKY et al., 1994) sowie das OCT Plasmid und das CAM-Plasmid (CHAKRABARTY et al., 1973) nachgewiesen werden konnte. Diese verwandten Plasmide konnten nicht stabil in einer Zelle existieren, da sie sich in ihrer Replikation und der

Verteilung auf Tochterzellen stören. Dies führte zu Segregationsverlusten eines der beiden Plasmide.

SOTSKY et al. (1994) gelang durch Koloniehybridisierung der Nachweis degradativer Gensequenzen sowohl des Aliphaten -als auch des Aromatenstoffwechsels in isolierten Mikroorganismen. In Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung der Kohlenwasserstoffverbindungen in den Anreicherungskulturen unterschied sich die Anzahl der Mikroorganismen, in denen sowohl alk B als auch xyl E nachgewiesen werden konnten. Der Anteil der Bakterien betrug nach Anreicherung auf Rohöl 36%, wurde keine Anreicherung vorgenommen, zeigte 32% der Kolonien Hybridisierungssignale mit der alk B- und xyl E-Sonde. Die Anreicherung auf Naphthalen führte zur Verschiebung der Verhältnisse, die Anteile der Bakterien, in denen die Gensequenzen der Alkanmonooxygenase nachgewiesen werden konnten, sanken unter 1%. Die Autoren verweisen auf unveröffentlichte Daten von GREER, der in der aus einem Petroleum kontaminierten Boden isolierten Biozönose bei 83% der Mikroorganismen Gensequenzen der Naphthalendioxygenase, Alkanmonooxygenase und Catechol-2,3-Oxygenase nachweisen konnte.

Neue Gesichtspunkte ergeben sich aus Untersuchungen des Plasmides pAB 96. Der Nachweis der Gensequenzen der Naphthalendioxygenase, Alkanmonooxygenase und Catechol-2,3-Oxygenase auf ein und demselben natürlich vorkommenden Plasmid erscheint sehr ungewöhnlich. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu der eingangs genannten Hypothese, daß Plasmide mit degradativen Eigenschaften für aliphatische bzw. aromatische Kohlenwasserstoffe nicht in einem Organismus coexistieren können (FOGHT et al., 1990) und bestätigt gleichfalls die Untersuchungsergebnisse von SOTSKY et al. (1994).

Das Plasmid (pAB 96) ist offensichtlich das Ergebnis eines Adaptationsprozesses der Mikroorganismen, die über einen langen Zeitraum mit einer Vielzahl aliphatischer, aromatischer und polycyclisch aromatischer Kohlenwasserstoffverbindungen konfrontiert sind.

Adaptationsprozessen von Mikroorganismen gehen zumeist Veränderungen der Primärstruktur mikrobieller DNA voraus. Dabei stellen die veränderten Milieubedingungen, wie beispielsweise eine neue Kohlenstoff- und Energiequelle, das Selektionskriterium für die ständig stattfindenden und spontanen Mutationen dar. So können Basenpaarsubstitutionen Sinnmutationen auslösen, in deren Folge sich beispielsweise die Substratspezifität eines Schlüsselenzyms derart ändern kann, daß die Umsetzung neuer Substrate möglich ist und der Organismus gegenüber anderen mikrobiellen Konkurrenten einen entscheidenden Vorteil besitzt. Bedeutende Mechanismen der Verbreitung des degradativen Potentials innerhalb mikrobieller Biozönosen stellen Austauschprozesse zwischen zwei Organismen (interzellulärer Transfer) oder zwischen den verschiedenen DNA-Molekülen einer Zelle (intrazellulärer Gentransfer) -Chromosom und plasmidale DNA- dar. Diese Prozesse setzen besondere Mechanismen der Rekombination und Kommunikation zwischen den Zellen voraus wie beispielsweise die Konjugation, Transformation oder Transduktion (VAN DER MEER, 1994). Die Insertion transponibler Elemente stellt einen besonderen Mechanismus des Gentransfers dar. Diese genetischen Elemente können ihren Ort innerhalb des Bakterienchromosoms verlagern, aber auch auf extrachromosomale DNA-Moleküle überspringen. Sie werden als natürliche Werkzeuge des *genetic engineering* angesehen. Die Häufigkeit der durch Transposonen verursachten Umbauten innerhalb der DNA wird höher eingeschätzt als die Frequenz spontaner Mutationen. Sie erhöhen damit wesentlich die Überlebenschancen ihrer Träger (PICKUP, 1992). Auf zahlreichen transponiblen Elementen wurden mittlerweile katabolische Gene lokalisiert. In der Übersichtsarbeit von VAN DER MEER (1994) werden dafür zahlreiche Beispiele genannt, so u. a. auch die Lokalisierung von Genen des xyl- und nah-Systems auf Transposonen. Für das Plasmid pWWO konnte von TSUDA et al. (1989) (zitiert in PICKUP, 1992) gezeigt werden, daß das katabolische Operon von Insertionselementen flankiert ist, die ihre eigene Transposition bewirken können. Transponible Elemente

konnten sowohl auf chromosomaler als auch auf plasmidaler DNA nachgewiesen werden (VAN DER MEER, 1994).

In Kenntnis dieser Tatsachen wäre es denkbar, daß das Plasmid pAB 96 das Ergebnis mehrerer Transpositionsvorgänge ist, in deren Verlauf katabolische Gene verschiedener Stoffwechselwege des Abbaus aliphatischer, aromatischer und polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe von Plasmiden und/oder dem Bakterienchromosom auf einem extrachromosomalen DNA-Molekül zusammengefaßt wurden. Jeder Teilschritt muß dabei einen Selektionsvorteil für den Träger des Plasmides dargestellt haben, so daß die genetische Information im Organismus stabil blieb. Katabolische Gene eines Stoffwechselweges sind zumeist in Operonen (Kassetten) organisiert (KOK et al., 1989; KOK et al., 1989; BURLAGE et al., 1989; SANSEVERINO et al., 1993; VAN DER MEER, 1994; KIYOHARA et al., 1994; FOGHT et al., 1996) und werden zumeist auch als solche übertragen. In künftigen Untersuchungen wäre zu prüfen, ob sich auf dem Plasmid pAB 96 noch weitere katabolische Gene der genannten Abbauege befinden.

5.5.4 Verbreitung des Degradationspotentials in mikrobiellen Biozöosen des Mineralöl belasteten Grundwassers

Unter dem Einfluß xenobiotischer Substanzen kann sich die Struktur mikrobieller Biozöosen ändern. Dies führt häufig zur Adaptation der Mikroorganismen an die geänderten Bedingungen, insbesondere durch Optimierung und Verbreitung degradativer Eigenschaften innerhalb der Populationen.

Mechanismen wie Induktion bzw. Derepression spezifischer Enzyme, Veränderung der molekulargenetischen Grundlagen degradativer Leistungen durch Mutationen unter Ausbildung neuer katabolischer Kapazitäten, horizontaler und vertikaler Gentransfer oder selektive Anreicherung von Organismen, die die Kontaminanten abbauen, können die katabolische Diversität und die Dichte abbauaktiver Mikroorganismen innerhalb mikrobieller Biozöosen ändern.

5.5.4.1 Nachweis des Plasmides pAB 96 in mikrobiellen Biozöosen des Mineralöl belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches

Nach der Charakterisierung und Lokalisierung degradativer Leistungen auf Restriktionsfragmenten des Plasmides pAB 96 wurde durch Hybridisierung dieses als Sonde eingesetzten Plasmides mit Gesamt-DNA-Präparaten aus degradativen Mikroorganismen des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches die Verbreitung des pAB 96 oder ihm ähnlicher Plasmide innerhalb der Biozöosen untersucht.

In einer Vielzahl der Isolate verschiedener mikrobieller Biozöosen wurden Plasmide nachgewiesen, deren Molekulargewicht dem des Plasmides pAB 96 ähnlich war. Einige Bakterien waren auch Träger größerer Plasmide bzw. mehrerer mit unterschiedlichem Molekulargewicht.

In der Ölphase und Wasserphase, deren Stichprobenumfang untersuchter Bakterien ca. ein Drittel der Gesamtzahl der vorhandenen Isolate betrug, konnte ein Anteil von 75 % bzw. 68 % plasmidtragender Isolate nachgewiesen werden. Die Identität dieser Bakterien wurde im BIOLOG®-System mit *P. fluorescens* bestimmt. Der enge Zusammenhang zwischen dem biochemischen Degradationspotential, dem Vorhandensein extrachromosomaler DNA-Moleküle und der Zugehörigkeit der Isolate zur Gattung *Pseudomonas* ist offensichtlich.

CAMPBELL et al. (1995) vergleichen 135 aus verschiedenen, u. a. auch industriell belasteten Böden isolierte, fluoreszierende *Pseudomonaden* hinsichtlich ihrer Abbaukapazitäten für polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und des Vorkommens extrachromosomaler DNA. Dabei konnten sie in einem Anteil von ca. 44% der Isolate aus industriell belasteten Böden das Vorhandensein von Plasmiden feststellen. Aus der Größe von mehr als 50 kb bei

über der Hälfte dieser Plasmide schließen die Autoren neben der Codierung degradativer Leistungen auch die Verschlüsselung von Transferfunktionen.

Die Hybridisierungssignale der Plasmid-Präparate aus verschiedenen Bereichen des Grundwassers im Untersuchungsgebiet mit dem markierten pAB 96 können noch nicht als Nachweis des Vorkommens dieses Plasmides in den getesteten Biozönosen gewertet werden, da eine vollständige Markierung natürlich auch Bereiche betreffen kann, die ebenfalls in anderen Plasmiden vorkommen und daher nicht ausschließlich für das Plasmid pAB 96 typisch sind. Nach einer eingehenden Charakterisierung des Plasmides sollten die Untersuchungen mit signifikanten Fragmenten als Sonde wiederholt werden, um die Ergebnisse zu bestätigen.

Das Vorhandensein des Plasmides pAB 96 oder eines ihm ähnlichen konnte bereits in den Biozönosen des unbelasteten Grundwasserbereiches wahrscheinlich gemacht werden. POREMBA et al. (1994) postulieren die ubiquitäre Verbreitung von Öl abbauenden Bakterien auch in Ökosystemen, die noch nie mit entsprechenden Stoffen konfrontiert waren. Anhand des Degradationspotentials in biochemischen Tests und der Hybridisierung des Plasmides pAB 96 mit Plasmid-Präparaten aus Isolaten des unbelasteten Grundwasserbereiches 21/92 kann diese Aussage bestätigt werden. Die mikrobiellen Populationen verfügen somit vermutlich über das Potential, auf eine Kontamination des Ökosystems mit Mineralölkohlenwasserstoffen mit selektiver Vermehrung und/oder dem Gentransfer plasmidaler DNA zu reagieren und sich den geänderten Bedingungen anzupassen.

Im belasteten Grundwasserbereich konnte die Verbreitung des Plasmides pAB 96 in unterschiedlichen Kompartimenten gezeigt werden. Eine zeitliche Stabilität des Plasmides pAB 96 in Isolaten aus der Ölphase konnte zu unterschiedlicher Probenahmezeitpunkte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr tritt ein Plasmid mit geringerem Molekulargewicht auf, das jedoch mit der Sonde pAB 96 hybridisiert; eine Verwandtschaft der Plasmide ist daher wahrscheinlich.

Hybridisierungssignale im Bereich der plasmidalen DNA in Isolaten der Interphase des belasteten Grundwasserbereiches 108/94 zeigen das Vorkommen komplementärer Sequenzen auch in räumlich getrennten Biozönosen.

Hybridisierungssignale ergaben sich auch mit größeren Plasmiden in Isolaten aus verschiedenen Biozönosen. Da bekannt ist, daß degradative Plasmide aufgrund ihrer Struktur (Transposonen) häufig Deletionen oder Duplikationen unterliegen, die sowohl das gesamte Operon als auch Teile davon betreffen, könnte dies zu Veränderungen im katabolischen Operon des Urplasmides geführt und damit auch sein Molekulargewicht beeinflusst haben. Zudem wäre es denkbar, daß ein ursprünglich kleineres Plasmid durch Rekombination zusätzliche Informationen aufgenommen hat.

Die Verbreitung des Degradationspotentials innerhalb mikrobieller Biozönosen ist vielfach auch als das Ergebnis einer selektiven Vermehrung abbauaktiver Mikroorganismen beschrieben worden. Der hohe Anteil von *Pseudomonaden* unter den Isolaten der untersuchten Biozönosen deutete zunächst auch auf diese Möglichkeit hin. Die biochemischen Tests zur Bestimmung des Abbaupotentials ließen jedoch für zahlreiche Isolate kein Abbaupotential für die Modellsubstanzen erkennen.

Die Methode des Ribotyping konnte Anhaltspunkte liefern, daß sich in den Grundwasserbiozönosen besondere Stämme etabliert haben. Sie erlaubte den Vergleich der Hybridisierungsmuster restringierter chromosomaler DNA. Dabei stand weniger eine Identifizierung im Vordergrund als vielmehr die Möglichkeit, die untersuchten Mikroorganismen mit weitestgehend übereinstimmendem Hybridisierungsmuster in Gruppen gleichen Ribotyps und damit einer engen Verwandtschaft zusammenfassen zu können. Für die Untersuchungen wurden Isolate ausgesucht, die folgende Voraussetzungen erfüllen mußten:

- biochemischer Nachweis des Abbaupotentials für mindestens eine der getesteten Modellsubstanzen,
- molekularbiologischer Nachweis für mindestens eine der getesteten Gensequenzen,
- Identifizierungsergebnis *P. fluorescens* im BIOLOG®-System bzw. Nachweis der postulierten Eigenschaften auf Pseudo F-Agar.

Der Nachweis der Zugehörigkeit von Mikroorganismen aus verschiedenen Kompartimenten des belasteten und unbelasteten Grundwasserbereiches zu einem Ribotyp zeigt die enge taxonomische Verwandtschaft. Daraus kann geschlossen werden, daß die Verbreitung des Degradationspotentials zusätzlich zu den vermuteten Mechanismen des horizontalen Gentransfers auch durch die selektive Vermehrung degradativer Mikroorganismen innerhalb der Grundwasserbiozöten bedingt ist.

6 Zusammenfassung

Aus verschiedenen Kompartimenten des mit Mineralöl belasteten und unbelasteten Bereiches eines Grundwasserleiters wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben analysiert und unter Anwendung klassischer mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden die Struktur, das Abbaupotential sowie die Dynamik dieses Potentials innerhalb der Biozönoson charakterisiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollten Rückschlüsse über die Beeinflussung der Beschaffenheit des Grundwassers durch aerobe Mikroorganismen erlauben.

Die Untersuchungsergebnisse können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Die Verwendung eines speziellen Schöpfers ermöglichte die phasengetrennte Entnahme von Probenmaterial aus der dem Grundwasser aufschwimmenden Ölphase, der Interphase, der Wasserphase und dem Sediment. Dies gestattete erstmals eine differenzierte Analyse der mikrobiellen Biozönoson der verschiedenen Kompartimente.
2. Die Bestimmung der Lebendkeimzahlen ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kompartimenten sowohl des unbelasteten als auch des belasteten Grundwasserbereiches in Abhängigkeit vom Probenahmezeitpunkt und dem Inkubationsmedium. Dabei wiesen die Ölphase die geringsten und die Interphase sowie das Sediment die höchsten KBE-Werte auf. Auf SMSÖ konnten in den Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches zumeist höhere Lebendkeimzahlen nachgewiesen werden als auf R2A-Agar, im unbelasteten Grundwasserbereich wurden auf beiden Medien ähnliche KBE-Werte ermittelt.
3. In Gesamtproben aus Kompartimenten beider Grundwasserbereiche konnten für verschiedene ökophysiologische Gruppen höhere Dichten aerober als anaerober Bakterien ermittelt werden. In Abhängigkeit vom beprobten Kompartiment bzw. dem Zeitpunkt seiner Entnahme wurde ein deutliches Potential der Biozönoson zur Denitrifikation festgestellt. Für die Nutzung weiterer alternativer Elektronenakzeptoren ergaben sich zusätzliche Hinweise.
4. Anhand von Primärisolaten wurde eine nähere Charakterisierung der mikrobiellen Biozönoson beider Grundwasserbereiche vorgenommen. Die taxonomische Einordnung der Isolate mit Hilfe des BIOLOG®-Systems ergab für alle Populationen einen hohen Anteil von *Pseudomonaden*, eine Dominanz von Isolaten mit der Identität *P. fluorescens* war dabei in allen Proben auffällig. Die Diversität der Biozönoson nahm vom unbelasteten zum belasteten Grundwasserbereich deutlich ab.
5. In biochemischen Tests wurde das physiologische Potential der Primärisolate bestimmt, aromatische und aliphatische Modellsubstanzen abzubauen. Der Anteil der Mikroorganismen unter den Isolaten, die aromatische Kohlenwasserstoffe abbauen konnten, zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom ursprünglichen Inkubationsmedium der Bakterien und eine signifikante Ungleichverteilung zwischen den Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches. In der Ölphase konnte der höchste Anteil abbauaktiver Bakterien bestimmt werden, in der Wasserphase der geringste. Die aromatischen Modellsubstanzen induzierten häufiger den *ortho*-Weg als den *meta*-Weg der Brenzcatechinumsetzung. Besonders unter Isolaten von SMSÖ wurden Bakterien nachgewiesen, die beide Wege der Brenzcatechinumsetzung induzierten. Naphthalen als Modellsubstanz der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wurde von den Primärisolaten am häufigsten abgebaut. Für den unbelasteten Grundwasserbereich konnten in 6% der Isolate Abbauaktivitäten für aromatische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen werden. Im zeitlichen Verlauf der Untersuchungen wurde ein Rückgang des Anteils degradativer Mikroorganismen in verschiedenen Kompartimenten nachgewiesen, der mit der Abnahme des Anteils fluoreszierender *Pseudomonaden* einherging.
6. Für die Bestimmung des Abbaupotentials der Primärisolate für aliphatische Kohlenwasserstoffe wurde ein modifizierter BIOLOG-MT-Test entwickelt. In Abhängigkeit vom Inku-

- bationsmedium konnten in einzelnen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches signifikante Unterschiede im Anteil abbauaktiver Isolate bestimmt werden. In der Ölphase verwerteten 97% der Isolate die angebotenen n-Alkane. Im Unterschied zum Degradationspotential für aromatische Kohlenwasserstoffe zeigten wesentlich mehr Isolate des Sedimentes Abbaueigenschaften gegenüber den getesteten n-Alkanen. Die Fähigkeit, mehr als eines der angebotenen Alkane zu verwerten, war in der Mehrzahl der Isolate aller Kompartimente nachweisbar. Im unbelasteten Grundwasserbereich war das Abbaupotential der Sedimentisolate wesentlich höher als das der Isolate aus der Wasserphase.
7. Durch die Anwendung molekularbiologischer Methoden konnten die Aussagen über Struktur und Abbaupotential mikrobieller Biozönosen ergänzt und erweitert werden. Mittels PCR -Technik und Hybridisierungsverfahren waren ausgewählte Genfragmente, die Schlüsselenzyme des Aromaten- und Aliphatenabbaus codieren, in Umweltisolaten nachzuweisen. Das Genfragment der Naphthalendioxygenase wurde dabei am häufigsten amplifiziert.
 8. In zahlreichen Isolaten aus unterschiedlichen Kompartimenten konnte das Vorhandensein extrachromosomaler DNA-Moleküle gezeigt werden. Einige Plasmide wiesen Zielsequenzen für das als Sonde eingesetzte Amplifikationsfragment der Naphthalendioxygenase auf.
 9. Eines dieser extrachromosomalen DNA-Moleküle (pAB 96) wurde näher charakterisiert. Dabei konnte die Lokalisierung von DNA-Sequenzen aus Genen sowohl des Aliphaten- als auch des Aromatenabbaus auf diesem Plasmid nachgewiesen werden. Damit ist es wahrscheinlich, daß Abbaupfade für n-Alkane sowie für Naphthalen und Brenzcatechin auf diesem Plasmid codiert sind. Die Gensequenzen waren bestimmten Restriktionsfragmenten zuzuordnen.
 10. Mit verschiedenen Plasmiden aus Isolaten unterschiedlicher Kompartimente des unbelasteten und belasteten Grundwasserbereiches konnten Homologien zum Plasmid pAB 96 nachgewiesen werden.
 11. Durch die Zuordnung verschiedener Isolate zu ein und demselben Ribotyp war es möglich zu zeigen, daß das Degradationspotential innerhalb der mikrobiellen Biozönosen durch unterschiedliche Mechanismen verteilt wird. Dies erfolgt sowohl durch die Weitergabe plasmidaler DNA durch horizontalen Gentransfer als auch durch eine selektive Vermehrung optimierter Mikroorganismen in den Grundwasserbiozönosen.

Abschließende Bemerkungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich eine Vielzahl neuer Fragen, deren Beantwortung zum besseren Verständnis der Struktur und Dynamik mikrobieller Biozönosen des Ökosystems Grundwasser beitragen könnten. Die Vielzahl der Isolate, die während der Bearbeitung des Themas gesammelt wurden, stellen einen großen Fundus für weitere Untersuchungen dar.

1. Von grundsätzlichem Interesse für das Verständnis der Dynamik der Bakteriengemeinschaften wäre es zunächst zu untersuchen, welchen Beitrag oligotrophe, autochthone Mikroorganismen eines unbelasteten Grundwassers beim Auftreten einer Kontamination dieses Ökosystems (z. B. mit Kohlenwasserstoffen) zum Abbau leisten können. Es wäre die Frage zu beantworten, ob unter den Mikroorganismen dieser Biozönosen Bakterien sind, die als Mixotrophe im unbelasteten Grundwasser chemolithotroph existieren und bei Eintrag organischer Verbindungen organotroph leben. Damit könnten sie einen Ausgangspunkt der Adaptationsprozesse der Bakteriengemeinschaften an die geänderten Milieubedingungen darstellen.
2. Der Beitrag anaerober Mikroorganismen zum Abbau der organischen Belastung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden. Die Untersuchung dieser Organismengruppe würde zu einer wichtigen Ergänzung der getroffenen Aussagen beitragen.
3. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen werfen interessante Fragen auf. Aufgrund des biochemisch nachgewiesenen Abbaupotentials für die getesteten Modells-substanzen, für die sich jedoch in einigen Isolaten durch PCR keine Genfragmente klassischer Abbauewege amplifizieren ließen, liegt die Vermutung nahe, daß eine Degradation über andere Stoffwechselwege verläuft. Durch die große Anzahl an Isolaten aus verschiedenen Biozönosen unterschiedlicher Kompartimente steht ein umfangreiches Material zur Untersuchungen dieser Abbauewege zur Verfügung.
4. Durch die hohen Konzentrationen mehrkerniger, polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe im Grundwasser über einen langen Zeitraum bestehen in den Kompartimenten des Grundwasserleiters gute Voraussetzungen, daß sich dort Mikroorganismen etabliert haben, die auch schwer abbaubare Substanzen verwerten können. Da Naphthalenabbauer mit einem hohen Anteil unter den Isolaten nachgewiesen werden konnten, wäre zu prüfen, ob sich darunter derartige Spezialisten befinden.
5. Von besonderem Interesse ist auch eine weitere Charakterisierung des Plasmides pAB 96 und anderer Plasmide aus Isolaten der mikrobiellen Biozönosen. Für das Plasmid pAB 96 wäre zu untersuchen, ob sich neben den molekularbiologisch nachgewiesenen Gensequenzen klassischer Abbauewege noch weitere Gene befinden, eventuell sogar die vollständigen katabolischen Operonen auf diesen extrachromosomalen DNA-Molekülen lokalisiert sind. Zudem sind weitere Untersuchungen zur Verbreitung dieses Plasmides (auch im zeitlichen Verlauf) in den mikrobiellen Biozönosen wünschenswert. Da es sich bei dem Plasmid pAB 96 vermutlich um das Ergebnis eines besonderen Adaptationsprozesses handelt, ist der Nachweis einzelner Entwicklungsstufen sicherlich von großem Interesse.
6. Unberücksichtigt bleiben mußten auch die Fähigkeiten der Mikroorganismen zur Synthese von Biotensiden, deren molekularbiologischen Grundlagen weitestgehend ungeklärt sind.
7. Aus einer näheren molekularbiologischen Charakterisierung der durch PCR amplifizierten Gensequenzen klassischer Abbauewege (z. B. Ermittlung der Nukleotidsequenz der alk B-, xyl E- und nah Ac-Amplifikationsfragmente) wären Hinweise auf die Veränderung dieser Gene im Zuge einer Adaptation an die speziellen Milieubedingungen zu erwarten.

Obwohl es nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein Sanierungskonzept zu erarbeiten, so ergeben sich aus den Ergebnissen deutliche Hinweise auf einen mikrobiellen Abbau der chemischen Kontamination. Die Bedingungen für einen mikrobiellen Abbau wären durch gezielte Maßnahmen zu optimieren. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lassen sich Schlußfolgerungen ableiten, die bei der Entwicklung einer Strategie zur Sanierung herangezogen werden könnten. Die praktische Umsetzbarkeit der folgenden Vorschläge kann und soll freilich nicht beurteilt werden.

- Eine der wesentlichsten Voraussetzungen einer *in situ*-Sanierung ist das Abbaupotential der mikrobiellen Biozosen für die Schadstoffe (Abb. 68). Diese Bedingung ist angesichts des hohen Anteils degradativer Isolate in allen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches erfüllt.
- Ein Sanierungserfolg würde nach den derzeit vorliegenden Erfahrungen dadurch minimiert, daß ein Teil der Schadstoffe im Grundwasser des Untersuchungsgebietes vermutlich noch in Phase vorliegen. Besonders durch den Ausfall der Pumpen kam es kurzzeitig zum Anstieg des Grundwasserspiegels, in dessen Folge die Mächtigkeit der organischen Phase im Brunnenrohr erheblich anstieg. In Kenntnis dieser Tatsache könnten durch gezielte hydraulische Maßnahmen (Heben und Senken des Grundwasserspiegels) die in großer Zahl im Untersuchungsgebiet vorhandenen Beobachtungsbrunnen als Ölsammler genutzt und die sich bildende Ölphase abgepumpt werden. Das im Grundwasserleiter verbleibende Öl würde bei einer möglichst weiträumigen Verbreitung größere Oberflächen bieten, die durch Mikroorganismen besiedelt werden können.
- Die Untersuchungen hatten deutlich gezeigt, daß in der (geringmächtigen) Ölphase der Anteil degradativer Mikroorganismen sowohl für aliphatische als auch für aromatische Kohlenwasserstoffe von allen Kompartimenten des belasteten Grundwasserbereiches am höchsten ist. Dies ist vermutlich auf eine Adaptation der mikrobiellen Biozöten (z. B. räumliche Nähe bei der Besiedlung der Ölphase als Voraussetzung für genetische Austauschprozesse zwischen den Bakterien) an Art und Grad der Kontamination zurückzuführen. Zur Nutzung dieses Potentials sollte man nach Möglichkeiten suchen, die Mikroorganismen aus der Ölphase nach dem Abpumpen zurückzugewinnen (z. B. Filtration), um sie dem Grundwasser wieder zuzuführen. Es ist davon auszugehen, daß jedoch bereits durch die Minimierung der Ölphase die Bedingungen für einen mikrobiellen Abbau positiv beeinflusst werden.
- Die Abnahme der Nitrat- und Sulfatkonzentrationen vom unbelasteten zum belasteten Grundwasserbereich sowie die in allen Kompartimenten nachweisbaren Denitrifizierer weisen auf die Fähigkeit der Mikroorganismen aus dem belasteten Grundwasser hin, alternative Elektronenakzeptoren zu nutzen. Dabei ist eine weitere Steigerung der Denitrifikation vermutlich durch den Mangel an Nitrationen limitiert. Die Zuführung dieses Elektronenakzeptors grundwasserstromaufwärts vom kontaminierten Bereich könnte den mikrobiellen Abbau stimulieren, wie Untersuchungen an ähnlichen Standorten zeigten. Das Vorhandensein zahlreicher Brunnen im belasteten und unbelasteten Bereich des Untersuchungsraumes könnte eine weiträumige Einspeisung von mit Nitrat angereicherterem Wasser unterstützen. Dabei sollten die Brunnen nach folgenden Kriterien ausgewählt werden:
 1. Lage in unmittelbarer Nähe des Kontaminationsbereiches, um die Transportstrecken und Verluste möglichst gering zu halten
 2. Ausbau der Filterstrecken bis in den Bereich des kontaminierten Grundwasserleiters, jedoch nicht tiefer, um einen Austrag von Nitrat in den Grundwasserleiter 1.5, die Körsdorfer Schotter, zu verhindern.

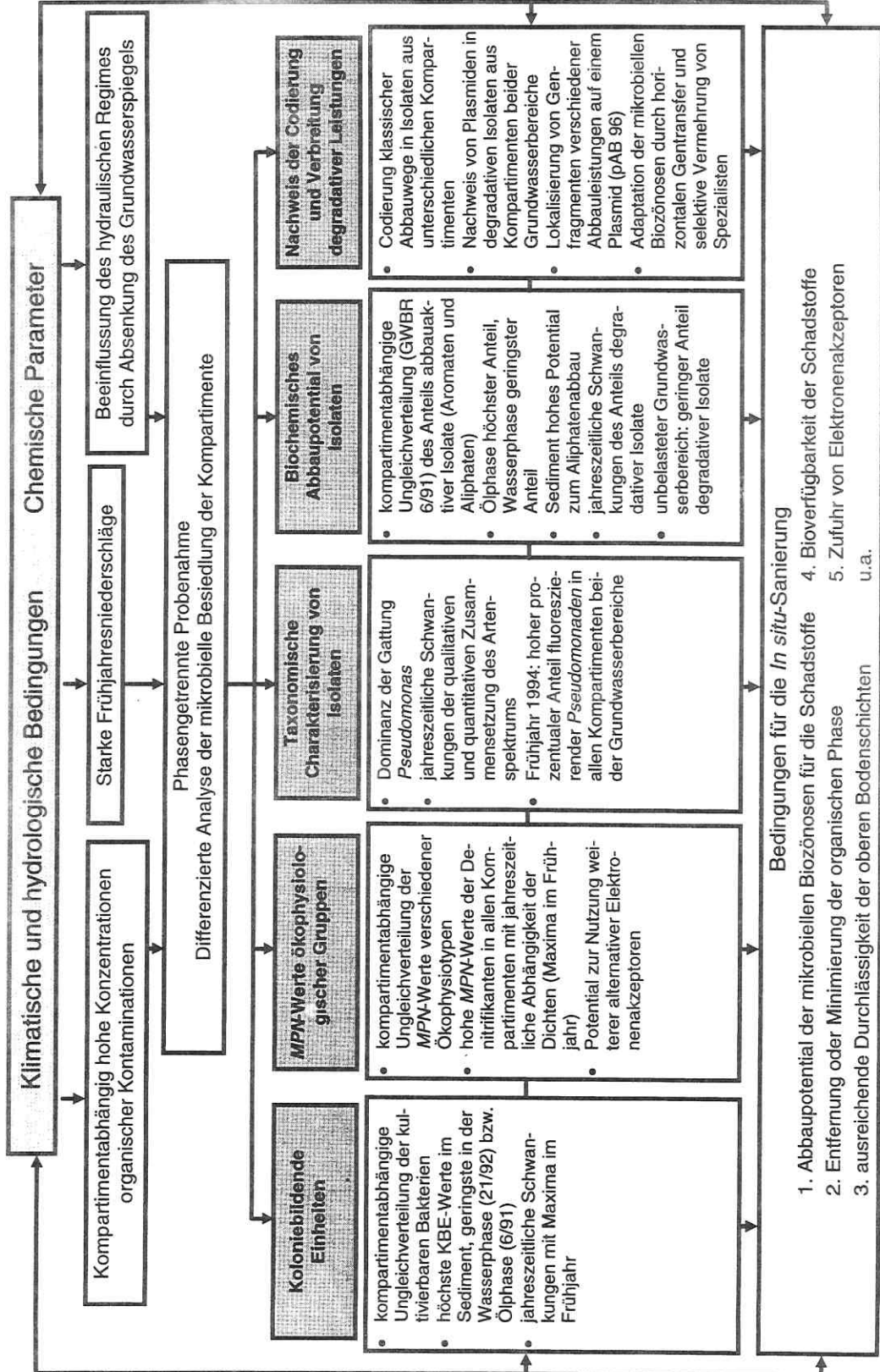


Abb. 68: Zusammenfassung der Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen in wechselseitiger Beziehung mit den Komponenten des Ökosystems Grundwasser

7 Literatur

- AECKERSBERG, F.; BAK, F.; WIDDEL, F.: Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. In: Arch Microbiol 156 (1991), S. 5-14.
- ALEF, K.: Bestimmung der wahrscheinlichsten Zahl (MPN). In: ALEF, K.: Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft, 1991, S. 44-49.
- ALLEN, C.C.R.; BOYD, D.R.; LARKIN, M.J.; REID, K.A.; SHARMA, N.D.; WILSON, K.: Metabolism of Naphthalene, 1-Naphthol, Indene and Indole by *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB 12038. In: Appl. Environ. Microbiol. 63 (1997), Nr. 1, S. 151-155.
- AMANN, R.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; GÖRTZ, H.-D.; SCHLEIFER, K.-H.: Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. In: Nature 351 (1991), Nr. 5, S. 161-164.
- ATLAS, R. M.: Biodegradation of hydrocarbons in the environment. In: OMENN, G.S.: Environmental Biotechnology. New York: Plenum Press, 1988, S. 211-236.
- ATLAS, R. M.; SAYLER, G.; BURLAGE, R. S.; BEJ, A. K.: Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. In: BioTechniques 12 (1992), Nr. 5, S. 706-717.
- AUSTIN, B.; CALOMIRIS, J. J.; WALKER, J. D.; COLWELL, R. R.: Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. In: Appl. Environ. Microbiol. 34 (1977), Nr. 1, S. 60-68.
- AUTORENKOLLEKTIV: Bedeutung biologischer Vorgänge für die Beschaffenheit des Grundwassers. In: DVWK: Schriftenreihe des DVWK (Fachauschuß Grundwasserbiologie). Bd. 80. Verlag Paul Parey, 1988. - 3-490-08097-1.
- BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; GANNON, F.: The 16S/ 23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify *Eubacteria*. In: Research (1991), S. 51-56.
- BARTHA, R.; ATLAS, R. M.: The microbiology of aquatic oil spills. In: Adv. Appl. Microbiol. 22 (1977), S. 225-266.
- BATTERMANN, G.; WERNER, P.: Beseitigung einer Untergrundkontamination mit Kohlenwasserstoffen durch mikrobiellen Abbau. In: gwf-wasser/ abwasser 125 (1984), Nr. 8, S. 366-373.
- BECKER, P. M.; DOTT, W.: Miniaturisierte Screening-Tests zum Nachweis des mikrobiellen Abbaupotentials für verschiedene Aromaten und Aliphaten. In: BioEngineering 9 (1993), Nr. 2, S. 20-26.
- BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H.; DICESARE, J. L.; ATLAS, R. M.: Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. In: Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991), Nr. 12, S. 3529-3534.
- BIANCHI, M.A.G.; BIANCHI, A.J.M.: Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurements. In: Microb. Ecol. 8 (1982), S. 61-69.
- BIRGER, A.; KRAUß, G.; DERMETZEL, J.; GLÄBER, W.: Abbaupotential für aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe in bakteriellen heterotrophen Communities differenter Grundwasserbiozönosen. In: DECHEMA: 12. DECHEMA-Fachgespräche Umweltschutz. Tagungsband (im Druck), 1996.
- BOCK, M.; KÄMPFER, P.; BOSECKER, K.; DOTT, W.: Isolation and characterisation of heterotrophic, aerobic bacteria from oil storage caverns in northern Germany. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 42 (1994), S. 463-468.
- BOURQUE, S. N.; VALERO, J. R.; LAVOIE, M. C.; LEVESQUE, R. C.: Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. In: Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995), Nr. 4, S. 1623-1626.
- BRAMER, H.; KUGLER, H.; MARCINEK, H.-J.; MARKUSE, G.; MÜCKE, E.; NEUMEISTER, H.; NITZ, B.; NOACK, K.; REUTER, B.; RICHTER, H.; ROSENKRANZ, E.; SCHOLZ, E.: Genese und Alter der Reliefformen der DDR. In: Akademie der Wissenschaften der DDR in Zusammenarbeit mit VEB Hermann Haack Gotha: Atlas DDR. Gotha/Leipzig: 1981.

Literatur

- BREITUNG, J.; BRUNS-NAGEL, D.; VON LÖW, E.; STEINBACH, K.; KAMINSKI, L.; HAAS, R.; GEMSA, D.: Mikrobielle Sanierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden. In: UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 7 (1995), Nr. 4, S. 195-200.
- BRINKMANN, U.; RAMOS, J.L.; REINEKE, W.: Loss of the TOL meta-cleavage pathway functions of *Pseudomonas putida* strain PaW1 (pWWO) during growth on toluene. In: J. Basic Microbiol. 34 (1994), S. 303-309.
- BURLAGE, R. S.; HOOPER, S. W.; SAYLER, G.S.: The TOL (pWWO) Catabolic Plasmid. In: Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989), Nr. 6, S. 1323-1328.
- CAMPBELL, J.I.A.; JACOBSEN, C.S.; SOERENSEN, J.: Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. In: FEMS Microbiol. Ecol. 18 (1995), S. 51-62.
- CHAKRABARTY, A.M.; CHOU, G.; GUNSALUS, I.: Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas* (incompatibility). In: Proc. Nat. Acad. Sci USA 70 (1973), Nr. 4, S. 1137-1140.
- CHAUDHRY, G. R.; TORANZOS, G. A.; BHATTI, A. R.: Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. In: Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989), Nr. 5, S. 1301-1304.
- CHRISTENSEN, H.; BOYE, M.; POULSEN, L. K.; RASMUSSEN, O. F.: Analysis of fluorescent *Pseudomonads* based on 23S ribosomal DNA sequences. In: Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994), Nr. 6, S. 2196-2199.
- CHURCHILL, S.A.; GRIFFIN, R.A.; CHURCHILL, P.F.: Biodegradation and Bioremediation- Biodegradation Rate Enhancement of Hydrocarbons by an Oleophilic Fertilizer and a Rhamnolipid Biosurfactant. In: J. Environ. Qual. 24 (1995), S. 19-28.
- CLEMENT, T.P.; PEYTON, B.M.; SKEEN, R.S.; JENNINGS, D.A.; PETERSEN, J.N.: Microbial growth and transport in porous media under denitrification conditions: experiments and simulations. In: J. Contam. Hydrol. 24 (1997), S. 269-285.
- DIBBLE, J. T.; BARTHA, R.: Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. In: Appl. Environ. Microbiol. 37 (1979), Nr. 4, S. 729-739.
- DOMMACK, A.: Das Mineralölwerk Lützkendorf- Eine Erstbewertung des Kontaminationszustandes (Diplomarbeit), 1992.
- DOTT, W.; WASCHKO-DRANSMANN, D.: Vorkommen und Bedeutung von *Actinomycetales* im Trinkwasser. In: Zbl. Bakt. Hyg. 173 (1981), S. 217-232.
- DOTT, W.; FRANK, C.; WERNER, P.: Mikrobiologische Untersuchungen eines mit Kohlenwasserstoffen verunreinigten Grundwassers 1. Mitteilung: Quantitative und qualitative Verteilung von Bakterienpopulationen. In: Zbl. Bakt. Hyg. 180 (1984), S. 62-75.
- DOTT, W.; FRANK, C.; KÄMPFER, P.; TUSCHEWITZKI, G. J.; WERNICKE, F.: Mikrobiologie des Grund- und Trinkwassers. In: Zbl. Bakt. Hyg. 182 (1986), S. 449-477.
- DOTT, W.; KÄMPFER, P.: Physiologie von Grundwasser-Mikroorganismen, Taxonomie und Bestimmung der Stoffwechselaktivitäten. In: Z. dt. geol. Ges. 139 (1988), S. 377-381.
- DOTT, W.; KÄMPFER, P.: Grenzen und Möglichkeiten mikrobiologischer Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Wasser- und Bodenbakterien. In: gwf-wasser-abwasser 130 (1989), Nr. 12, S. 47-51.
- EGGINK, G.; ENGEL, H.; MEIJER, W. G.; OTTEN, J.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.: Alkane utilization in *Pseudomonas oleovorans*. In: J. Biol. Chem. 263 (1988), Nr. 26, S. 13400-13405.
- EISSMANN, L.: Grundzüge der Quartärgeologie Mitteldeutschlands (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Südbrandenburg, Thüringen). In: EISSMANN, L. und LITT, T.: Altenburger naturwissenschaftliche Forschungen: Das Quartär Mitteldeutschlands - Ein Leitfaden und Exkursionsführer. Bd. 7., 1994., S. 55-135.
- ERB, R. W.; WAGNER-DÖBLER, I.: Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. In: Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993), Nr. 12, S. 4065-4073.
- FAVARO, R.; BERNASCONI, C.; PASSININ, N.; BERTONI, G.; BESTETTI, G.; GALLI, E.; DEHO, G.: Organisation of the *tmb* catabolic operons of *Pseudomonas putida* TMB and evolutionary relationship with the *xyl* operon of the TOL plasmid pWWO. In: Gene 182 (1996), Nr. 1-2, S. 189-193.

Literatur

- FESTL, H.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H.: DNA hybridization probe for the *Pseudomonas fluorescens* group. In: Appl. Environ. Microbiol. 52 (1986), Nr. 5, S. 1190-1194.
- FJERDINGSTAD, E.: Bacterial corrosion of concrete in water. In: Wat. Res. 3 (1969), S. 21-30.
- FOGHT, J.M.; FEDORAK, P.M.; WESTLAKE, D.W.S.: Mineralization of [14C] hexadecane and [14C] phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. In: Can. J. Microbiol. 36 (1990), S. 169-175.
- FOGHT, J.M.; WESTLAKE, D.W.S.: Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. In: Biodegradation 7 (1996), Nr. 4, S. 353-366.
- FORSMAN, M.; NYREN, A.; SJÖSTEDT, A.; SJÖKVIST, L.; SANDSTRÖM, G.: Identification of *Francinella tularensis* in natural water samples by PCR. In: FEMS Microbiol. Ecol. 16 (1995), S. 83-92.
- FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H.: Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. In: J. Ind. Microbiol. 8 (1991), S. 237-246.
- FRITSCHKE, W.: Mikrobiologie. UTB für Wissenschaft. 1. Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag, 1990.
- FUHRMANN, J. E.; COMEAU, D. E.; HAGSTRÖM, A.; CHAN, A. M.: Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. In: Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988), Nr. 6, S. 1426-1429.
- FUHS, W.: Der mikrobielle Abbau von Kohlenwasserstoffen. In: Arch. Mikrobiol. 39 (1961), S. 374-422.
- GEHLEN, M.; TRAMPISCH, H. J.; DOTT, W.: Physiological characterization of heterotrophic bacterial communities from selected aquatic environments. In: Microb. Ecol. 11 (1985), S. 205-219.
- GODE, P.; OVERBECK, J.: Untersuchungen zur heterotrophen Nitrifikation im See. In: Z. Allg. Mikrobiol. 12 (1972), S. 567-574.
- GUNKEL, W.: Ölverunreinigung der Meere und Abbau der Kohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen. In: SCHWEISFURT, R.: Angewandte Mikrobiologie der Kohlenwasserstoffe in Industrie und Umwelt.. Bd. 164., 1988, S. 1-89; 182-194.
- HENSCHKE, R. B.; HENSCHKE, E. J.; SCHMIDT, F. R. J.: Monitoring survival and gene transfer in soil microcosms of recombinant *Escherichia coli* designed to represent an industrial production strain. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 (1991), S. 247-252.
- HERRICK, J. B.; MADSEN, E. L.; BATT, C. A.; GHIORSE, W. C.: Polymerase chain reaction amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. In: Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993), Nr. 3, S. 687-694.
- HESS, A.; HÖHENER, P.; HUNKELER, D.; ZEYER, J.: Bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer: simulation studies in laboratory aquifer columns. In: J. Contam. Hydrol. 23 (1996), S. 329-345.
- HEUER, H.; DWYER, D.F.; TIMMIS, K.N.; WAGNER-DÖBLER, I.: Efficacy in aquatic microcosms of a genetically engineered *Pseudomonas* applicable for bioremediation. In: Microb. Ecol. 29 (1995), S. 203-220.
- HIRSCH, P.; RADES-ROHKOHL, E.: Die Zusammensetzung der natürlichen Grundwassermikroflora und Untersuchungen über ihre Wechselbeziehung mit Fäkalbakterien. In: DVGW-Schriftenreihe Wasser (1983), Nr. 35, S. 59-80.
- HOPFSTOCK, H.: Mikrobielle Alterung von Mineralölverunreinigungen in Böden. In: gwf-gas-erdgas 135 (1994), Nr. 1, S. 17-24.
- HPC HARRESS PICKEL CONSULT GMBH: Orientierende Untersuchungen auf Verunreinigungen im Untergrund des Mineralölwerkes Lützkendorf (Ergebnisbericht), 1992.
- HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R.: Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. In: TIBTECH 14 (1996), Nr. 6, S. 190-197.
- JAIN, D. K.; LEE, H.; TREVORS, J. T.: Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. In: J. Ind. Microbiol. 10 (1992), S. 87-93.
- JANKE, D.; KUJAU, M.; ZIPPEL, M.; SCHÖPP, W.: Enzyme regulation in vivo-constructed *Pseudomonas putida* strains with two alternative routes for oxidative degradation of phenol. In: J. Basic Microbiol. 30 (1990), Nr. 3, S. 153-163.

Literatur

- JEFFREY, W. H.; NAZARET, S.; VON HAVEN, R.: Improved method for recovery of mRNA from aquatic samples and its application to detection of mer expression. In: Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994), Nr. 6, S. 1814-1821.
- JENSEN, M.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N.: Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. In: Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993), Nr. 4, S. 945-952.
- JOHNSON, K.; ANDERSEN, S.; JACOBSEN, C.S.: Phenotypic and Genotypic Characterization of Phenanthrene-Degrading Fluorescent *Pseudomonas* Biovars. In: Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996), Nr. 10, S. 3818-3825.
- JORKS, S.: Differentiation of *Rhodococcus* species by ribotyping. In: J. Basic Microbiol. 36 (1996), Nr. 6, S. 399-406.
- JUNG, K. D.; SCHRÖTER, J.: Lebensdauer und Transport von Bakterien in typischen Grundwasserleitern-Halterner Sande. In: DVGW-Schriftenreihe Wasser (1983), Nr. 35, S. 139-150.
- KADDU-MULINDWA, D.; FILIP, Z.: Mikrobiologische Untersuchungen als ein Beitrag zum Grundwasserschutzkonzept. In: Schr.-Reihe Verein WaBoLu 64 (1986), S. 203-215.
- KÄLIN, M.; NEUJAHN, H.Y.; WEISSMAHR, R.N.; SEJLITZ, T.; JÖHL, R.; FIECHTNER, A.; REISER, J.: Phenol hydroxylase from *Trichosporum cutaneum*: Gene cloning, sequence analysis and functional expression in *E. coli*. In: J. Bacteriol. 174 (1992), Nr. 11, S. 7112-7120.
- KÄMPFER, P.; DOTT, W.: Systematisierung der mikrobiologischen Untersuchung von Boden und Wasser. In: THOME-KOZMIENSKY, K. J.: Altlasten 2. Berlin: EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, 1988, S. 1-26.
- KÄMPFER, P.; STEIOF, M.; DOTT, W.: Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. In: Microb. Ecol. 21 (1991), S. 227-251.
- KAZUMI, J.; HÄGGBLUM, M.M.; YOUNG, L.Y.: Degradation of Monochlorinated and Nonchlorinated Aromatic Compounds under Iron-Reducing Conditions. In: Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995), Nr. 11, S. 4069-4073.
- KIVISAAR, M.A.; HABICHT, J.K.; HEINARU, A.L.: Degradation of phenol and m-toluate in *Pseudomonas* sp. Strain EST 1001 and its *Pseudomonas putida* transconjugants is determined by a multiplasmid system. In: J. Bacteriol. 171 (1989), Nr. 9, S. 5111-5116.
- KIYOHARA, H.; TORGIGOE, S.; KAIDA, N.; ASAKI, T.; IIDA, T.; HAYASHI, H.; TAKIZAWA, N.: Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, pah, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82 OUS82. In: J. Bacteriol. 176 (1994), Nr. 8, S. 2439-2443.
- Klima-Atlas für das Gebiet der DDR In: Meteorologischer und hydrologischer Dienst der DDR, 1953.
- KOK, M.; OLDENHUIS, R.; VAN DER LINDEN, M.P.G.; RAATJES, P.; KINGMA, J.; VAN LELYVELD, P.H.; WITHOLT, B.: The *Pseudomonas oleovorans* Alkane Hydroxylase Gene. In: J. Biol. Chem. 264 (1989), Nr. 10, S. 5435-5441.
- KOK, M.; OLDENHUIS, R.; VAN DER LINDEN, M. P. G.; MEULENBERG, C. H. C.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.: The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. In: J. Biol. Chem. 264 (1989), Nr. 10, 5442-5451.
- KÖLBEL-BOELKE, J.: Diversität und in-vitro-Aktivitäten heterotropher Bakteriengesellschaften in einem pleistozänen, sandigen Grundwasserleiter (Dissertation).
- KÖLBEL-BOELKE, J.: Diversität heterotropher Bakteriengemeinschaften in einem pleistozänen, sandig-kiesigen Grundwasserleiter bei Bocholt/ Westfalen. In: Z. dt. geol. Ges. 139 (1988), S. 355-363.
- KÖLBEL-BOELKE, J.; TIENKEN, B.; NEHRKORN, A.: Microbial communities in the saturated groundwater environment 1: methods of isolation and characterisation of heterotrophic bacteria. In: Microb Ecol (1988), S. 17-29.
- KÖLBEL-BOELKE, J.; ANDERS, E.-M.; NEHRKORN, A.: Microbial communities in the saturated groundwater Environment 2: Diversity of bacterial communities in a pleistocene sand aquifer and their in vitro activities. In: Microb Ecol (1988), S. 31-48.

Literatur

- KRUG, M.; STRAUBE, G.: Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis* HP 15 II. Some properties of the first two enzymes of the degradation pathway. In: J. Basic Microbiol. 26 (1986), Nr. 5, S. 271-281.
- KRUMBEIN, W.E.; ALTMANN, H.J.: A new method for detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. In: Helgol. wiss. Meeresuntersuchungen 25 (1973), S. 347-354.
- KRUMBIEGEL, G.: Tertiär und Pleistozän im Geiseltal. In: VIETE, G.: Das Pleistozän im sächsisch-thüringischen Raum- Exkursionsführer., S. 81-95.
- KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.: Catechol 2,3-Dioxygenases Functional in Oxygen-Limited (Hypoxic) Environments. In: Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996), Nr. 5, S. 1728-1740.
- LESER, T. D.; BOYE, M.; HENDRICKSEN, N. B.: Survival and activity of *Pseudomonas sp.* strain B13 (FR1) in a marine microcosm determined by quantitative PCR and an rRNA-Targeting probe and its effect on the indigenous bacterioplankton. In: Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995), Nr. 4, S. 1201-1207.
- LMBV LAUSITZER UND MITTELDEUTSCHE BERGBAU-VERWALTUNGSGESELLSCHAFT MBH: Rehabilitierung des Wasserhaushaltes im Braunkohlerevier Mitteldeutschland.
- Majcherczyk, A.; Zeddel, A.; Kelschebach, M.; Loske, D.; Hüttermann, A.: Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Weißfäulepilze. In: BioEngineering 9 (1993), Nr. 2, S. 27-31.
- MANZ, W.; SZEWCZYK, U.; ERICSSON, P.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.-H.; STENSTRÖM, T.-A.: In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. In: Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993), Nr. 7, S. 2293-2298.
- MARXSEN, J.: Investigations into the number of respiring bacteria in groundwater from sandy and gravelly deposits. In: Microb Ecol 16 (1988), S. 65-72.
- MATTHEß, G.: Die Beschaffenheit des Grundwassers. In: Lehrbuch der Hydrogeologie 2 (1983), S. 82-87; 168-197; 302-353.
- MATTHEß, G.; ALEXANDER, I.; ALTHAUS, H.; DIZER, H.; FILIP, Z.; HAVEMEISTER, G.; HIRSCH, P.; JUNG, K. D.; KADDU-MULINDWA, D.; KÄSS, W.; LOPEZ, J.; MILDE, G.; NASSER, A.; PEKDEGER, A.; RADES-ROHKOHL, E.; RIEMER, R.; RITTER, R.; SACRE, C.; SCHRÖTER, J.; SEIDEL, K.; SEILER, K. P.: Lebensdauer von Bakterien und Viren in Grundwasserleitern. In: Umweltforschungsplan des Bundesministeriums des Innern-Wasserwirtschaft, Wirkungen/Ökologie (1985), Nr. 2, S. 1-108.
- MCDONALD, I.R.; KENNA, E.M.; MURRELL, J.C.: Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. In: Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995), Nr. 1, S. 116-121.
- MEYNEN, E.; SCHMITHÜSEN, J.: Handbuch der naturräumlichen Gliederung Deutschlands, 1959.
- MIETHE, D.; RIIS, V.; BABEL, W.: The relationship between the microbial activity of the autochthonous microorganisms of pristine and contaminated soils and their potential for the degradation of mineral oil hydrocarbons. In: Acta Biotechnol 14 (1994), Nr. 2, S. 131-140.
- MIKESSELL, M.D.; KUKOR, J.J.; OLSON, R.H.: Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. In: Biodegradation 4 (1993), S. 249-259.
- MORE, M. I.; HERRICK, J. B.; SILVA, M. C.; GHIORSE, W. C.; MADSEN, E. L.: Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. In: Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994), Nr. 5, S. 1572-1580.
- MORGAN, J.A.W.; RHODES, G.; PICKUP, R.W.: Survival of Nonculturable *Aeromonas salmonicida* in Lake Water. In: Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993), Nr. 3, S. 874-880.
- MÜLLER-HURTIG, R.; WAGNER, F.: Mikrobieller Abbau von aliphatischen Kohlenwasserstoffen unter umweltrelevanten Aspekten. In: PRÄVE, P.: Jahrbuch der Biotechnologie. Bd. 3. München, Wien: Carl Hanser Verlag, 1990, S. 338-350.
- NEHRKORN, A.: Siedlungsdichte und Verteilung von Bakterien im Grundwasserbereich. In: Z. dt. geol. Ges. (1988), Nr. 139, S. 309-319.
- NEIDLE, E.L.; ORNSTON, L.N.: Cloning and Expression of *Acinetobacter calcoaceticus* Catechol-1,2-Dioxygenase Structural Gene cat A in *Escherichia coli*. In: J. Bacteriol. 168 (1986), Nr. 2, S. 815-820.
- OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T.: DNA-Extraction and purification of microbial DNA from sediments. In: Elsevier Science publishers B.V. (1987), S. 57-66.

Literatur

- OGRAM, A.; SUN, W.; BROCKMAN, F.J.; FREDRICKSON, J.K.: Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995), Nr. 2, S. 763-768.
- PAUL, J. H.; PICHARD, S. L.: Extraction of DNA and RNA from Aquatic Environments. In: TREVORS, J.T. und VAN ELSAS, J.D.: *Nucleic Acids in the Environment- Methods and Applications*. Springer Verlag, 1995, S. 153-177.
- PELLIZARI, V. H.; BEZBORODNIKOV, S.; QUENSEN III, J. F.; TIEDJE, J. M.: Evaluation of Strains Isolated by Growth on Naphthalene and Biphenyl for Hybridization of Genes to Dioxygenase Probes and Polychlorinated Biphenyl-Degrading Ability. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996), Nr. 6, S. 2053-2058.
- PEMBERTON, J.M.: Degradative Plasmids. In: *Int. Rev. Cytol.* 84 (1983), S. 155-183.
- PERFEROEN, M.; HUYBRECHTS, R.; DE LOOF, A.: Vacuum blotting: a new, simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel to nitrocellulose. In: *FEBS Letters* 145 (1982), S. 369-372.
- PICKUP, R.W.: Genetic interactions among microorganisms in the natural environment . In: Weelington, E.M.H. und Ellas, J.D.: *Detection of gene transfer in aquatic environments*. Oxford: Pergamon Press, 1992, S. 145-164.
- POREMB, K.; GUNKEL, W.: Ölabbauende Bakterien - Leben in hydrophober Umgebung. In: HAUSMANN, K., KREMER, B. P.: *Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen*. Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994, S. 211-228.
- POREMB, K.; GUNKEL, W.; LANG, S.; WAGNER, F.: Mikrobieller Ölabbau im Meer. In: *Biologie in unserer Zeit* 19 (1989), Nr. 5, S. 145-148.
- PRADE, K.: Bestimmung der mikrobiellen Abbauleistung bei der in-situ-Sanierung kontaminierter Standorte. In: *Wasser und Boden* 47 (1995), Nr. 4, S. 28-31.
- PREUSS, A.; STÜTZEL, K.; KUHN, F.: Betriebserfahrungen bei der mikrobiologischen In-situ-Sanierung eines Heizölschadens. In: *TerraTech* (1996), Nr. 6, S. 32-35.
- PREUß, G.: Untersuchungen zu mikrobiellen Sukzessionen bei der Infiltration von Oberflächenwasser in den Untergrund (Dissertation). (1991).
- PREUß, G.; NEHRKORN, A.: Mikrobielle Sukzessionen im Grundwasser bei der Uferfiltration-Veränderungen in Dichte und Verteilung verschiedener Bakteriengruppen. In: *Z. dt.geol. Ges.* 139 (1988), S. 575-586.
- PROVIDENTI, M.A.; FLEMMING, C.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T.: Effect of addition of rhamnolipid biosurfactant or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. In: *FEMS Microb. Ecol.* 17 (1995), S. 15-26.
- RABUS, R.; WIDDEL, F.: Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. In: *Arch Microbiol* 163 (1995), S. 96-103.
- RASKIN, L.; STROMLEY, J. M.; RITTMANN, B. R.; STAHL, D. A.: Group-specific 16S rRNA hybridisation probes to describe natural communities of methanogenes. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994), Nr. 4, S. 1232-1240.
- REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985), Nr. 1, S. 1-7.
- RHYKERD, R.L.; WEAVER, R.W.; MCINNES, K.J.: Influence of Salinity on Bioremediation of Oil in Soil. In: *Environ. Poll.* 90 (1995), Nr. 1, S. 127-130.
- RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHILIPS, D.; CARL, P.; CLARK, D.: Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990), Nr. 11, S. 3565-3575.
- RIPPER, J.: Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen Altölabbaus unter Verwendung verschieden maßstäblicher Versuchssysteme (Dissertation). (1995).
- RODINA, A. G.: In: ZAMBRUSKI, M. D.: *Methods in aquatic microbiology*. Baltimore: University Park Press, 1972.
- ROMANOWSKI, G.; LORENZ, M.G.; WACKERNAGEL, W.: Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993), Nr. 10, S. 3438-3446.

- ROSENBERG, E.: The hydrocarbon-oxidizing bacteria. In: BARLOWS, E.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. und SCHLEIFER, K.-H.: The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Bd. 1. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1992, S. 446-459.
- ROSENBERG, M.; ROSENBERG, E.: Bacterial adherence at the hydrocarbon-water interface. In: Oil Petrochem. Poll. 2 (1985), S. 155-162.
- RUETER, P.; RABUS, R.; WILKES, H.; AECKERSBERG, F.; RAINEY, F. A.; JANNASCH, H. W.; WIDDEL, F.: Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. In: Nature 372 (1994), S. 455-458.
- RUSKE, R.: Gliederung des Pleistozäns im Geiseltal und in seiner Umgebung. In: Geologie 10 (1961), Nr. 1, S. 152-168.
- RUSKE, R.: Zur Gliederung der Holstein- und Saalezeit im östlichen Harzvorland. In: Eiszeitalter und Gegenwart 16 (1965), S. 88-96.
- SANSEVERINO, J.; APPLIGATE, B.M.; KING, J.M.H.; SAYLER, G.S.: Plasmid-Mediated Mineralization of Naphthalene, Phenanthrene and Anthracene. In: Appl. Environ. Microbiol. 59 (1993), Nr. 6, S. 1931-1937.
- SAYLER, G. S.; SHIELDS, M. S.; TEDFORD, E. T.; BREEN, A.; HOOPER, S. W.; SIROTKIN, K. M.; DAVIS, J. W.: Application of DNA-DNA colony hybridisation to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. In: Appl. Environ. Microbiol. 49 (1985), Nr. 5, S. 1295-1302.
- SAYLER, G.S.; HOOPER, S.W.; LAYTON, A.C.; KING, M.H.: Catabolic Plasmids of Environmental and Ecological Significance. In: Microb. Ecol. 19 (1990), S. 1-20.
- SCHAUER, F.; HENNING, K.; PSCHIEDL, H.; WITTICH, R.M.; FORTNAGEL, P.; WILKES, H.; SINNWELL, V.; FRANCKE, W.: Biotransformation of diphenyl ether by the yeast *Trichosporum beigelii* SBUG 752. In: Biodegradation 6 (1995), Nr. 6, S. 173-180.
- SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W.; AMANN, R.: Gensonden und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. In: Naturwissenschaften 79 (1992), S. 213-219.
- SCHUMANN, W.: Biologie bakterieller Plasmide Braunschweig: Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1990.
- SELENSKA, S.; KLINGMÜLLER, W.: Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil. In: Microb. Releases 1 (1992), S. 41-46.
- SHANKLIN, J.; WHITTLE, E.; FOX, G. B.: Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. In: Biochemistry 33 (1994), S. 127
- SMITH, R. L.; CEAZAN, M. L.; BROOKS, M. H.: Autotrophic, hydrogen-oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. In: Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994), Nr. 6, S. 1949-1955.
- SOMERVILLE, C. C.; KNIGHT, I. T.; STRAUBE, W. L.; COLWELL, R. R.: Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. In: Appl. Environ. Microbiol. 55 (1989), Nr. 3, S. 548-554.
- SOTSKY, J. B.; GREER, C. W.; ATLAS, R. M.: Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. In: Can. J. Microbiol. 40 (1994), S. 981-985.
- STEFAN, R. J.; GOKSÖYR, J.; BEJ, A. K.; ATLAS, R. M.: Recovery of DNA from soil and sediments. In: Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988), Nr. 12, S. 2908-2915.
- SÜBMUTH, R.; EBERSPÄCHER, J.; HAAG, R.; SPRINGER, W.: Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum Stuttgart, New York: Georg-Thieme-Verlag, 1987.
- SWANNELL, R.P.J.; LEE, K.; MCDONAGH, M.: Field evaluations of marine oil spill bioremediation. In: Microbiol. Rev. 60 (1996), Nr. 2, S. 342-365.
- TEUTSCH, G.; GRATHWOHL, P.; SCHAD, H.; WERNER, P.: In-situ-Reaktionswände - ein neuer Ansatz zur passiven Sanierung von Boden- und Grundwasserverunreinigungen. In: Grundwasser 1 (1996), Nr. 1, S. 12-20.
- TSAI, Y.; OLSON, B.: Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for Polymerase chain reaction. In: Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992), Nr. 7, S. 2292-2295.

Literatur

- TSAI, Y.; PARK, M. J.; OLSON, B. H.: Rapid method for direct extraction of mRNA from seeded soils. In: Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991), Nr. 3, S. 765-768.
- TSCHÄPE, H.: Plasmide- Biologische Grundlagen und praktische Bedeutung. In: TAUBENECK, U.: Wissenschaftliche Taschenbücher Biologie. Berlin: Akademie-Verlag, 1987.
- VAN BEILEN, J. B.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.: Substrate specificity of the alkane hydroxylase system of *Pseudomonas oleovorans* GPo1. In: Enzyme Microb. Technol. 16 (1994), S. 904-911.
- VAN DER MEER, J.R.: Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. In: FEMS Microbiol. Rev. 15 (1994), S. 239-249.
- VESCIO, P.A.; NIERZWICKI-BAUER, S.A.: Extraction and purification of PCR amplifiable DNA from lacustrine subsurface sediments. In: J. Microbiol. Meth. 21 (1995), S. 225-232.
- WAGNER, F.: Strategies for biosurfactant production. In: Fat Sci. Technol. 89 (1987), S. 586-591.
- WALLNER, G.; AMANN, R.; BEISKER, W.: Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. In: Cytometrie 14 (1993), S. 136-143.
- WERNICKE, F.; KÄMPFER, P.; DOTT, W.: Einfluß des Isolationsmediums und der Isolationsbedingungen auf die Erfassung des bakteriellen Artenspektrums im Trinkwasser. In: Zbl. Hyg. 190 (1990), S. 26-38.
- WHYTE, L.G.; GREER, C.W.; INNIS, W.E.: Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. In: Can. J. Microbiol. 42 (1996), S. 99-106.
- WOLTERS, N.; SCHWARZ, W.: Untersuchungen über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in reinen Grundwässern. In: Arch. Hydrobiol. 51 (1956), S. 500-511.
- WORSEY, M.J.; FRANKLIN, F.C.H.; WILLIAMS, P.A.: Regulation of Degradative Pathway Enzymes coded for by the TOL Plasmid (pWWO) from *Pseudomonas putida* mt-2. In: J. Bacteriol. 134 (1978), Nr. 3, S. 757-764.
- ZAJIC, J. E.; SUPPLISSON, B.; VOLESKY, B.: Bacterial degradation and emulsification of No. 6 fuel oil. In: Environ. Sci. Technol. 8 (1974), Nr. 7, S. 664-668.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M.: Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. In: Appl. Environ. Microbiol. 61 (1995), Nr. 6, S. 2247-2251.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M.: Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). In: Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992), Nr. 10, S. 3276-3282.
- ZOBELL, C. E.: Action of microorganisms on hydrocarbons. 10 (1946), S. 1-49.

Verzeichnis der verwendeten Karten

- KÖNIGLICHE PREUBISCHE GEOLOGISCHE ANSTALT: Geologische Karte Blatt Weißenfels 4737, 1908.
- KÖNIGLICHE PREUBISCHE GEOLOGISCHE ANSTALT: Geologische Karte Blatt Merseburg West 4637, 1908.
- LANDESAMT FÜR LANDESVERMESSUNG UND DATENVERARBEITUNG SACHSEN-ANHALT: Topographische Karte Blatt Mücheln (Geiseltal) O, M-32-36-B-a-2., 1992.
- LANDESAMT FÜR LANDESVERMESSUNG UND DATENVERARBEITUNG SACHSEN-ANHALT: Topographische Karte Blatt Gröst, M-32-36-B-a-4., 1992.
- REICHSANSTALT FÜR LANDESAUFNAHMEN: Weißenfels 4737, Stand 1904, 1905.
- REICHSANSTALT FÜR LANDESAUFNAHMEN: Merseburg West 4637, 1925.
- ZENTRALES GEOLOGISCHES INSTITUT: Horizontkarte W-HO, Halle/S., S 2564, 1980.
- ZENTRALES GEOLOGISCHES INSTITUT: Horizontkarte E2-iE, Halle/S., S 2564, 1980.
- ZENTRALES GEOLOGISCHES INSTITUT: Horizontkarte Q1-E1, Halle/S., S 2564, 1980.
- ZENTRALES GEOLOGISCHES INSTITUT: Karte ohne Quartär mit Darstellung der Quartärbasis, Halle/S., S 2564, 1980.
- ZENTRALES GEOLOGISCHES INSTITUT: Lithofacieskarte Quartär, Geologische Schnitt, Halle/S., S 2564, 1982.

Anhang A

A 2 Zusammensetzung des Mediums R2A-Agar

Der für die Grundwassermikrobiologie besonders empfohlene R2A-Agar (REASONER und GELDREICH, 1985) wurde in gebrauchsfertiger Form von Merck bezogen und in der vom Hersteller empfohlenen Weise bereitet. Die Zusammensetzung des Mediums ist im folgenden aufgeführt.

Bacto-Hefe-Extrakt	0,5 g/l	
Casaminosäure	0,5 g/l	
Glucose	0,5 g/l	
lösliche Stärke	0,5 g/l	
Natrium-Pyruvat	0,3 g/l	
K ₂ HPO ₄	0,3 g/l	
MgSO ₄	0,05 g/l	pH 7,20

A 3 Zusammensetzung des Standardmediums mit 1% Spindelöl bzw. 1% Mineralölrestgemisch

Alle Proben aus dem belasteten und unbelasteten Bereich des Grundwasserleiters wurden auf einem Standardmedium mit 1% Spindelöl und teilweise mit 1% Mineralölrestgemisch (Oberflächenverfahren) inkubiert. Die Zusammensetzung des Mediums (WÜNSCHE, persönliche Mitteilung) ist im folgenden aufgeführt.

Zusammensetzung der Konzentrate

Calciumchlorid-Konzentrat:

CaCl₂ x 6 H₂O 5,47g/l

Ammoniumchlorid-Konzentrat

NH₄Cl 152,28 g/l

Phosphat-Konzentrat

KH₂PO₄ 68,05 g und

K₂HPO₄ 87,09 g in 1l *aqua bidest.* lösen.

Spurensalz-Konzentrat

MgSO₄ x 7 H₂O 71,20 g

ZnSO₄ x 7 H₂O 0,44 g

MnSO₄ x 4H₂O 0,812 g

CuSO₄ x 5 H₂O 0,785 g

Na₂MoO₄ x 2 H₂O 0,252 g

FeSO₄ x 7 H₂O 4,98 g

Die Salze wurden einzeln eingewogen und in jeweils 10 ml 1nH₂SO₄ gelöst, zusammengegeben, auf 100 ml mit 1n H₂SO₄ aufgefüllt und anschließend mit sterilem *aqua bidest.* auf 1l ergänzt.

Lösung I

Hefeextrakt	0,5 g
Ammoniumchlorid-Konzentrat	5,0 ml
Calciumchlorid-Konzentrat	1,0 ml
Spurensalz-Konzentrat	1,0 ml

Mit *aqua bidest.* wurde auf 180 ml aufgefüllt.

Lösung II

15 g Agar wurden in 800 ml *aqua bidest.* erhitzt.

Beide Lösungen wurden bei 121°C autoklaviert, der Lösung I wurden 10 ml Phosphat- Konzentrat, 10 ml sterilfiltriertes Spindelöl bzw. Mineralölrestgemisch und 2 ml einer 500 fach konzentrierten Cycloheximid-Lösung zugesetzt. Die Lösungen I und II wurden zusammengegeben, gut gemischt und jeweils ca. 20 ml unter ständigem Bewegen (gleichmäßige Verteilung des Spindelöls) in sterile Petrischalen ausgegossen.

Anhang A

A 4 Zusammensetzung des Medium nach LURIA-BERTONI

10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g Natriumchlorid *ad 1 l aqua bidest.*

Tab. A 5: Zusammensetzung der Medien zur Bestimmung der MPN-Werte verschiedener ökophysiologischer Gruppen

Menge	Bestandteil	pH	Bemerkungen
Denitrifizierer			
3,0 g	Fleischextrakt	k. A.	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen und autoklavieren
5,0 g	Pepton		
1,0 g	KNO ₂		
Ammoniumoxidierer			
0,5 g	K ₂ HPO ₄	7,6	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert einstellen und autoklavieren
0,1 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O		
0,05 g	FeSO ₄ x 7H ₂ O		
1,0 g	CaCO ₃		
0,26 g	(NH ₄) ₂ SO ₄		
Nitritoxidierer			
0,5 g	K ₂ HPO ₄	7,6	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert einstellen und autoklavieren
0,1 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O		
0,05 g	FeSO ₄ x 7H ₂ O		
1,0 g	CaCO ₃		
0,001g	NaNO ₂		
Manganreduzierer			
<u>Lösung I</u>			
2,0 g	Pepton	6,8	in 990 ml <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert regulieren und autoklavieren
2,5 g	Glucose		
0,01 g	FePO ₄ x 4H ₂ O		
<u>Lösung II</u>			
2,0 g	KMnO ₄		in 100 ml <i>aqua bidest.</i> lösen und steriltrieren
10 ml von Lösung II in die abgekühlte Lösung I geben			
Manganoxidierer			
2,0 g	Difco-Bacto-Pepton	7,6	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert regulieren und autoklavieren
0,5 g	Difco-Hefe-Extrakt		
0,002 g	FeSO ₄ x 7H ₂ O		
0,1g	MnSO ₄ x H ₂ O		
Eisenreduzierer			
2,0 g	Glucose	7,0	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert regulieren und autoklavieren
0,5 g	Asparagin		
3,0 g	K ₂ HPO ₄		
0,8 g	KH ₂ PO ₄		
0,2 g	KCl		
0,2 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O		
0,5 g	Hefeextrakt		
1,0 g	Fe ₂ O ₃		

Anhang A

Eisenoxidierer			
2,0 g	Difco-Bacto-Pepton	7,6	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert regulieren und autoklavieren Eisenpulver nach Abkühlen der Lösung zusetzen
0,5 g	Difco-Hefeextrakt		
0,05 g	hitzeesterilisiertes reduziertes Eisenpulver		
Desulfurikanten			
Lösung I			
0,5 g	KH ₂ PO ₄	7,4	in 975 ml <i>aqua bidest.</i> , pH-Wert regulieren und autoklavieren
1,0 g	(NH ₄)Cl		
0,5 g	Na ₂ SO ₄		
0,1 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O		
1,0 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O		
1,0 g	Hefeextrakt		
5,6 ml	50%ige Na-Lactat Lsg.		
Lösung II			
0,5 g	FeSO ₄ x 7H ₂ O		in 10 ml <i>aqua bidest.</i> unter Ansäuern lösen und autoklavieren
Lösung III			
0,1 g	Na-Thioglycolat		in 10 ml <i>aqua bidest.</i> unter Ansäuern lösen und autoklavieren
0,1 g	Ascorbinsäure		
Die Lösungen wurden nach dem Abkühlen zusammengegeben.			
Sulfurikanten			
10,00 g	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	6,6	in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen, pH-Wert regulieren und autoklavieren
0,10 g	(NH ₄) ₂ SO ₄		
4,00 g	K ₂ HPO ₄		
0,02 g	FeCl ₃ x 6 H ₂ O		
0,02 g	MnSO ₄ x 1 H ₂ O		
0,10 g	CaCl ₂		
0,10 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O		

A 6 Nachweisreagenzien ökophysiologischer Gruppen:

Benzidin-HCl-Reagenz:

1,0 g Benzidin-HCl in 100 ml 2N Essigsäure

Pyridin-Reagenz:

0,2 g 2,2-Di-Pyridin in 100 ml 10%iger Essigsäure

Griess-Ilosvay-Reagenz und Neblers Reagenz wurden gebrauchsfertig von Merck bezogen.

Anhang A

Tab. A 7: Genspezifische Charakteristika der PCR-Amplifikationen

	alk B	xyl E	nah Ac
Gen	Alkanmonooxygenase	Catechol-2,3-Dioxygenase	Naphthalen-dioxygenase
Primer			
Referenz	WHYTE et al. (1996)	MORGAN et al. (1993)	HERRICK et al. (1993)
Referenzorganismus	<i>P. oleovorans</i> ATCC 29347	<i>P. putida</i> mt-2 (pWWO)	<i>P. putida</i> G 7 Stamm NCIB 9816
Oligonukleotidsequenz			
forward [5'-3']	TGG CCG GCT ACT CCG ATG ATC GGA ATC TGG	CTG AAG GCT TGG ACC GAA GT	GTT TGC AGC TAT CAC GGC TGG GGC TTC GGC
Position	703-732	130-149	794-823
reverse [5'-3']	CGC GTG GTG ATC CGA GTG CCG CTG AAG GTG	GGT CCG GGT AGT TGT AAT CT	TTC GAC AAT GGC GTA GGT CCA GAC CTC GGT
Position	1543-1572	810-829	1495-1466
Fragmentgröße [bp]	870	700	672
PCR-Regime			
A) Denaturierung	95°C; 5 min	95°C; 5 min	94°C; 5 min
Denaturierung	80°C; 5 min Polymerasezugabe		
B) Amplifikation			
Anzahl der Zyklen	1	30	30
1.Schritt: Denaturierung		95°C; 1 min	94°C; 5 min
2.Schritt: Annealing	58°C; 1.5 min	55°C; 1 min	42°C; 30 sec.
3.Schritt: Synthese	72°C; 2 min	72°C; 3 min	72°C; 5 min
Anzahl der Zyklen	1		
1.Schritt: Denaturierung	95°C; 1.5 min		
2.Schritt: Annealing	58°C; 1.5 min		
3.Schritt: Synthese	72°C; 2 min		
Anzahl der Zyklen	2		
1.Schritt: Denaturierung	95°C; 1.5 min		
2.Schritt: Annealing	57°C; 1.5 min		
3.Schritt: Synthese	72°C; 2 min		
Anzahl der Zyklen	2		
1.Schritt: Denaturierung	95°C; 1.5 min		
2.Schritt: Annealing	56°C; 1.5 min		
3.Schritt: Synthese	72°C; 2 min		
Anzahl der Zyklen	2		
1.Schritt: Denaturierung	95°C; 1.5 min		
2.Schritt: Annealing	55°C; 1.5 min		
3.Schritt: Synthese	72°C; 2 min		
Anzahl der Zyklen	22		
1.Schritt: Denaturierung	95°C; 1.5 min		
2.Schritt: Annealing	54°C; 1.5 min		
3.Schritt: Synthese	72°C; 2 min		
C) Auffüllreaktion	72°C; 2 min	72°C; 7 min	72°C; 5 min

Tab. A 8: Genspezifische Charakteristika der Hybridisierung

	alk B	xyl E	nah Ac
Gen	Alkanmonoxygenase	Catechol-2,3-Dioxygenase	Naphthalen-dioxygenase
Referenz	WHYTE et al. (1996)	MORGAN et al. (1993)	HERRICK et al. (1993)
Referenzorganismus	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 29347	<i>P. putida</i> mt-2 (pWWO)	<i>P. putida</i> G7 (NAH 7) NCIB 9816
Oligonukleotidsonden			
Sequenz	5' TC AAT ACA GGA CAC GAA CTC G 3'	5' CGT CGC CCA GTT TCT CAG TC 3'	5' GC TCG CGT GGÄ GAG CTT CCA TGG CTT CAT C 3'
Position	1022-1042	561-580	911-940
Größe (bp)	21	20	30
Hybridisierungsbedingungen			
Temperatur	42°C	42°C	60°C
Waschbedingungen			
1. Waschschritt	2x5 min 2xSSC, 0.1% SDS Raumtemperatur	2x5 min 2xSSC, 0.1% SDS Raumtemperatur	2x5 min 2xSSC, 0.1% SDS Raumtemperatur
2. Waschschritt	2x15 min 0.1xSSC, 0.1% SDS	2x15 min 0.1xSSC, 0.1% SDS	2x15 min 0.1xSSC, 0.1% SDS
Temperatur	42°C	42°C	50°C

A 9 Zusammensetzung der bei der Detektion verwendeten Lösungen

Waschpuffer

150 mM NaCl
100 mM Maleinsäure, pH 7,5 (mit NaOH)
0.3% Tween 20

Maleinsäurepuffer

150 mM NaCl
100 mM Maleinsäure, pH 7,5 (mit NaOH)

Blockierungspuffer

1% Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer

Detektionspuffer

100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl

TE-Puffer

10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0

A 10 Zusammensetzung der für Plasmidpräparation benötigten Lösungen und Puffer

25 mM Tris-HCl, pH 7,0
0.2 N NaOH
2 M Tris-HCl, pH 7,0
10 M LiCl
Isopropanol, 70% Ethanol, 96% Ethanol
TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 8,0)

Anhang A

STET-Puffer

32 g Saccharose

20 ml Triton X 100

40 ml 0.5 M EDTA, pH 8,0

10 ml 2 M Tris-HCl

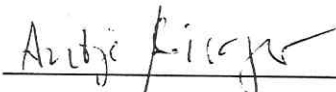
Abkürzungsverzeichnis

alk B	Gen zur Codierung der Alkanmonooxygenase
bp	Basenpaar(e)
C 10	Decan
C 12 O	Catechol-1,2-Dioxygenase
C 23 O	Catechol-2,3-Dioxygenase
C 8	Octan
C 9	Nonan
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
GC-MS	Gaschromatograph Massenspektrometer
GW	Grenzwert
GWBR	Grundwasserbeobachtungsrohr
kb	(kilo) Basenpaar(e)
KBE	Koloniebildende Einheiten
m ü HN	Meter über Höhe Null
MPN	most probable number (Höchstwahrscheinliche Zahl)
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA
MT	Mikrotiterplatten
nah Ac	Gen zur Codierung der Naphthalendioxygenase
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
rpm	rotation per minuts (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
SMMÖ	Standardmedium mit 1% Mineralölrestgemisch
SMSÖ	Standardmedium mit 1% Spindelöl
U	Units (Einheiten)
V	Volumen
xyl E	Gen zur Codierung der Catechol-2,3-Dioxygenase
µS	(mikro) Siemens

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorgelegte Arbeit „Mineralöbelastetes Grundwasser - Struktur, Dynamik, biochemisches Abbaupotential sowie Codierung und Verbreitung degradativer Leistungen in mikrobiellen Biozönosen dieses Ökosystems“ von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt wurde. Die den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.


Antje Birger

Halle, im Mai 1997

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH in den Sektionen Hydrogeologie und Umweltmikrobiologie in der Zeit von Dezember 1993 bis November 1996 angefertigt. Für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas in dieser Institution möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Gläßer und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Babel, die mir das Thema überließen, die materiellen Grundlagen schufen und durch ihre Anregungen und die helfende Kritik die Anfertigung der Arbeit ermöglichten.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Jan R. Andreesen für sein Interesse an der Thematik und die Übernahme eines Gutachtens.

Für die allseitige Unterstützung bei der Planung der molekularbiologischen Untersuchungen, die ständige Hilfsbereitschaft, die zahlreichen praktischen Hinweise und die Diskussion meiner Ergebnisse gilt Frau Dipl.-Biologin Bärbel Kiesel mein ganz besonderer Dank.

Bedanken möchte ich mich auch sehr herzlich bei Frau Dr. Gudrun Krauß für ihre Unterstützung auf organisatorischem und fachlichem Gebiet sowie für die ausführliche Diskussion des Manuskriptes.

Frau Bärbel Krause gilt mein besonderer Dank für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Herrn Dipl.-Biologe Siegfried Jorks danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit, zahlreiche Umweltisolate mit der Methode der Ribotyping zu charakterisieren, wozu er mir u. a. die 16S rDNA-Sonde aus *E. coli* zur Verfügung stellte.

Frau Klein und Frau Bötze möchte ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in das BIOLOG-System danken.

Mein Dank gilt weiterhin den vielen namentlich nicht genannten Kolleginnen und Kollegen der Sektionen Hydrogeologie und Umweltmikrobiologie, die durch ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und durch ihre Aufgeschlossenheit und Gesprächsbereitschaft wesentlichen Anteil an der Schaffung eines angenehmen und konstruktiven Arbeitsklimas hatten

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig -Halle GmbH
Sektion Hydrogeologie
Hallesche Straße 44
D-06246 Bad Lauchstädt
Telefon 034645/73-215
Telefax 034635/73287

Sektion Umweltmikrobiologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2225
Telefax 0341/235-2247