

SCHLUSSBERICHT

VERBUNDVORHABEN: BIOLOGISCHE SANIERUNG VON CARBOCHEMIE ALTLASTEN; TEILVERBUND 1: HUMIFIZIERUNG VON PAK

Teilvorhaben 1/2: Bakterielle Metaboliten

**Prof. Dr. Karl-H. Engesser
ISWA, Universität Stuttgart**

1 ZUR STRATEGIE DER HUMIFIZIERUNG VON PAK:	2
2 NEUISOLIERUNG VON PAK-VERWERTERN:	3
3 UNTERSUCHUNG DER STÄMME AUF IHRE EIGNUNG ZUR BIOTRANSFORMATION	4
4 UMSATZUNTERSUCHUNG VON BENZ(A)PYREN	7
5 WICHTIGE LEISTUNGEN DER AUSGEWÄHLTEN STÄMME US1 UND DPO360	8
6 IDENTIFIZIERUNG VON HAUPTMETABOLITEN AUS DPO360 UND US1	9
6.1 STRUKTURDATEN DES ANTHRACENMETABOLITEN	10
6.2 STRUKTURDATEN DER PYRENMETABOLITEN.....	12
<i>6.2.1 Pyrenmetabolit A</i>	<i>12</i>
<i>6.2.2 Pyrenmetabolit B</i>	<i>13</i>
7 VORARBEITEN ZUR OPTIMIERUNG DES GENERELLEN UMSATZVERHALTENS	14

8 UMSATZ VON ANTHRACEN SOWIE PYREN DURCH TERRABACTER STAMM DPO360 BZW. MYCOBACTERIUM SP. US1	15
8.1 AUFARBEITUNG DES PYREN-METABOLIT 2 IN GEGENWART VON 4,5-DICARBOXYPHENANTHREN (PYREN-METABOLIT 1)	21
9 ANMERKUNG ZUR RADIOAKTIVITÄTSMESSUNG:	22
10 ZWISCHENZUSAMMENFASSUNG.....	23
11 PRÄPARATION DER METABOLITEN.....	24
11.1 PRODUKTION VON C-14 MARKIERTEM CIS-ANTHRACENDIHYDRODIOL.....	24
11.1.1 Bilanz Anthracenumsatz I	26
11.1.2 Bilanz Anthracenumsatz II	26
11.2 PRODUKTION VON C-14 MARKIERTEM DICARBOXYPHENANTHREN.....	27
11.2.1 Bilanz Pyren Umsatz I:	28
11.2.2 Bilanz Pyren Umsatz II	28
12 KRITISCHE WERTUNG UND AUSBLICK.....	29
13 LITERATUR.....	31

1 Zur Strategie der Humifizierung von PAK:

PAKs (polyanellierte Kohlenwasserstoffe) - und hier vor allem die höheren Vertreter - sind häufig toxisch und cancerogen (Sved et al., 1997; Klein et al., 1990; Weyand et al., 1993; Nesnow et al., 1995; Weyand et al., 1993; Marshall et al., 1993; Fuchs et al., 1993) Bei der biologischen Sanierung von schwer-wasserlöslichen Bodenkontaminationen spielt, neben der vollständigen mikrobiellen Umwandlung dieser Verbindungen zu Kohlendioxid und Wasser, auch deren teilweise mikrobielle Oxidation eine Rolle (Sack and Gunther, 1993; Kastner et al., 1994; Maue et al., 1994; Trzesickamlynarz and Ward, 1995; Tongpim and Pickard, 1996). Die Reaktionsprodukte dieser Prozesse können ausgeschieden werden, und für chemische Reaktionen z.B. Polymerisationen zur Verfügung stehen (Shuttleworth and Cerniglia, 1995; Wegst et al., 1981; Gibson et al., 1975; Reineke et al., 1978; Sutherland et al., 1990; Casillas et al., 1996).

Eine vollständige Mineralisation von schwerlöslichen Verbindungen (z.B. PAK) kann im Boden praktisch nicht erreicht werden, weil sich immer gebundene Rückstände (sog. „bound residues“) bilden, die nicht oder nur sehr langsam umgesetzt werden. Daher muß untersucht

werden, welche Vorgänge die Entstehung dieser „bound residues“ begünstigen. Eine Erklärungsmöglichkeit besteht in der Bildung von kovalenten Bindungen zwischen PAK-Metaboliten und der Bodenmatrix. Als dafür potentiell geeignete PAK-Strukturen kommen solche in Frage, die bekanntermaßen häufig im umgebenden Milieu als sog. Cometabolismus-Produkte akkumulieren (Ohmoto et al., 1996; Sutherland et al., 1993; Lecoq et al., 1991; Cerniglia et al., 1994; Gibson et al., 1975; Mohammed et al., 1996; Engesser et al., 1989; Jerina et al., 1976).

Im Rahmen des Teilprojekts „Bakterielle Metaboliten“ wurde festgestellt, welche Metaboliten-Strukturen zur Untersuchung dieses Effektes besonders geeignet sind. Dazu wurden repräsentative Oxidationsprodukte von ausgewählten PAK isoliert und strukturell charakterisiert. Von Anthracen und Pyren wurde jeweils ein Metabolit mit ¹⁴C-Markierung hergestellt. Diese markierten Verbindungen (ein cis-Dihydrodiol und eine Dicarbonsäure) werden dann in Tracer-Experimenten auf ihr chemisches und sorptives Verhalten gegenüber einer definierten Bodenmatrix untersucht werden. Dabei werden auch Erkenntnisse über das Ausmaß und die eventuelle Reversibilität der Veränderung der Bodenstruktur bei der Bindung dieser PAK-Metaboliten erwartet.

2 Neuisolierung von PAK-Verwertern:

Zur Gewinnung von Bakterien, die zur Biotransformation von PAK befähigt sind, wurden Neuanreicherungen durchgeführt.

Aus fünf verschiedenen Umweltproben wurden Bakterien mit der Fähigkeit zur PAK-Verwertung isoliert (belastete Böden: Neustadt, Rositz, Kokereigelände Essen, unbelastete Böden: Schwäbische Alb, Belebtschlamm aus der Kläranlage Stuttgart-Büsnau). Dabei sind zahlreiche Naphthalin- und Phenanthren-Verwerter isoliert worden; das entspricht der weitverbreitenden Fähigkeit der Bodenmikroflora – auch an scheinbar unbelasteten Standorten – diese relativ gut wasserlöslichen PAK-Verbindungen unter Energiegewinn zu metabolisieren. Mikrobielle Kulturen, die ausschließlich mit den schwerer-löslichen PAK anreicherbar sind, sind weit weniger zahlreich zu finden (Trzesickamlynarz and Ward, 1995; Kastner et al., 1994). Benz(a)pyren-Verwerter konnten auf diesem Wege nicht erhalten werden. Im Zuge der Isolierung von Kulturen aus den Anreicherungsansätzen wurde untersucht, ob daraus eine Mikroflora mit der Fähigkeit, reale PAK-Gemische zu verwerten,

zu isolieren ist. Daher wurde das toxische, als Kokereiboden-Kontaminante auftretende Anthracenöl als Cosubstrat eingesetzt; dabei konnten lediglich Anthracenöl-tolerante Stämme erhalten werden. Eine signifikante mikrobielle Verwertung von Anthracenöl oder ein Bakterienwachstum in Gegenwart dieses PAK-Gemisches ist aufgrund seiner Bakterientoxizität (möglicherweise verursacht durch phenolische Komponenten) nicht erreicht worden.

Anreicherungsresultat:

Phenanthren-Verwerter:	16
davon mit Anthracenöl Resistenz:	3
Naphthalin-Verwerter	1
davon mit Anthracenöl Resistenz:	1
Pyren-Verwerter:	3
Fluoranthren-Verwerter:	1

3 Untersuchung der Stämme auf ihre Eignung zur Biotransformation

Mikrobielle PAK-Verwertung und die daran beteiligten biochemischen Reaktionen sind intensiv untersucht und beschrieben worden. Das Ziel vieler Optimierungsversuche im Hinblick auf Bodensanierung ist die Beschleunigung und Vervollständigung des mikrobiellen Abbaus.

Am Beispiel des TNT (Trinitrotoluol) konnte gezeigt werden, daß unter Sauerstoffarmen bzw. reduzierenden Bedingungen einmal eine schnelle Reduktion der Nitrogruppen eintritt und zum anderen diese teilweise oder voll reduzierten Produkte einer nahezu irreversiblen Festlegung im Boden unterliegen (PastiGrigsby et al., 1996; Spain, 1995; Funk et al., 1995; Preuss et al., 1993; Boopathy and Kulpa, 1994; Rieble et al., 1994). Eine Sanierung ist auf diesem Wege also prinzipiell erreichbar.

Eine auf irreversibler Festlegung von PAK-Metaboliten und der damit verbundenen PAK-Dekontamination beruhende analoge Strategie setzt jedoch voraus, daß partiell oxidierte PAK-Verbindungen in signifikanter Menge und vielleicht sogar stöchiometrisch produziert und ins umgebende Milieu ausgeschieden werden.