

Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik  
der Technischen Universität München

**Untersuchungen zur Elimination von  
polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen  
durch Streptomyceten**

Alexandros Papaderos

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff  
Prüfer der Dissertation 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. (RO) A. Kettrup  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil.  
Dr. h. c. (Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar

Die Dissertation wurde am 29.09.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.01.2006 angenommen.

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 1996 bis März 1999 am Institut für Ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. A. Kettrup, Ordinarius am Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik, für die aktuelle Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die mir zugestandene Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil. H. Parlar, Ordinarius am Lehrstuhl für Chemisch-technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie, danke ich für die Übernahme des Korreferates. Herrn Prof. Dr.-Ing. R. Meyer-Pittroff, Ordinarius am Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. K. Rehmann gilt mein Dank für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. K.-W. Schramm, Herrn Dipl.-Chem. A. Behecti und Frau I.-U. Grande danke ich für ihre Unterstützung bei den ökotoxikologischen Tests.

Herrn Dr. T. Machate danke ich für die Bereitstellung der Bodenproben, Herrn Dr. habil. P. Schmitt-Kopplin für die Unterstützung bei der Gewinnung der Huminsäuren.

Herzlich danke ich meinen Laborkollegen Frau Dr. K. Ebert, Herrn Dipl.-Chem. O. Klobasa und Herrn Dr. O. Eikenberg für die hervorragende Arbeitsatmosphäre. Ferner danke ich meinen Kollegen am Institut für Ökologische Chemie für das angenehme Arbeitsklima.

Für die wertvollen fachlichen Anregungen danke ich Herrn Prof. Dr. Z. Ou.

Herrn Dr. H. Bauer danke ich für die wertvollen Anregungen bei der Verfassung dieser Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, den Eheleuten Katharina und Helmut Lembrich und vor allem Frau Edith Lembrich, die diese Arbeit verschiedentlich förderten.

Wir haben in der Annahme gelebt, dass das, was gut für uns ist, auch gut für die Welt sein würde. Wir haben uns geirrt. Wir müssen unser Leben ändern, so dass es möglich wird, mit der gegenteiligen Annahme zu leben, nämlich, dass das, was gut für die Welt ist, gut für uns sein wird.

*Wendell Berry, Recollected Essays*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>6</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>8</b>
<b>1. Einführung in die Problematik</b>	<b>9</b>
1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als Umweltschadstoffe	11
1.2 Mikrobieller Abbau von PAK	16
1.3 Huminstoffe und Streptomyceten	19
1.4 Ökotoxizitätsproblematik	23
1.5 Problemstellung und Zielsetzung	25
<b>2. Experimenteller Teil</b>	<b>26</b>
2.1 Chemikalien	26
2.2 Nährmedien und Lösungen	27
2.3 Referenzbakterienstämme	31
2.4 Kultivierungsbedingungen	31
2.4.1 Stammhaltung	31
2.4.2 Schrägagarkultur zur Sporengewinnung	32
2.4.3 Sporengewinnung	32
2.4.4 Flüssigkulturen	32
2.5 Isolierung von Streptomycetenstämmen	33
2.5.1 Isolierung aus kontaminierten Böden	33
2.5.2 Isolierung PAK-kometabolisierender Streptomycetenstämme	33
2.5.2.1 "Direkte Isolierung"	34
2.5.2.2 Isolierung nach PAK-Verwerter-Screening	34
2.5.2.3 Isolierung nach Entfärbung von Poly-R-478-Agar	34
2.6 Charakterisierung der isolierten Stämme	35
2.6.1 Gramfärbung	35
2.6.2 Katalasetest	35
2.6.3 Nachweis von LL-Diaminopimelinsäure	35
2.6.4 Resistenz gegen Antibiotika	36
2.7 Analytik	36
2.7.1 Probenaufbereitung	36
2.7.2 Analyse der kontaminierten Böden	37
2.7.3 HPLC-Analytik für Bakterienkulturen	38
2.7.4 Wiederfindungsraten	40
2.8 Physiologische Tests	40
2.8.1 Bestimmung des Wachstums der Streptomyceten	40
2.8.2 Abbau von Huminsäuren	40
2.8.3 Versuche zur Bildung von Konjugaten	41
2.9 Extraktion von Huminstoffen aus Böden	41

<b>2.10 Toxizitätstests</b>	<b>43</b>
2.10.1 Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von <i>Daphnia magna</i> STRAUS - Daphnienschwimmhemmtest	43
2.10.1.1 Versuchstiere	44
2.10.1.2 Kulturbedingungen	44
2.10.2 Leuchtbakterientest nach DIN 38412 L34, L341	46
2.10.2.1 Vorbereitung des Bodens für den Leuchtbakterientest	47
2.10.2.2 Leuchtbakterientest mit kontaminierten Böden	48
2.10.2.3 Leuchtbakterientest mit Reinsubstanzen	49
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Isolierung und Charakterisierung der Bakterien</b>	<b>51</b>
3.1.1 Isolierung der Bakterien	51
3.1.1.1 PAK-Gehalt der kontaminierten Böden	51
3.1.1.2 Isolierung der Bakterien	53
3.1.1.3 Charakterisierung der isolierten Streptomycesstämme	56
<b>3.2 Abbau von PAK durch die isolierten Streptomyces</b>	<b>59</b>
3.2.1 Untersuchungen mit dem Isolat AP18.1	59
3.2.1.1 Metabolisierung von Phenanthren durch AP18.1	59
3.2.1.2 Weitere Metabolite des Isolats AP18.1	62
3.2.1.3 Quantitative Analyse des Phenanthrenabbaus durch das Isolat AP18.1	65
3.2.1.4 Metabolisierung von Pyren durch AP18.1	65
3.2.1.5 Metabolisierung von Fluoranthren durch AP18.1	68
3.2.2 Untersuchungen mit dem Isolat KR15	70
3.2.2.1 Mineralisierung von Fluoranthren durch KR15	70
3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aller Isolate	73
3.2.4 Versuche zur Identifizierung von Konjugaten	74
3.2.5 Abbau in Anwesenheit von Huminsäuren	74
3.2.6 Diskussion	74
3.2.6.1 Diskussion der PAK-Abbauversuche durch die isolierten Streptomyces	75
3.2.6.2 Abbau von PAK in Anwesenheit von Huminsäuren	82
3.2.6.3 Bildung von Konjugaten und PAK-Abbau	86
<b>3.3 Untersuchungen zur Verwertung von Huminsäuren durch die isolierten Streptomyces</b>	<b>87</b>
3.3.1 Abbau von Huminsäuren in Festmedien	87
3.3.2 Abbau von Huminsäuren in Flüssigkulturen	88
3.3.3 Diskussion der Versuche zum Abbau von Huminsäuren	92
<b>3.4 Ökotoxikologische Untersuchungen</b>	<b>95</b>
3.4.1 Bestimmung der Toxizität von Kulturüberständen	95
3.4.2 Bestimmung der Toxizität von Einzelsubstanzen	97
3.4.3 Bestimmung der Toxizität von Böden	98
3.4.4 Diskussion der Toxizitätsversuche	105
<b>4. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>112</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
A. deion	deionisiertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BodSchV	Bodenschutz- und Altlastenverordnung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIN	Deutsche Industrienorm
DMF	Dimethylformamid
DOM	engl. Dissolved Organic Matter
EC <sub>20</sub> , EC <sub>50</sub>	engl. Effective Concentration
engl.	englisch
E <sub>x</sub>	Extinktion bei x nm
EE	Essigsäureethylester
EPA	engl. Environmental Protection Agency
HPLC	engl. High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
IE	Integrationseinheiten
KW	Kohlenwasserstoffe
mAU	engl. milli Absorption Units
MeOH	Methanol
MSM	Mineralsalzmedium
nb	nicht bestimmt
NIH	National Institute of Health
ne	nicht eindeutig
neR	nicht extrahierbare Rückstände
nn	nicht nachweisbar
ns	nicht signifikant
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
p.a.	per analysi

PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCP	Pentachlorophenol
r	Korrelationskoeffizient (Lineare Regression)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor, engl. Ratio of frontiers
R <sub>t</sub>	engl. Retention time
Tab	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TOC	engl. Total Organic Carbon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
vgl.	vergleiche
v l n r	von links nach rechts
Vol	Volumen, -mina
U	engl. units
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV-VIS	engl. Ultraviolet-Visible

### **Abkürzungen von PAK**

Nap	Naphthalin
Acy	Acenaphthylen
Ace	Acenaphthen
Flu	Fluoren
Phe	Phenanthren
Ant	Anthracen
Fla	Fluoranthen
Pyr	Pyren
Baa	Benzo(a)anthrazen
Cry	Chrysen
Bbf	Benzo(b)fluoranthen
Bkf	Benzo(k)fluoranthen
Bap	Benzo(a)pyren
Db	Dibenzo(ah)anthrazen
Bgh	Benzo(ghi)perylen
Ind	Indeno(1,2,3-cd)pyren

## Veröffentlichungen

Einige Ergebnisse dieser Dissertation wurden nach Genehmigung durch die Technische Universität München und durch die GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH bereits veröffentlicht:

1. *A Study on Cometabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Soil Streptomyces*. Posterbeitrag am Symposium „Protection and Restoration of the Environment III“, 28. - 30.08.1996, Technische Universität Kreta, in Chania, Griechenland.

2. Papaderos, A. E., Rehmann, K., Kettrup A. (1997)

*A Study on Cometabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Soil Streptomyces*. Proceedings of the 9th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region, 4.- 9.10.1997, in S. Agnello di Sorrento, Italien.

3. Papaderos, A.E., Rehmann, K., Kettrup, A. (1998)

*A Study on Cometabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) by Soil Streptomyces*. Fresenius Environmental Bulletin, 7, 321-327

## 1. Einführung in die Problematik

Die industrielle Revolution hat die Möglichkeiten für die materielle Entwicklung des Menschen immens erweitert [HAWKEN et al., 2000]. Sie tut das auch heute noch, doch zu einem hohen Preis. Seit Mitte des 18. Jahrhunderts ist mehr an Natur zerstört worden als in der gesamten Zeitspanne davor. Die Verlustrate an natürlichem Kapital steigt dabei proportional zum wachsenden materiellen Reichtum.

Seit 1994 ist der Schutz der natürlichen Lebensgrundlagen ein durch den Artikel 20a des Grundgesetzes vorgegebenes Staatsziel der Bundesrepublik Deutschland [BENDER et al., 1995]. Die natürliche Ressource Boden war, anders als die anderen Umweltkompartimente Wasser und Luft, bis Ende der siebziger Jahre wegen des sehr schwierigen und daher nicht angemessenen Abgleiches konkurrierender Nutzungsinteressen ein von der Umweltpolitik nicht zentral behandeltes Umweltmedium [HULPKE et al., 1998]. Später wurde sogar vom "vergessenen" Umweltmedium Boden gesprochen. Die Gründe für diese Fehleinschätzung beruhten u. a. auf folgender, nicht zutreffender Annahme: Für Böden gibt es Eigentümer, weshalb man eine durchgreifende Fürsorge dieser Bodeneigentümer zum Schutz der Böden unterstellte. Weiterhin waren die Zuständigkeiten für den Boden bei den staatlichen Institutionen zersplittert, z.B. zwischen Wasserwirtschaft- und Landwirtschaftsämtern.

In den letzten Jahren nahm die Belastungssituation des Bodens durch Abfalldeponierung, Versiegelung und Bebauung und vor allem durch direkte oder über die Pfade Wasser und Luft erfolgende Einträge von Schadstoffen kontinuierlich zu. Das Umweltbundesamt hat in seiner letzten veröffentlichten Erhebung über 360.000 Altlastverdachtsflächen in Deutschland erfasst [ANONYMOUS, 2001] und trifft hierzu folgende Feststellung: Da erfahrungsgemäß jede zehnte dieser Risikoflächen saniert werden müsste, könne die Sanierung bei den verbliebenen 324.000 nicht 100%ig durchgeführt werden. Bei über 30.000 dieser Altlastenverdachtsflächen besteht die Hauptbelastung in aus dem Umfeld von Tanklagern, Umschlagplätzen und Werkstätten ins Bodenreich eingesickerten Treib- und Schmierstoffen. Nach vorsichtigen Schätzungen gefährdet jede dritte davon das Grundwasser.

Bei den Sanierungstechnologien für kontaminierte Böden lassen sich zunächst *ex situ*- (das kontaminierte Erdreich wird ausgehoben und behandelt) und *in situ*-Verfahren (das kontaminierte Erdreich wird im Bodenverbund belassen und dort gereinigt) unterteilen.

Zu den *ex situ*-Verfahren zählen die biologische Bodensanierung (z.B. in Bio-Beeten bis hin zu stationären *off site*-Bodenreinigungsanlagen mit einer Kapazität von über 100.000 Tonnen kontaminierten Bodens), die Bodenwäsche und die thermische Bodensanierung.

*In situ*-Verfahren umfassen biologische und biologisch-hydraulische Verfahren, Bioventing, Biosparging, chemisch-physikalische Verfahren, Bodenluftabsaugung und Airsparging [COLLERAN, 1997; HENKE, 1998; RULKENS et al., 1998; BAYERISCHES LfU, 2002].

Methoden zur Stabilisation und zur geohydrologischen und physikalisch/ mechanischen Isolierung schließlich zielen im allgemeinen nicht auf die Entfernung von Schadstoffen, sondern auf das Verhindern ihrer Verbreitung. Auch wenn Schadstoffe mit einer der *in situ*-Wiederherstellungsmethoden entfernt werden sollen, ist eine temporäre Isolierung des Standorts gelegentlich erforderlich.

Die vorhandenen Techniken eignen sich nicht für die Sanierung aller Arten von Bodenverschmutzungen. Zum Beispiel existiert noch keine Technik für die Behandlung diffus verschmutzter Zonen, in denen Schadstoffe z.B. nur an der Oberfläche des Bodens vorkommen. Eine interessante potentielle Sanierungstechnik für diese Form der Bodenverschmutzung ist die Phytoremediation (Verwendung von Schadstoff absorbierenden Pflanzen zur Reinigung kontaminierter Böden).

## 1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als Umweltschadstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind Verbindungen mit mindestens drei kondensierten Benzolringen, die lediglich Kohlenstoff- und Wasserstoffatome enthalten und die linear oder abgewinkelt angeordnet sind oder in Clustern vorliegen. Zu den PAK werden gewöhnlich auch Naphthalin, Fluoren und Acenaphthen gerechnet [NOLL, 1996]. PAK sind im engeren Sinne keine Xenobiotika. Sie entstehen seit je her durch Verbrennung, Pyrolyse und Pyrosynthese aus organischem Material bei natürlichen Vorgängen wie Vulkanausbrüchen, Wald- und anderen natürlichen Bränden [BLUMER, 1976; SAMANTA et al., 2002].

PAK werden als Schadstoffe am zweithäufigsten nach den Mineralölkohlenwasserstoffen auf Altlastverdachtsflächen angetroffen [HELLMANN, 1998]. Umweltpolitische Bedeutung haben die PAK vor allem als Stoffe erlangt, die humantoxikologisch bedenklich sind, da es unter ihnen Verbindungen mit karzinogenem und mutagenem Potential gibt [LIU et al., 2001]. Diese Schadstoffklasse gelangt „als Nebenprodukte von Verbrennungsprozessen überwiegend in Partikel-adsorbierter Form durch atmosphärische Deposition in Gewässer und Böden“ [REHMANN, 1995]. Betriebe der Teerproduzierenden und -verarbeitenden Industrie, Holzimprägnierungsplätze und Tankstellen sind ausschlaggebend für die hochgradige punktuelle Kontamination von Böden und Grundwasser durch PAK. Aus solchen Quellen werden PAK direkt in benachbarte Umweltkompartimente eingetragen. Viele dieser Produktions- und Verarbeitungsstätten sind seit langer Zeit stillgelegt und stehen als Altlasten zur Sanierung an [WIESMANN, 1994].

Auch andere Begebenheiten des modernen Lebens führen zu Kontaminationen von Böden mit PAK:

- Rückstände aus Ö raffinerien,
- Leckagen von Ölpipelines und unterirdischen Lagerungstanks und
- Ausflüsse von Rohöl im marinen Milieu aufgrund von Unfällen auf See.

In Abbildung 1 sind die sog. "16 EPA-PAK" dargestellt. Sie sind die durch die amerikanische Umweltbehörde EPA (Environmental Protection Agency) als wichtige Vertreter dieser Substanzklasse in die "Priority Pollutant List" aufgenommenen Verbindungen.

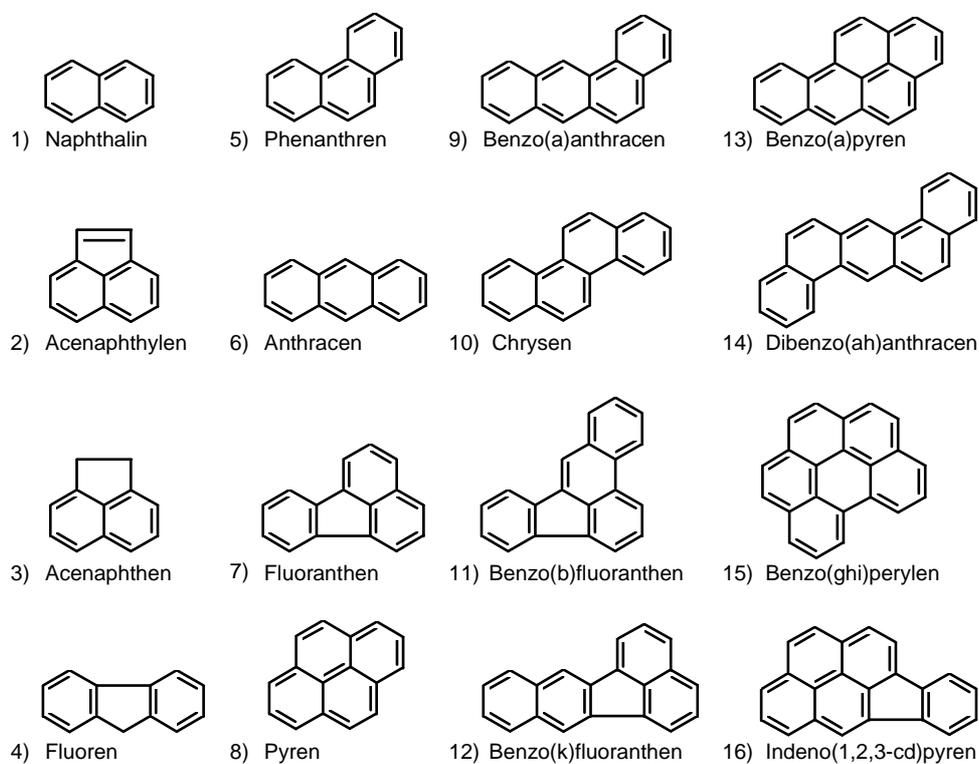


Abb. 1.: Strukturformeln der 16 PAH der „Priority Pollutant List“

In Tabelle 1 sind die 16 EPA-PAK mit einigen physikalisch-chemischen Eigenschaften angegeben. Die Eigenschaften ändern sich in Abhängigkeit des Molekulargewichts und werden ebenfalls durch die Topologie der Moleküle beeinflusst [EBERT, 2000].

Tab. 1.: Physikalisch-chemische Eigenschaften der 16 EPA PAK [SIMS, 1983; SIMS UND OVERCASH, 1988; EBERT, 2000]

PAK	Dampfdruck [Pa] bei 20°C	Löslichkeit [mg/l] bei 20°C	Molmasse [g mol <sup>-1</sup> ]	log K <sub>ow</sub>
Nap	6,1 x 10 <sup>-1</sup>	30	128,18	3,37
Acy	2,6 x 10 <sup>-1</sup>	3,93	152,2	4,07
Ace	3,8 x 10 <sup>-1</sup>	3,47	154,2	4,33
Flu	2,6 x 10 <sup>-1</sup>	1,98	166,23	4,18
Phe	9,0 x 10 <sup>-3</sup>	1,29	178,24	4,46
Ant	1,7 x 10 <sup>-3</sup>	0,07	178,24	4,45
Fla	7,9 x 10 <sup>-5</sup>	0,26	202,26	5,33
Pyr	9,1 x 10 <sup>-6</sup>	0,14	202,26	5,32
Baa*	6,6 x 10 <sup>-8</sup>	0,014	228,3	5,61
Cry*	8,3 x 10 <sup>-6</sup>	0,002	228,3	5,61
Bbf*	6,6 x 10 <sup>-6</sup>	0,0012	252,32	6,57
Bkf*	6,6 x 10 <sup>-6</sup>	0,00055	252,32	6,84
Bap*	6,6 x 10 <sup>-6</sup>	0,0038	252,32	6,04
Db*	1,3 x 10 <sup>-9</sup>	0,0005	278,36	5,97
Bgh	1,3 x 10 <sup>-9</sup>	0,00026	276,34	7,23
Ind*	1,3 x 10 <sup>-9</sup>	0,062	276,34	7,66

log K<sub>ow</sub>: dekadischer Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

\*karzinogene Effekte im Tierversuch [IARC, 1987]

Zu den die Böden schonenden Sanierungsverfahren für PAK-kontaminierte Standorte gehört ohne Zweifel die biologische Sanierung. Mikroorganismen mit geeigneten metabolischen Fähigkeiten kommen in vielen kontaminierten Böden von Natur aus vor [GUERIN, 1999]. Diese Mikroorganismen können durch den Einsatz verschiedener Techniken stimuliert werden, zumal die Raten des biologischen Abbaus nicht nur durch die Anzahl der aktiven Mikroorganismen, sondern auch durch andere Faktoren im Bo-

den, unter anderem durch die Bioverfügbarkeit der abzubauenen Schadstoffe, definiert werden.

Die Bioverfügbarkeit ist einer der limitierenden Faktoren bei der biologischen Sanierung von PAK-kontaminierten Böden. Mit steigendem Molekulargewicht sinkt die Bioverfügbarkeit der PAK im Boden. Eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit, die oft von weiteren positiven Effekten für den Abbau von PAK durch Mikroorganismen begleitet wird, kann z.B. durch die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen erreicht werden [SOEDER et al., 1996].

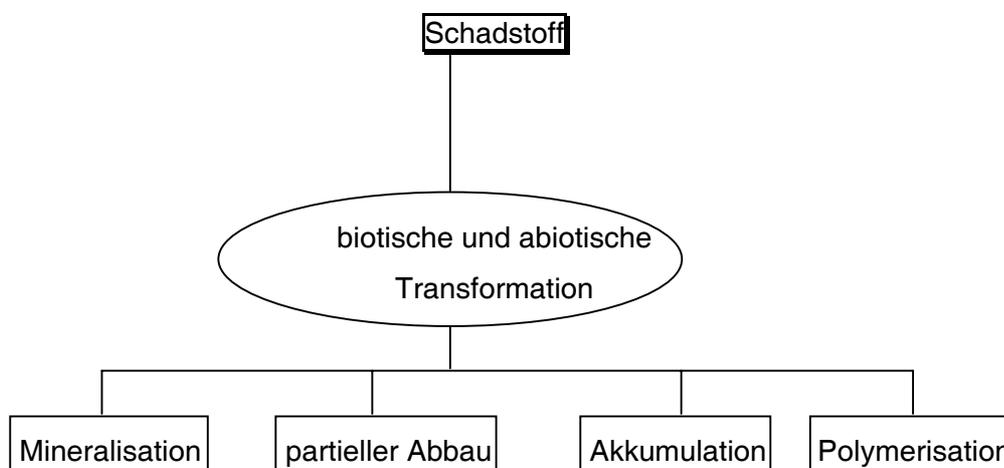


Abb. 2.: Möglichkeiten der Transformation eines Schadstoffes im Boden  
(nach RUGGIERO, 1999)

Aus verschiedenen Studien ist seit langem bekannt, dass sich die Bioverfügbarkeit von PAK z.B. durch ihre Adsorption an die Bodenmatrix verringert. Die PAK werden, zumindest vorübergehend, einer analytischen Erfassung entzogen. Dieses Phänomen wird unter dem Begriff "nicht extrahierbare gebundene Rückstände" (neR) diskutiert [MAHRO UND KÄSTNER, 1993; RICHNOW et al., 1998]. Die Definition der neR ist längst Gegenstand von Diskussionen. In der vorliegenden Arbeit ist der Terminus im folgenden Kontext zu betrachten: chemische Spezies, die aus einer ursprünglich vorhandenen Verbindung stammen, die durch Methoden aus dem Boden extrahiert werden kann, welche die chemische Natur der organischen Verbindungen nicht bedeutend verändern.

So bedeutet das analytische "Verschwinden" eines Schadstoffes nach erfolgter Bodensanierung nicht automatisch, dass dieser im Boden auch vollständig abgebaut worden und somit die biologische Sanierung erfolgreich abgelaufen ist. Sollte die Biover-

ffügbarkeit des Schadstoffs oder seiner Metabolite gering sein, kann eine bedeutende Fraktion des Schadstoffes im Verlauf einer biologischen Sanierung unberührt bleiben. Außerdem ist in vielen Fällen nicht die ursprüngliche Verbindung an sich diejenige, die für die Bildung von gebundenen Rückständen verantwortlich ist. Tatsächlich ist die Bindung für viele organische Schadstoffe eine Konsequenz der Transformation der ursprünglichen Verbindung in reaktivere Spezies, wie phenolische Verbindungen und Aminoderivate [VERSTRAETE UND DEVLIEGHER, 1996].

Laborstudien haben gezeigt, dass die Bildung von gebundenen Rückständen eines der elementaren Schicksale der PAK ist. GUTHRIE UND PFAENDER (1998) belegten in einer Studie, dass eine der größten Fraktionen (43-80%) des wiedergefundenen radioaktiv markierten Kohlenstoffs (zugesetzt als  $^{14}\text{C}$ -markiertes Pyren) in Humin- und Fulvinsäureextrakten des Bodens (6,6-26%) oder im restlichen Humin (29-73%) festzustellen war.

Die Risiken, die mit gebundenen Rückständen aus PAK verbunden sind, hängen von ihrer chemischen Struktur und von ihrer möglichen Freisetzung in die Umwelt ab. In der o.g. Studie zeigten GUTHRIE UND PFAENDER, dass Rückstände von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Pyren, die in Humin- und Fulvinsäureextrakten und im Restboden gebunden waren, nach Säurespaltung nicht leichter bioverfügbar für eine Pyren-mineralisierende mikrobielle Gemeinschaft wurden. ESCHENBACH et al. (1998) zeigten, dass gebundene PAK-Rückstände, einschließlich solcher aus Pyren, mit niedrigen Raten abgebaut wurden, vergleichbar den Raten des natürlichen Humus.

## 1.2 Mikrobieller Abbau von PAK

Der Abbau organischer Substanzen im Boden und die damit einhergehende Neubildung von Stoffen, die ihrerseits gegen einen mikrobiologischen und chemischen Angriff verhältnismäßig resistent sein können und dadurch einen beständigeren Bodenbestandteil bilden, ist ein sehr komplexer Vorgang, an dem zahlreiche Mikroorganismen beteiligt sind.

Natürliche Gemeinschaften von Mikroorganismen beherbergen eine erstaunliche physiologische Vielseitigkeit und eine Vielzahl von katabolischen Möglichkeiten für die Spaltung einer enormen Anzahl von organischen Molekülen [KNACKMUSS, 1996]. Jedes natürliche Produkt, unabhängig von seinem Molekulargewicht oder seiner strukturellen Komplexität, ist durch die eine oder andere mikrobielle Spezies in einem besonderen Milieu (leicht) abbaubar. Die „Omnipotenz“ der Mikroorganismen erstreckt sich auch auf die Mehrzahl der synthetischen Verbindungen, die in natürliche metabolische Kreisläufe eingeschleust werden. So wurde in den letzten Jahren eine große Anzahl von Mikroorganismen isoliert, die Verbindungen abbauen können, die früher als nicht abbaubar betrachtet wurden [TIMMIS UND PIEPER, 1999]. Dies lässt darauf schließen, dass unter dem selektiven Druck der Umweltverschmutzung eine mikrobielle Kapazität für den Abbau von persistenten Xenobiotika entwickelt wurde, die für die Beseitigung von Schadstoffen durch biotechnologische Prozesse nutzbar gemacht werden kann. Die Tatsache, dass viele Schadstoffe in der Umwelt persistieren, betont dennoch die gegenwärtige „Unzulänglichkeit“ dieser katabolischen Kapazität, mit solchen Schadstoffen fertig zu werden.

Die Möglichkeit, PAK mit Hilfe von Mikroorganismen in biologisch verträglichere Verbindungen zu transformieren, wird seit Jahren weltweit intensiv untersucht [MAHRO UND KÄSTNER, 1993]. Als Folge ist eine Vielzahl von Mikroorganismen isoliert und beschrieben worden, die diese Verbindungen unter Laborbedingungen entweder vollständig mineralisieren oder zumindest kometabolisch transformieren können. Diese Untersuchungen führten zu der Idee, auch die Reinigung kontaminierter Böden mit Hilfe von Mikroorganismen vorzunehmen. In letzter Zeit sind jedoch verschiedentlich Bedenken laut geworden, ob diese biotechnologischen Bodenreinigungsverfahren tatsächlich zu einer vollständigen Sanierung der Böden führen. Insbesondere wird befürchtet, dass die

beim Schadstoffabbau mutmaßlich entstehenden Metabolite selbst ein toxisches Potential aufweisen könnten. Ferner funktionieren die meisten der mikrobiellen Aktivitäten, die als Basis für biotechnologische Anwendungen dienen können, unter Realbedingungen nicht optimal.

Die Stoffwechselwege, mit deren Hilfe Mikroorganismen PAK abbauen können, unterscheiden sich im Hinblick auf die dabei möglicherweise entstehenden Metaboliten allerdings deutlich. Man kann die drei folgenden Typen unterscheiden:

- Typ 1: Vollständige aerobe Mineralisierung
- Typ 2: Kometabolische Transformation, partielle Mineralisierung
- Typ 3: Unspezifische radikalische Oxidation

Der jeweilige Mechanismus der initialen Biotransformation der PAK hängt unter anderem davon ab, wie die involvierten Mikroorganismen enzymatisch ausgestattet sind. Dieser Faktor wird nicht nur die Rate, sondern auch den Weg und die endgültigen Produkte des Abbaus beeinflussen.

Zu den für den biologischen Abbau von organischen Schadstoffen besonders geeigneten Mikroorganismen zählt die Gruppe der Aktinomyceten. Sie machen eine signifikante Komponente der mikrobiellen Population in den meisten Böden aus [NYER et al., 1996; GROTH UND SAIZ-JIMENEZ, 1999] und gelten als die bedeutendsten Mikroorganismen für den Abbau von verhältnismäßig komplexen, widerstandsfähigen Polymeren, die naturgemäß in Pflanzenüberresten und im Boden vorkommen [MCCARTHY UND WILLIAMS, 1992].

Die zu den Aktinomyceten gehörenden Streptomyceten scheinen für den biologischen Abbau von organischen Schadstoffen besonders prädestiniert zu sein. Zu dieser Fähigkeit könnten ihnen folgende Eigenschaften verhelfen [POGELL, 1995; XU et al., 1996]:

1. Sie haben eine breite sekundäre metabolische Aktivität gegen vielfältige Xenobiotika. In diesen Prozessen sind Reaktionen oxidativer Art involviert.
2. Durch ihr myzelartiges, invasives Wachstum sind sie in der Lage, Böden optimal zu penetrieren und so den Bedarf an Durchmischung des Bodens zu minimieren.
3. Sie wachsen schnell auf semiselektiven Substraten, bauen zügig eine hohe Biomasse auf und erzielen hohe Raten bei Pestizid- und Herbizidabbau.
4. Streptomyceten können zur zukünftigen Anpassung an ein neues Milieu und neue Umweltschadstoffe genetisch manipuliert werden.

Streptomyceten sind aerobe Sporoaktinomyceten, die ein sehr ausgedehntes und verzweigtes Substrat- und Luftmyzelium bilden [GOODFELLOW UND WILLIAMS, 1983]. Ihre Sporen werden auf dem Luftmyzelium getragen, gelegentlich auch auf dem Substratmyzelium.

Das myzeliale Wachstum wird in Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit, unlösliche organische Materialien durch extrazelluläre Enzyme abzubauen, in Verbindung gebracht. Streptomyceten bilden ein nichtfragmentiertes, verzweigtes Substratmyzelium [LOCCI, 1984]. Mit fortschreitendem Wachstum kann ein Netzwerk von Lufthyphen die Kolonieoberfläche bedecken. Dadurch entsteht ein typisches "haariges" oder "pulvriges" Aussehen.

Einige Streptomyceten greifen sowohl die Zellulose- als auch die Ligninbestandteile von abgestorbenem Pflanzenmaterial an und oxidieren den Kohlenstoff aromatischer Ringe und der Seitenketten zu CO<sub>2</sub>. Die Fähigkeit von Streptomyceten, Schadstoffe im Boden abzubauen oder zu transformieren, wurde im Rahmen verschiedener Studien untersucht:

- Der Abbau von chlororganischen Verbindungen sowohl mit niedrigem als auch hohem Molekulargewicht wurde beschrieben. So konnten DE SCHRIJVER UND DE MOT (1999) den Abbau von PCP durch *Streptomyces* zeigen.
- Mehrere *Streptomyces* spp. sind in der Lage, während ihrer aktiven Wachstumsphase DDT zu DDD (1,1-dichloro-2,2-bis[p-chlorophenyl]ethan) und PCNB zu Pentachloroanilin zu dechlorieren. Außerdem wurde der Abbau des Chloroazetanilidherbizids Metolachlor, des Herbizids Atrazin und des Insektizids Lindan beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass einige Streptomycetenstämme Aldrin zum Epoxid Exodieldrin abbauen können. Ein weiterer Streptomycetenstamm ist in der Lage,  $\gamma$ -HCH zu dechlorieren und den Herbizidwirkstoff Dalapon abzubauen. Der Metabolismus von Sulfonylhurea-Herbiziden durch zwei induzierbare Cytochrom P450-Enzymsysteme von *Streptomyces griseolus* ATCC 11796 wurde ebenso beschrieben [HARDER et al., 1991; O'KEEFE et al., 1993].
- Einige Streptomycetenstämme können eine wichtige Rolle beim Abbau von Rohöl sowohl in schwach sauren als auch in schwach basischen Böden spielen und letztlich einen Vorteil gegenüber Rohöl abbauenden Pilzen haben, die eventuell ineffizient beim Abbau in basischen Böden sind [IJAH UND ANTAI, 1995].

### 1.3 Huminstoffe und Streptomyceten

Vergleicht man den Gehalt des gesamten Kohlenstoffs in terrestrischen und marinen Milieus, machen Huminstoffe (organische Materie der Böden) in Böden  $2.500 \times 10^{12}$  kg aus, während Huminstoffe im marinen Milieu (mariner Humus) ungefähr  $3.000 \times 10^{12}$  kg erreichen [KÖRDEL et al., 1997]. Huminstoffe sind farbdunkle, hochmolekulare Substanzen. Wasser und andere Moleküle, wie auch Ionen, können reversibel aufgenommen werden.

Entsprechend ihres Verhaltens in wässrigen Lösungen und bei verschiedenen pH-Werten werden Huminstoffe in drei Gruppen aufgeteilt:

- Huminsäuren: die sauren Komponenten der Huminstoffe, die in Basen löslich, in Säuren unlöslich sind;

- Fulvinsäuren: die sauren Komponenten der Huminstoffe, die sowohl in Basen als auch in Säuren löslich sind; und
- Humine: die Komponenten der Huminstoffe, die weder in Basen noch in Säuren löslich sind. Der traditionelle Begriff "Humin" bezieht sich auf die unlösliche organische Fraktion des Bodens und von neueren Sedimenten [ALMENDROS et al., 1996]. Nachdem freie Lipide und in Basen lösliche Humusfraktionen (Humin- und Fulvinsäuren) im Labor entfernt wurden, macht der unlösliche Rückstand oft bis zu einem Drittel des gesamten organischen Kohlenstoffs aus. Humin ist aliphatischer als Huminsäuren als Folge der Anwesenheit von Polysacchariden und parafinischen Komponenten [HATCHER et al., 1994].

Die oben genannten Fraktionen unterscheiden sich in der Farbe und im Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt. Von der Fulvin- über die Huminsäuren zu den Huminen nehmen sowohl die Löslichkeit im Wasser als auch die aziden und reduktiven Eigenschaften ab, während die Molekülgröße zunimmt. Die Struktur der Huminstoffe ist eng mit der Struktur der biologischen Komponenten verwandt, aus denen sie gebildet wurden. Terrestrische Huminsäuren, die im allgemeinen aus Lignin stammen, sind aromatischer als marine Huminsäuren.

Die hauptsächlichlichen Strukturelemente der Huminstoffe stellen Kohlenwasserstoffe, Phenole, Ligninmonomere und -dimere, Alkane, Alkene, Lipide (Fettsäuren und n-Alkylester), Alkylaromaten und stickstoffhaltige Verbindungen dar [SCHULTEN und SCHNITZER, 1997; HERTKORN et al., 2001]. Sauerstoff ist anwesend in der Form von Karboxylen, phenolischen und alkoholischen Hydroxylen, Karboxylestern und -ethern. Stickstoff ist mit heterozyklischen Strukturen und als Nitril gebunden [SCHULTEN et al., 1991; SCHULTEN und SCHNITZER, 1993].

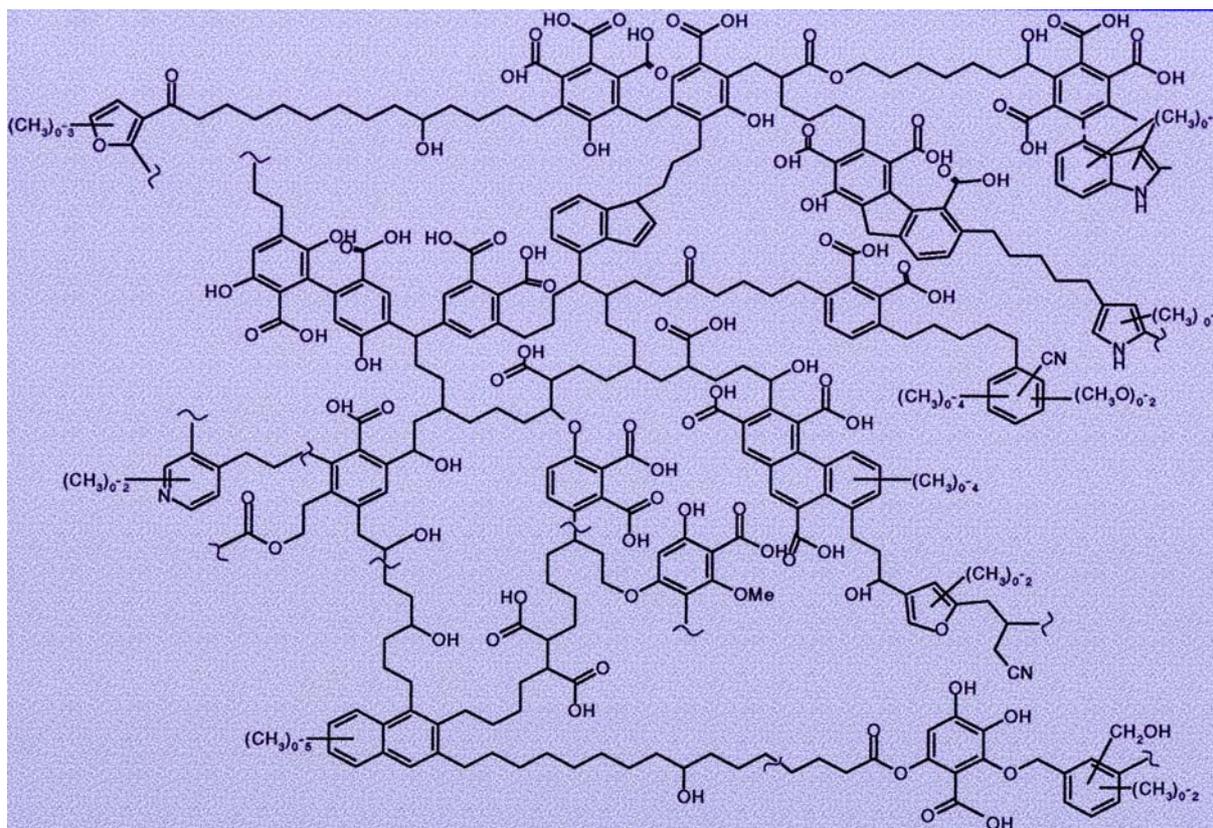


Abb. 3.: Struktur einer Huminsäure (aus Schulten H.-R. & Schnitzer, M., 1997)

Eine der interessantesten Besonderheiten der in der Literatur beschriebenen Huminsäurestruktur ist die Anwesenheit von „Lücken“ verschiedener Dimensionen, die andere organische Bestandteile, wie Kohlenwasserstoffe, „einfangen“ und binden können. Dies hätte zum Ergebnis, dass in vielen Fällen eine signifikante Fraktion des Schadstoffes im Verlauf einer biologischen Sanierung unberührt bliebe. Neuere Studien deuten darauf hin, dass Rückstände, die chemisch in den Bodenhumaten gebunden sind, toxikologisch inaktiv sein könnten. So wurde bei Chlorhumuspolymeren keine Toxizität festgestellt. Eine Freisetzung oder Verlagerung der Schadstoffe aus der Bodenmatrix birgt jedoch langfristig ein noch nicht abschätzbares Gefährdungspotential.

Huminstoffe werden durch Polymerisation von phenolischen Verbindungen gebildet. Die Hauptbestandteile von Pflanzen, wie Zellulosen und Hemizellulosen (bis zu 40%), Lignine (5-20%) und Proteine (3-8%), sind wichtige Ausgangsmaterialien für die Prozesse der Humifizierung [FLAIG, 1988]. Dazu gehören auch verschiedene stickstoffhaltige Substanzen, Zucker und Polysaccharide sowohl als Substanzen der Zellen als auch

als Mineralien. In kleineren Mengen werden auch Fette, Wachse, Tannine und Farbstoffe gefunden. Deshalb ist es nicht überraschend, dass aromatische Zwischenprodukte, die natürlich vorkommenden Chemikalien ähneln und während der Transformation von PAK gebildet werden, in gebundenen Bodenrückständen (Humus) durch enzymatische oder abiotische chemische oxidative Kopplungsreaktionen inkorporiert werden können [SHEVCHENKO und BAILEY, 1996].

Streptomyceten wurden bereits 1900 von BEIJERINCK als "Humusbildner" betrachtet. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Turnover von Huminstoffen im Boden. 1955 stellte KÜSTER fest, dass einige Streptomyceten in der Lage sind, auf peptonhaltigen Nährmedien oder einzelnen aromatischen Aminosäuren, wie Tyrosin und Tryptophan, dunkelbraune, säureausfällbare Stoffe zu bilden, die natürlichen, aus dem Boden extrahierten Huminsäuren sehr ähnlich sind. Untersuchungen zur Bildung von Huminstoffen durch Streptomyceten zeigen, dass die hierfür notwendigen Enzyme (Phenoloxidasen) von ihnen gebildet werden. Mittlerweile ist bestätigt, dass sich zahlreiche Streptomycetenarten durch die Fähigkeit auszeichnen, auf gewissen Nährmedien, besonders auf eiweiß- oder peptonhaltigen, ein dunkelbraunes bis schwarzes Pigment zu bilden. Solche Streptomyceten werden als "chromogen" bezeichnet und der dunkelbraune Farbstoff aufgrund seiner Ähnlichkeit in Bildungsweise und chemischen Eigenschaften mit den aus Tieren bekannten Melaninen als "melanoides Pigment" bezeichnet. Von den bei diesen Versuchen verwendeten „phenolischen“ Ausgangssubstanzen sowie den sehr wahrscheinlich unter natürlichen Bedingungen in Frage kommenden Ligninabbauprodukten kann angenommen werden, dass sie auch im Boden für diesen Prozess zur Verfügung stehen.

Streptomyceten sind am Aufbau der Huminstoffe folgenderweise beteiligt [KUTZNER, 1968]:

- Abbau von aromatischen Polymeren, besonders von Lignin, und damit Bereitstellung von aromatischen Monomeren.
- Oxidation aromatischer Monomere, im Wesentlichen von phenolischen Verbindungen, zu den entsprechenden Chinonen, die dann ohne Mitwirkung von Enzymen zu "dunkel gefärbten Substanzen", den Melaninen, polymerisieren.

Wenn auch die Beteiligung der unterschiedlichsten Organismen bei den oben genannten Reaktionen außer Zweifel steht, sei doch erwähnt, dass huminartige Komplexe auch ohne mikrobielle Mitwirkung aus autooxidiertem Lignin und organischen N-Verbindungen entstehen können.

Die Tatsache, dass Streptomycceten andererseits bei der biologischen Degeneration von natürlicher Materie eine wichtige Rolle spielen, macht sie zu einer bedeutenden Bakteriengruppe bei der Transformation von Umweltschadstoffen im Boden [LACEY, 1988; JENDROSSEK et al., 1997]. Sie greifen sowohl natürliche Produkte als auch komplexe, widerstandsfähige Moleküle und Polymere an, die durch andere Organismen wenig in Mitleidenschaft gezogen werden [CRAWFORD und SUTHERLAND, 1979; MCCARTHY, 1987; FADULLON et al., 1998].

Da Huminstoffe wiederum durch ihre spezifischen Struktureigenschaften in der Lage sind, Xenobiotika durch Einschleusung in Humifizierungsvorgänge zu eliminieren oder durch Festlegung von Verbindungen in stabilen Huminstoff/Nicht-Huminstoff-Komplexen aus natürlichen Kreisläufen auszuschleusen [ZIECHMANN, 1997], könnte die Aktivität von Streptomycceten die Festlegung/Freisetzung von Umweltschadstoffen beeinflussen.

## 1.4 Ökotoxizitätsproblematik

Wie bereits erwähnt, besitzen einige PAK (human-)toxikologische Eigenschaften. Dabei sind sie selbst nicht kanzerogen; erst nach metabolischer Transformation entfalten sie ihre karzinogene Wirkung.

Zur Analyse von Umweltschadstoffen wie PAK werden traditionell physikochemische Methoden eingesetzt. Durch die fortschreitende Empfindlichkeit der analytisch-chemischen Methodik können zunehmend kleinere Stoffmengen nachgewiesen werden. Diese Stoffmengen können jedoch nicht mehr als Richtzahl für Grenzwerte genommen werden, um die Bedenklichkeit von Umweltschadstoffen festzulegen [BALLSCHMITTER UND WIEDMANN, 1999]. Für die praktische Umweltpolitik folgt daraus die Erkenntnis, dass analytisch-chemisch nachweisbare Mengen einer Verbindung so klein sein können, dass sie humantoxikologisch nahezu sicher als unbedenklich anzusehen sind. Die

schwierige Einordnung der allgemeinen Umweltrelevanz einer vorliegenden niedrigen Konzentration muss aufgrund anderer Kriterien gelöst werden. Geringe Gehalte eines Stoffes haben z.B. dann eine ernst zu nehmende Umweltrelevanz, wenn sich der Stoff über unvermeidbare Verteilungsprozesse in der Umwelt langfristig in Organismen anreichern kann.

Die Charakterisierung komplexer Proben hinsichtlich ihrer toxisch wirkenden Inhaltsstoffe allein durch eine stoffbezogene chemische Analytik ist nicht ausreichend, denn für eine Vielzahl von Stoffen sind deren toxische Eigenschaften unbekannt [VIGELAHN UND KALNOWSKI, 1997]. Im Laufe der letzten Jahre hat die Überwachung von toxischen und bioverfügbaren Schadstoffen mit Hilfe von „Bioindikatoren“ an Bedeutung gewonnen [TOUSSAINT et al., 1995; CHUN et al., 1996; BLAISE, 1998]. Dazu gehören Bakterien, Algen, Daphnien, Regenwürmer, Fische sowie höhere Pflanzen.

Nichtzuletzt aus Gründen der Vergleichbarkeit hat man sich auf definierte Testorganismen und normierte Versuchsbedingungen geeinigt. Zu einer möglichst umfassenden Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffen und Stoffgemischen werden Versuchssysteme aus verschiedenen ökologischen Gruppen zu einer Testbatterie kombiniert. Von ihrer Konzeption her sind es statische Monospezies-tests zur Erkennung akut toxischer Wirkungen. Aussagen über Wirkungen im Ökosystem sind aufgrund der problematischen Übertragbarkeit auf andere Organismen und auf die Bedingungen in der Umwelt nur eingeschränkt möglich.

## 1.5 Problemstellung und Zielsetzung

Aus den Ausführungen in den vorherigen Abschnitten lässt sich ein vielfältiger Forschungsbedarf in Bezug auf das Schicksal von PAK im Ökosystem Boden ableiten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit folgenden Fragen:

- Elimination von ausgewählten Modell-PAK: Phenanthren, Fluoranthen und Pyren durch Streptomyceten
  - Bildung von Metaboliten in Reinkulturen
  - Zusammenhänge zwischen der Elimination von PAK und dem Abbau von Huminstoffen sowie
  - die ökotoxikologische Relevanz der o.g. Prozesse.

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Als erstes sollte der bakterielle Metabolismus von PAK in Reinkulturen von Streptomyceten untersucht werden. Dazu sollten Streptomyceten aus mit PAK kontaminierten Böden isoliert und charakterisiert werden.
2. Als nächstes sollten die PAK-Metaboliten identifiziert und isoliert werden.
3. Die Untersuchung des Abbaus von Huminstoffen durch PAK-metabolisierende Streptomyceten war ein weiteres Experiment in der vorliegenden Arbeit. Dabei sollten selbstisolierte, native und kommerziell erhältliche Huminstoffe eingesetzt werden.
4. Die Ökotoxizität von Produkten des Metabolismus der Modell-PAK durch die isolierten Streptomyceten, von Kulturüberständen sowie von Bodeneluatensollten mit dem Daphnien- und mit dem Leuchtbakterientest untersucht werden.

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, mit Ausnahme der nachfolgend genannten, von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen und waren von höchstem erhältlichen Reinheitsgrad.

Tab. 2.: Verwendete Chemikalien

Stoff	Reinheitsgrad	Bezugsquelle
Agar Agar	analytical grade	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	-	Difco Laboratories, USA
Bacto Malt Extract	-	Difco Laboratories, USA
Bacto Tryptone	-	Difco Laboratories, USA
Bacto Yeast Extract	-	Difco Laboratories, USA
Benz[a]anthrazen	95%	Sigma, Deisenhofen
Benzo[a]pyren	98%	Sigma, Deisenhofen
Biphenyl	99%	Aldrich, Steinheim
Chrysen	98%	Aldrich, Steinheim
Coronen	99%	Aldrich, Steinheim
Dibenzofuran	99%	Aldrich, Steinheim
Dibenzothiophen	95%	Aldrich, Steinheim
Essigsäureethylester	p.a.	Riedel de Haën, Seelze
Fluoranthen	98%	Aldrich, Steinheim
<i>trans</i> -2, 3-Fluoranthendihydrodiol	>92%	National Cancer Institute, USA
Fluoren	98%	Aldrich, Steinheim
Huminsäure		Fluka, Schweiz
1-Hydroxyfluoranthen	>97%	National Cancer Institute, USA
3-Hydroxyfluoranthen	>97%	National Cancer Institute, USA
1-Hydroxyphenanthren	-	Dr. Ehrendorfer
2-Hydroxyphenanthren	-	Dr. Ehrendorfer
3-Hydroxyphenanthren	-	Dr. Ehrendorfer

Fortsetzung Tab. 2.

4-Hydroxyphenanthren	-	Dr. Ehrendorfer
9-Hydroxyphenanthren	-	Dr. Ehrendorfer
1-Hydroxypyren	>97%	Aldrich, Steinheim
Naphthalin	99%+	Fluka, Schweiz
Phenanthren	99,5%+	Aldrich, Steinheim
Poly-R-478	-	Sigma, USA
Pyren	99%	Aldrich, Steinheim

Folgende Substanzen wurden von Herrn Dr. A. Seidel, Institut für Toxikologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, als HPLC-Referenzmaterial zur Verfügung gestellt:

Substanz	Reinheit
<i>trans</i> -9, 10-Phenanthrendihydrodiol	DC/HPLC-rein
3-Hydroxyphenanthren	DC/HPLC-rein
4-Hydroxyphenanthren	DC/HPLC-rein

Handelsnamen und eingetragene Warenzeichen werden im Text nicht extra kenntlich gemacht.

## 2.2 Nährmedien und Lösungen

Alle Nährmedien wurden nach Einstellen des pH-Wertes durch Autoklavieren (35min, 121°C, 1bar) sterilisiert. Komplexe Medien wurde mit deionisiertem, das definierte Medium und die Spurenelementlösung mit hochreinem Wasser hergestellt. Feste Medien enthielten zusätzlich max. 2% (w/v) Agar. Alle Gewichtsangaben beziehen sich auf ein Volumen von 1000ml.

- **Medium 1:** Mineralsalzmedium (MSM) [LOCKHEAD & CHASE, 1973]

$K_2HPO_4$	0,8g
$KH_2PO_4$	0,2g
$KNO_3$	1,0g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2g
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,1g
NaCl	0,1g
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0,01g
Spurenelementlösung	1ml
pH 7,25	$H_3PO_4$

- **Spurenelementlösung** für MSM/für Medium 5

EDTA-Natriumsalz	500mg/-
$FeSO_4 \times 7H_2O$	200mg/-
$H_3BO_3$	30mg/ 4g
$CoCl_2 \times 6H_2O$	20mg/ 0,5g
$CuCl_2 \times 2H_2O$	10mg/ 0,5g
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	10mg/ 2g
$NiCl_2 \times 6H_2O$	6mg/ 2g
$MnCl_2 \times 4H_2O$	3mg/ 3g
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	3mg/ 3g

Die Lösung wurde in 2ml-Aliquots bei  $-30^\circ C$  gefroren aufbewahrt.

- **Medium 2:** R2A Medium [REASONER UND GOLDREICH, 1985]

Bacto Yeast Extract	0,5g
Proteose Peptone	0,5g
Casein Hydrolysat	0,5g
Stärke löslich	0,5g
Glucose	0,5g
Natriumpyruvat	0,3g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,05g
pH 7,2	krist. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

- **Medium 3:** Medium zur Anzucht von Streptomyceten

Glucose	4,0g
Hefeextrakt	4,0g
Malzextrakt	10,0g
CaCO <sub>3</sub>	2,0g
Agar	12,0g
Cycloheximid	50 µg
pH 7,2	KOH

- **Medium 4:** Medium zur Isolierung von Streptomyceten [KÜSTER UND WILLIAMS, 1964]

Glycerol (oder Stärke)	10g
Casein (vitaminfrei)	0,3g
KNO <sub>3</sub>	2g
NaCl	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,05g
CaCO <sub>3</sub>	0,02g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,01g
Cycloheximid	50 µg
Agar Agar	20g
pH 7,0-7,2	

- **Medium 5:** Huminsäure-Medium [DARI et al., 1995]

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,2g
NaCl	0,2g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,05g
CaCl <sub>2</sub>	0,055g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,01g
Glucose	2,5g
Huminsäure	0,25g
Spurenelemente	0,1ml
pH 7,0	krist. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Für Versuche zur Isolierung von PAK-abbauenden Streptomyceten wurde in der o.g. Rezeptur die Huminsäure durch Poly-R 478 ersetzt (0,2 g/l).

- **Medium 6:** Medium zur Untersuchung der Verwertung von Kohlenwasserstoffen [PLANT et al., 1988]

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	2g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
$\text{CaCl}_2$	0,1g
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	5mg
pH 7,0	krist. $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$

## 2.3 Referenzbakterienstämme

Als Referenzstämme bei der Charakterisierung der isolierten Streptomyceten dienten folgende Streptomycetenstämme:

*Streptomyces griseus* ATCC 027507

*Streptomyces viridosporus* ATCC 3876

## 2.4 Kultivierungsbedingungen

### 2.4.1 Stammhaltung

Zur langfristigen Aufbewahrung der Isolate wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden frische, auf Medium 3 gezogene Zellen in 0,5ml Medium 3 suspendiert und mit 0,5ml Glycerin versetzt. Nach intensiver Durchmischung mittels Vortex wurden diese Suspensionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Die kurzfristige Haltung der Stämme erfolgte auf 5ml-Schrägagarröhrchen mit Medium 3-Agar. Diese wurden nach Beimpfen 7-10d bis zur Entwicklung deutlicher Kolonien bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Überimpfung der Isolate erfolgte im zweimonatlichen Rhythmus.

Die Kontrolle auf mögliche Kontaminationen erfolgte durch Ausplattieren auf Medium 2-Agar.

#### **2.4.2 Schrägagarkultur zur Sporengewinnung [Rehmann, 1991]**

500ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich wurden mit 125ml Medium 3 gefüllt. Die Kolben wurden durch Überspülen mit einer Sporensuspension der Streptomycetenstämme in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  angeimpft. Die Inkubation erfolgte bis zur Sporenernte (nach 10-14d) bei 28°C. Nicht geerntete Kolben wurden bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.4.3 Sporengewinnung [Rehmann, 1991]**

Nach 10-14tägiger Inkubation wurden Schrägagar-Kolbenkulturen durch Abschaben der Sporen mit der Impföse in 20ml 0,05%-iger Tween 80-Lösung pro Kolben geerntet. Die Sporensuspension wurde bei 4°C für 20min mit 5.900UpM (Heraeus Biofuge 20R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Reste des Nährmediums und Luftmyzel wurden durch zweimaliges Waschen mit 0,05%-iger Tween 80-Lösung und erneute Zentrifugation unter obigen Bedingungen entfernt. Die Sporen wurden in soviel 0,05%-iger Tween 80-Lösung resuspendiert, dass die  $\text{OD}_{578}$ , gegen  $\text{H}_2\text{O}$  (hochrein; Millipore) gemessen, ca. 60 betrug (1cm-Durchflußküvette, Unicam UV5675). Bis zur Verwendung wurden 1ml-Portionen bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.4.4 Flüssigkulturen**

Für die Versuche zum Screening von PAK-abbauenden Streptomyceten sowie zur Ermittlung des kometabolisierenden Potentials der isolierten Streptomyceten für PAK wurde die benötigte Menge an PAK (0,5mg/ml) als 1-%ige DCM-Lösung (w/v) in 100ml-Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss und Teflondichtung (Glasgerätebau Ochs, Bovenden) einpipettiert und das DCM im Stickstoffstrom abgeblasen. Zur Verdrängung des Stickstoffs wurden die Kolben offen ca. 30min im Luftzug stehen gelassen, anschließend mit 9ml MSM-Medium versetzt und im fest verschlossenen Zustand autoklaviert.

Falls nichts anders erwähnt, wurden alle in dieser Arbeit eingesetzten Flüssigkulturen auf eine  $\text{OD}_{578\text{nm}}$  von 0,05 angeimpft. Als Energie- und Kohlenstoffquellen wurden folgende Kohlenwasserstoffe eingesetzt: Glucose, Glycerol, Stärke, Casein, Mannit,

Saccharose und Zellobiose. Für die Screeningversuche wurden die benötigten Kohlenwasserstoffe in einer Konzentration von 0,5% (w/v) den Flüssigkulturen hinzugefügt. Die Inkubation der 10ml-Kulturen erfolgte bei 28°C, 105UpM auf Rotationschüttelmaschinen (Infors AG, Bottmingen, CH). Kulturen in 500ml- bzw. 1000ml-Infusionsflaschen wurden liegend inkubiert.

Kulturen zur präparativen Metabolitgewinnung wurden in 500ml- bzw. 1000ml-Infusionsflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden) mit Kautschuk-Septen und Aluminiumschraubkappen geführt.

## **2.5 Isolierung von Streptomyccetenstämmen**

### **2.5.1 Isolierung aus kontaminierten Böden** [Methode modifiziert nach Kutzner, 1968]

Der Boden wurde zunächst für 48h im Ofen bei 45°C getrocknet, anschließend mit CaCO<sub>3</sub> (10%w/w) gut durchmischt und für weitere 7-9d bei Raumtemperatur in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre gelagert.

1000ml-Kulturflaschen wurden mit 20g Glasperlen und 99ml H<sub>2</sub>O (hochrein; Millipore) bestückt und autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen wurde 1g kontaminierter Boden hinzugefügt. Anschließend wurden die Flaschen flach auf einen Rotationschüttler gelegt und bei Raumtemperatur bei 125UpM für 24h geschüttelt.

1ml aus der Boden-Glasperlen-Suspension wurde in 9ml H<sub>2</sub>O (hochrein; Millipore, steril) bei 45°C für 16h bebrütet. Aus dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-7</sup> auf Medium 4-Agar ausplattiert.

### **2.5.2 Isolierung PAK-kometabolisierender Streptomyccetenstämmen**

Zum Erhalt PAK-kometabolisierender Streptomyccetenstämmen fanden zwei unterschiedliche Isolierungstechniken Anwendung.

### **2.5.2.1 “Direkte Isolierung”**

Die durch die in 2.5.1 beschriebenen Methode isolierten Streptomyceten wurden auf Medium 3-Agar ausplattiert und bis zum Auftreten deutlicher Kolonien inkubiert. Kolonien unterschiedlicher Farbe, Größe und Morphologie wurden einzeln in PAK-haltigem Flüssigmedium (Medium 1) mit Kohlenwasserstoffen als Energie- und Kohlenstoffquellen subkultiviert.

### **2.5.2.2 Isolierung nach PAK-Verwerter-Screening [KIYOHARA et al., 1982]**

Für das PAK-Kometabolismus-Screening wurden nach der Methode von KIYOHARA Selektivagarplatten hergestellt und folgende Modifikationen des Verfahrens vorgenommen:

Die Agarplatten wurden erst nach dem Beschichten beimpft. Die Kohlenwasserstoffe wurden in 1%iger (w/v) DCM-Lösung unter sterilen Bedingungen auf die Agarplatten pipettiert. Durch rasches Schwenken entstand eine einheitlich dünne, trübe Schicht. Die Agarplatten wurden für 1-2h offen unter sterilen Bedingungen gehalten, bis das DCM sich verflüssigt hatte.

Die Isolate wurden nun punktförmig mit einer Impfnadel auf die Agarplatten aufgebracht. Von jeder Reinkultur wurden drei Parallelansätze hergestellt und bei 27°C inkubiert (abhängig vom jeweiligen PAK 10-40d).

### **2.5.2.3 Isolierung nach Entfärbung von Poly-R-478-Agar [Andersson und Henrysson, 1996]**

Das Potential der isolierten Streptomycetenstämme, den roten Polymer-Farbstoff Poly-R-478 abzubauen, wurde untersucht. Ein positives Ergebnis weist auf die Fähigkeit hin, Lignin und PAK anzugreifen. Die Streptomycetenstämme wurden bei 25°C in Petrischalen mit Medium 5, das statt Huminsäure Poly-R-478 enthielt, inkubiert. Die Entfärbung des Agars wurde visuell kontrolliert.

## 2.6 Charakterisierung der isolierten Stämme

### 2.6.1 Gramfärbung

Gramfärbungen wurden nach der Methode von DREWS (1984) unter Verwendung des Gram-Color-Färbesets der Firma Merck, Darmstadt, durchgeführt.

### 2.6.2 Katalasetest

Als Nachweis für Katalase diente die Schaumbildung (Sauerstoffentwicklung) nach Beträufeln von Kolonien mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung.

### 2.6.3 Nachweis von LL-Diaminopimelinsäure [nach STANECK UND ROBERTS, 1974]

Der Nachweis von LL-Diaminopimelinsäure erfolgte nach Staneck und Roberts, um die isolierten Bakterienstämme als Streptomycceten zu identifizieren. Als Referenz dienten die unter 2.3 erwähnten Streptomycceten.

Die Zellen wurden in 125ml Medium 2 angezüchtet. Nach ca. 8-14d bzw. nachdem die OD bei 578nm über dem Wert 1 lag, wurden die Kulturen abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1ml Wasser (hochrein; Millipore) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Bakterien lyophilisiert (Sentry SL, The Virtis Company, Inc., USA). Das Zellmaterial (ca. 1-3mg) wurde anschließend in 10ml-Pyrexgläser mit Schraubdeckel und Teflondichtung überführt und 1ml 6N HCl wurde hinzugefügt. Die Zellen wurden für ca. 18h bei 100°C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Lösung wurde über Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) mit 1ml H<sub>2</sub>O (hochrein; Millipore) filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C und Unterdruck zur Trocknung eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,3ml H<sub>2</sub>O (hochrein; Millipore) aufgenommen.

Die anschließende Dünnschichtchromatographie wurde unter Einsatz von Fertigplatten [Cellulose, Merck, Darmstadt, 20 x 20cm, Schichtdicke: 0,2mm] durchgeführt. Als Laufmittel diente ein Methanol/Wasser/10NHCl/Pyridin-Gemisch (80:17,5:2,5:10). Der Rückstand wurde auf die Platte aufgetragen, die nach der Entwicklung mit einer

Aceton-Ninhydrin-Lösung (0,1%) gesprüht wurde. Anschließend wurde die Platte bei 100°C für 3min erhitzt.

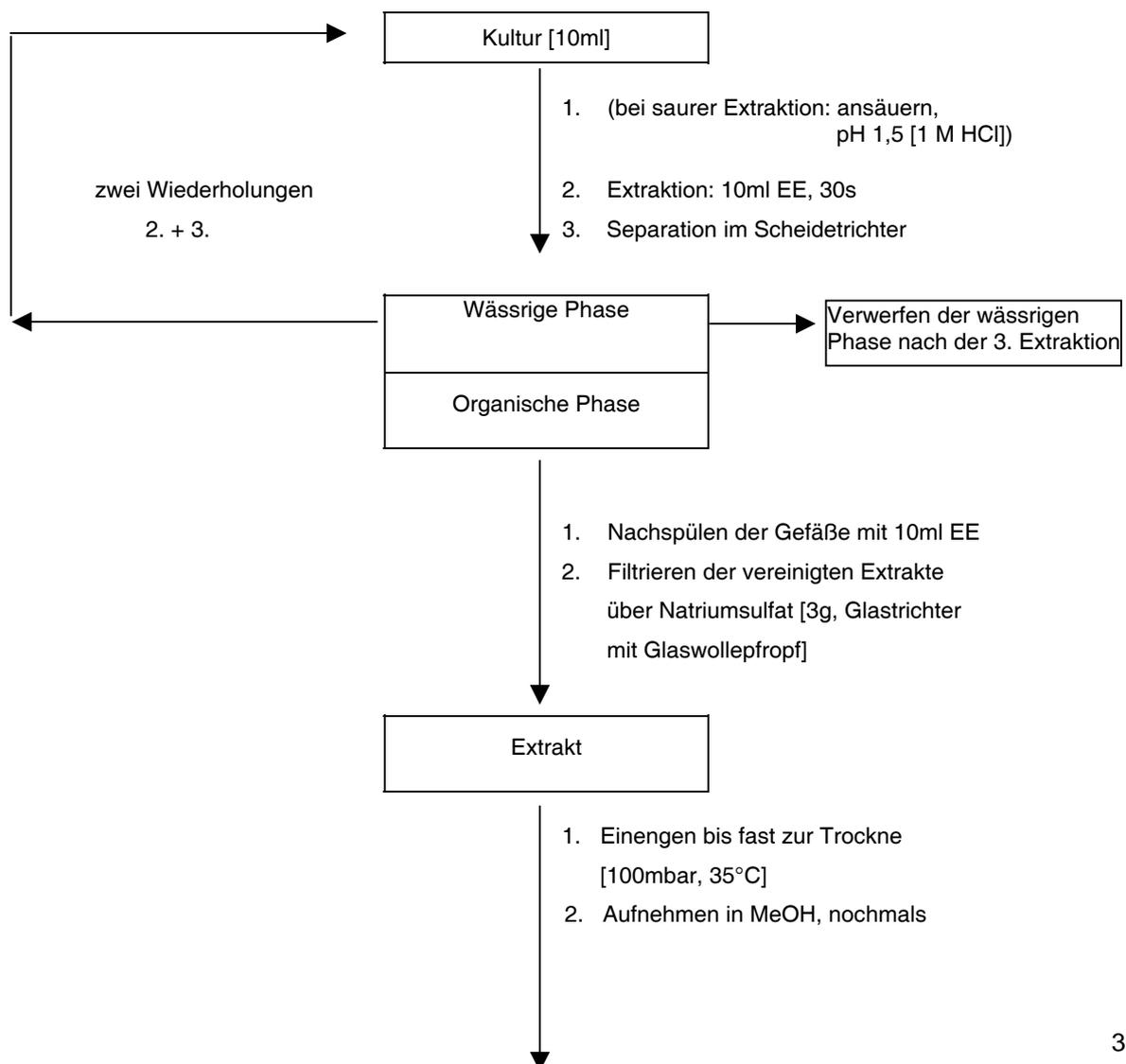
## 2.6.4 Resistenz gegen Antibiotika

Die Resistenz der isolierten Bakterien gegen Penicillin G, Oleandomycin, Rifampicin und Neomycin wurde als weiteres Kriterium zur Charakterisierung der isolierten Streptomyceten eingesetzt.

## 2.7 Analytik

### 2.7.1 Probenaufbereitung

Die Probenaufbereitung der Laborkulturen erfolgte, soweit nicht anders erwähnt, stets nach dem in der Abbildung 4 dargestellten Schema [REHMANN, 1995].



- einengen  
3. In definiertem Volumen MeOH  
aufnehmen

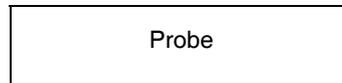


Abb. 4.: Probenaufbereitung für die PAK- und Metabolitanalytik aus 10ml Kulturen

### 2.7.2 Analyse der kontaminierten Böden

2-10g Boden wurden in ein Zentrifugenglas eingewogen und mit 40ml THF versetzt. Anschließend verblieben die Proben 2h im Ultraschallbad. Zur Trennung wurden die Proben 30min bei 2.500UpM zentrifugiert (Cryofuge 8000, Heraeus Christ). Ein Aliquot des Extraktes (20ml) wurde in einen 50ml-Spitzkolben überführt und eingeeengt (50°C Wasserbad, 300mbar). Um Verlusten durch zu starkes Einengen vorzubeugen, wurden jeder Probe 100µl DMF als Keeper zugesetzt. Die Proben wurden nach dem Einengen auf ein definiertes Volumen mit ACN aufgefüllt.

Die Messung erfolgte an einer HPLC-Anlage mit wellenlängenprogrammierbarem Fluoreszenzdetektor.

Chromatograph:	Hewlett Packard HP series 1100
Säule:	Bakerbond PAH-Säule (5µm), 3mm x 250mm, Malinckrodt Baker, Griesheim
Flussrate:	0,5ml/min
Säulentemperatur:	20°C
Injektionsvolumen:	10µl
Gradient:	ACN:H <sub>2</sub> O, 47:53, 82:18 (20min), 100:0 (30min), 100:0 (40min)

### 2.7.3 HPLC-Analytik für Bakterienkulturen

Chromatograph:	Hewlett Packard HP 1090 mit Autosampler, Photodiodenarray-detektor und PC-Workstation, Hewlett-Packard, Waldbronn
Säule:	Baker Widebore RP18 (5µm), 250 x 4,6mm, J.T. Baker Inc., Philipsburg, New Jersey, USA
Vorsäule:	Merck Lichrospher RP 18 (5µm), 10 x 4,6mm, Merck, Darmstadt
Flußrate:	0,8ml/min
Säulentemperatur:	40°C
Injektionsvolumen:	10µl
Laufmittel:	A: H <sub>2</sub> O (hochrein; Millipore) / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,30 B: MeOH C: A/B; 15/85 (v/v), vorgemischt
Detektor:	Küvettenlichtweg: 6mm Spaltbreite: Detektionswellenlängen: 4nm Referenzwellenlänge (550nm): 100nm Empfindlichkeit: 1,0mAU; Peakbreite 0,1min; Threshold: -2 UV-VIS-Spektren: 210-400nm

Für die Quantifizierung von Phenanthren, Pyren und Fluoranthen wurde isokratisch mit Laufmittel C gearbeitet.

Analysedauer:	10min
Detektion:	Pyren und Fluoranthen: 238nm Phenanthren: 254nm

Die Metabolitanalytik der untersuchten PAK wurde mittels eines linearen Gradienten durchgeführt.

Gradient:	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	100	0
	30	0	100
	40	100	0
	45	100	0

Detektion: 235nm, 254nm

Kalibrierung: Aus den bei RT in Methanol bereiteten Standardlösungen der Einzelsubstanzen wurden Verdünnungsreihen mit sieben Konzentrationswerten hergestellt und je 3fach analysiert. Alle Kalibrierungskurven zeigten einen linearen Verlauf und konnten durch Regressionsgeraden beschrieben werden (Tab. 3).

**Tab. 3.:** Kalibrierungsfunktionen von PAK und Metaboliten unter den in 2.7.1 beschriebenen Bedingungen

Substanz	Bereich [µg/ml]	λ [nm]	Geradengleichung [µg/ml =]	R
Phenanthren	0-20	254	(IE-17,593)/238,5	0,9999
Pyren	0-20	238	(IE-5,058)/285,73	0,9999
Fluoranthren	0-20	238	(IE-5,1378)/172,3	0,9999
1-Hydroxyphenanthren	0-20	254	(IE+1,8836)/62,381	0,9999
2-Hydroxyphenanthren	0-20	254	(IE+6,468)/158,243	0,9994
3-Hydroxyphenanthren	0-20	254	(IE+9,457)/147,874	0,9998
4-Hydroxyphenanthren	0-20	254	(IE+1,7832)/54,329	0,9996
9-Hydroxyphenanthren	0-20	254	(IE+3,2945)/95,324	0,9999
1-Hydroxypyren	0-20	235	(IE+5,011)/92,678	0,9999
3-Hydroxyfluoranthren	0-20	235	(IE+4,452)/42,4532	0,9997

### 2.7.4 Wiederfindungsraten

Um zu bestimmen, ob die Extrahierbarkeit der PAK durch Bindung an die mikrobielle Biomasse eventuell beeinträchtigt wird, wurde die Effizienz der Extraktion durch Vergleich der Wiederfindung in Ab- oder Anwesenheit von der Biomasse bestimmt [SHELTON et al., 1996]. Ein Milliliter einer jeweiligen *Streptomyces*-Kultur in der späten log-Phase wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 0,75ml einer PAK-Lösung bekannter Konzentration zugegeben und die Mixtur für 30min inkubiert. Die Kultur wurde dann, wie vorher beschrieben, extrahiert.

## 2.8 Physiologische Tests

### 2.8.1 Bestimmung des Wachstums der Streptomyceten [KONTCHOU UND BLONDEAU, 1992]

Das Wachstum der Streptomyceten wurde anhand des Trockengewichts der Biomasse bestimmt [HERNANDEZ-PEREZ et al., 1998; MONIB et al., 1981]. Für die Bestimmung des Trockengewichts des Myzeliums wurden die Kulturen durch Whatman No. 1 Papier gefiltert, das vorher bei 100°C getrocknet und gewogen wurde. Die Myzelien wurden mit 25ml N/10 NaOH und anschließend mit H<sub>2</sub>O (hochrein; Millipore) gewaschen. Das Filterpapier wurde danach bei 70°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und das Trockengewicht des Myzeliums als Differenz errechnet.

### 2.8.2 Abbau von Huminsäuren [DARI ET AL., 1995]

Die katabolische Aktivität der isolierten Streptomycetenstämme auf Huminsäuren wurde in Suspensionen mit 50ml des Mediums 5 in 500ml-Erlenmeyerkolben untersucht. Die Kolben wurden mit 0,5ml einer Sporensuspension (OD 0,05 bei 578nm) angeimpft, mit Gewebestopfen verschlossen und bei 35°C im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert. Dabei wurden sie 1mal pro Tag unter sterilen Bedingungen mit Luftsauerstoff versorgt.

Der Abbau der Huminsäuren wurde anhand der Verminderung der Absorption bei 350nm im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien ermittelt. Um zwischen Abbau der

Huminsäuren und Adsorption an der Zelloberfläche zu unterscheiden, wurden die Messwerte nach Filtration der Proben durch eine Nylonmembran (70µm) und 24-stündiger Behandlung mit 2 Volumina 0,2M NaOH bei Raumtemperatur (BLONDEAU, pers. Mitteilung) korrigiert.

### 2.8.3 Versuche zur Bildung von Konjugaten

Die Probenaufbereitung der Kulturen zur Untersuchung der Bildung konjugierter Metabolite erfolgte wie in 2.7.1 beschrieben. Es wurden 100ml-Flüssigkulturen in 1000ml-Infusionsflaschen angesetzt. Nach der neutralen Extraktion wurden Ethylacetatreste abrotiert. 10ml des Überstands wurden mit 5ml 0,2M TRIS-HCl (pH 7,2) eingestellt. Die Proben wurden 24h und 96h mit 12,5µl β-Glucuronidase 5U (350µl) Arylsulfatase (Typ V, Sigma) (Typ H-1; Sigma Chemical C., St. Louis, Missouri, USA) bei 37°C inkubiert. Die dritte Probe wurde ohne Enzyme inkubiert und diente als Kontrolle.

## 2.9 Extraktion von Huminstoffen aus Böden

Die in dieser Arbeit eingesetzte Huminsäure wurde mit der nachfolgend beschriebenen Methode aus einem Standardboden (Kaldenkirchen) gewonnen. Dieser Boden wurde von Herrn Prof. Dr. F. Führ und Herrn Dr. Burauel (Institut für Radioagronomie, KFA-Forschungszentrum Jülich GmbH) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine saure Braunerde aus Flugsand über Löß.

Die ausgewählte Extraktionsmethode - akzeptiert beim 1. Meeting der International Humic Substances Society (IHSS) im Jahre 1981 in Denver, Colorado, USA - besteht aus 20 Stufen [SCHMITT-KOPPLIN, persönliche Mitteilung].

#### Extraktionsstufen:

- Stufe 1:** Boden im Verhältnis 1:10 (trockener Boden/Lösung) mit 1N HCl auf pH 1 einstellen; eine Stunde schütteln
- Stufe 2:** Zentrifugieren der Suspension bei 2.500UpM; Überstand mit XAD8-Adsorberharz aufkonzentrieren (siehe weiter Stufe 13)

- Stufe 3:** Bodentrückstand aus Stufe 2 mit 1N NaOH auf pH 7 und unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 0,1N NaOH auf ein Boden/Lösung-Verhältnis von 1:10 bringen (100g Boden für 1l Lösung)
- Stufe 4:** Extraktion unter N<sub>2</sub> mindestens 4h schütteln, danach zentrifugieren
- Stufe 5:** Überstand aus der Zentrifugation mit 6N HCl auf pH 1 bringen; 12-16h stehen lassen
- Stufe 6:** Zentrifugieren, um flockige Huminsäuren von den Fulvinsäuren (FA) zu trennen
- Stufe 7:** Huminfraction unter N<sub>2</sub> in minimalem Volumen KOH 0,1N lösen, mit KCl auf 0,3N K<sup>+</sup> bringen. Bei 6.000UpM zentrifugieren, um die Suspension zu trennen. Festpartikel fallen aus.
- Stufe 8:** Fällung der Huminsäuren aus dem Überstand wie in Stufe 5 und bei 6.000UpM zentrifugieren; den Überstand aus dieser Stufe entsorgen
- Stufe 9:** Ausgefällene Huminsäure (Rückstand) in HCl 0,1N und HF 0,3N suspendieren und in Plastikbehältern über Nacht schütteln
- Stufe 10:** Bei 6.000UpM zentrifugieren und Stufe 9 wiederholen, bis der Aschegehalt niedrig bleibt (einige Prozente)
- Stufe 11:** gegen destilliertes Wasser dialysieren (Dialyseschlauch von Visking, cut off 1000 Daltons) , bis frei von Cl<sup>-</sup> (AgNO<sub>3</sub>-Test)
- Stufe 12:** erhaltene Huminsäuren mit verdünnter Lauge in Lösung und über Ionenaustauscher in H<sup>+</sup> Form bringen; gefriertrocknen
- Stufe 13:** Überstand aus Stufe 2 auf XAD8-Säule (0,15ml XAD8 pro Gramm Bodenprobe mit einem Fluss von 15 Gesamtvolumen pro Stunde). Die Fulvinsäuren bleiben auf der Säule: mit 0,65 Säulenvolumen A. dest. waschen
- Stufe 14:** XAD8-Säule mit 1Vol 0,1N NaOH und 3 Vol destilliertem Wasser eluieren
- Stufe 15:** eluierte Fulvinsäuren gleich mit HCl auf pH 1 ansäuern und mit HF auf 0,3 N bringen; alle Fulvinsäuren müssen in Lösung bleiben
- Stufe 16:** Überstand aus Stufe 6 auf XAD8-Säule bringen (1ml XAD8 pro Gramm Bodenprobe)

- Stufe 17:** Stufen 14 und 15 wiederholen
- Stufe 18:** Eluate aus Stufen 15 und 17 vereinen und auf XAD8 in Plastiksäule bringen (Säulenvolumen sollte gleich 1/5 Lösungsvolumen sein), mit 0,65 Säulenvolumen destilliertem Wasser waschen
- Stufe 19:** mit 1 Vol 0,1N NaOH und 2 Vol Wasser eluieren; über Ionenaustauscher in H<sup>+</sup>-Form bringen
- Stufe 20:** Lyophilisieren der Endprobe

## 2.10 Toxizitätstests

Zur Charakterisierung der ökotoxikologischen Eigenschaften von Reinsubstanzen, Kulturüberständen und Bodeneluaten wurden standardisierte Testverfahren angewendet, die Bestandteil der ökotoxikologischen Bewertungsverfahren nach dem Chemikaliengesetz sind. Es wurden ausschließlich aquatische Testsysteme eingesetzt, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

### 2.10.1 Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* STRAUS - Daphnienschwimmhemmtest [OECD, 1984]

In diesem Testsystem zur Bestimmung der akuten Toxizität wird die Wirkung einer Prüfsubstanz oder einer Substanzmischung auf den Modellorganismus *Daphnia magna* STRAUS untersucht.

Die Tests wurden nach dem in Abbildung 5 dargestellten Schema durchgeführt. Testparameter ist der Verlust der Schwimmfähigkeit bei definierten Konzentrationen der Prüfsubstanz. Der Test ist gültig, wenn der EC<sub>50</sub>-Wert der Referenzsubstanz Kaliumdichromat zwischen 0,9 und 1,9 mg/l (Kaliumdichromat-Referenztest) liegt. Nach Ablauf der Prüfzeit (24h) wurden die Anteile schwimmunfähiger Daphnien bestimmt.

**VORTEST:**

- Ermittlung des testrelevanten Wirkungsbereichs:
- grobe Verdünnungsabstufungen über einen weiten Konzentrationsbereich
- Kaliumdichromat-Referenztest

**HAUPTTEST:**

- relevante Konzentrationsabstufungen und Blindwert in 2-facher Bestimmung
- jede Konzentrationsstufe à 10 Individuen
- Kaliumdichromat-Referenztest

**AUSWERTUNG:**

- Berechnung der Konzentrations-Wirkung-Beziehung mit Hilfe einer Probitanalyse
- Ermittlung der Konzentration, bei der nach 24h 50% der eingesetzten Daphnien eine Hemmung der Schwimmfähigkeit aufweisen:  $EC_{50}$

Abb. 5.: Durchführung der Daphnientests

### **2.10.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstier diente *Daphnia magna* Straus. Seit 1982 wird diese Art am Institut für Ökologische Chemie der GSF kultiviert. Aus der Institutskultur wurde im März 1991 ein Weibchen zur Anzucht einer eigenen Kultur entnommen. Alle Versuchstiere waren parthenogenetische Nachkommen dieses Individuums. Die für die Toxizitätstests verwendeten maximal 24h alten Neonate stammen aus der dritten und den folgenden drei bis vier Bruten.

### **2.10.1.2 Kulturbedingungen**

Die Haltung der Tiere erfolgte in 2000ml-Bechergläsern (Schott) aus Standard-Borosilikatglas, die mit 1800ml Kulturmedium beschickt wurden. Die Kulturgefäße wurden zur Vermeidung einer Kontamination durch Staub mit Plexiglasplatten abgedeckt. Die Daphnienkultur befand sich in einem auf  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  klimatisierten Raum und wurde durch Warmlichtlampen in einem Rhythmus von 16h Helligkeit/8h Dunkelheit beleuchtet.

Als Kulturmedium diente rekonstruiertes Wasser (DION, 1989) mit Selenzusatz nach ELENDDT (1990). Das fertige Medium hatte einen pH-Wert von 7,8-7,9.

- **Daphnia-Kulturmedium** nach DIN mit Selenzusatz nach Elendt (1990)

Ca <sup>2+</sup>	80,16mg
Mg <sup>2+</sup>	12,15mg
K <sup>+</sup>	2,93mg
Na <sup>+</sup>	17,24mg
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	48,03mg
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	45,77mg
Cl <sup>-</sup>	144,47mg
SeO <sub>2</sub>	0,001mg

pH 7,8±0,1 ad 1000ml H<sub>2</sub>O (hochrein; Millipore)

Als Futter für *Daphnia magna* diente die einzellige Grünalge *Scenedesmus subspicatus* Chodat, Stamm 86.81 der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen.

Wöchentlich wurden zur Anzucht einer neuen Generation neonate Tiere (Altersunterschied maximal 24h) in einer Dichte von 60 Individuen pro Glas (=33,3 Ind./l) in die Kulturgefäße eingebracht. Nach einer Woche wurde die Dichte auf 25 Individuen pro Glas (=14,4 Ind./l) reduziert, wobei die Tiere unter einer Stereolupe auf ihr Geschlecht kontrolliert und eventuell auftretende Männchen verworfen wurden. Alle Glasgeräte wurden vor jeder Benutzung mechanisch ohne Verwendung von Spülmittel in Leitungswasser gereinigt, mit A. deion gespült und 40min bei 121°C autoklaviert. Die restlichen Geräte wurden gelegentlich zur Desinfektion mit 70% Ethanol gereinigt, anschließend mit Leitungswasser und A. deion nachgespült.

Bei Substanzen, deren Löslichkeit nicht bekannt war, wurden gesättigte, wässrige Lösungen mit einer Konzentration von 10mg in 25ml Daphnienkulturmedium mit 5% Methanol hergestellt. Die Lösungen wurden für 24h im Dunkeln bei Raumtemperatur und 105UpM geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurde der Überstand der Lösung über ein Papierfilter (Schleicher und Schüll, 0,45µm) filtriert. Ein Aliquot der Lösungen wurde für die Bestimmung der Konzentration mittels HPLC abgenommen.

Am Versuchstag wurden zur Herstellung der PAK-Lösung abgewogene Mengen der PAK unter Rühren in Daphnia-Kulturmedium gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden die im Test eingesetzten Verdünnungsreihen unter Verwendung volumimetrischer Gefäße angesetzt.

Als Testgefäße für den 24h-Schwimmhemmtest dienten 50ml-Bechergläser (Schott), die nach Einbringen der Testlösungen und der Tiere mit Glasdeckel abgeschlossen wurden. Pro Glas wurden 50ml Testlösung eingefüllt und 5 bzw. 10 Tiere eingebracht. Das Einsetzen der Tiere erfolgte mit einer für diesen Zweck graduierten Pipette mit einem Wasservolumen von 0,8ml.

Die Testansätze mit den Versuchstieren wurden in einer gesonderten Klimakammer unter den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen inkubiert, wie sie für die Kultur der Daphnien verwendet wurden. Bei der Auszählung am Testende wurde zunächst die Gesamtzahl, anschließend die Zahl der beweglichen bzw. der unbeweglichen Tiere pro Glas bestimmt. Als unbeweglich wurden die Tiere gezählt, die sich innerhalb von 15s bei leichtem Klopfen gegen die Gefäßwand nicht mehr bewegten.

### **2.10.2 Leuchtbakterientest nach DIN 38412 L34, L341**

Der Leuchtbakterientest ist ein Biotest zur Bestimmung der Toxizität von flüssigen Proben mit marinen Leuchtbakterien als Testorganismen. Er basiert auf der Ermittlung des Einflusses der Verdünnungsreihe einer Probe auf das Leuchten der Bakterien. Die hier eingesetzten Bakterien sind gram-negative, fakultativ anaerobe Leuchtbakterien, deren auffallendste Eigenschaft stoffwechselabhängige Biolumineszenz ist. Die Toxizitätstests wurden mit dem Photoluminometer LUMISTox 300<sup>®</sup> und einem Leuchtbakterienpräparat (*Vibrio fischeri* NRRL-B-111777) der Fa. Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin, durchgeführt.

Die Proben wurden durch Zugabe von NaCl aufgesalzen, da die Leuchtbakterien als Meeresorganismen einen entsprechenden Salzgehalt benötigen. Anschließend wurde eine geometrische Verdünnungsreihe der Probe hergestellt. Parallel dazu wurden die Leuchtbakterien auf eine testfertige Konzentration gebracht und das Ausgangsleuchten der unbelasteten Leuchtbakterienansätze registriert. Danach wurden die Verdünnungsstufen der Probe mit Leuchtbakterienansätzen vermischt und nach 30min der

Endwert des Leuchtens bestimmt. Die Inkubation der Bakterien mit den Probenverdünungen erfolgte bei einer Temperatur von 15°C. Als Maß für die Toxizität wird die Abnahme der Biolumineszenz während der 30minütigen Testzeit genommen; Leuchtbakterienansätze mit NaCl-Lösung als Probe wurden als Kontrollansätze parallel gemessen. Als Testergebnis von Proben unbekannter Zusammensetzung wurde angegeben, wie stark die Probe noch verdünnt werden muss, um das Leuchten weniger als 20% zu hemmen. Bei Reinchemikalien bzw. Proben bekannter Zusammensetzung wurde diejenige Konzentration angegeben, die das Leuchten um 50% hemmt ( $EC_{50}$ ).

Zur Überprüfung der korrekten Funktionsweise des Systems erfolgte eine Eigenkontrollmessung mit der beige-packten Standardlösung (7,5% NaCl). 0,5ml Standardlösung mit 0,5 ml Bakteriensuspension ergeben 40 bis 60% Hemmung nach 30min Inkubationszeit.

#### **2.10.2.1 Vorbereitung des Bodens für den Leuchtbakterientest**

Die für die Versuche eingesetzten Bodenproben wurden bis zum Versuchsbeginn bei -20°C, vor Beginn der Versuche für 7d bei 4°C und anschließend für 2d bei Zimmertemperatur gelagert. Die Bodenproben wurden durch Dampf bei 121°C für 30min an drei aufeinander folgenden Tagen sterilisiert, um die Zerstörung von bakteriellen Sporen zu sichern [GRAY, 1994]. Eine Exposition der Bodenproben gegenüber Licht wurde minimiert, um ggf. Photooxidationsprozesse zu verhindern.

Die Bodenfraktion kleiner als 10mm wurde für die Versuche eingesetzt. Der Feuchtigkeitsgehalt der Böden wurde auf 30% (Nassgewicht) eingestellt, Kulturflaschen mit einem Volumen von 1l wurden eingesetzt. Jede Flasche enthielt insgesamt ca. 200g Boden.

Der Boden in den Flaschen wurde mit Suspensionen des Isolats AP 18.1 inokuliert, das vorher auf PAK und Glucose subkultiviert worden war. Nach Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellsuspensionen bei 4°C für 20min mit 5.900 UpM (Heraeus Biofuge 20R) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in Mineralsalzmedium resuspendiert, so dass schließlich ein Feuchtgewichtsverhältnis von 10% Zellenfeuchtgewicht zu 90% Boden eingestellt wurde. Glucose (Endkonzentra-

tion 0,5mg/l) wurde als Medium 1-Lösung unter Berücksichtigung des gewünschten Wassergehalts zugesetzt.

Die Flaschen wurden bei Raumtemperatur ( $20\pm 3^\circ\text{C}$ ) im Dunkeln inkubiert. Evaporationsverluste wurden überwacht und mit sterilem A. dest. ausgeglichen. Die Böden wurden gut gemixt, um das hinzugefügte Wasser (steril und deionisiert) zu verteilen. Einmal pro Woche wurden die Flaschen unter sterilen Bedingungen für 20min belüftet [MARWOOD et al., 1998].

Für Messungen wurden periodisch Bodenproben mit autoklavierten Stahlspateln entfernt. Für jeden Ansatz wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt.

### **2.10.2.2 Leuchtbakterientest mit kontaminierten Böden**

Zur Abschätzung der Gefährdung, die von der Freisetzung toxischer Stoffe aus Böden ausgeht, wurde der Freisetzungsvorgang im Labor simuliert. Dieses Vorgehen wird als Elution bezeichnet und ist in der Vorschrift DIN 38414, T4, kurz S4 genannt, beschrieben. Da diese Elutionsmethode sehr zeitaufwendig ist, ist eine Reihe von alternativen Elutionen entwickelt worden [ANONYMOUS, 1998].

Zur Bestimmung der freisetzbaren toxischen Belastung einer Feststoffprobe wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kurzzeitelution von 40min mit 2% NaCl-Lösung durchgeführt. Das resultierende Eluat wurde dann mit dem LUMISTox-Leuchtbakterientest untersucht:

10g Boden wurden mit 40ml 2% NaCl-Lösung versetzt. Auf einem Schüttler oder Magnetrührer wurde die Suspension für 30min kräftig bewegt. Die Suspension wurde für ca. 10min stehen gelassen und anschließend vom Überstand 10ml mit einer Spritze abgenommen. Der Filterhalter wurde mit einem Membranfilter (modifizierter Polysulfon,  $0,8\mu\text{m}$ ) bestückt, auf die Spritze aufgesetzt und der Überstand in ein sauberes Gefäß filtriert. Falls die Probe noch deutlich trüb war, wurde mit einem Membranfilter (modifizierter Polysulfon,  $0,4\mu\text{m}$ ) die Filtration wiederholt.

Der pH-Wert des Eluats wurde mit NaOH auf ca. 6,8-7,2 eingestellt und dann ohne weiteres Aufsalzen als Probe im Leuchtbakterientest eingesetzt.

### **2.10.2.3 Leucht bakterientest mit Reinsubstanzen**

Gesättigte Lösungen von PAK wurden durch Lösen einer bekannten Menge der kristallinen Verbindung in sterilem MSM oder Wasser (jeweils 5% MeOH), Rühren bei 40°C für 24h, anschließend bei Raumtemperatur für zusätzliche 24h in einer geschlossenen volumimetrischen Flasche, verhüllt mit Aluminiumfolie, vorbereitet [RENOUX et al., 1999]. Die Lösung wurde anschließend durch einen extra dicken Borosilikatglasfiberfilter ohne Binder (1µm) filtriert, um alle ungelösten schwebenden Kristalle zu entfernen. Dies resultierte in Stammlösungen mit Konzentrationen nahe der maximalen Löslichkeit, wie durch HPLC bestimmt werden konnte.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden wie folgt diskutiert:

1. Isolierung von PAK-metabolisierenden Streptomycesstämmen
  - Charakterisierung der Streptomycesstämmen
  - Untersuchung ihrer physiologischen Eigenschaften
2. Abbau von ausgewählten PAK durch die isolierten Streptomycesstämmen
  - Charakterisierung von PAK-Metaboliten
3. Untersuchungen zur Verwertung von isolierten Huminsäuren durch die isolierten Streptomycesstämmen
4. Untersuchungen des ökotoxikologischen Verhaltens von synthetischen PAK-Metaboliten und Kulturüberständen
  - Verhalten der PAK-Metabolite gegenüber Huminstoffen
  - Metabolitgenese in Anwesenheit von Huminstoffen

## 3.1 Isolierung und Charakterisierung der Bakterien

### 3.1.1 Isolierung der Bakterien

#### 3.1.1.1 PAK-Gehalt der kontaminierten Böden

Für die Isolierung von PAK-verwertenden Streptomycesstämmen wurden Proben von fünf kontaminierten Böden aus Projekten der Firma UMWELTSCHUTZ NORD GmbH & Co. verwendet. Die Böden rochen mehr oder weniger deutlich nach Teer. Das Material war sandig, dunkelbraun und mit geringen Mengen Bauschutt und Pflanzenmaterial vermischt. Die Belastung der Böden mit PAK wurde freundlicherweise von Frau Dr. Konstanze Ebert bestimmt (2.7.2). Die Ergebnisse der Bodenanalyse sind in Tabelle 4 und in Abbildung 6 zusammengefasst.

Drei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Böden zeigen eine Belastung mit PAK von ca. 15.000 bis ca. 100.000 ppm ( $\Sigma 15$  PAK, ohne Acenaphthylen, da mittels Fluoreszenzdetektion nicht bestimmbar). Besonders hohe PAK-Werte zeigte dabei der Boden TF 48 aus einem stillgelegten Gaswerk. Seine Werte überstiegen bei weitem die in der sogenannten "Hollandliste" (Niederländisches Ministerium für Wohnungswesen, Raumordnung und Umwelt, 1988) empfohlenen Richtwerte für Sanierungsmaßnahmen. Die Böden MKW 1 und MKW zeigten dagegen PAK-Werte, die um 1 ppm lagen.

Der prozentuale Anteil der einzelnen PAK an der Gesamtkonzentration ist aus Abbildung 6 zu ersehen. Fluoranthene zeigte, mit Ausnahme des MKW 1-Bodens, in dem es nicht nachgewiesen wurde, mit 16,7% bis 20,3% die höchsten Anteile an den Gesamtkonzentrationen. Den zweitgrößten Anteil in der Gesamtkonzentration bei allen 4 untersuchten Böden stellte Pyren mit Anteilen zwischen 13,1% und 18,4%. Ausnahmen bildeten Naphthalin und Chrysen, die im Boden MKW 1 einen Anteil von 18,1% respektive 21,8% vorwiesen. Die restlichen PAK trugen im allgemeinen mit Anteilen zwischen 1% und 10% zur Gesamtkonzentration bei.

Tab. 4.: PAK-Gehalt der kontaminierten Böden [ppm]

Verbindung	GdF	UN	TF 48	MKW 1	MKW 2
Naphthalin	n.n.	150	n.n.	0,17	0,20
Acenaphthen	130	42	229	0,02	0,02
Fluoren	360	102	1126	0,03	0,03
<b>Phenanthren</b>	<b>3200</b>	<b>738</b>	<b>7819</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>
Anthracen	1970	679	4395	0,00	0,00
<b>Fluoranthren</b>	<b>11765</b>	<b>2734</b>	<b>25637</b>	<b>n.n.</b>	<b>0,24</b>
<b>Pyren</b>	<b>9385</b>	<b>2357</b>	<b>17937</b>	<b>0,18</b>	<b>0,19</b>
Benz(a)anthracen	5025	1361	14027	0,06	0,07
Chrysen	4605	1137	897	0,21	0,20
Benzo(b)fluoranthren	4900	1227	13423	0,06	0,08
Benzo(k)fluoranthren	2570	659	5173	0,02	0,04
Benzo(a)pyren	5415	1415	10822	0,03	0,08
Dibenz(a,h)anthracen	625	220	3974	n.n.	0,03
Benz(g,h,i)perylen	4145	1241	8112	0,11	0,10
Indeno(1,2,3-cd)pyren	3720	1482	8451	n.n.	0,08
<b>Σ 15 PAK</b>	<b>57825</b>	<b>15544</b>	<b>105889</b>	<b>0,95</b>	<b>1,44</b>

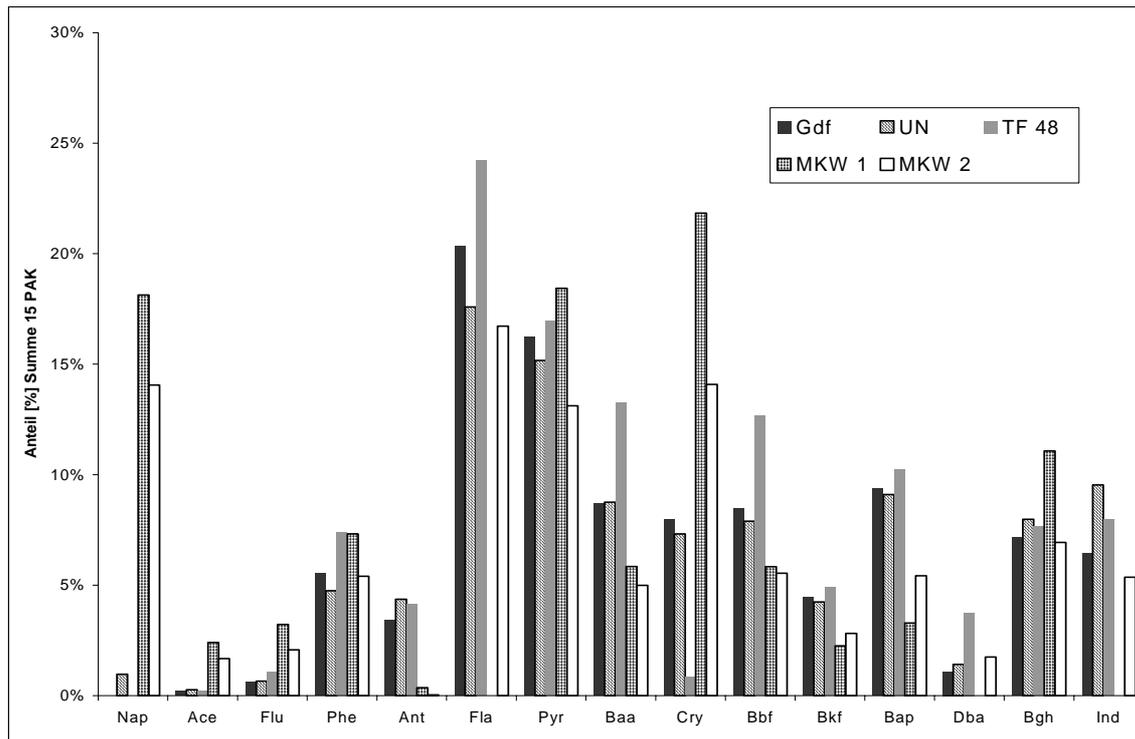


Abb. 6.: PAH-Profil der kontaminierten Böden

Das PAH-Profil der kontaminierten Böden, die zur Isolierung der in dieser Arbeit eingesetzten Streptomyces herangezogen wurden, war, was die in dieser Arbeit eingesetzten PAH Fluoranthene, Pyren und Phenanthren betrifft, inhomogen.

### 3.1.1.2 Isolierung der Bakterien

Nach der in 2.5.1 beschriebenen Methode wurden aus den PAH-belasteten Böden 55 phänotypisch unterscheidbare Streptomycesstämme isoliert, die fortlaufend mit AP 1, AP 2 etc. benannt wurden.

Die Fähigkeit der isolierten Streptomyces, PAH zu kometabolisieren oder zu verwerten, wurde entweder „direkt“ (2.5.2.1), unter Einsatz des KIYOHARA-Tests (2.5.2.2) oder anhand des Abbaus des polymeren Farbstoffs Poly-R-478 (2.5.2.3) charakterisiert.

Es stellte sich relativ rasch heraus, dass keiner der 55 isolierten Stämme in der Lage war, mit den hinzugefügten PAH als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle (Wachstum erkennbar an der Trübung der Flüssigkultur oder an der Bildung von PAH-Metaboliten) zu wachsen.

Nachdem sowohl im Kiyohara-Test als auch im Poly-R-478-Test erkennbar war, dass alle 55 Isolate PAK ohne zusätzlich zugesetzte Kohlenstoff- und Energiequellen nicht wachsen konnten, wurden die Versuche wiederholt, wobei den Agarplatten folgende Kohlenstoffquellen zugesetzt wurden: Glucose, Mannit, Glycerol, Casein oder Stärke (je 0,5 % (w/v)). Die Untersuchungen zeigten, dass von allen getesteten Kohlenstoffquellen Glucose die besten Resultate in Bezug auf den PAK-Abbau erbrachte. Daher wurde für alle nachfolgenden Versuche letztere als Kohlenstoffquelle verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 10 - 40d (abhängig vom jeweiligen PAK) zeigte sich bei einigen Platten ein eindeutiger Lysehof, d.h. eine Zersetzung der PAK- oder der Poly-R-478-Schicht um die Kolonien. Je nach Kommetabolisierungsvermögen war dieser Lysehof verschieden groß, und es zeigte sich unter dem Binokular eindeutig, dass sich in diesen Lysehöfen keine PAK-Kristalle mehr befanden. Die Agarplatten wurden über acht Wochen weiter beobachtet.

In den nachfolgenden Tabellen 5 und 6 sind die Ergebnisse des KIYOHARA- und des Poly-R-478-Tests zusammengefasst. Die in den Tabellen aufgeführten Stämme wurden aufgrund der oben genannten Screening-Untersuchungen weiterhin für die Verwertungsversuche mit PAK- und Huminsäuren eingesetzt.



### 3.1.1.3 Charakterisierung der isolierten Streptomyccetenstämme

Vielleicht das charakteristischste Merkmal der Streptomycceten ist ihr makroskopisches Erscheinungsbild. Insgesamt konnten anhand unterschiedlichen Aussehens und Färbung bzw. der Farbe des Luftmyzels und der Bildung von Melanin, eines löslichen Pigments, sowie der Farbe der Sporen 55 Stämme unterschieden werden. Sie wurden durch Reinigungsausstriche auf Medium 3-Agarplatten isoliert.

Die Streptomyccetenstämme, die ein gewisses Metabolisierungspotential für PAK zeigten, wurden makroskopisch näher charakterisiert. Dabei wurden koloniemorphologische Merkmale, wie die Farbe des Luftmyzels [ETTLINGER et al., 1958], die Farbe des Substratmyzels und die Konsistenz des Luftmyzels, ermittelt. In Tabelle 7 ist die makroskopische Charakterisierung einiger Isolate zusammengefasst.

Tab. 7.: Makroskopische Charakterisierung einiger Isolate anhand der Luft- und Substratmyzelfarbe und der Konsistenz des Luftmyzels (Anzucht auf Medium 3-Agarplatten)

<b>Isolat</b>	<b>Farbe des Luftmyzels</b>	<b>Farbe des Substratmyzels</b>	<b>Konsistenz des Luftmyzels</b>
AP 4.3	weißgelb	gelblich	feinstaubig
AP 10	aschgrau	gelbbraun	grobwollig
AP 12.1	grau	hellgelb	feinstaubig-grobwollig
AP 16.1	hellgrau	hellgelb	feinstaubig-wollig
AP 18.1	weißgrau	braun	feinstaubig
KR 13	weiß	weißgelb	feinstaubig
KR 15	weißgrau	hellgelb	feinstaubig

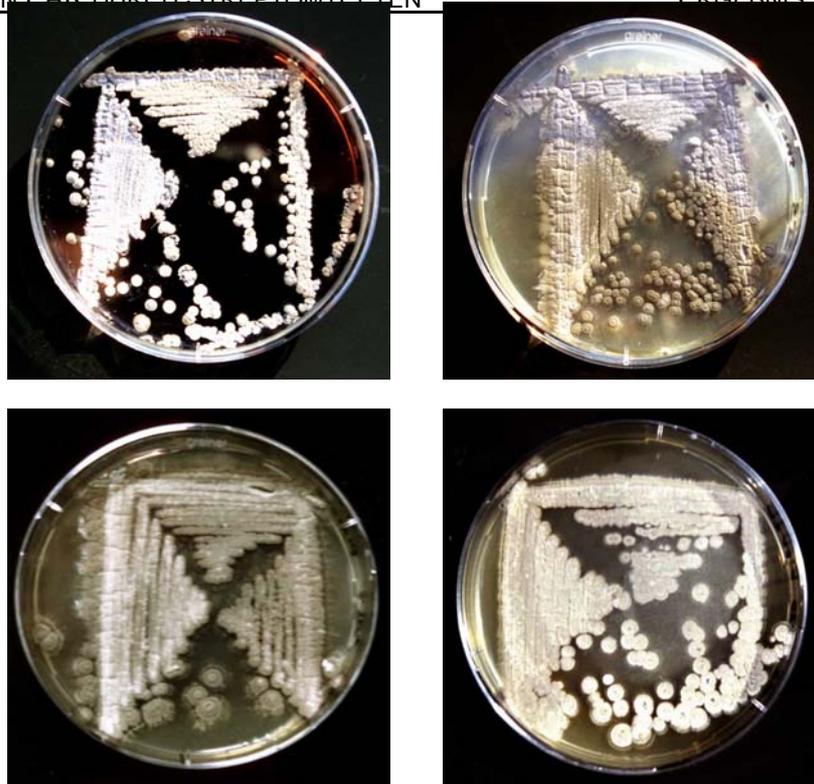


Abb. 7.: Wachstum der Isolate AP18.1, AP12.1, AP16.1 und KR15 auf Medium 3-Agarplatten (von links oben nach rechts unten); 5 Wochen; 27°C

Tab. 8.: Substratnutzung und Antibiotikaresistenz einiger der isolierten Streptomyceten auf Medium 6-Agarplatten und in Flüssigkultur

Isolat	AP 4.3	AP 10	AP12.1	AP 16.1	AP 18.1	KR 13	KR 15
<b>Wachstum auf</b>							
Saccharose	±	±	-	±	-	-	-
Mannose	-	+	-	-	+	+	-
Zellobiose	+	+/-	+/-	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
<b>Resistenz gegen</b>							
Penicillin G	-	-	-	-	-	-	-
Oleandomycin	-	-	+	+	-	-	-
Neomycin	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicin	-	-	-	-	-	-	-

- kein Wachstum

+ deutliches Wachstum

± schwaches Wachstum

Die Absicherung der Zuordnung der Isolate zur Gattung der Streptomyceten erfolgte durch Überprüfung der Anwesenheit von LL-Diaminopimelinsäure gemäß 2.6.3 [LE-

CHEVALIER UND LECHEVALIER, 1970]. Abbildung 8 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Ganzzellhydrolysaten.

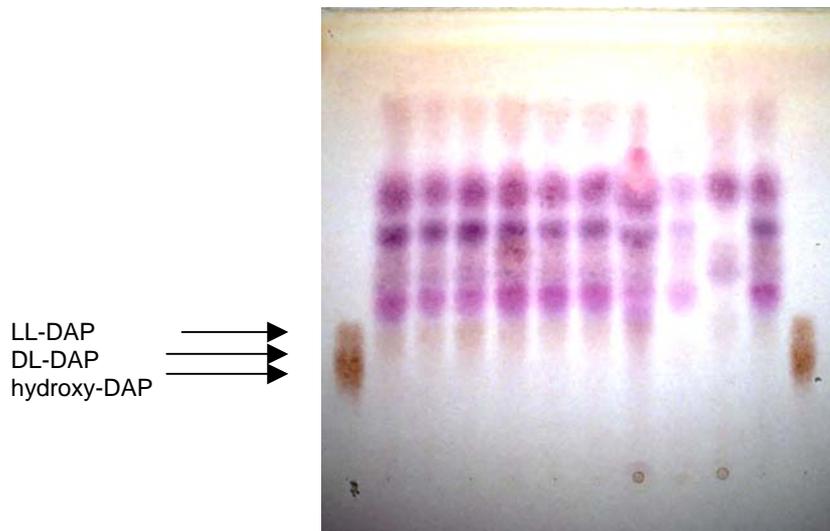


Abb. 8.: Auftrennung der Ganzzellhydrolysate der Isolate und der Referenzstämme *S. viridosporus* und *S. griseus*; Trennbedingungen: vgl. 2.6.3

Auftragung: v. l. n. r.: Referenzsubstanz, *S. viridosporus*, *S. griseus*, AP4.3, AP10, AP12.1, AP16.1, AP18.1, AP13, AP14, AP21, Referenzsubstanz.

## 3.2 Abbau von PAK durch die isolierten Streptomycceten

### 3.2.1 Untersuchungen mit dem Isolat AP18.1

Die nachfolgenden Untersuchungen dienten dem Nachweis von PAK-Metaboliten und gegebenenfalls deren Identifikation. Die Flüssigkulturen wurden hierzu zweistufig extrahiert (pH 7 und pH 1,5) (2.7.1).

#### 3.2.1.1 Metabolisierung von Phenanthren durch AP18.1

Die HPLC-Analyse (2.7.3.) von Kulturextrakten des mit Phenanthren beaufschlagten Stammes AP18.1 lieferte das in Abbildung 9 dargestellte Chromatogramm. Die Nummerierung der Metabolitsignale erfolgt nach abnehmender Retentionszeit. Bei den Signalen nach 7,4, 8,5 und 14,5 min handelt es sich um Verunreinigungen.

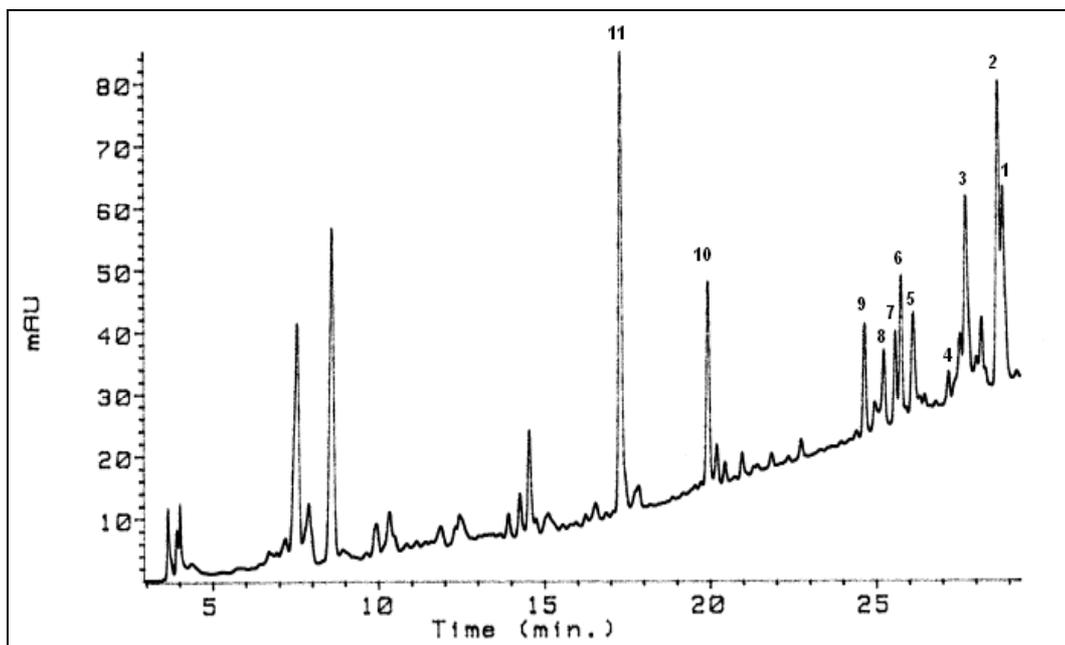


Abb. 9.: HPLC-Chromatogramm eines AP18.1-Kulturfiltratextrakts;

Kulturbedingungen: 27°C, 0,5 mg/ml Phenanthren, 0,5 mg/ml Glucose,  
Kulturalter: 14 d; Konzentration des Extrakts bzgl. des Kulturfiltrats: 100-fach

Unter Subtraktion des Lösungsmittelhintergrundes wurden die UV-VIS Spektren der Signale aufgezeichnet (Diodenarraydetektor). Anhand dieser Spektren und durch Chromatographie mit Referenzsubstanzen wurden 1-, 4- und 9-Hydroxyphenanthren sowie *trans*-9,10-Phenanthrendihydrodiol als Metabolite identifiziert.

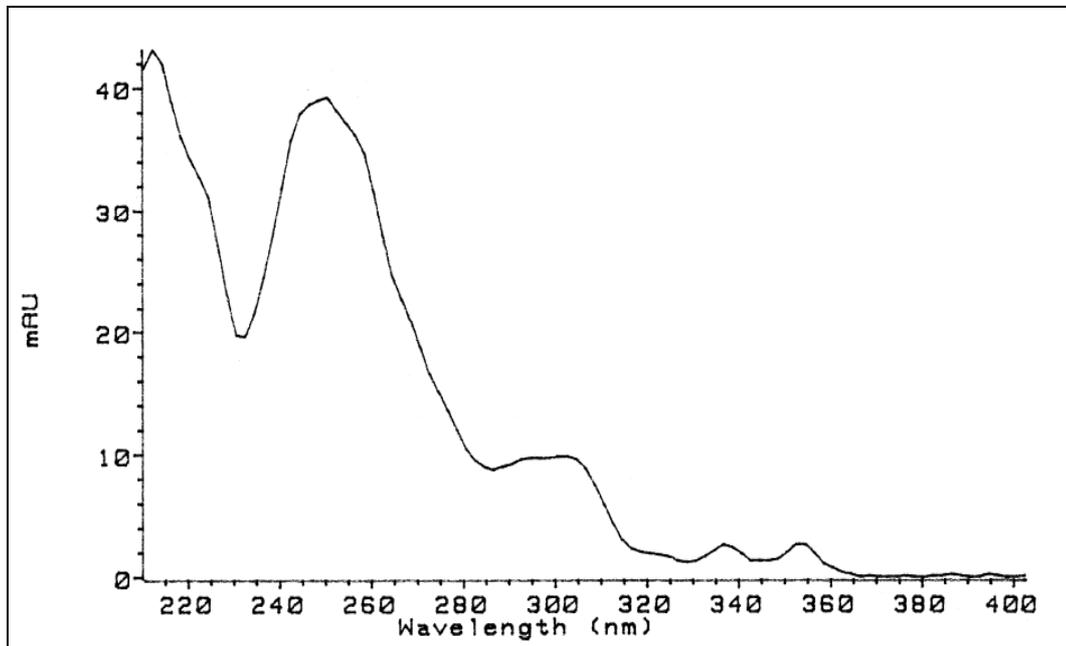


Abb. 10.: UV-VIS-Spektrum des Phenanthrenmetaboliten 6 (1-Hydroxyphenanthren), Rt: 25,7 min.

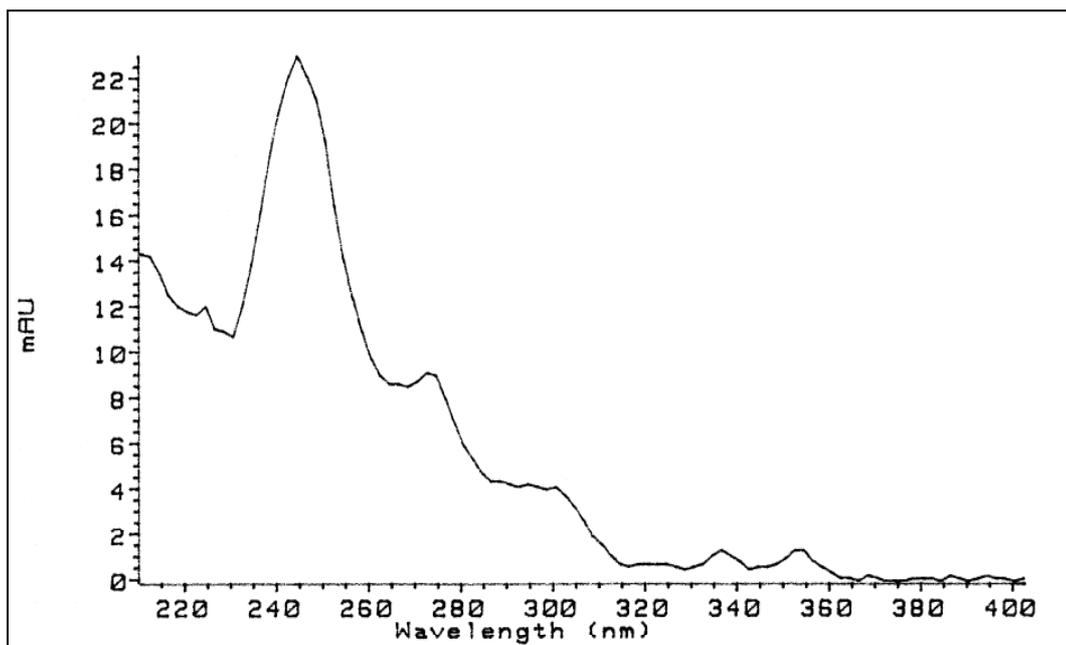


Abb. 11.: UV-VIS-Spektrum des Phenanthrenmetaboliten 7 (4-Hydroxyphenanthren), Rt: 25,5 min.

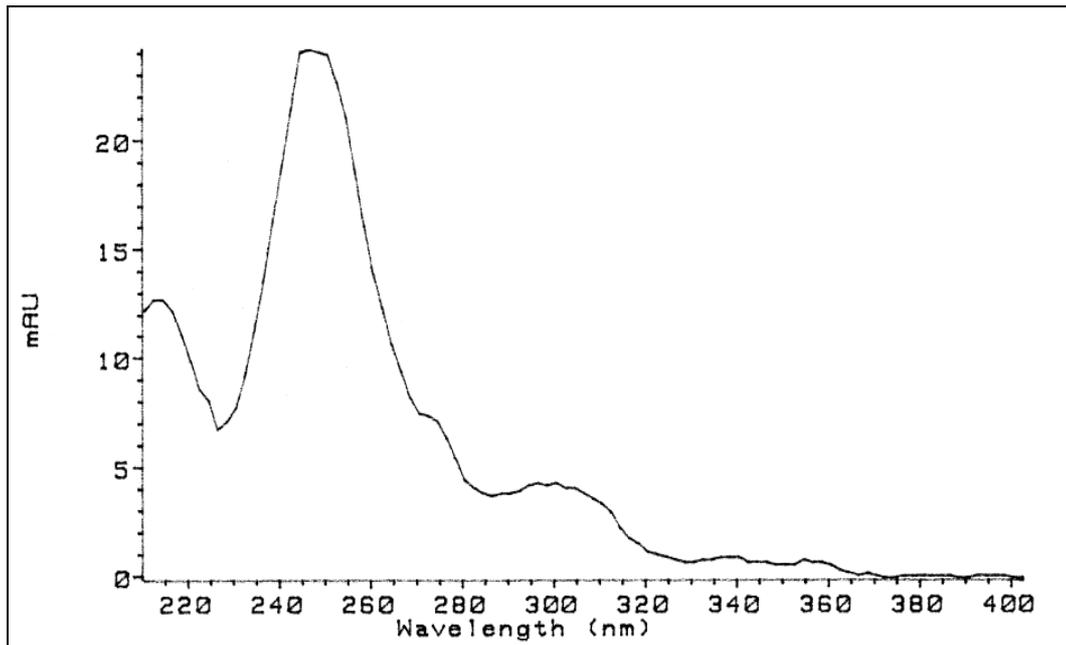


Abb. 12.: UV-VIS-Spektrum des Phenanthrenmetaboliten 8 (9-Hydroxyphenanthren), Rt: 25,2 min.

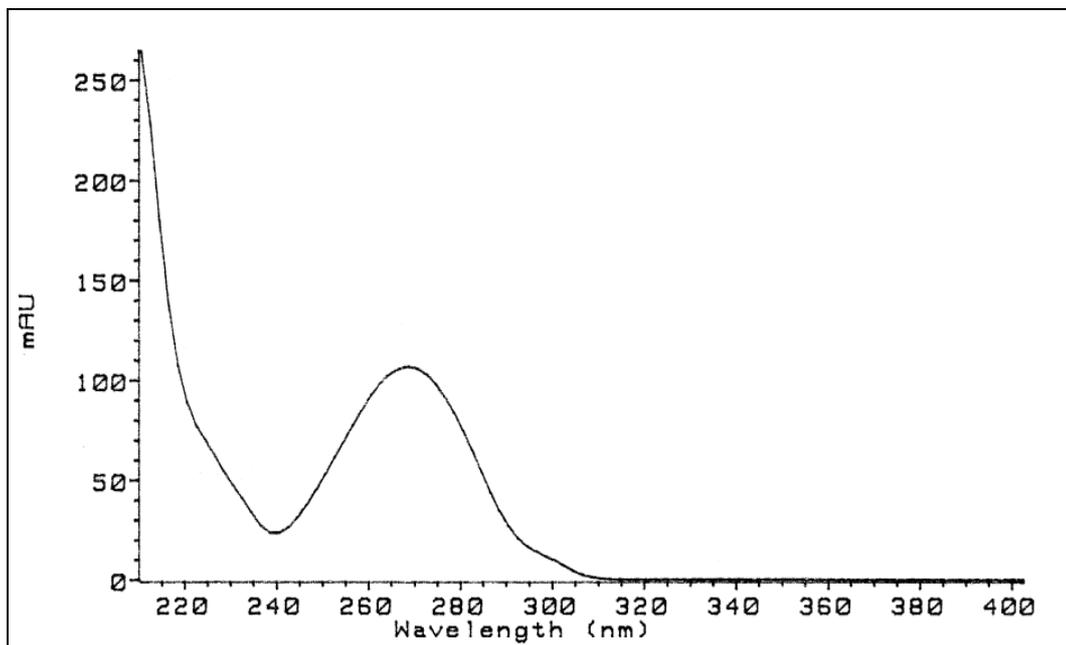


Abb. 13.: UV-VIS-Spektrum des Phenanthrenmetaboliten 10 (trans-9,10-Phenanthren-Dihydrodiol), Rt: 19,9 min.

### 3.2.1.2 Weitere Metabolite des Isolats AP18.1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund der geringen Ausbeute nicht geklärt werden, ob es sich bei den Metabolitsignalen 1, 2, 3, 5, 9 und 11 um weitere Phenanthrenmetabolite handelt.

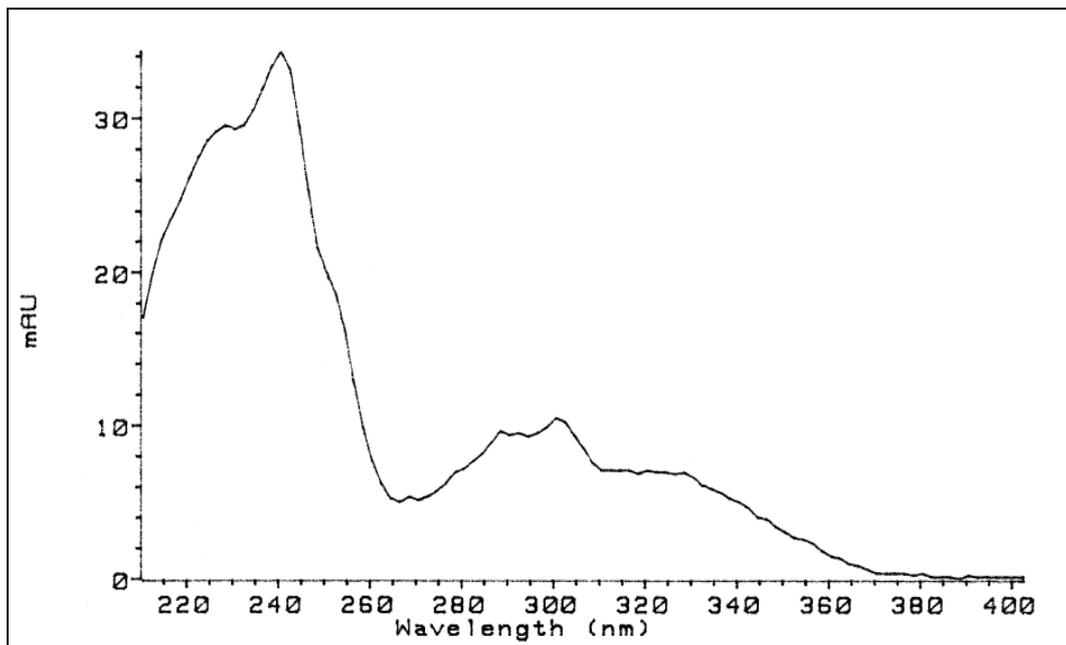


Abb. 14.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 1, Rt: 28,7 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 241, 288, 300

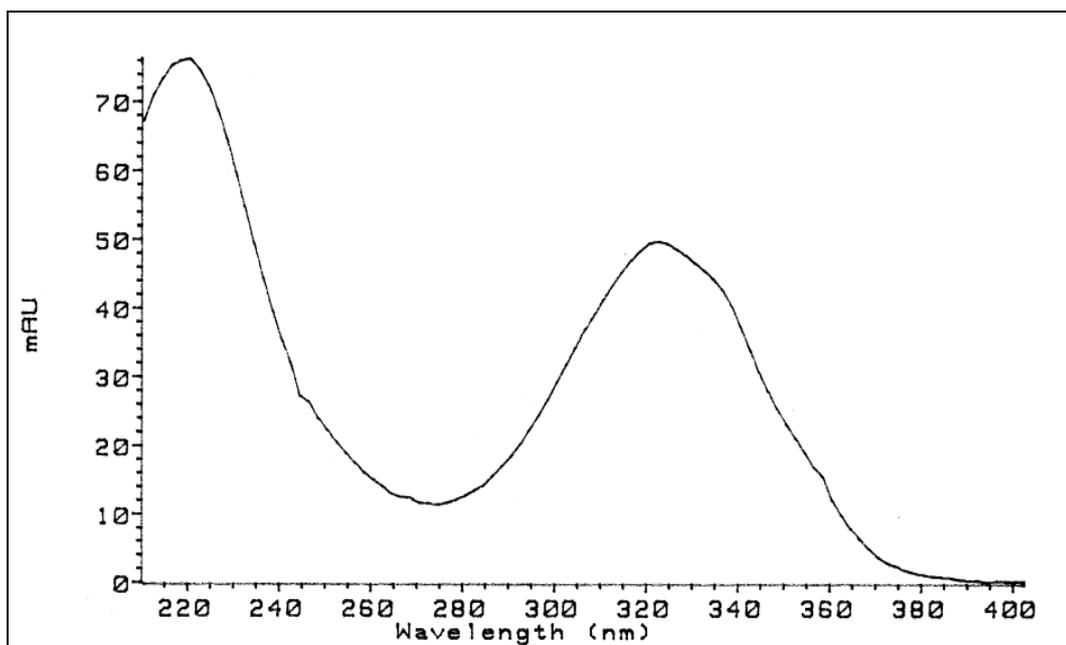


Abb. 15.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 2, Rt: 28,6 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 221, 322, 336

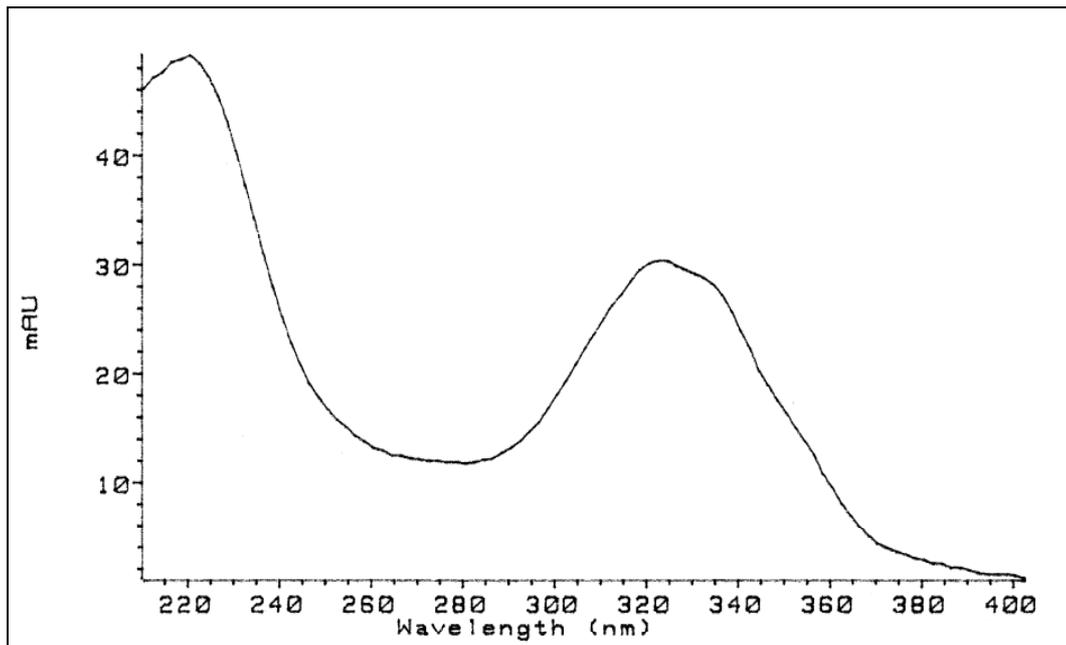


Abb. 16.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 3, Rt: 27,7 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 221, 322, 336

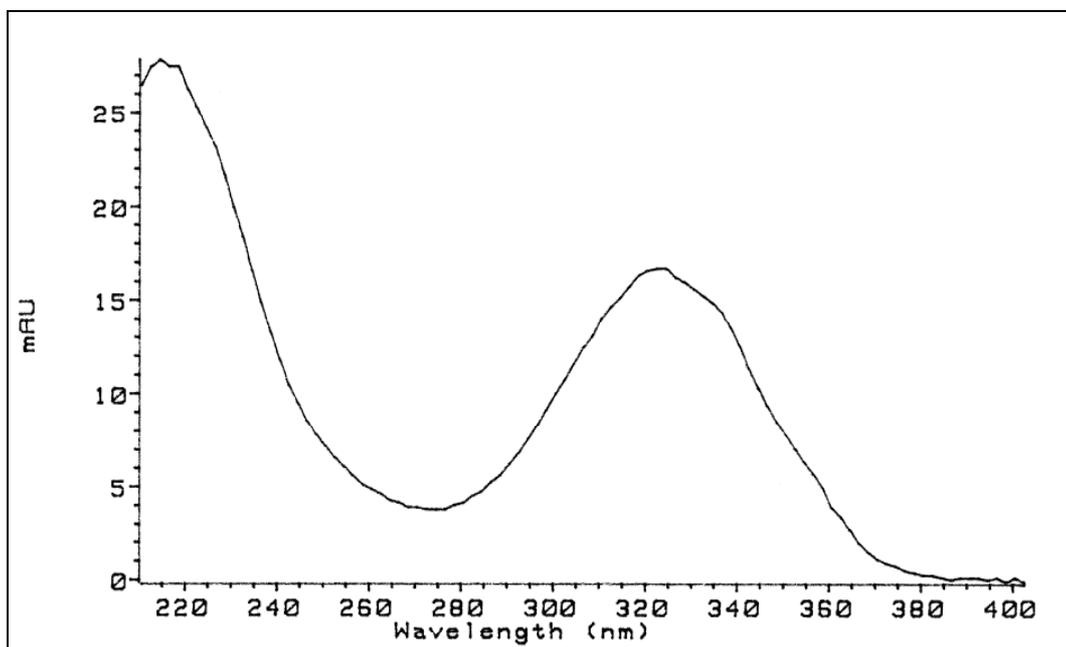


Abb. 17.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 5, Rt: 24,6 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 221, 322, 336

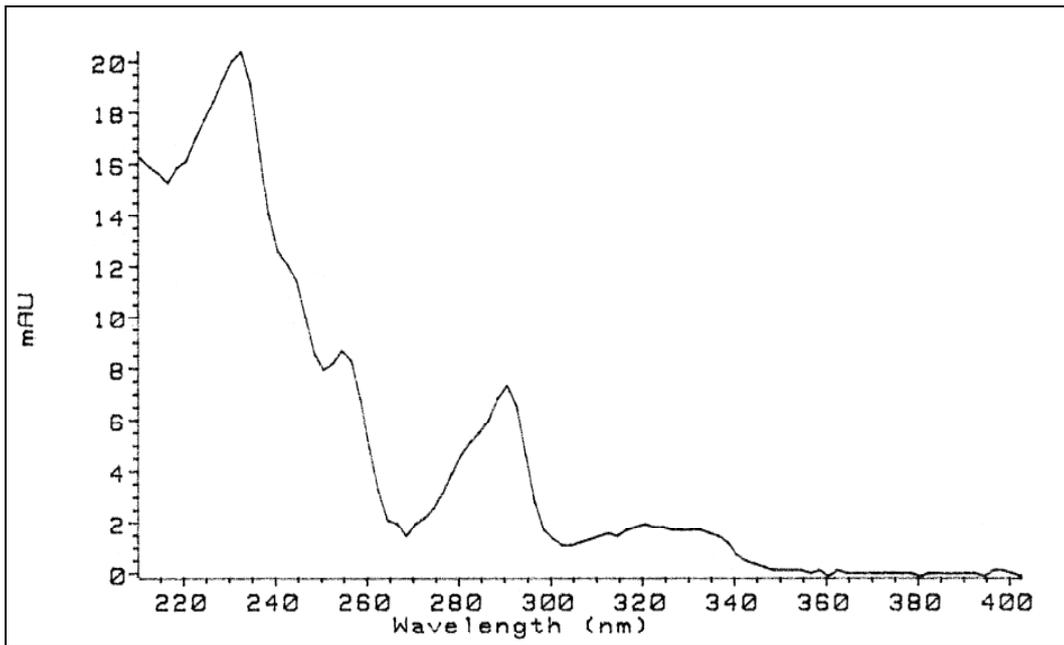


Abb. 18.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 9, Rt: 26 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 227, 255, 291, 320

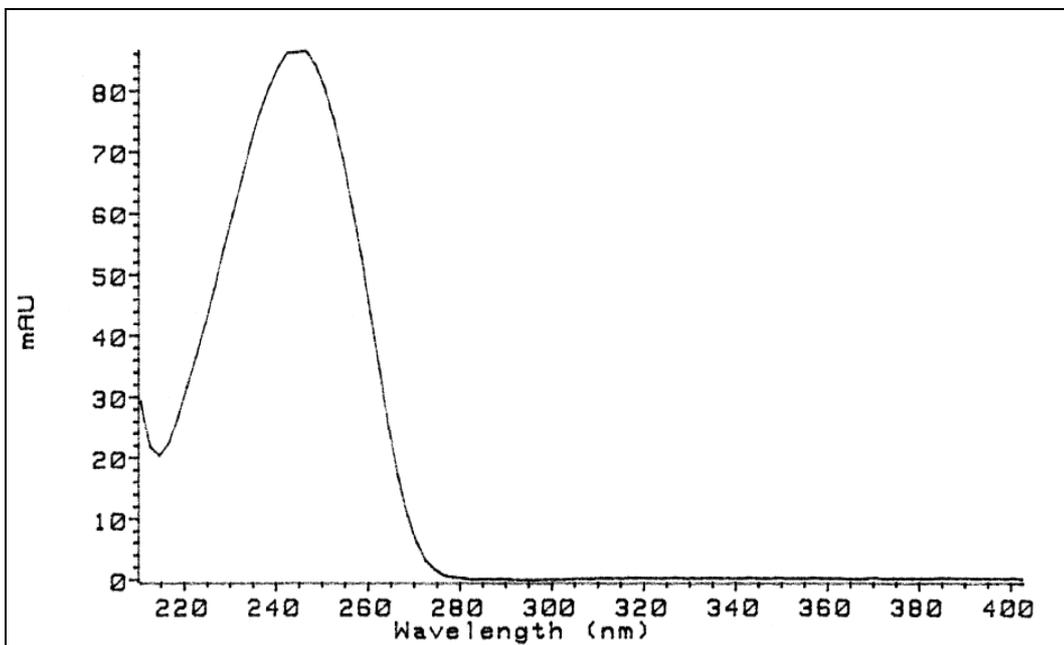


Abb. 19.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 11, Rt: 17,3 min;  $\lambda_{\max}$  [nm]: 246

### 3.2.1.3 Quantitative Analyse des Phenanthrenabbaus durch das Isolat AP18.1

Versuche zur quantitativen Analyse der Elimination von Phenanthren durch das Isolat scheiterten an der geringen Konzentration an Metaboliten.

### 3.2.1.4 Metabolisierung von Pyren durch AP18.1

Die HPLC-Analyse (2.7.3) von Kulturextrakten des mit Pyren supplementierten Stammes AP18.1 lieferte das in Abb. 20 dargestellte Chromatogramm. Die Nummerierung der Metabolitsignale erfolgt nach abnehmender Retentionszeit.

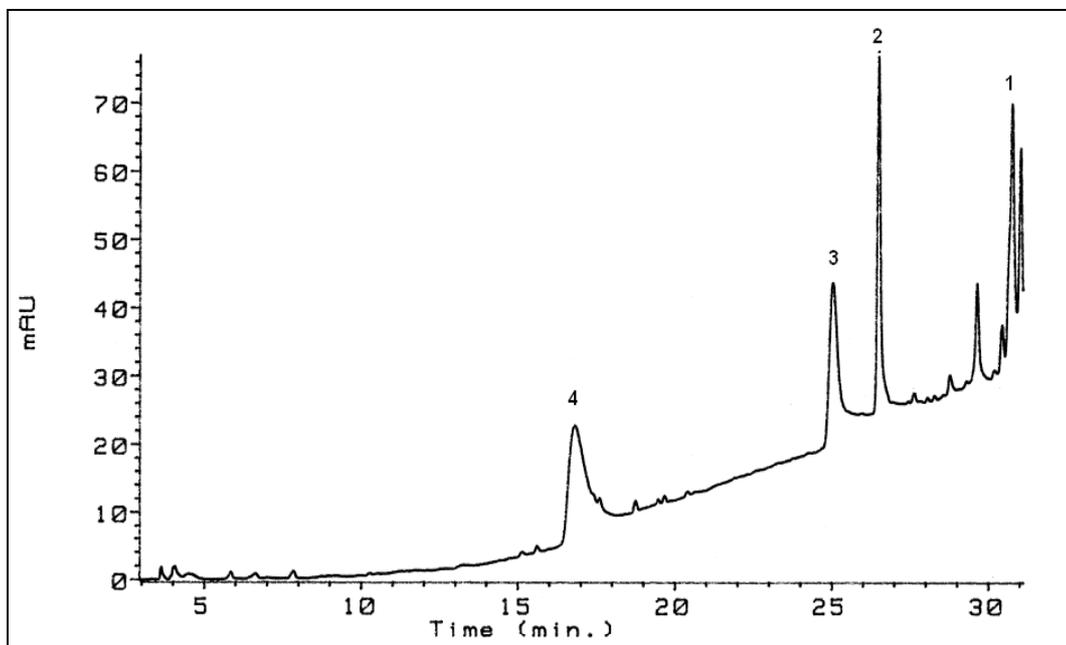


Abb. 20.: HPLC-Chromatogramm eines AP18.1-Kulturfiltratextrakts;

Kulturbedingungen: 27°C, 0,5 mg/ml Pyren, 0,5 mg/ml Glucose, Kulturalter: 216 h;  
Konzentration des Extrakts bzgl. des Kulturfiltrats: 100fach

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund der geringen Ausbeute nicht geklärt werden, ob es sich bei den Metabolitsignalen 1, 2, 3 und 4 um Pyrenmetabolite handelt.

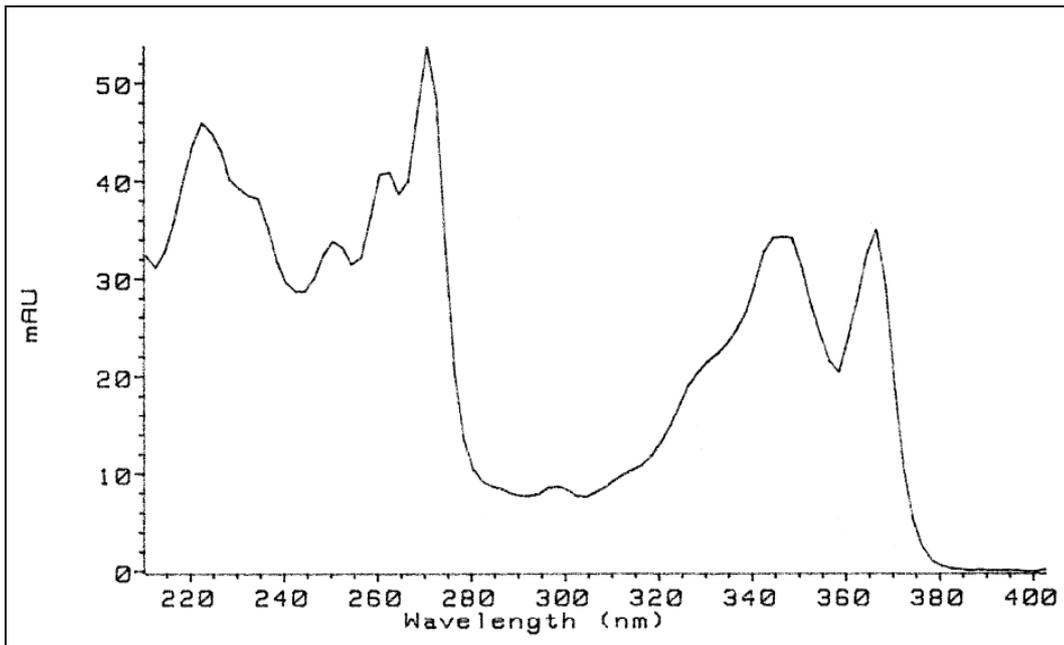


Abb. 21.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 1, Rt: 30,7 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 223, 236, 252, 263, 271, 342, 366

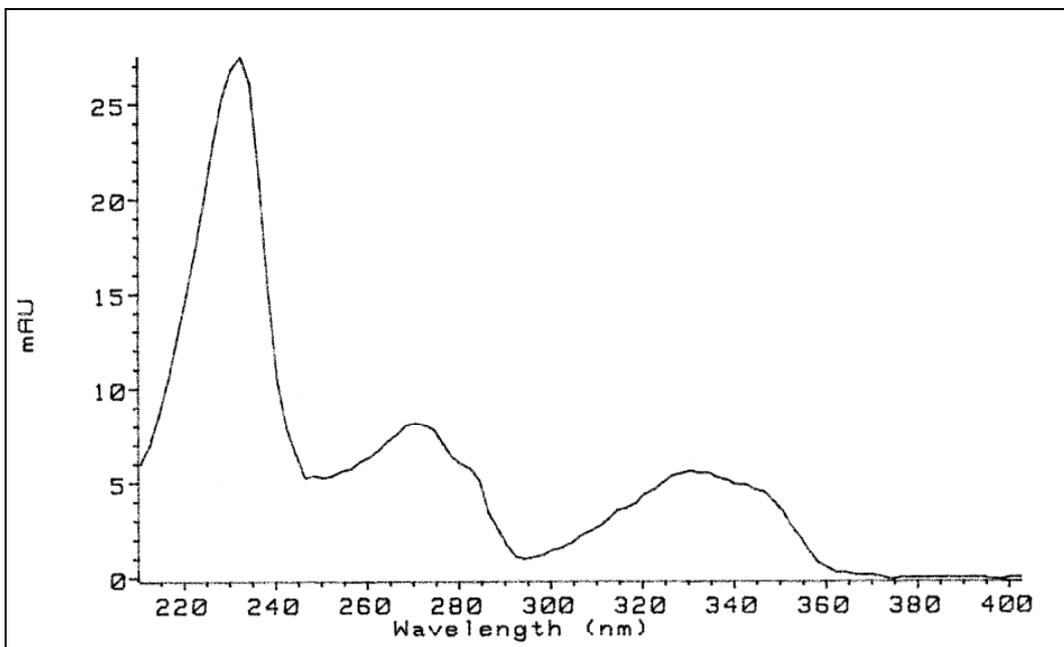


Abb. 22.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 2, Rt: 26,4 min;  $\lambda_{\max}$  [nm]: 234, 270, 329

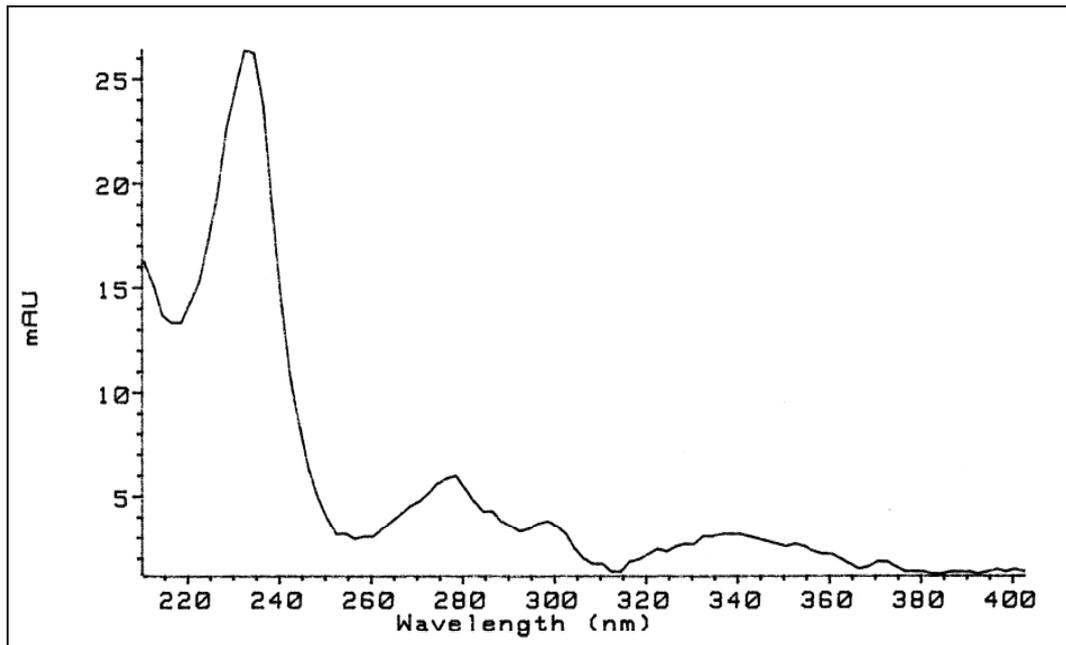


Abb. 23.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 3, Rt: 25 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 235, 277, 297, 336

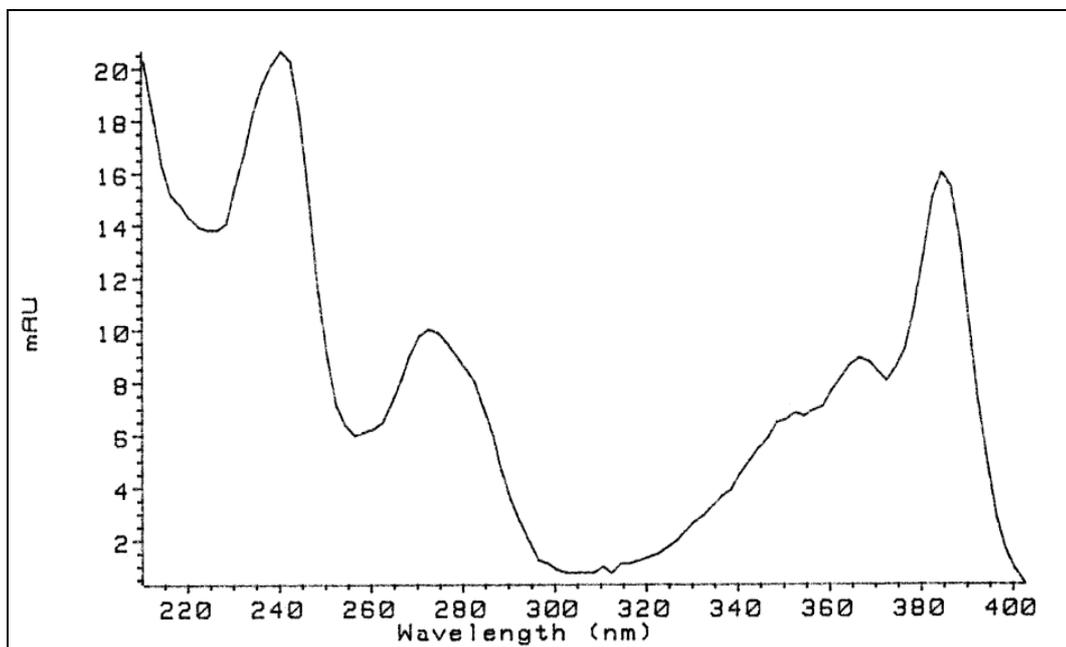


Abb. 24.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 4, Rt: 16,8 min;  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 240, 272, 366, 382

### 3.2.1.5 Metabolisierung von Fluoranthen durch AP18.1

Die HPLC-Analyse (2.7.3.) von Kulturextrakten des mit Fluoranthen supplementierten Stammes AP18.1 lieferte das in Abbildung 25 dargestellte Chromatogramm. Die Nummerierung der Metabolitsignale erfolgt nach abnehmender Retentionszeit.

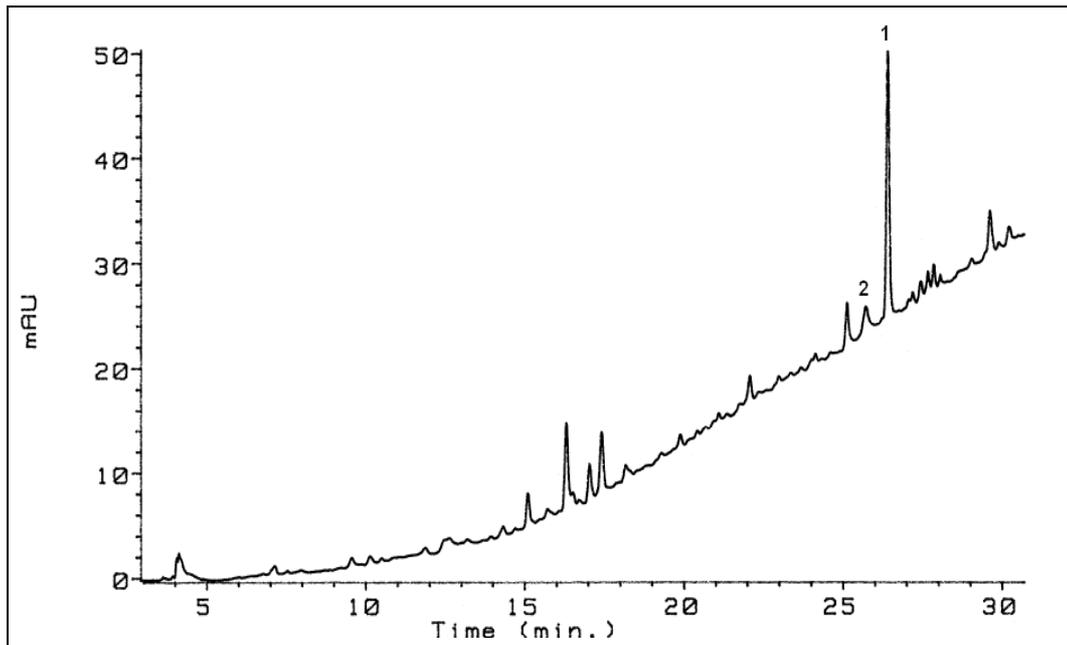


Abb. 25.: HPLC-Chromatogramm eines AP18.1-Kulturfiltratextrakts;

Kulturbedingungen: 27°C, 0,5 mg/ml Fluoranthen, 0,5 mg/ml Glucose;  
Kulturalter: 216 h; Konzentration des Extrakts bzgl. des Kulturfiltrats: 100-fach

Anhand des Spektrums und durch Cochromatographie mit der Referenzsubstanz wurde 8-Hydroxyfluoranthen identifiziert.

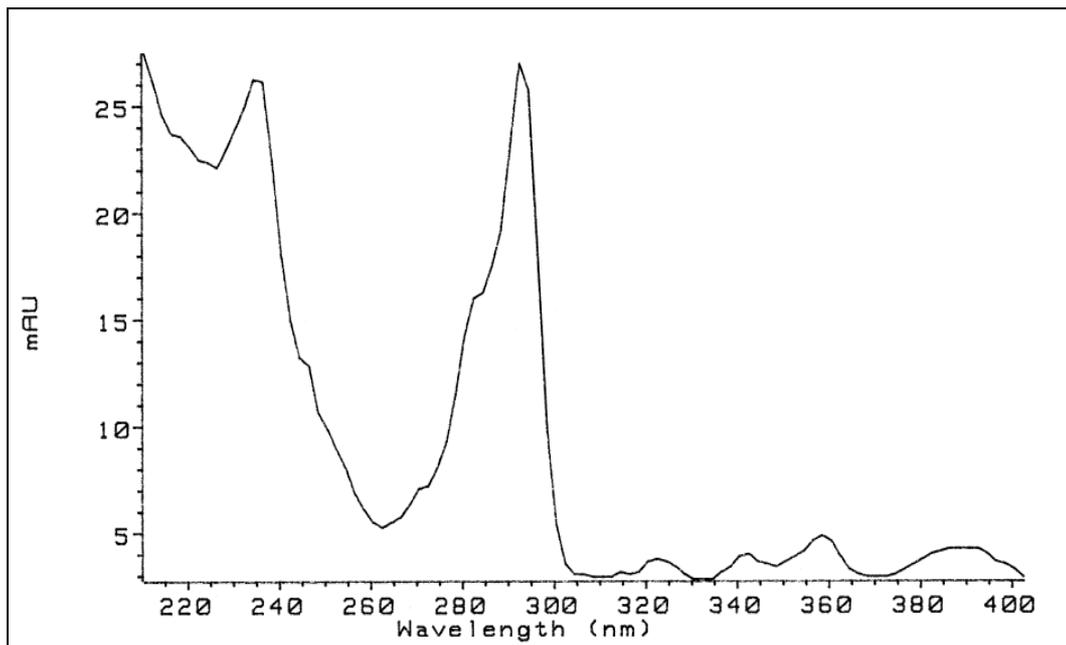


Abb. 26.: UV-VIS-Spektrum des Fluoranthrenmetaboliten 1 (8-Hydroxyfluoranthren),  
Rt: 26,4 min

Bei Metabolit 2 könnte es sich um 1-Hydroxyfluoranthren handeln. Die sehr geringe Konzentration des Metaboliten ließ keine endgültige Identifizierung zu.

### 3.2.2 Untersuchungen mit dem Isolat KR15

Die nachfolgenden Untersuchungen dienten ebenfalls dem Nachweis von PAK-Metaboliten und gegebenenfalls deren Identifikation. Die Flüssigkulturen wurden dabei zweistufig extrahiert (pH 7 und pH 1,5) (2.7.1).

#### 3.2.2.1 Mineralisierung von Fluoranthen durch KR15

Die HPLC-Analyse (2.7.3) von Kulturextrakten des mit Fluoranthen supplementierten Stammes KR15 lieferte das in Abbildung 27 dargestellte Chromatogramm. Die Nummerierung der Metabolitsignale erfolgt nach abnehmender Retentionszeit.

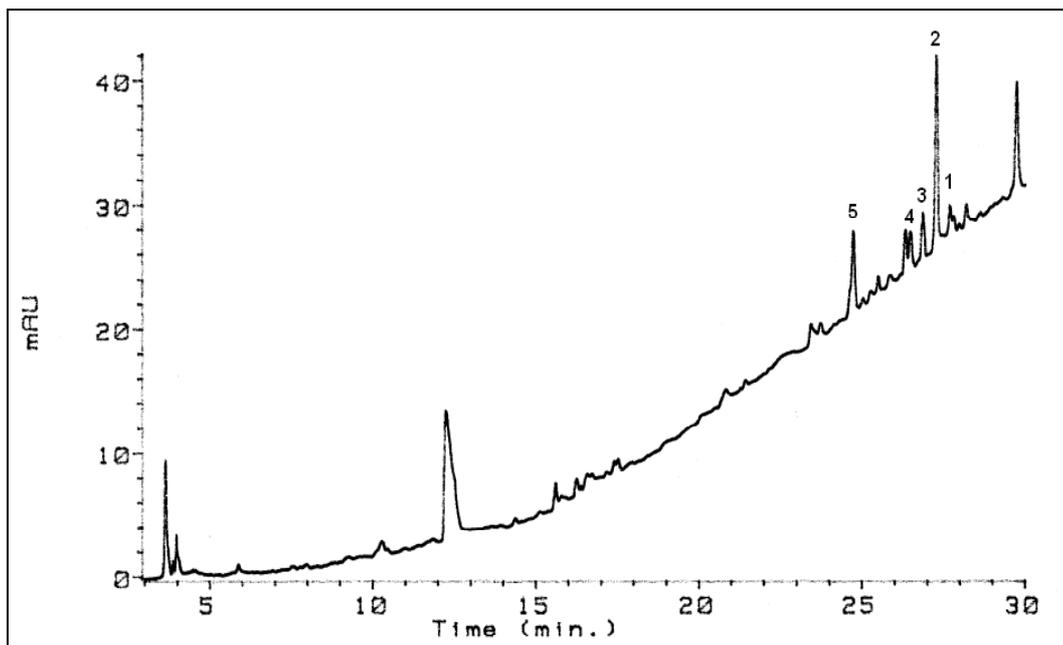


Abb. 27.: HPLC-Chromatogramm eines KR15-Kulturfiltratextrakts;

Kulturbedingungen: 27°C, 0,5 mg/ml Fluoranthen, 0,5 mg/ml Glucose;  
Kulturalter: 216 h; Konzentration des Extrakts bzgl. des Kulturfiltrats: 100fach

Anhand der UV-VIS-Spektren und durch Cochromatographie mit Referenzsubstanzen wurden 1-, 3- und 8-Hydroxyfluoranthen identifiziert. Metabolit 1 und 5 konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund ihrer geringen Konzentration nicht identifiziert werden.

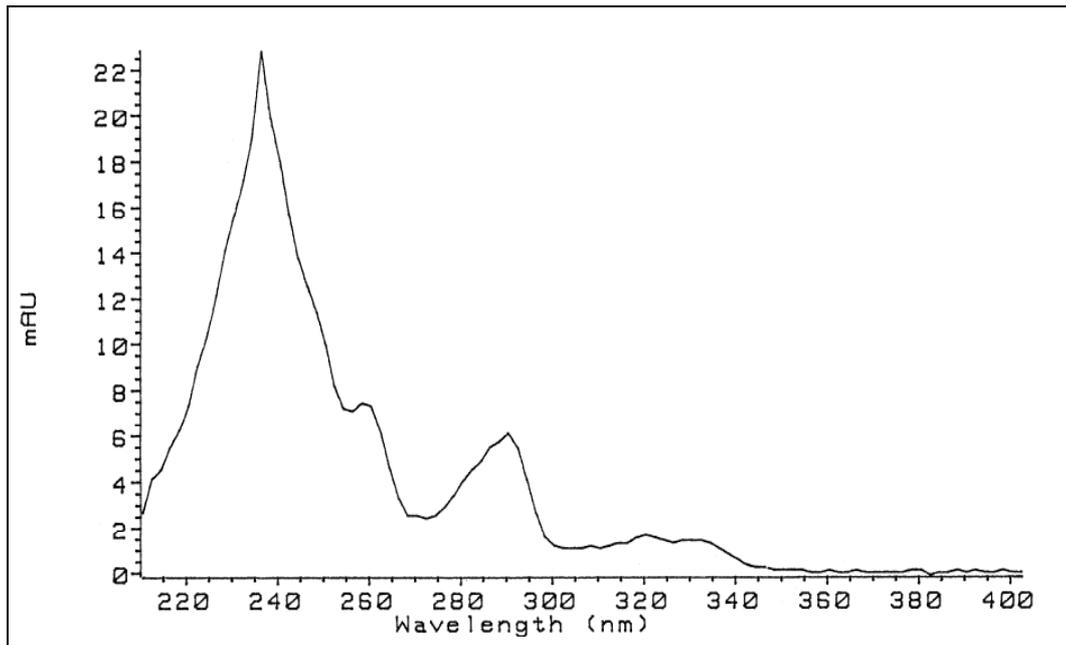


Abb. 28.: UV-VIS-Spektrum des Metaboliten 1, Rt: 27,7 min,  
 $\lambda_{\max}$  [nm]: 236, 260, 290, 320

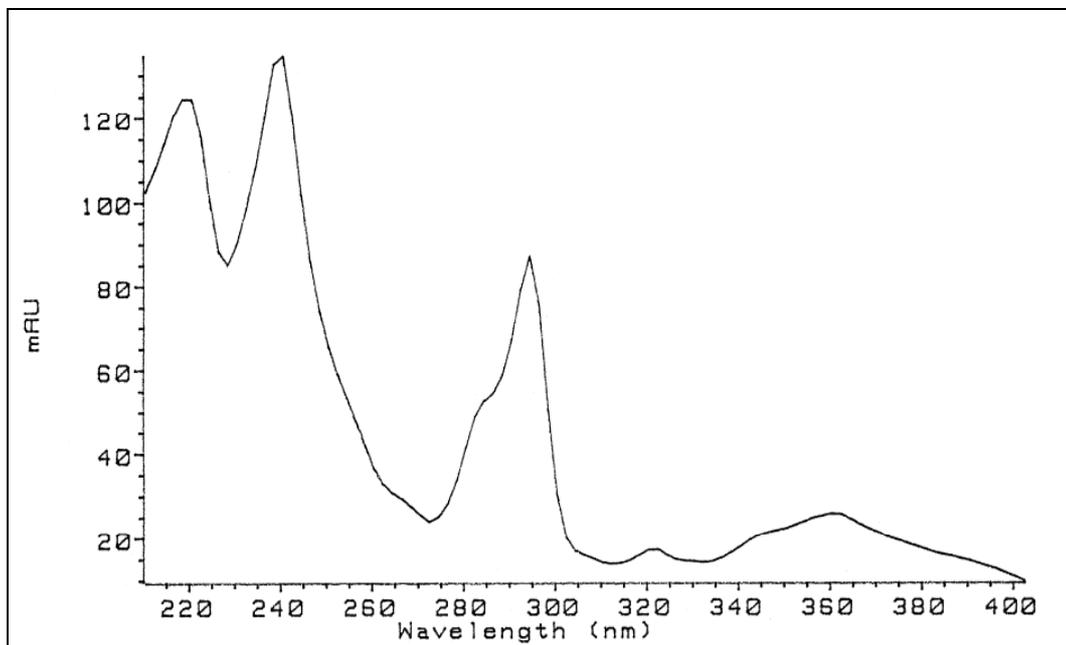


Abb. 29.: UV-VIS-Spektrum des Fluoranthenmetaboliten 2 (3-Hydroxyfluoranthen),  
Rt: 27,3 min

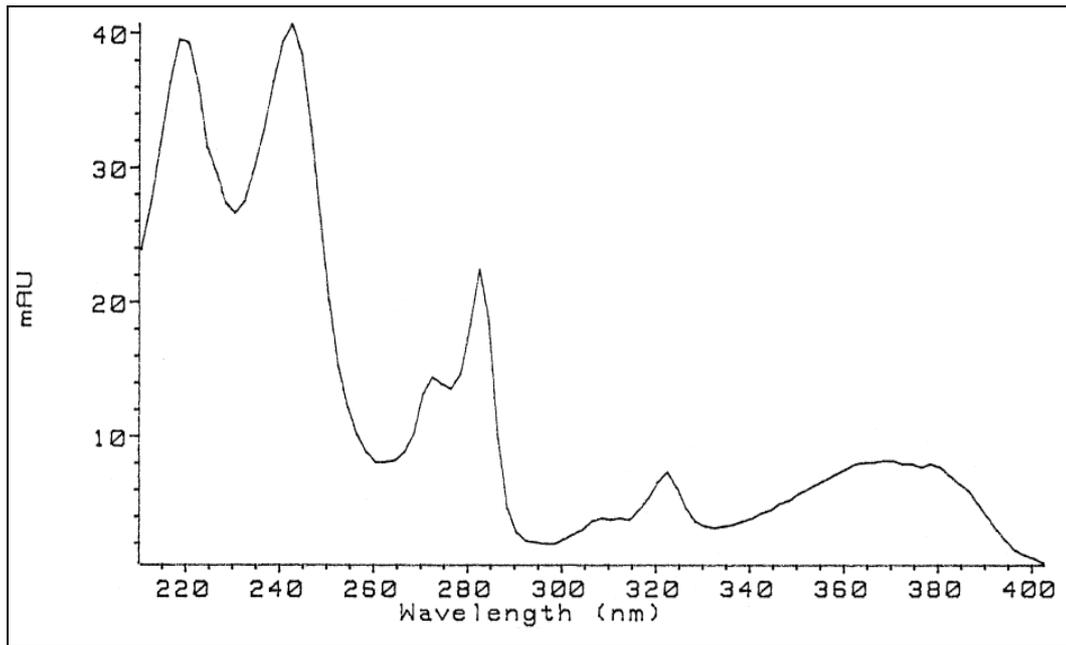


Abb. 30.: UV-VIS-Spektrum des Fluoranthrenmetaboliten 3 (1-Hydroxyfluoranthren),  
Rt: 26,8 min

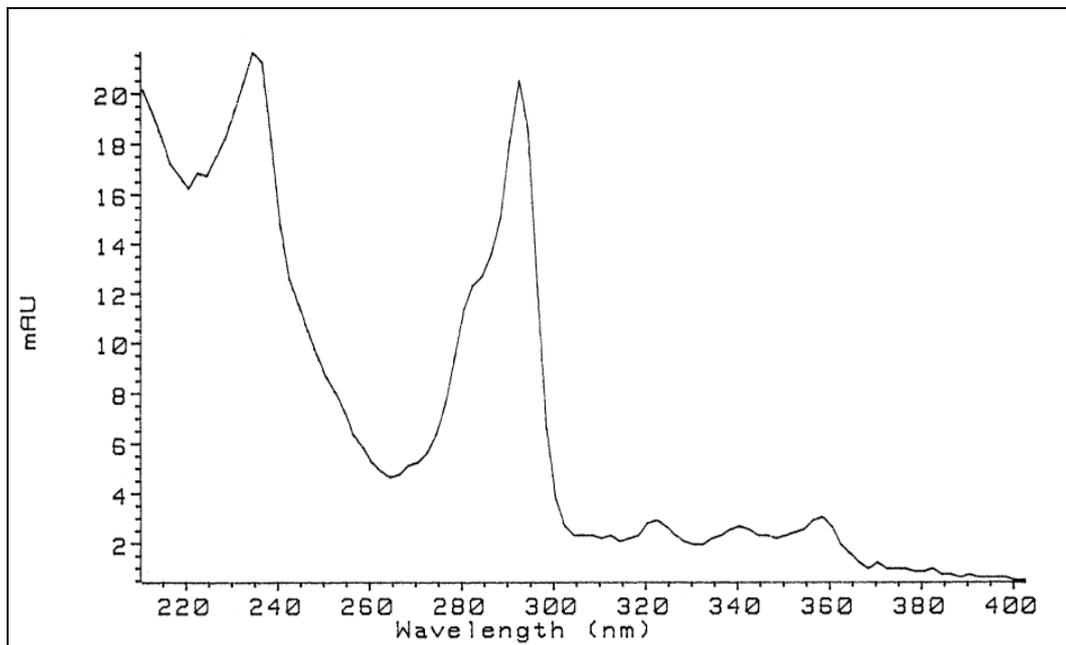


Abb. 31.: UV-VIS-Spektrum des Fluoranthrenmetaboliten 4 (8-Hydroxyfluoranthren),  
Rt: 26,4 min

### 3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aller Isolate

Weitere der isolierten Streptomyceten zeigten in den Screeningversuchen die Fähigkeit, Phenanthren, Pyren und/oder Fluoranthren zu kometabolisieren. Aus der Mehrzahl dieser Isolate wurden, wie bereits erwähnt, nur solche weiter untersucht, die einerseits ein im internen Vergleich höheres Potential zur Kometabolisierung zeigten und andererseits in der Lage waren, Huminsäuren abzubauen.

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse aller Versuche zur Isolierung und Identifikation von Metaboliten aus Streptomycetenkulturen mit Phenanthren, Fluoranthren und Pyren zusammengefasst.

Tab. 9.: Zusammenfassung der Ergebnisse der Identifizierung von PAK-Metaboliten, verschiedene Isolate

Isolat	Phenanthrenmetabolite	Fluoranthrenmetabolite	Pyrenmetabolite
AP 1	1-Hydroxyphenanthren; <i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol,	-	-
AP 3	1-Hydroxyphenanthren; <i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol,	-	-
AP 4.3	1-Hydroxyphenanthren	8-Hydroxyphenanthren	-
AP 12.1	1-, 3- und 4-Hydroxy- phenanthren; <i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol	-	1-Hydroxypyren
AP 16.1	-	-	<i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol, 1-Hydroxy- phenanthren
AP 18.1	1-, 3- und 4-Hydroxy- phenanthren; <i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol	8-Hydroxyphenanthren	-
AP 18.5	<i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol	-	-
KR 13	1-Hydroxyphenanthren; <i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol	3-Hydroxyfluoranthren	1-Hydroxypyren
KR 15	1-, 3-, 4,- und 9-Hydroxy- phenanthren; <i>trans</i> -9,10-Phenanthren- dihydrodiol	1-, 3- und 8-Hydroxy- fluoranthren	1-Hydroxypyren

### 3.2.4 Versuche zur Identifizierung von Konjugaten

Die Möglichkeit der Bildung von Sulfat-, Glukosid- und/oder Glucuronidkonjugaten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Für keine der getesteten PAK/Streptomyceten-Kombinationen konnten Konjugate nachgewiesen werden.

### 3.2.5 Abbau in Anwesenheit von Huminsäuren

In Anwesenheit von Huminsäuren konnte für keine der getesteten PAK/Streptomyceten-Kombinationen die zuvor beschriebenen Metabolite detektiert werden.

### 3.2.6 Diskussion

Ziel der Untersuchungen der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente war es, aus PAK-kontaminierten Böden solche Streptomycetenstämme zu isolieren, die in der Lage sind, die Modell-PAK Phenanthren, Pyren und Fluoranthen zu metabolisieren.

Zu diesem Zweck wurden Screening-Methoden eingesetzt, die visuell auf den Abbau von Xenobiotika anhand der Elimination spezifischer Chemikalien schließen lassen. Screening-Methoden werden für die Isolierung von Schadstoff abbauenden Mikroorganismen bevorzugt, da quantitative Extraktion und Analyse von Xenobiotika zeit- und kostenintensiv sind. Einfachere Methoden, die auf dem Nachweis von spezifischen Enzymen (z.B. Peroxidasen, Laccasen) basieren, vernachlässigen die Tatsache, dass die vereinigte Aktion von verschiedenen Enzymen für die Aktivität der Mikroorganismen *in vivo* erforderlich ist. Dennoch ist die in dieser Arbeit eingesetzte Screening-Methode der Entfärbung des polymeren Farbstoffs Poly-R-478 empfehlenswert, da sie einfach auszuwerten und preiswert ist. Sie zeigte eine deutliche Korrelation zur Transformationsfähigkeit für Huminsäuren und PAK durch die isolierten Streptomyceten.

Die hier zum Zweck des PAK-Abbauscreenings beobachtete Entfärbung von polymeren Farbstoffen hat sich als ein guter Indikator für die durch die Aktivität von peroxidativen Enzymen bei Mikroorganismen vermittelte initiale Transformation von Xenobiotika erwiesen. FIELD et al. (1992 und 1993) beobachteten, dass sowohl der Abbau von Anthracen als auch der von Benzo[a]pyren signifikant mit der Fähigkeit von Mikroorganismen korrelierte, den polymerischen Farbstoff Poly R-478 zu zersetzen. Die Ergebnisse der Vorversuche in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Screening

mit Poly R-478 ein nützliches Instrument bei der Selektion PAK-abbauender Mikroorganismen ist.

Ogleich die durch Monoxygenasen vermittelten Biotransformationen den Screening-Systemen, die polymere Farbstoffe benutzen, sehr wohl entgehen können, gehört die peroxidative Aktivität zum ligninabbauenden System der Streptomyceten [HERNÁNDEZ et al., 1997]. Peroxidasen sind die Enzyme, die unmittelbar in die Entfärbung der polymerischen Farbstoffe involviert sind. Die *in vivo* beobachtete Entfärbung ist ein Hinweis für eine globale Peroxidaseaktivität, da sie summarisch den Effekt der Peroxidasen und anderer vergleichbar aktiver Oxidasen widerspiegelt. Deshalb stellt sie eine angemessene Eigenschaft dar, um ein Screening für PAK-abbauende Streptomyceten durchzuführen. Die Beobachtung, dass einige der isolierten Streptomyceten Poly-R-478-Agarplatten entfärbten und andere nicht, ist ein Hinweis auf eine unterschiedliche Strategie beim Abbau von Schadstoffen durch die Mikroorganismen.

Die ausgewählten Kulturtechniken zur Isolation von PAK-metabolisierenden Mikroorganismen begünstigen die Selektion von solchen Organismen, die höhere Wachstumsraten haben und somit gegebenenfalls eine Mischkultur schnell dominieren [GRUND et al., 1990]. Auch wenn die Isolierung der Streptomyceten in dieser Arbeit gleichfalls in Bezug auf langsam wachsende Stämme durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass langsamer wachsende Streptomycetenstämme dem Screening entgangen sind.

### **3.2.6.1 Diskussion der PAK-Abbauversuche durch die isolierten Streptomyceten**

Die Gründe, warum bestimmte Chemikalien abgebaut werden und andere nicht, sind sehr unterschiedlich [CORNELISSEN UND SIJM, 1996]. Die Struktur der Substanz ist dabei sehr wichtig; je geringer eine Verbindung biotischen Verbindungen ähnelt und je stabiler ihre Struktur gegenüber enzymatischem Abbau ist, desto schwieriger wird sie abgebaut werden. Die Konzentration der Chemikalie ist ein anderer wichtiger Faktor, der den biologischen Abbau bestimmt. Niedrige Konzentrationen resultieren in einem schwachen biologischen Abbau, bis zum Punkt einer Konzentrationsschwelle, unter der Verbindungen nicht mehr abgebaut werden. Andererseits können hohe Konzentrationen toxische Effekte verursachen, welche die Abbauraten reduzieren können. Biologische

Abbauraten werden auch stark von Umweltfaktoren, wie Temperatur, Sauerstoffmenge, Redoxpotential, pH, Salzgehalt und die Anwesenheit von anderen Nährstoffen, beeinflusst.

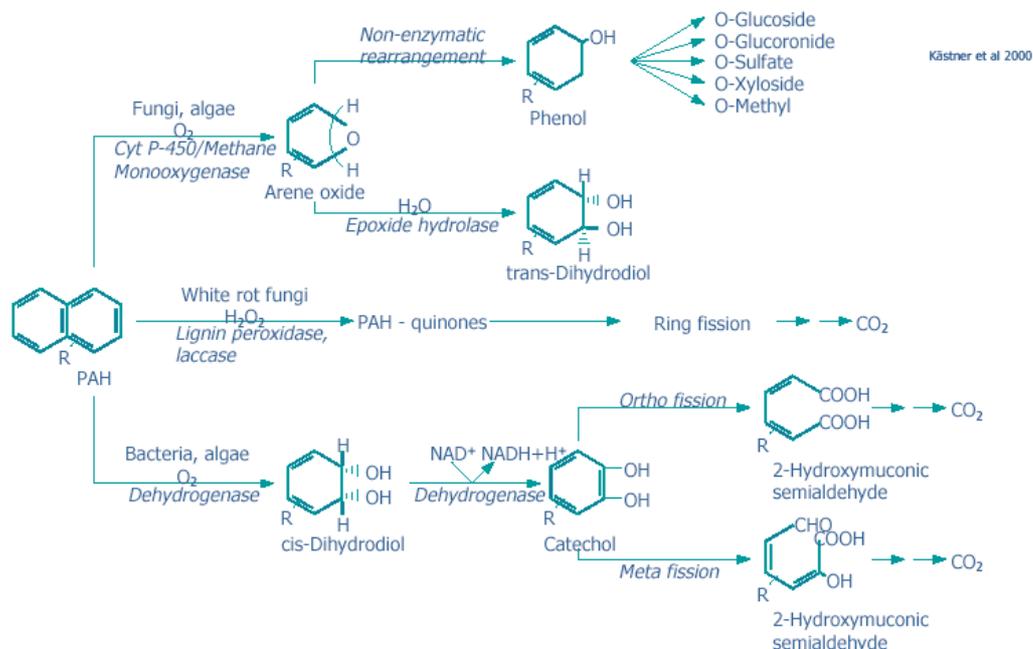


Abb. 32.: Mikrobielle Abbauwege von PAK in Böden [TOTSCHKE, 2000]

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Modell-PAK Phenanthren, Fluoranthren und Pyren gehören zu den am weitesten verbreiteten PAK in der Umwelt. Diese Substanzen werden bei vielen PAK-Studien als Modell zum Studium des photochemischen und biologischen Abbaus dieser Substanzklasse eingesetzt. Außerdem fungieren sie als Indikatoren für die Überwachung, da ihre molekularen Strukturen in hoch karzinogenen PAK gefunden werden, weshalb sie als Modellsubstanz bei der Messung von Bindungen an die DNA eingesetzt werden. Schließlich wurden, vor allem bei Pyren, Metabolismusexperimente zum Studium der Induktion verschiedener Formen des Cytochroms P-450 durchgeführt [SACK et al. 1997; CERNIGLIA et al., 1986].

Die PAK-Metabolisierungsversuche in der vorliegenden Arbeit lieferten als Ergebnis der Transformation von Phenanthren folgende durch Cochromatographie identifizierte Substanzen: 1-, 3-, 4- und 9-Hydroxyphenanthren sowie *trans*-9,10-Phenanthrendihydrodiol. Bei den Versuchen mit Fluoranthren konnten 1-, 3- und 8-Hydroxyfluoranthren identifiziert werden. Schließlich lieferten die Untersuchungen mit Pyren

1-Hydroxypyren als Metaboliten. Eine Reihe von weiteren potentiellen PAK-Metaboliten konnte mangels Referenzsubstanzen und/oder aufgrund sehr niedriger Konzentrationen nicht identifiziert werden.

Ergebnisse von FOGHT et al. (1989) lassen auf eine Hierarchie des Abbaus von PAK mit einer aufsteigenden Anzahl von Ringen schließen; d. h., Bakterienstämme, die monozyklische und dicyklische Aromaten mineralisieren, können nicht notwendigerweise trizyklische Aromaten abbauen, wogegen Mikroorganismen, die trizyklische aromatische Kohlenwasserstoffe abbauen, in der Lage sind, weniger komplexe Verbindungen einschließlich Biphenyl abzubauen. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Während mehrere Isolate in der Lage waren, Phenanthren zu transformieren, konnten die wenigsten das Gleiche mit Fluoranthren und noch weniger mit Pyren bewerkstelligen.

Mehrere Veröffentlichungen berichten über Bakterienstämme, die in der Lage sind, sowohl Pyren als auch Phenanthren zu verwerten, was auf eine metabolische Ähnlichkeit in der Nutzung dieser beiden Verbindungen hindeutet. MOLINA et al. (1999) stellten fest, dass nicht nur Pyren und Phenanthren nach Induktion mit einer der beiden Verbindungen abgebaut werden können. Das Ausmaß der Mineralisation von Pyren hing von der den Abbau induzierenden Substanz ab, wogegen das Ausmaß des Abbaus von Phenanthren unabhängig davon war. Im Gegensatz dazu berichteten BOUCHEZ et al. (1995), dass die Aktivität des Abbaus von Phenanthren bei mehreren Stämmen abnahm, wenn der Stamm vorher nicht anderen PAK-Verbindungen ausgesetzt war. Die Autoren interpretierten den Verlust der Aktivität als einen Hinweis, dass Phenanthren ein schwacher Induktor der für seinen Abbau benötigten Enzyme ist. Reaktionen auf verschiedene Induktor-PAK scheinen demnach stammspezifische Eigenschaften zu sein. Eine Vorhersage über die Fähigkeit zum Abbau von PAK (in diesem Fall Pyren und Phenanthren) in Umweltmatrizes ist deshalb schwierig. Auch könnte es eine Erklärung dafür sein, weshalb mehrere in der vorliegenden Arbeit isolierte Streptomycesstämme nicht alle drei untersuchten PAK abbauen konnten.

Bereits 1974 berichteten SMITH UND ROSAZZA, dass Naphthalin und Biphenyl durch Streptomyceten metabolisiert werden. SUTHERLAND et al. (1990) zeigten, dass *S. flavovirens* Phenanthren in zwei enzymatischen Schritten an der K-Region metabolisiert, wobei *trans*-9,10-Phenanthrendihydrodiol gebildet wird. Der erste Schritt, katalysiert durch eine Cytochrom P-450-Monooxygenase, bildet ein Arenoxid. Der zweite Schritt, katalysiert durch eine Epoxidhydratase, bildet das *trans*-Dihydrodiol.

In der Studie von SUTHERLAND bildete *S. flavovirens* ein Phenanthrendihydrodiol, das ähnlich dem durch Säugetiere produzierten Dihydrodiol ist. Das CD-Spektrum des mikrobiell gebildeten Dihydrodiols wies darauf hin, dass der Metabolit eine 9S.10S-Stoffkonfiguration hatte. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass *S. flavovirens* Phenanthren in einer regio- und stereospezifischen Art metabolisiert und eine Verbindung produziert, wie sie auch für den Phenanthrenmetabolismus der Säugetiere typisch ist.

Im allgemeinen ist Sauerstoff direkt in den initialen Angriff auf aromatische Verbindungen involviert. Weil die Einführung von Hydroxylgruppen in das Molekül für den weiteren oxidativen Katabolismus notwendig ist, kann der initiale elektrophile Angriff durch die Oxygenasen der aeroben Bakterien ein limitierender Schritt für die Abbaurate werden. Die hydroxylierten Metabolite könnten entweder durch Neuordnung des Arenoxids oder durch Dehydrierung eines Dihydrodiols entstehen. Eine direkte Hydroxylierung von Phenanthren durch Monooxygenasen ist auch denkbar.

Die Metabolisierung von Fluoranthen wurde bereits für andere Bakterien beschrieben [WEISSENFELS et al., 1991; KELLEY et al., 1993; LAMBERT et al., 1994; TIEHM UND FRITZSCHE, 1995; REHMANN et al., 2001]. Über die Metabolisierung von Fluoranthen durch Streptomyceten wurde bis dato in der Literatur nicht berichtet. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Produkte des Metabolismus von Fluoranthen durch Streptomyceten 1-, 3- und 8-Hydroxyfluoranthen wurden somit zum ersten Mal für Streptomyceten nachgewiesen. Die identifizierten Metabolite geben jedoch keinen Aufschluss über eine mögliche weitere Metabolisierung von Fluoranthen durch die verwendeten Streptomyceten.

Nach REHMANN (1995) vermögen u.a. Vertreter der Gattungen *Mycobacterium*, *Rhodococcus* und *Pseudomonas* mit Pyren als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Eine Verwertung von Pyren als alleinige Kohlenstoffquelle durch Streptomyceten wurde zum ersten Mal von PETERS (1999) beschrieben. Als Hauptmetabolit wurde dabei 1-Hydroxypyren nachgewiesen. PETERS wertet den Nachweis von 1-Naphthol als Hinweis auf eine weitere Verwertung von 1-Hydroxypyren via 1-Naphthol. Bei einigen der in der vorliegenden Arbeit isolierten Streptomyceten wurde ebenfalls 1-Hydroxypyren als Pyrenmetabolit nachgewiesen, allerdings nur, wenn eine zusätzliche Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurde. Ein Pyrenmetabolismus über ligninolytische Enzyme, wie bei Pilzen, wäre daher für diese Streptomyceten denkbar.

Bei der Metabolisierung von PAK durch Streptomyceten gibt es einige grundlegende Unterschiede zu der durch andere Bakterien. In der vorliegenden Arbeit konnte die Transformation der PAK ohne den Zusatz einer Energie- und Kohlenstoffquelle nicht bewerkstelligt werden. Hier tritt eindeutig das Phänomen Kometabolismus zu Tage. Außerdem beginnt die Transformation von PAK bei vielen Bakterien mit einer Dioxygenierung, die mit Hilfe von Dioxygenasen ausgeführt wird [KANALY UND HARAYAMA, 2000]. Wie der Nachweis von *trans*-Dihydrodiolen zeigt, gehen dagegen Streptomyceten mit Hilfe von Monooxygenasen in die erste Phase der Transformation von PAK.

Diese Monooxygenasen bilden vermutlich Teile eines Cytochrom P-450-Enzymsystems, das eine zentrale Rolle in der Oxidation von xenobiotischen und endogenen natürlichen Verbindungen spielt [O' KEEFE UND LOPPER, 1996]. Eine bemerkenswerte charakteristische Eigenschaft der Cytochrom P-450-Enzymsysteme, die im xenobiotischen Metabolismus involviert sind, ist die Induzierbarkeit durch ihre Substrate. Diese Induzierbarkeit führt manchmal zur Akkumulation von großen Mengen von ihnen und stellt so sicher, dass sogar schwache Induktoren vollständig metabolisiert werden.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass verschiedene Aktinomyceten, insbesondere *Streptomyces spp.*, Xenobiotika mit Hilfe von Cytochrom P-450-Enzymen metabolisieren. Die Cytochrome P-450 der Streptomyceten weisen dabei eine verhältnismäßig breite Substratspezifität auf [O' KEEFE UND HARDER 1991]. In einer Studie von O' KEEFE et al. (1988) konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass PAK Cytochrom P-450-Aktivität in *Streptomyces spp.* induzieren können, wohingegen andere Verbindungen,

wie Veratrol und Guaiakol in *S. setonii*, Sulfometuronmethyl und Chlorometuronethyl in *S. griseolus* und Genistein in *S. griseus*, dazu in der Lage waren. So wurde die Hydroxylierung von Naphthalin zu 1-Naphthol und von Biphenyl zu 2- und 4-Hydroxybiphenyl mit Extrakten aus Genistein-induzierten Kulturen von *S. griseus* demonstriert. In der o. g. Studie von O'KEEFE (1988) wurde zudem gezeigt, dass die lösliche Proteinfraction von *S. griseolus* mindestens drei Cytochrom P-450-Enzymsysteme besitzt.

Eine weitere Beobachtung der vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, dass alle Versuche zur Untersuchung der Transformation von PAK durch Streptomycceten nur dann erfolgreich waren, wenn eine zusätzliche Energie- und Kohlenstoffquelle (Glucose) in den Flüssigkulturen anwesend war. Die isolierten Stämme konnten mit Phenanthren, Fluoranthren und Pyren als alleinigen Energie- und Kohlenstoffquellen nicht wachsen. Die transformierenden Streptomycceten hatten demnach keinerlei Nutzen aus der Transformation der PAK erzielt. Dagegen bildeten sich "dead-end"-Produkte, die wahrscheinlich nicht in CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O umgewandelt werden können.

Die Bedeutung kometabolischer Transformationen organischer Schadstoffe in der Umwelt wurde erstmals erkannt, als die Isolation der für bestimmte Umsetzungen verantwortlichen Organismen durch traditionelle mikrobiologische Einzelsubstrat-Anreicherungstechniken erfolglos blieb. Kometabolismus wird heute als einer der wichtigsten Mechanismen angesehen, die von Mikroorganismen benutzt werden, um aromatische und chlorierte aliphatische Schadstoffe in aeroben wie anaeroben Milieus zu transformieren [MAPLESTONE et al., 1992].

Die kometabolische Transformation einer xenobiotischen Verbindung erzeugt, wie bereits angedeutet, oft reaktive Metabolite, wie Epoxide, Dihydrodiole, aromatische Diole, aromatische Amine oder zumindest Produkte, die leichter zu oxidieren sind als die ursprünglichen Chemikalien. Einerseits können spontane physikalische oder chemische Reaktionen, wie Adsorptions-, Kopplungs- oder Polymerisierungsreaktionen, diese reaktiven Metabolite von einer möglichen Transformation fernhalten. Andererseits kann die weitere chemische oder biologische Transformation die Substanzen, die mit den Xenobiotika verbunden sind, eliminieren, so dass zumindest ein Teil der xenobiotischen Verbindung durch bestimmte Mitglieder der Population mineralisiert und verwertet werden kann.

Beispielweise ist fungischer Kometabolismus ein Prozess, von dem bekannt ist, dass er den biologischen Abbau von PAK erhöhen kann [QIU UND MCFARLAND, 1991]. Die entstehenden Produkte können mit der organischen Materie des Bodens polymerisieren und gebundene Schadstoff-Huminstoff-Rückstände (Humifizierung) bilden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse im Labormaßstab sind bei Überführung in die Praxis mit folgenden allgemeinen Überlegungen zu verknüpfen:

- In den meisten natürlichen Systemen, so auch im Boden, leben viele verschiedene Mikroorganismen auf engstem Raum zusammen. Der Abbau eines Xenobiotikums hängt dabei oft von der Aktivität mehrerer Mikroorganismen ab, obgleich hintereinander folgende Reaktionen auch von nur einem einzelnen Mitglied der mikrobiologischen Gemeinschaft ausgeführt werden können [ALLARD UND NEILSON, 1997]. Die initiale Oxidation durch Streptomycceten könnte daher Substrate für andere Mikroorganismen liefern, welche die Mineralisation der PAK-Metabolite bis hin zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O bewältigen könnten.
- Es ist sehr selten, dass in einem natürlichen Ökosystem nur ein einzelnes Substrat zur Verfügung steht. Es ist deshalb wichtig zu untersuchen, wie die Regulation der Abbauege durch verschiedene Substrate beeinflusst werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass der mikrobielle Abbau eines der drei eingesetzten PAK durch die Anwesenheit der anderen unterdrückt wurde. Dabei spielte es keine Rolle, welcher PAK im Anzuchtmedium anwesend war. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von PETERS (1999) überein. Die Metabolisierung eines PAK scheint bei den hier isolierten Streptomycceten speziesabhängig zu sein.
- Schließlich gibt es keine Organismen oder Gruppen von Organismen, die universal anwendbar für eine biologische Sanierung sind. Streptomycceten jedoch sind metabolisch versiert und daher fähig, ein breites Spektrum von Substraten abzubauen.

Mehrere Studien zur Abschätzung der Fähigkeit von Streptomycceten, Schadstoffe wie Pestizide, organochlorine Verbindungen und PAK abzubauen oder zu transformieren, wurden in der Literatur beschrieben [FADULLON et al., 1998]. Streptomycceten kön-

nen mit Hilfe ihres invasiven Myzels Böden penetrieren und so den Bedarf an Durchmischung minimieren. Diese Eigenschaft, in Verbindung mit ihrer enzymatischen Ausstattung sowie der Fähigkeit, schnell auf semiselektiven Substraten zu wachsen, macht die Gattung *Streptomyces* zu einem attraktiven Organismus für die biologische Sanierung von kontaminierten Böden. Außerdem sind Streptomyceten natürliche Bewohner des Bodens, die unter den ungewöhnlichsten Zuständen, die in der Bodenmatrix angetroffen werden, überleben und sich vermehren können. Aus den oben genannten Gründen könnte diese Bakteriengruppe erfolgreich beim Abbau von PAK im Boden eingesetzt werden.

### **3.2.6.2 Abbau von PAK in Anwesenheit von Huminsäuren**

Eines der Hauptprobleme beim biologischen Abbau von Schadstoffen stellt ihre Alterung dar [GUERIN, 2000]. Durch die Alterungsmechanismen werden organische Verbindungen mit polymerischen Bestandteilen der Bodenmatrix, wie Huminstoffen, verbunden. Dies führt dazu, dass die anfänglich monomeren, organischen Verbindungen nicht länger für die für den Abbau in Frage kommenden Mikroorganismen zugänglich sind. Auswertungen der Fähigkeit zum biologischen Abbau, die dieses Phänomen nicht in Betracht ziehen, können die Persistenz einer Verbindung stark unterschätzen. Ein kritischer Punkt dabei ist der Grad an Reversibilität dieser Prozesse, da eine langsame Freisetzung z.B. durch die Einwirkung von Mikroorganismen oder durch Auswaschen Xenobiotika in die wässrige Phase einleiten und dadurch das Grundwasser kontaminieren könnte.

GAUTHIER et al. (1987) haben berichtet, dass das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen PAK und der wässrigen Phase nicht nur eine Funktion der Konzentration der gelösten organischen Materie, sondern auch eine Funktion ihrer Qualität ist. Dabei ist ihre zugrunde liegende chemische Zusammensetzung unzweifelhaft ein elementarer Faktor. Die meisten chemischen Eigenschaften der natürlichen Huminstoffe, wie z. B. das Verhältnis C:H:N oder die Aromatizität, spielen dabei eine große Rolle. Außer den chemischen Eigenschaften kann sich auch die Struktur der Huminstoffe auf die Wechselwirkungen zwischen PAK und organischer Materie auswirken. Dabei wird die Struktur der Huminstoffe kontrolliert durch:

- die Anzahl der Bindungsstellen und den Grad der Ionisation der Karboxylate und Hydroxylstellen,
- die Konfiguration in Lösung und
- die Dichte, Verteilung und Reaktivität der Hydroxylstellen der Oberfläche sowie weitere mikrotopographische Besonderheiten der Oberfläche.

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebene Bildung von PAK-Metaboliten blieb bei Streptomyceskulturen aus, denen Huminsäuren beigefügt waren. Keiner der zuvor beschriebenen und identifizierten Metaboliten konnte HPLC-analytisch nachgewiesen werden.

In der Literatur werden sowohl positive als auch negative Einflüsse von Huminsäuren auf den PAK-Abbau beschrieben. SHIMP UND PFAENDER (1985) fanden, dass Huminsäuren alleine oder in Verbindung mit einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle, wie Aminosäuren, nachteilige Effekte auf die Fähigkeit der an Humine adaptierten mikrobiellen Gemeinschaft hatten, m-Kresol, m-Aminophenol und p-Chlorophenol abzubauen. Die Verminderung in der Schadstoffaufnahme stand dabei in Korrelation mit einer abnehmenden Anzahl von Schadstoff abbauenden Bakterien. Jedoch klärt dieser Befund weder den zugrunde liegenden Mechanismus, der die Reduktion im biologischem Abbau herbeigeführt hat, noch wie Humine die abbauenden Bakterien hemmen.

Für die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit, nämlich den fehlenden Abbau von PAK in Anwesenheit von Huminsäuren, gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

1. JONES UND TILLER (1999) beschreiben anhand von Ergebnissen aus  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen ein großes, gewundenes, humisches, makromolekulares Modellmolekül mit hydrophoben aliphatischen Abschnitten. In diesem Molekül sind mögliche Bindungsorte für hydrophobe organische Verbindungen vorhanden. Experimente wurden durchgeführt, deren Ergebnisse die Vorstellung einer gewundenen humischen Struktur unterstützen. Dieses Molekül könnte seine Konformation so ändern, dass es sich bei höheren pH-Werten und niedriger Elektrolytkonzentration ausdehnt. SCHLAUTMAN UND MORGAN (1993) zeigten Interaktionen von drei verschiedenen PAK mit Huminsäuren und unterstützten ein Modell des humischen Materials als eine lückenartige Struktur mit spezifischen Affinitätszonen für

hydrophobe Substanzen. Eine solche Struktur der Huminsäuremoleküle könnte dafür verantwortlich gewesen sein, dass die PAK für die Streptomycceten nicht verfügbar waren.

Einer der wichtigsten Parameter in der Chemie aquatischer Huminsäuren ist der pH-Wert der Lösung [RAGLE et al., 1997]. Bei hohen pH-Werten wird erwartet, dass das Huminsäuremolekül größtenteils deprotoniert und sich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung in einer gedehnten Konfiguration befindet. Falls die negativen Standorte neutralisiert werden, werden die intramolekularen Abstoßungen vermindert und das Huminsäuremolekül kann sich winden oder falten und dabei hydrophobe Taschen oder pseudomizellare Regionen bilden, in denen sich PAK verteilen können.

Die Huminsäuren könnten die PAK also während der Versuche adsorbiert und so den Metabolismus durch die Bakterien verhindert haben. In einer Studie von ORTEGA-CALVO et al. (1997) wurde die Menge an gelöstem Phenanthren in Anwesenheit von gelöster organischer Materie vermindert. Eine starke Sorption von Phenanthren an der gelösten organischen Materie und eine Verminderung des biologischen Abbaus wurden beobachtet. Bei einem Feldversuch in der gleichen Studie konnte sogar nach Zugabe von Nährstoffen und PAK-abbauenden Bakterien in einem kontaminierten Boden aus einer Kokerei, der einen hohen Prozentsatz an organischer Materie enthielt, kein biologischer Abbau beobachtet werden. In einer Studie von LAOR et al. (1999) dagegen waren die Mineralisationsraten in An- und Abwesenheit von Huminsäuren fast gleich.

2. Die adsorptive Kapazität der Humine könnte außerdem die Verfügbarkeit von Mikronährstoffen des Mediums für die Bakterien reduziert haben. Huminsäuren sind bekanntermaßen in der Lage, eine breite Vielfalt von anorganischen Ionen zu adsorbieren. Dass die Adsorption der Ionen vielleicht vitale Mikronährstoffe immobilisiert und das Wachstum und die Aktivität der Mikroorganismen unterdrückt, scheint jedoch keine ausreichende Erklärung für die beobachteten Effekte zu sein. Der Bedarf an Spurenelementen wird im Medium mehrfach abgedeckt. In der natürlichen Umwelt überleben Streptomycceten bei

Anwesenheit von Mengen an Spurenelementen, die weit unter denen der eingesetzten Kulturmedien lagen.

3. Eine weitere Möglichkeit, die den hemmenden Effekt der Huminsäuren erklären könnte, ist die Anwesenheit von an den Huminsäuren gebundenen Schwermetallen. Diese könnten in den Kulturüberstand freigesetzt worden sein und toxische/inhibitorische Effekte auf die Aktivitäten der Bakterien ausüben, z. B. durch Enzymhemmung [KANDELER et al., 1998]. In der Literatur ist der Einfluss von Schwermetallen auf mikrobielle Aktivitäten unterhalb der gültigen Grenzwerte beschrieben [FLIESSBACH UND REBER, 1991]. Deshalb könnte die Desorption von sogar kleinen Mengen von Metallen in den Kulturüberständen ausreichend gewesen sein, um den PAK-Metabolismus in den Kulturen zu beeinträchtigen.
4. Letztlich gibt es Anhaltspunkte in der Literatur, dass Huminsäuren die Aktivitäten bakterieller Enzyme verändern können [SHIMP UND PFAENDER, 1985]. So wurde berichtet, dass sowohl Humin- als auch Fulvinsäuren die Aktivitäten einer Anzahl von Proteasen unterdrücken. Solche Hemmungen könnten aufgrund der Bindung des Enzyms an die Huminsäuremoleküle irreversibel sein und sonach die Fähigkeit der Streptomyceten, PAK zu kometabolisieren, hindern.

Aus den oben beschriebenen Möglichkeiten der Blockade des PAK-Metabolismus durch Huminstoffe scheint für die vorliegende Arbeit die der Adsorption von PAK in hydrophoben oder pseudomizellaren Regionen am wahrscheinlichsten zu sein. Diese Aussage muss allerdings durch weitere Untersuchungen unterstützt werden.

Wie bereits erwähnt, sind in der Literatur auch positive Einflüsse von Huminsäuren auf den Abbau von PAK beschrieben worden [KOPINKE et al., 2001]. ORTEGA-CALVO UND SAIZ-JIMENEZ (1998) stellten z.B. fest, dass die Anwesenheit von gelöster humischer Materie, übereinstimmend mit früheren Studien, eindeutig zu einer Zunahme der Wasserlöslichkeit von Phenanthren führte. Jedoch konnte eine solche Beobachtung in der vorliegenden Arbeit nicht gemacht werden.

### 3.2.6.3 Bildung von Konjugaten und PAK-Abbau

Als weitere mögliche Produkte der Transformation von PAK durch Streptomyceten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Sulfat-, Glukosid- und/oder Glucuronidkonjugate in Erwägung gezogen. Ihre Bildung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es ist es daher möglich, dass die isolierten Streptomyceten die enzymatische Ausstattung für diese Umwandlungsprozesse nicht besitzen.

Angaben aus Untersuchungen mit Pilzen lassen die Möglichkeit offen, dass Streptomyceten in der Lage sein könnten, phenolische PAK-Derivate zu Konjugaten zu transformieren. In einer Studie von LANGE et al. (1994) konnte *Crinipellis stipitaria* Pyren zu 1-Pyrenylsulfat und zu *trans*-4,5-Dihydro-4,5-Dihydroxypyren metabolisieren. Außerdem wurden kleine Mengen von 1-Hydroxypyren, dem wahrscheinlichen Vorläufer des Sulfatkonjugationsprodukts, detektiert. 1-Hydroxypyren wurde in der vorliegenden Arbeit als Pyrenmetabolit identifiziert. POTHULURI et al. (1996) und CERNIGLIA (1992) konnten bei ihren Studien mit *Cunninghamella elegans* auch Sulfatkonjugate von Benzo[e]pyrenol nachweisen. Bei Streptomyceten wurde beim Phenanthrenmetabolismus durch *S. flavovirens* ein Dihydrodiol identifiziert, das dem Dihydrodiol des Phenanthrenmetabolismus von Säugetieren gleich [SUTHERLAND et al., 1990].

Die o. g. Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Transformation von PAK zu Glucuronid-, Glukosid- und Sulfatkonjugaten und ihr Abbau durch Pilze für die Detoxifizierung und Elimination der PAK in der Umwelt wichtig sein können [CERNIGLIA et al., 1982; CERNIGLIA, 1985]. Untersuchungen, die endgültig eine solche Aussage auch für Streptomyceten erlauben, sind weiterhin notwendig.

### 3.3 Untersuchungen zur Verwertung von Huminsäuren durch die isolierten Streptomycceten

Ziel des folgenden Abschnitts dieser Arbeit war es, den Abbau von Huminstoffen durch die aus den PAK-kontaminierten Böden isolierten Streptomycceten zu untersuchen. Aus den Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf die Rolle der isolierten Streptomycceten bei der Freisetzung dieser Schadstoffe aus dem Boden gewonnen werden.

#### 3.3.1 Abbau von Huminsäuren in Festmedien

Zunächst wurden Untersuchungen auf festen Medien (Huminsäure-Agarplatten) durchgeführt. Eine Entfärbung des durch Huminsäuren braun gefärbten Agars und die Bildung von Klarhöfen ist als Beweis für den Abbau der Huminsäuren zu werten. Es wurden Versuche sowohl mit kommerzieller als auch mit selbst isolierten Huminsäuren durchgeführt.

Das unter 2.2 beschriebene Huminsäuremedium (Medium 5) wurde unter Zusatz von 15 g/l Agar hergestellt. Es wurden zwei Systeme untersucht: die Verwertung von Huminsäuren mit und ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle (Glucose 1% (w/v)).

In Tabelle 10 sind die Beobachtungen nach drei Wochen Kultivierung zusammengefasst. Es sind nur die Isolate aufgeführt, die ein Verwertungspotential zeigten.

Tab. 10.: Bildung von Klarhöfen auf Huminsäure-Agarplatten, mit und ohne zusätzlicher Kohlenstoffquelle

Isolat	kommerziell bezogene Huminsäure	isolierte Huminsäure
	ohne / mit C-Quelle	ohne / mit C-Quelle
AP 1	- / -	- / +
AP 10	- / -	- / +
AP 11	- / -	- / +
AP 12.1	- / -	+ / +
AP 13	- / -	- / +

## Fortsetzung Tabelle 10

AP 14	- / -	- / +
AP 15	- / -	- / +
AP 16.1	- / -	+ / +
AP 17	- / -	- / -
AP 18.1	- / -	+ / +
AP 19	- / -	- / +
AP 20	- / -	- / +
AP 22	- / -	- / +
AP 23	- / -	- / +
KR 13	- / -	- / +
KR 15	- / -	- / +
<i>S. viridosporus</i>	- / -	+ / +
<i>S. griseus</i>	- / -	+ / +

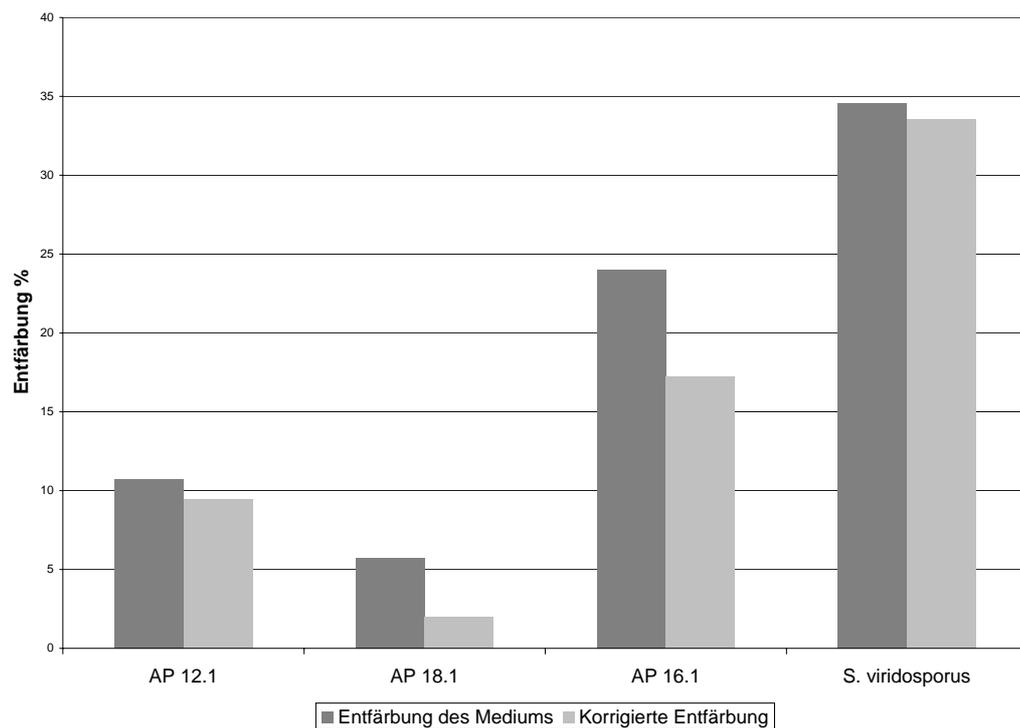
Wie aus der Tabelle 10 hervorgeht, konnte lediglich ca. ein Drittel (mit zusätzlicher C-Quelle) und ein Zehntel (ohne zusätzliche C-Quelle) der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Streptomyceten eindeutige Klarhöfe auf den Agarplatten bilden. Diese Streptomyceten besitzen folglich ein Abbaupotential für Huminsäuren. Die kommerzielle Huminsäure wurde von den Bakterien nicht erkennbar angegriffen. Die isolierten Huminsäuren dagegen konnten in Anwesenheit von Glucose umgewandelt werden. Drei der Isolate (AP12.1, AP16.1 und AP18.1) und die beiden Referenzstämme konnten auf den Huminsäure-Agarplatten Klarhöfe ohne Zusatz einer weiteren Kohlenstoffquelle bilden.

### 3.3.2 Abbau von Huminsäuren in Flüssigkulturen

Weitere Versuche zur Abbauaktivität der Isolate wurden in Flüssigkultur nach den Angaben in 2.8.2 durchgeführt. Dabei wurde der Abbau der Huminsäuren qualitativ über die Entfärbung des Mediums bestimmt.

Die aufgeführten Ergebnisse betreffen Versuche mit den Isolaten, die entsprechend der bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowohl die Modellsbstanz Phenanthren, Pyren und Fluoranthren als auch Huminsäuren (ko)metabolisch transformieren konnten.

Eine Entfärbung des Kulturmediums konnte bereits nach ca. 24 Stunden beobachtet werden. Nach 144 Stunden Inkubation wurde das Medium zwischen 5% und 24% (34,5% mit dem Referenzstamm) entfärbt. Die beobachtete Entfärbung beruht jedoch teilweise auf der Adsorption der Huminsäuren an die Streptomyces. Ein korrigiertes Bild der Entfärbung und somit des Abbaus der Huminsäuren lieferte eine Filtration und anschließende Behandlung der Flüssigkulturen nach 2.8.2.



**Abb. 33.:** Entfärbung des Huminsäuremediums durch die Aktivität diverser Streptomyces nach 144 Stunden Inkubation

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse aus den Versuchen mit Flüssigkulturen zusammengefasst.

Tab. 11.: Abbau von Huminsäuren durch die isolierten Streptomycceten; Entfärbung des Mediums vor und nach der Behandlung

<b>Isolat</b>	<b>Entfärbung in %</b>	<b>Korrigierte Entfärbung in %</b>
AP 1	20	18
AP 10	ne	ne
AP 11	ne	ne
AP 12.1	11	10
AP 13	5	1
AP 14	3	-
AP 15	5	1
AP 16.1	24	17
AP 17	ne	ne
AP 18.1	4	-
AP 19	6	ne
AP 20	3	-
AP 22	6	ne
AP 23	8	3
KR 13	15	6
KR 15	13	8
<i>S. viridosporus</i>	34	33
<i>S. griseus</i>	5	3

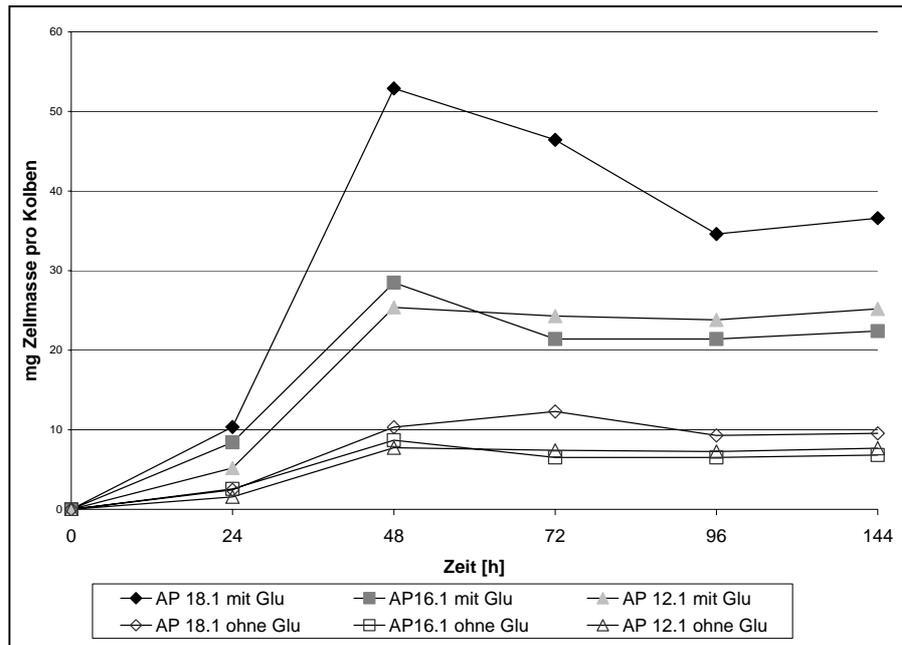


Abb. 34.: Wachstum der isolierten Streptomyceten in huminsäurehaltigen Flüssigkulturen in An- und Abwesenheit von Glucose (2,5 mg/l)

In Abbildung 34 ist das Wachstum der drei Isolate AP12.1, AP16.1 und AP18.1 im Huminsäuremedium mit und ohne Zusatz von Glucose zu sehen. Alle drei untersuchten Isolate zeigten in den Ansätzen mit Glucose ein stärkeres Wachstum. AP18.1 wuchs am besten, dagegen waren zwischen AP12.1 und AP16.1 geringe Unterschiede im Wachstum zu beobachten.

Vergleicht man die Abbildungen 33 und 34, stellt man fest, dass, obwohl AP18.1 das stärkste Wachstum von allen drei Isolaten zeigte, dieser Stamm die niedrigste Aktivität hinsichtlich der Entfärbung des Mediums aufwies. Dagegen zeigte AP16.1 ein viel geringeres Wachstum als AP18.1, war jedoch wesentlich aktiver. Das Wachstum der drei Isolate korreliert also nicht mit der Entfärbung des Mediums.

### 3.3.3 Diskussion der Versuche zum Abbau von Huminsäuren

Einen Aspekt der vorliegenden Arbeit stellen Untersuchungen des Potentials der isolierten Streptomycceten zum Abbau von Huminsäuren im Hinblick auf eine eventuelle Freisetzung von an Huminsäuren gebundene Schadstoffe dar. Die Beobachtung aus den vorherigen Untersuchungen, dass einige der isolierten Streptomycceten PAK transformieren können, sollte außerdem mit dem hier untersuchten Abbau von Huminsäuren in Verbindung gebracht und diskutiert werden.

Zur Kontrolle des Abbaus von Huminsäuren durch die isolierten Streptomycceten wurde die Entfärbung von sowohl festen als auch flüssigen Huminsäuremedien untersucht [MONIB et al., 1981; DARI et al., 1995; FILIP et al., 1998]. Da Huminstoffe unter Laborbedingungen Mikrobewachstum nur sehr begrenzt fördern, wenn sie als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt werden, ist es bei Untersuchungen dieser Art üblich, eine zusätzliche Kohlenstoffquelle einzusetzen. Etwa ein Drittel aller isolierten Streptomycceten konnte Huminsäuren unter Zugabe einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle abbauen. Von diesen Isolatcn konnte dagegen lediglich ein Drittel Huminsäuren ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle abbauen.

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Huminsäure-Agarplatten haben ferner im Bezug auf den Abbau von Huminsäuren gezeigt, dass sich die kommerziell bezogene Huminsäure signifikant von der selbst isolierten unterscheidet. Im allgemeinen ist es aufgrund der Unterschiede innerhalb der natürlichen organischen Materie (im Gehalt von Kohlenstoff und Sauerstoff, in der Aromatizität, in der Verteilung der funktionellen Gruppen, in der durchschnittlichen molekularen Größe, in der Azidität, usw.) schwierig, die Ergebnisse von Studien zu vergleichen, in denen verschiedene Huminstoffe eingesetzt werden [MURPHY UND ZACHARA, 1995]. Deshalb sollte bei realitätsorientierten Untersuchungen dieser Art neben kommerziell bezogenen Huminstoffen auch standort-spezifisches, humisches Material berücksichtigt werden.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, beschrieben KONT-CHOU UND BLONDEAU (1992) den Abbau von Huminsäuren in Flüssigkulturen von *S. viridosporus*. Die Autoren nahmen dabei die Entfärbung des Kulturmediums, die Veränderung des Molekulargewichts der Huminsäuren und die Produktion von  $^{14}\text{CO}_2$  aus

<sup>14</sup>C-Melanoidin als Beweis für den Abbau. In dieser Studie konnte ebenfalls kein Netto-Huminsäureabbau ohne Bindung der humischen Moleküle an die Bakterienzelle nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten Veränderungen der optischen Dichte in den Flüssigkulturen beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine Umwandlung sein. Huminsäuren bestehen aus einer Mischung verschiedener Verbindungen mit variabler Resistenz gegen biologischen Abbau. Die beobachteten Änderungen an der Farbe der Flüssigkulturen oder an der optischen Dichte widerspiegeln jedoch nicht unbedingt eine tatsächliche Abnahme der Menge an Huminsäuren.

Die Untersuchungen mit den Huminsäure-Flüssigkulturen zeigten, dass die Isolate in der Lage waren, während des Abbaus von Huminsäuren zu wachsen. Dabei war das Wachstum in den Kulturen ohne Glucose geringer als in Anwesenheit von Glucose. Das Bakterienwachstum in den Kulturen ohne Glukose nur auf den Abbau von Huminstoffen zu begründen, wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass Huminstoffpräparate mit anderen Kohlenstoffquellen oder durch den Eintrag geringer Mengen von Nährstoffen verunreinigt sind. Diese Nährstoffe werden wahrscheinlich zuerst oder alleine von den Mikroorganismen verwertet. Das beobachtete geringere Bakterienwachstum könnte auf Grund einer Beteiligung von extrazellulären Enzymen, wie Zellulasen, Xylanasen und Esterasen, erklärt werden, die durch die Streptomyceten freigesetzt wurden. Diese Enzyme könnten die Assimilation von für Bakterien leicht verfügbaren nichtaromatischen Fraktionen an der Peripherie der Huminmoleküle ermöglicht haben.

Eine weitere interessante Beobachtung in diesen Versuchen war, dass die Entfärbung des Huminsäuremediums durch das Isolat AP18. 1 fünfmal geringer ausfiel, obwohl AP 18.1 dreimal mehr Zellmasse als das Isolat AP16.1 bildete. Dieses Ergebnis zeigt, dass für diese beiden Isolate keine Korrelation zwischen Wachstum und Entfärbung des Huminsäuremediums besteht. Die Annahme, dass die eine große Menge an Huminstoff-abbauenden Mikroorganismen nicht gleich einen effektiveren Huminstoffabbau bedeutet, liegt nahe, müsste jedoch durch weitere Versuche untermauert werden.

Die o. g. Beobachtungen zum Abbau von Huminsäuren durch einige der isolierten Streptomyceten legen nahe, dass die Anwesenheit von Streptomyceten das Schicksal

von in der organischen Substanz des Bodens festgelegten organischen Schadstoffen beeinflussen kann. Organische Schadstoffe, die in den Boden gelangen, werden reversibel oder irreversibel in der organischen Matrix festgelegt. Sie können dabei im dreidimensionalen organisch-mineralischen Komplex der organischen Materie der Böden eingeschlossen oder in das hydrophobe Innere von mizellartigen Huminaggregaten oder in den Mikroporen von Tonmineralien eingeschlossen werden [GAUTHIER et al., 1987; AMADOR UND ALEXANDER, 1988; WEISSENFELS et al., 1992; ENGBRETSON UND WANDRUSZKA, 1994; MAHRO et al., 1994; ESCHENBACH, 1995; MCGRODDY et al., 1996; SCOW, 1997; WAIS, 1998; BOGAN et al., 1999; NORTHCOTT UND JONES, 2001]. Bleiben die organischen Schadstoffe länger im Boden, nehmen ihre Desorptionsraten mit der Zeit ab.

Als ein Ergebnis dieser Wechselwirkungen mit der organischen Bodensubstanz entstehen nicht-extrahierbare Rückstände, die eine abnehmende Verfügbarkeit zur Extraktion oder zum biologischen Abbau vorweisen [WHITE et al., 1999]. Die Bildung von gebundenen Rückständen aus Schadstoffen und aus Huminstoffen hat demnach Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit, auf die Toxizität und auf den Transport der Schadstoffe im natürlichen Milieu [RICHNOW et al., 1997]. Einige typische Metabolite von PAK, die an Huminsubstanzen aus Flüssen durch Esterverknüpfungen chemisch gebunden waren, konnten in der Studie von RICHNOW identifiziert werden,.

Der hier beschriebene Abbau von Huminsäuren durch die isolierten Streptomyces könnte folglich dazu führen, dass an Huminsäuren gebundene organische Schadstoffe wieder in die Umwelt freigesetzt werden. Somit können sie wieder bioverfügbar und biologisch aktiv werden. Sie können Teile der Nahrungskette oder die Eigenschaften des Bodens langfristig beeinflussen [JONES et al., 2000].

Die o.g. Ausführungen betrachten die Problematik der nicht-extrahierbaren Rückstände aus einer negativen Perspektive. Die Bindung von Schadstoffen an die organische Materie kann jedoch, zumindest vorübergehend, positive Effekte für die Umwelt haben. Es ist bekannt, dass eine reduzierte Tendenz eines organischen Schadstoffes zur chemischen Extraktion darauf hinweist, dass die Substanz eine geringe Tendenz hat, in die wässrige Phase im Boden einzutreten. Niedrige Extrahierbarkeit kann mit einer niedrigen Bioverfügbarkeit in Beziehung gesetzt werden. Auf diese Weise kann

die Bildung von gebundenen Rückständen als ein erster Schritt in Richtung Deaktivierung von Xenobiotika betrachtet werden, die ihren Endpunkt in der kompletten Inkorporation in die organische Materie des Bodens erfährt. Demnach kann eine erhöhte Bindung und Bildung von Rückständen organischer Schadstoffe als ein natürlicher Prozess verstanden werden, der in der mikrobiologischen Sanierung von Böden eingesetzt werden kann.

### **3.4 Ökotoxikologische Untersuchungen**

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das ökotoxikologische Verhalten von Einzelsubstanzen, Kulturüberständen und wässrigen Eluaten aus PAK-kontaminierten Böden bestimmt. Da das Umweltkompartiment Wasser den vorrangigen Pfad für die Verfrachtung der PAK vom Boden bis zu dem Ort einer möglichen Wirkung darstellt, wurden hier die Wirkungen auf aquatische Organismen (Daphnien und Leuchtbakterien) betrachtet. Diese Testsysteme integrieren alle schädlichen Wirkungen, die von einem Bodenmaterial ausgehen und liefern Informationen, die eine sinnvolle Ergänzung einer auf spezifische Schadstoffe ausgerichteten chemischen Analyse darstellen [DOTT et al., 2001].

#### **3.4.1 Bestimmung der Toxizität von Kulturüberständen**

Zunächst wurden Vorversuche zur Ermittlung des testrelevanten Wirkungsbereichs der Kulturüberstände durchgeführt. Tabelle 11 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der Vorversuche.

Die Daten in der Tabelle 12 und aus den Untersuchungen mit den Isolaten AP 12.1 und AP 16.1 zeigen, dass sich in beiden Testsystemen alle getesteten Kulturen im Komplexnährmedium als toxisch erwiesen. Auch Kontrollen ohne PAK und ohne Streptomyceten zeigten eine toxische Wirkung sowohl gegen Daphnien als auch gegen Leuchtbakterien.

Alternativ wurde der Ansatz verfolgt, ein definiertes Medium für diese Versuche einzusetzen. Dafür wurde Medium 1 mit Glucose (1% w/v) eingesetzt. Die Kulturüberstände dieser Ansätze erwiesen sich in den beiden Tests als ebenso toxisch. Die beobach-

tete Toxizität war allerdings nach 24 h geringfügig niedriger als die in den Ansätzen mit Komplexmedium.

Tab. 12.: Ergebnisse der ökotoxikologischen Voruntersuchungen von Kulturüberständen des Isolats AP18.1; Konzentration von Phenanthren: 0,5mg/ml

<b>Ansatz</b>	<b>Ergebnis des Leuchtbakterientests (Hemmung in %)</b>	<b>Ergebnis des Daphnientests, nach 24 h und nach 48 h</b>
AP18.1, Phenanthren, Medium 3	85	toxisch <sup>1</sup>
AP18.1, Medium 3	84	toxisch
Medium 3	66	toxisch
Medium 3, Phenanthren	67	toxisch
AP18.1, Phenanthren, Medium 1	78	toxisch
AP18.1, Phenanthren, Medium 1, Glucose	81	toxisch
Medium 1, Phenanthren, Glucose	74	toxisch
Medium 1, Glucose	78	toxisch

Da auch die Kulturüberstände der Ansätze im Glukosemedium toxisch waren, wurde in weiteren Vorabtests versucht, eine geeignete Kohlenstoffquelle und eine anwendbare Konzentration für weitere Untersuchungen zur Bestimmung der Toxizität von PAK-Kulturüberständen mit Streptomyceten zu finden. Eine Konzentration von Glucose, die einerseits die Produktion von PAK-Metaboliten erlaubte, andererseits nicht toxisch gegenüber den Testorganismen war, konnte jedoch nicht ermittelt werden. Die Versuche konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zum Abschluss gebracht werden.

<sup>1</sup> Toxisch bedeutet hier, dass alle Tiere schwimmunfähig waren.

### 3.4.2 Bestimmung der Toxizität von Einzelsubstanzen

Es wurden Toxizitätsbestimmungen ( $EC_{50}$ ) mit folgenden Substanzen durchgeführt: Phenanthren, Pyren, Fluoranthen und 1-Hydroxypyren.

Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der Toxizitätstests von einzelnen Substanzen sowie ausgewählte, aus der Literatur bekannte Werte zusammen [MEYER, 1999].

Tab. 13.: Bestimmung der Toxizität von Einzelsubstanzen

Substanz	Leuchtbakterientest, $EC_{50}$ (mg/l), Literaturwerte	Leuchtbakterientest, $EC_{20}$ (mg/l), 30 min	Daphnientest $EC_{50}$ (mg/l)
Fluoranthen	0,83 <sup>1</sup> ; 2,0 <sup>2</sup> ; 1,3 <sup>4</sup>	1,6	- <sup>7</sup>
Phenanthren	0,48 <sup>1</sup> ; 0,53 <sup>2,4</sup> ; 2,1 <sup>3</sup> ; 0,049 <sup>5</sup>	0,35	- <sup>7</sup>
Pyren	>500 <sup>6</sup>	- <sup>7</sup>	- <sup>7</sup>
1-Hydroxypyren		0,67	0,49

<sup>1</sup>: JOHNSON UND LONG (1998)

<sup>5</sup>: KAISER UND PALABRICA (1991)

<sup>2</sup>: JACOBS et al. (1993)

<sup>6</sup>: HAUSER et al. (1997)

<sup>3</sup>: AHLF (1998), zitiert aus MEYER 1999

<sup>7</sup>: keine reproduzierbaren Ergebnisse

<sup>4</sup>: MCCONKEY et al. (1997)

Sowohl zwischen den Literaturzitatzen als auch den gemessenen Werten ist keine Übereinstimmung erkennbar. Dies könnte an den unterschiedlichen Testkonditionen in den erwähnten Studien liegen. Ein anderer Grund für diese Beobachtung könnte eine unterschiedliche Inkubationszeit der Testorganismen mit den zu testenden Substanzen oder aber auch der Einsatz unterschiedlicher Lösungsvermittler sein. Während JOHNSON UND LONG, JACOBS sowie MCCONKEY et al. Dimethylsulfoxid eingesetzt haben, verwendete AHLF Methanol als Lösungsvermittler.

### 3.4.3 Bestimmung der Toxizität von Böden

Die PAK-kontaminierten Böden, aus denen die in den vorherigen Abschnitten eingesetzten Streptomyceten isoliert wurden, wurden hinsichtlich ihrer PAK-Belastung analysiert (vgl. 3.1.1.1). Dabei ergab sich folgendes Bild in Bezug auf die Kontamination der Böden mit PAK (Tabelle 14):

Tab. 14: Vergleich der PAK-Belastungen der eingesetzten Böden

Niedrige PAK-Belastung (ppm)			Hohe PAK-Belastung (ppm)					
MKW 1 (0,95)	<	MKW 2 (1,44)	<	UN (15.544)	<	GdF (57.825)	<	TF 48 (105.888)

Um den Einfluss der Streptomyceten auf die Toxizität dieser Böden zu bewerten, wurden Inokula des Isolats AP 18.1 den Bodenzubereitungen hinzugefügt (vgl. 2.10.2.1). Die Toxizität wurde über Toxizitätsmessungen von Bodeneluaten untersucht. Dazu wurden der Leuchtbakterien- und der Daphnientest eingesetzt (vgl. 2.10.2.2.). Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Inokula sowie Ansätze mit einem gering PAK-belasteten Boden<sup>2</sup>.

Die Böden wurden vor ihrem Einsatz sterilisiert (vgl. 2.10.2.1). Die Bodenansätze wurden über einen Zeitraum von ca. 10 Monaten inkubiert. In bestimmten Zeitabschnitten wurden pro Ansatz drei Proben entnommen, die aufbereitet und anschließend auf ihre Toxizität gemessen wurden. In den Abbildungen 35 bis 39 ist die Luminenzhemmung der wässrigen Bodeneluaten aus den verschiedenen Ansätzen dargestellt. Die hier dargestellten Daten sind Mittelwerte aus den jeweils drei entnommenen Proben.

<sup>2</sup> Hierzu wurde der Standardboden Kaldenkirchen eingesetzt. Bei diesem Boden handelt es sich um saure Braunerde aus Flugsand über Löß. Er lag in getrockneter und gesiebter Form vor. Er wurde von Herrn Dr. P. Schmitt-Kopplin (Institut für Ökologische Chemie, GSF) zur Verfügung gestellt [SCHMITT et al., 1997].

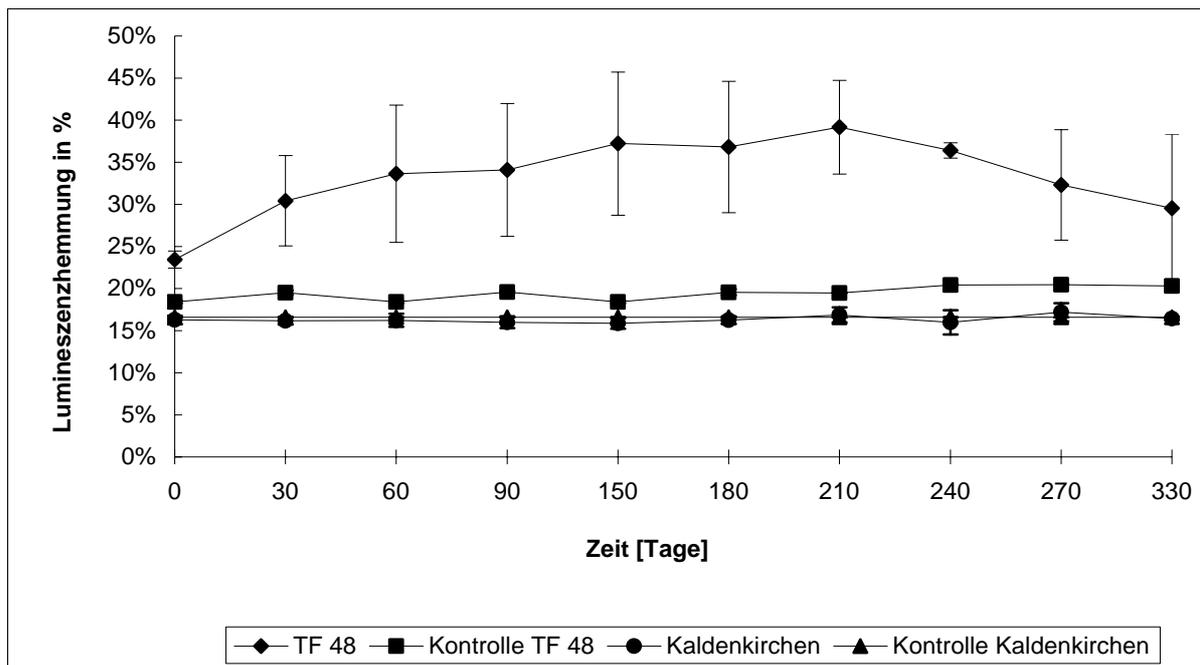
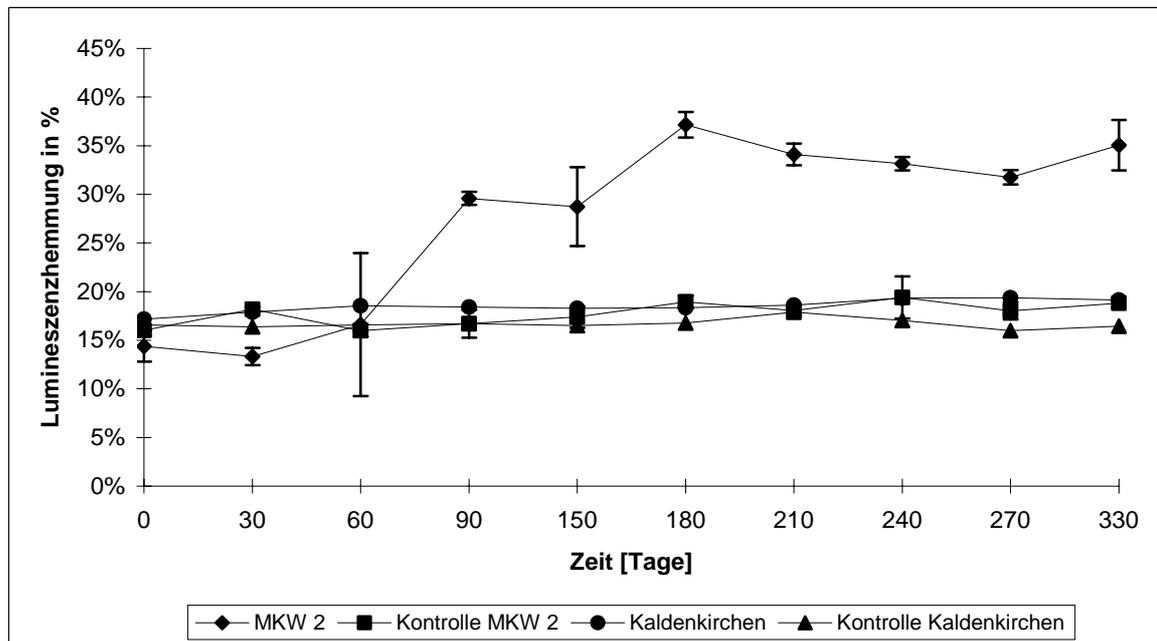


Abb. 35.: Lumineszenzhemmung der wässrigen Eluate aus dem Boden TF48 und aus der Kontrolle Kaldenkirchen; *TF 48*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle TF 48*: Ansatz ohne Bakterien; *Kaldenkirchen*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle Kaldenkirchen*: Ansatz ohne Bakterien; Fehlerbalken;  $\pm s$

Aus der Tabelle 14 ist zu entnehmen, dass der Boden TF 48 die höchste PAK-Belastung aufwies. Im Versuchsansatz mit dem Boden TF 48, dem das Isolat AP 18.1 hinzugefügt wurde, erreichte die am Anfang des Versuchs gemessene Hemmung (23 %) nach 210 Tagen den Höchstwert von 39 % (Abb. 35). Bei Abbruch des Versuchs lag die Hemmung bei 29 % und damit um ca. 6 % höher als zu Beginn der Messungen. Im Kontrollansatz ohne Bakterien wurden keine nennenswerten Änderungen der Lumineszenzhemmung beobachtet. In den Ansätzen mit dem Standardboden wurden ebenfalls keine Änderungen der Lumineszenzhemmung gemessen.

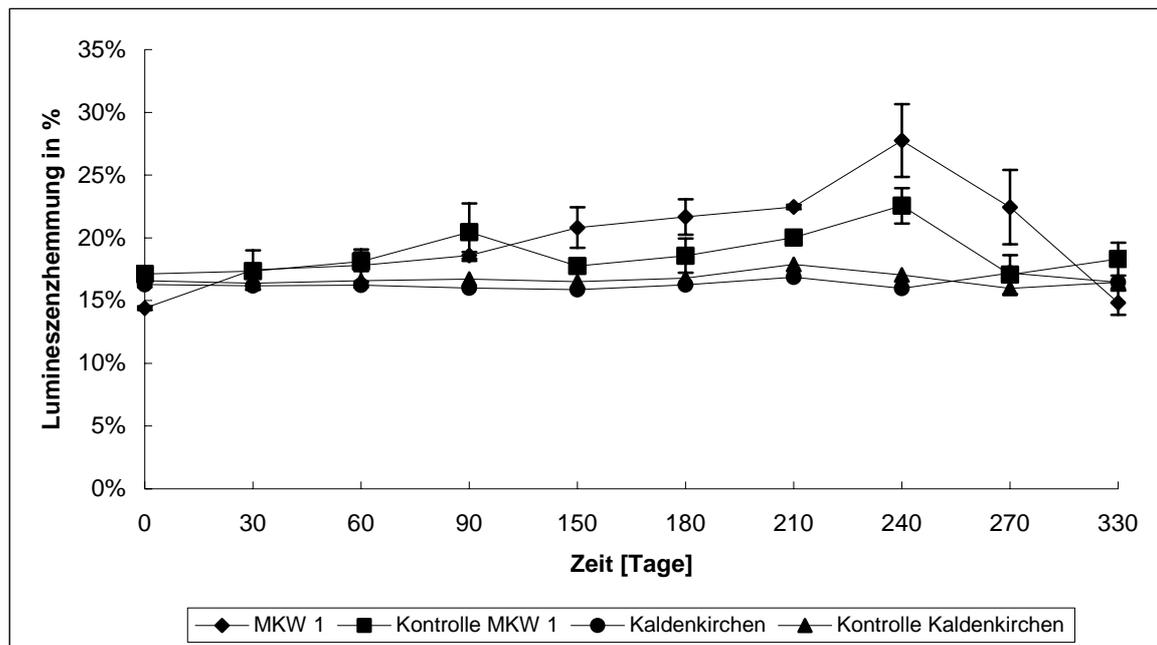
Aus dem Vergleich des Ansatzes mit Bakterien und der Kontrollansätze ist der Einfluss der Zugabe des Isolats AP 18.1 auf die Lumineszenzhemmung erkennbar: In den Ansätzen ohne Bakterien bleibt die Hemmung während des Versuchs beinahe konstant. Dagegen erhöht sich die Lumineszenzhemmung im Ansatz mit dem Isolat bis zu 16%.



**Abb. 36.:** Lumineszenzhemmung der wässrigen Eluate aus dem Boden MKW 2 und aus der Kontrolle Kaldenkirchen; *MKW 2*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle MKW 2*: Ansatz ohne Bakterien; *Kaldenkirchen*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle Kaldenkirchen*: Ansatz ohne Bakterien; Fehlerbalken:  $\pm$ s

Der Boden MKW 2 ist mit einer PAK-Belastung von 1,44 ppm kaum kontaminiert (Tab. 14.). Ähnlich wie im Ansatz TF 48 stieg beim Ansatz MKW 2 die Hemmung kontinuierlich an (Anfangswert 14 %) und erreichte einen Höchstwert von 37 % nach 180 Tagen (Abb. 36). Die Hemmung reduzierte sich jedoch im Laufe des Versuchs kaum und erreichte bei Abbruch einen Wert von 34 %. Damit lag die Lumineszenzhemmung beim Abbruch des Versuchs 20 % höher als am Anfang.

Auch im Boden MKW 2 ist der Einfluss der Zugabe des Isolats AP 18.1 auf die Lumineszenzhemmung erkennbar. Während im Ansatz ohne Bakterien die Hemmung bei nahe konstant bleibt, ist im Ansatz mit dem Isolat eine deutliche Zunahme der Hemmung erkennbar.



**Abb. 37.:** Lumineszenzhemmung der wässrigen Eluate aus dem Boden MKW 1 und aus der Kontrolle Kaldenkirchen; *MKW 1*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle MKW 1*: Ansatz ohne Bakterien; *Kaldenkirchen*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle Kaldenkirchen*: Ansatz ohne Bakterien; Fehlerbalken:  $\pm s$

Ähnlich wie der Boden MKW 2 ist der Boden MKW 1 kaum mit PAK belastet. Im Ansatz MKW 1 wurde eine leichte Erhöhung der Lumineszenzhemmung um ca. 6 % nach 150 Tagen beobachtet (Abb. 37). Die Hemmung nahm erneut um ca. 7 % nach 240 Tagen zu. Allerdings ging die Hemmung beim Abbruch des Versuchs auf 15 % zurück und war damit nahezu identisch mit dem Ausgangswert von 14 %.

Im Boden MKW 1 ist der Einfluss der Zugabe des Isolats AP 18.1 auf die Lumineszenzhemmung nicht so deutlich zu erkennen wie in den Böden TF 48 und MKW 2. Die Unterschiede in der Lumineszenzhemmung zwischen dem Ansatz ohne Bakterien und dem Ansatz mit dem Isolat sind marginal.

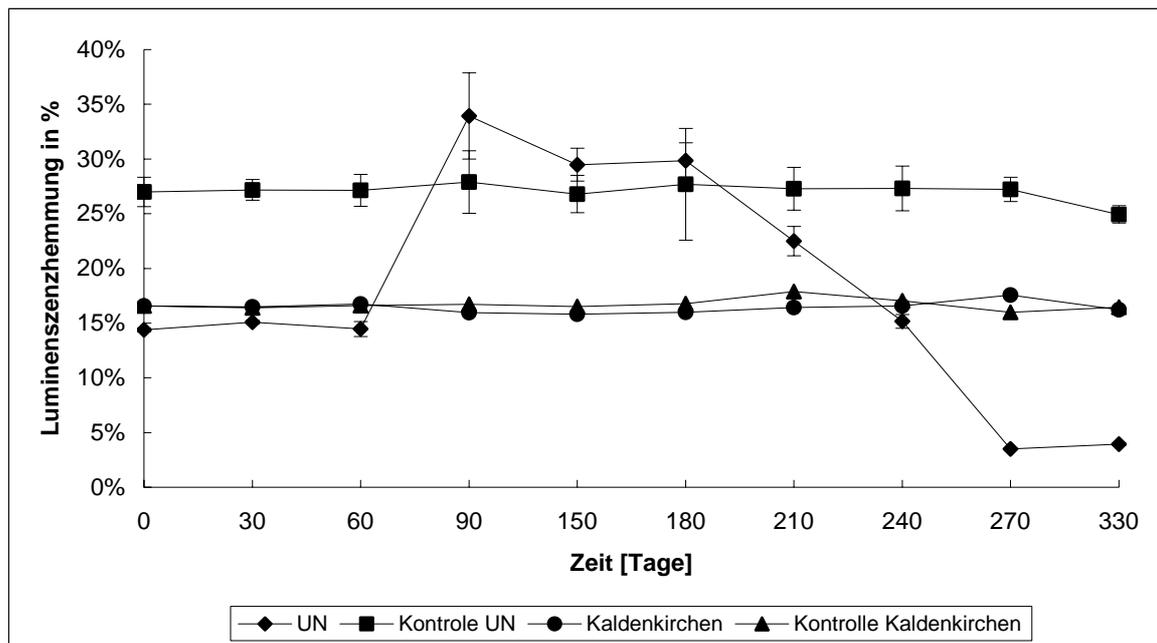


Abb. 38.: Lumineszenzhemmung der wässrigen Extrakte aus dem Boden UN und aus der Kontrolle Kaldenkirchen; *UN*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle UN*: Ansatz ohne Bakterien; *Kaldenkirchen*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle Kaldenkirchen*: Ansatz ohne Bakterien; Fehlerbalken:  $\pm s$

Im Boden UN wurde eine PAK-Konzentration von über 15.000 ppm gemessen. Damit ist er wesentlich stärker kontaminiert als die Böden MKW 1 und MKW 2. Dennoch wurde hier eine völlig andere Beobachtung gemacht: Die Lumineszenzhemmung im Ansatz ohne Bakterien (*Kontrolle UN*) war beinahe während des ganzen Versuchs höher als beim Ansatz mit Bakterien (Abb. 38). Die anfängliche Hemmung der Kontrolle ohne Bakterien betrug dabei 27 % und lag somit um 12 % höher als die Hemmung beim Ansatz mit Bakterien.

Nach 90 Tagen stieg die Lumineszenzhemmung im Ansatz mit Bakterien um knapp 20 % und betrug 33 %. Die Hemmung hielt sich auch nach 180 Tagen auf einem hohen Niveau. Sie sank jedoch zwischen 180 und 270 Tagen kontinuierlich ab und erreichte beim Abbruch des Versuchs einen Wert von 4 %. Dies entspricht eine Reduzierung der anfänglich gemessenen Hemmung von ca. 10 %.

Durch die höhere Lumineszenzhemmung in der Kontrolle ist es schwierig, hier Schlüsse zu ziehen. Der Zusatz des Isolats AP 18.1 jedoch verursachte im Ansatz UN wie in den zuvor beschriebenen Ergebnissen, Änderungen im Verlauf der Lumines-

zenzhemmung. Der Unterschied besteht darin, dass hier eine Reduzierung der Toxizität, die aus dem Bodeneluat UN hervorgeht, gemessen wurde.

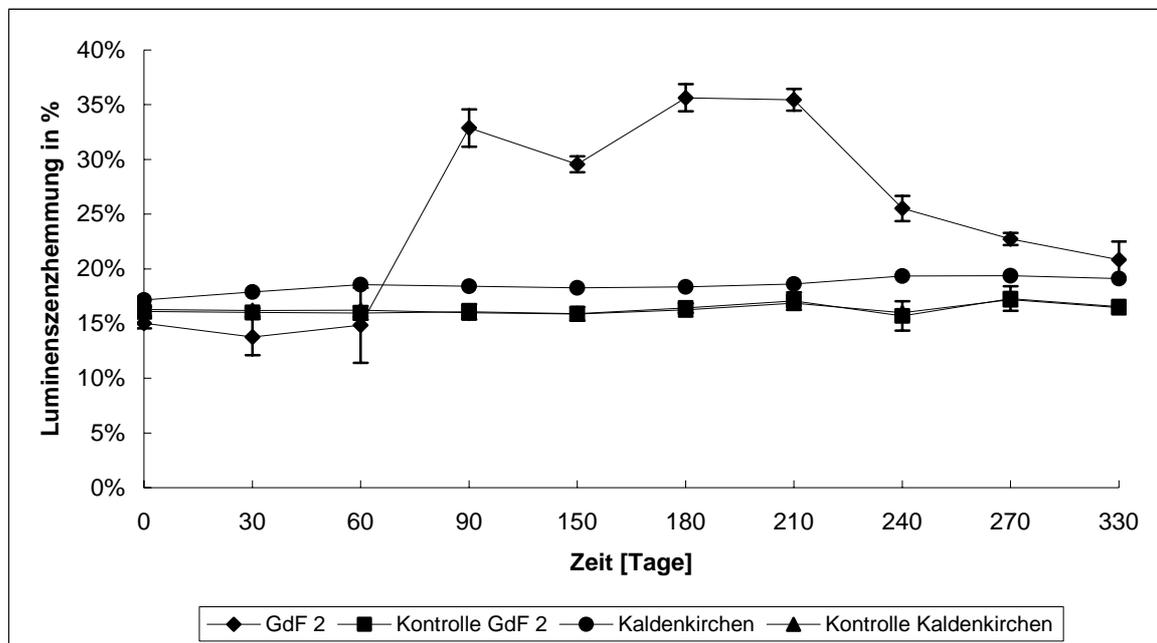


Abb. 39.: Lumineszenzhemmung der wässrigen Eluate aus dem Boden GdF 2 und aus der Kontrolle Kaldenkirchen; *GdF 2*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle GdF 2*: Ansatz ohne Bakterien; *Kaldenkirchen*: Ansatz mit Bakterien; *Kontrolle Kaldenkirchen*: Ansatz ohne Bakterien; Fehlerbalken:  $\pm s$

Der Boden GdF 2 ist mit einer PAK-Konzentration von über 57.000 ppm stark belastet. Im Ansatz GdF 2 wurde eine Erhöhung der Hemmung von anfänglich 14 % auf 34 % nach 210 Tagen festgestellt (Abb. 42). Anschließend wurde eine Abnahme der Hemmung beobachtet, die beim Abbruch des Versuchs nach 330 Tagen einen Wert von 20 % erreichte und damit um ca. 6 % höher als zu Beginn der Messungen lag.

Aus den Ergebnissen der Kontrollmessungen ist der Einfluss der Zugabe des Isolats AP 18.1 im Ansatz mit dem Boden GdF 2 auf die Lumineszenzhemmung erkennbar. Die Lumineszenzhemmung erhöhte sich im Verlauf des Versuchs, reduzierte sich jedoch kontinuierlich bis zum Abbruch. Im Ansatz ohne Bakterien dagegen blieb die Hemmung beinahe konstant.

Die Konzentration der PAK in den verschiedenen Böden war unterschiedlich hoch (Tab. 14). Daher ist es schwierig, Vergleiche zwischen den verschiedenen Ansätzen zu ziehen. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit der Grund, wieso der Verlauf der Lumineszenzhemmung bei allen Ansätzen uneinheitlich war. Zu beobachten war, dass die Anfangswerte der Lumineszenzhemmung trotz gravierender Unterschiede beim PAK-Gehalt der Böden relativ nah beieinander lagen.

Bei jedem Bodenansatz wurde die maximale Hemmung jeweils zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt beobachtet. Für den Boden TF 48 (Boden mit der höchsten PAK-Konzentration) wurde eine maximale Erhöhung der Hemmung um 16 % festgestellt. Für den Boden MKW 2 (Boden mit der niedrigsten PAK-Konzentration) wurde dagegen eine maximale Erhöhung der Hemmung um 23 % beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass ein hoher PAK-Gehalt des Bodens nicht zwangsweise auch in einer hohen Lumineszenzhemmung resultieren muss. Da während der Versuche keine Messungen des PAK-Gehalts vorgenommen wurden, kann keine Aussage über den Einfluss von eventuell freigesetzten PAK oder PAK-Metaboliten auf die Lumineszenzhemmung getroffen werden.

Beim Ansatz mit dem Boden MKW 2 wurde eine Erhöhung der Lumineszenzhemmung um 20 % am Versuchsende festgestellt. Der Boden MKW 2 hatte im Vergleich den niedrigsten Gehalt an PAK. Im Gegensatz dazu, wurde beim Ansatz mit dem Boden UN, der eine viel höhere PAK-Belastung aufwies, eine Reduzierung der Lumineszenzhemmung um 10 % am Versuchsende gemessen. Auch hier kann keine Korrelation zwischen hoher PAK-Belastung und hoher Lumineszenzhemmung gezeigt werden.

Die Untersuchung der wässrigen Bodeneluete mit dem Daphnientest ergab keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Ursache dafür könnte am Zustand der Tiere liegen. Bis zur Beendigung der vorliegenden Arbeit erbrachte die Fehlersuche keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Auf die Darstellung der Ergebnisse wird daher an dieser Stelle verzichtet.

### 3.4.4 Diskussion der Toxizitätsversuche

Die Fähigkeit von Bakterien zum Abbau von PAK kann von der Vorgeschichte der Böden, aus denen sie stammen, abhängig sein [SHUTTLEWORTH UND CERNIGLIA, 1995]. Aus dieser Überlegung heraus wurden in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen zur Rolle der Streptomyceten in PAK-kontaminierten Böden Proben und ein Isolat aus PAK-kontaminierten Böden eingesetzt.

Die Verminderung der Leuchtfähigkeit des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* wird im Verfahren nach DIN 38412 - L 34/341 ("Leuchtbakterientest") zur Indikation einer toxischen Belastung von Wasserproben oder Bodeneluatn herangezogen. Der Test beruht auf der Fähigkeit des marinen Bakteriums *V. fischeri*, auf Grund enzymatischer, Energiestoffwechselabhängiger Prozesse (Luciferin-Luciferase-System) zu leuchten. Die Leuchtintensität der Organismen wird gehemmt, wenn toxische Einflüsse auf diese wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Leuchtbakterientest ein weiterer Kurzzeittest, der Daphnientest nach DIN 38412 - Teil 30, zur Bestimmung der Toxizität verschiedener Proben eingesetzt. Als Zeichen für eine toxische Wirkung in wässrigen Proben wird die Schwimmfähigkeit des Blattfußkrebsses *Daphnia magna STRAUS* beim Kontakt mit toxischen Substanzen herangezogen.

Bei den Versuchen zur Untersuchung der Toxizität von PAK-Kulturüberständen mit Streptomyceten zeigte sich, dass die Kulturmedien sowohl im Daphnien- als auch im Leuchtbakterientest schon an sich toxisch waren. Eine Veränderung in der toxischen Wirkung aufgrund der metabolischen Aktivität der isolierten Streptomyceten konnte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die beobachteten toxischen Effekte könnten eingetreten sein:

1. auf Grund der Produktion von toxikologisch aktiven Substanzen durch die Streptomyceten. Es ist bekannt, dass einige Streptomyceten Antibiotika produzieren [Locci, 1982];

2. auf Grund der toxischen Wirkung von Komponenten des Komplexmediums oder
3. auf Grund einer möglichen toxischen Wirkung von Glucose auf die Testorganismen.

Der Daphnien- und der Leuchtbakterientest wurden weiterhin zur Messung der Toxizität der drei Modellsubstanzen und eines PAK-Metaboliten, nämlich 1-Hydroxypyren, der als Produkt des Pyrenmetabolismus durch die isolierten Streptomyceten nachgewiesen wurde, herangezogen.

Die Messung der Toxizität der Einzelsubstanzen brachte keine sowohl untereinander als auch mit der Literatur konsistenten Werte hervor. Gründe dafür könnten sein:

- die unterschiedliche Inkubationszeit der Testorganismen mit den zu testenden Substanzen
- der Einsatz anderer als in der Literatur erwähnten Lösungsvermittler
- die Messung unterschiedlicher Endpunkte
- die unterschiedliche Empfindlichkeit der Testorganismen.

Schließlich wurde der Daphnien- und der Leuchtbakterientest bei der Untersuchung der Toxizität von wässrigen Eluaten aus Bodenproben der mit dem Isolat AP18.1 angeimpften Testböden eingesetzt. Aufgrund fehlender reproduzierbarer Ergebnisse beim Daphnientest wurden hier nur die Ergebnisse aus dem Leuchtbakterientest diskutiert.

Die nähere Betrachtung der toxischen Effekte der wässrigen Eluate zeigt zunächst, dass die Zugabe des Isolats AP 18.1 eine Änderung der Toxizität verursacht hat. Bei vier der fünf eingesetzten Böden resultierte die Zugabe des Isolats in einer Erhöhung der Lumineszenzhemmung. Nur beim Boden UN konnte eine deutliche Reduzierung der Lumineszenzhemmung beobachtet werden.

Bezieht man in die Diskussion der Ergebnisse den PAK-Gehalt der Böden mit ein, ist kein schlüssiges Bild für eine Verbindung zwischen PAK-Gehalt der Böden und der gemessenen Toxizität zu erkennen. Interessanterweise wurde die größte Erhöhung der Toxizität beim Boden mit der geringsten Konzentration an PAK gemessen (MKW 2). Bei

den Testböden mit der höchsten und zweithöchsten Konzentration an PAK wurde dagegen eine vergleichbare Erhöhung der Toxizität gemessen.

In der Übertragung von Ergebnissen wie den oben beschriebenen auf die Überwachung und die Abschätzung der Wirksamkeit von biologischen Sanierungen ist festzuhalten, dass es keine gut etablierten und standardisierten Protokolle dafür gibt [MARWOOD et al., 1998]. Analytische Messungen aller Verbindungen, die in einer Mischung von chemischen Schadstoffen anwesend sind, sind aus praktischer und kosteneffektiver Sicht unmöglich. Analytische Messungen können nicht unmittelbar darauf hinweisen, ob vollständiger Abbau stattgefunden hat oder nicht. Die Detektion von  $^{14}\text{CO}_2$ , das während der Transformation von radioaktiv markierten chemischen Indikatorsubstanzen in Bodenproben oder mikrobielle Kulturen produziert wird, ist noch der unmittelbarste Hinweis auf die Mineralisation der Schadstoffe. Obgleich diese Technik sehr häufig für die Bestimmung der Raten der biologischen Sanierung im Labor angewendet wird, ist die Methode ungeeignet für das Messen des biologischen Abbaus am Standort selbst. Ferner sind radioaktiv markierte Indikatoren lediglich Stellvertreter für die komplexe Mischung von Schadstoffen, die normalerweise an einem kontaminierten Standort gefunden werden. Ihre Transformation spiegelt nicht notwendigerweise auch eine Reduktion der Konzentration aller anwesenden Schadstoffe wider. Darüber hinaus wird die Transformation der Schadstoffe nicht immer von einer reduzierten Toxizität des Bodens begleitet, da Zwischenprodukte, die gefährlicher für die Umwelt sein können, nicht detektiert werden. Biotests, wie die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, messen ebenfalls nicht unmittelbar das Ausmaß der Transformation des Schadstoffes. Wenn sie jedoch benutzt werden, um die chemische Rückstandsanalyse zu ergänzen, können sie eine effektive Methode zur Detektion von Veränderungen in der Verschmutzung des Bodens darstellen, insbesondere dort, wo komplexe Gemische von Schadstoffen involviert sind.

Aus den o.g. Tatsachen heraus kann hier nur eine allgemeine Interpretation der Ergebnisse erfolgen:

Von den einzelnen Testböden kann erwartet werden, dass sie unterschiedliche Toxizitätstrends zeigen, da sich die Zusammensetzung des Bodens auf die Testergebnisse auswirken kann. Ferner können während der Testzeit unterschiedliche Metaboliten in

den getesteten Böden gebildet werden, die zu unterschiedlichen Toxizitätswerten führen können.

Das Isolat AP 18.1 war in der Lage, wie die Versuche im vorherigen Abschnitt zeigen, Huminsäure abzubauen. Die beobachtete Erhöhung der Toxizität bei einigen der eingesetzten Böden könnte demnach auf der Metabolisierung der organischen Materie des Testbodens durch das Isolat AP 18.1 und als Folge davon auf der Freisetzung von toxischen Substanzen beruhen. In einer Studie von RICHNOW et al. (1994) konnten durch Flüssigextraktion des radioaktiv markierten, einer biologischen Behandlung unterzogenen Bodens signifikante Mengen an PAK, aber nur kleine Mengen von PAK-Metaboliten abgetrennt werden. Höhere Restmengen von PAK konnten nach dem chemischen Aufschluss des Bodens erhalten werden. Dies deutet auf eine relativ starke Adsorption dieser Verbindungen an die Bodenbestandteile hin. Ein großer Teil der PAK war an Huminstoffen adsorbiert und konnte nur nach der Isolierung und dem nachfolgenden chemischen Abbau der Huminstoffe extrahiert werden.

So wie zahlreiche Studien weisen auch die Ergebnisse von RICHNOW darauf hin, dass Huminstoffe eine große Adsorptionskapazität für PAK haben. Eine Teilerstörung der humischen Substanzmatrix scheint für die Freisetzung dieser Verbindungen erforderlich zu sein. Im Vergleich zu den Muttersubstanzen war die Assoziation ihrer Metabolite mit Huminstoffen sogar noch offensichtlicher. Nur kleine Mengen von Metaboliten waren in der o.g. Studie durch konventionelle flüssige Extraktion extrahierbar, während die Mehrheit fest mit Huminstoffen verbunden war.

In einer Untersuchung von WEISSENFELS et al. resultierte die Zugabe von Aktivkohle in einer verstärkten Adsorption der organischen hydrophoben Verbindungen an Partikel und einer verringerten Toxizität der wässrigen Eluate des Bodens. Die Autoren folgerten daraus, dass PAK aus Böden, wenn sie in der organischen Materie des Bodens immobilisiert sind, nicht biologisch abbaubar sind und nicht durch Ausspülen der Böden mit Wasser freigesetzt werden können [WEISSENFELS et al., 1992].

Falls PAK-Metabolite zur gemessenen Toxizität beigetragen haben, könnte dies über Kombinationswirkungen erfolgt sein. In der Studie von BOYD et al. (1997) wurden Untersuchungen von Gemischen von Benzol und Catechin mit einem Leuchtbakterien-

test durchgeführt. Die Autoren fanden heraus, dass die Gemische toxischer als die Summe der toxischen Wirkungen der Einzelsubstanzen waren.

Bei den Testböden der vorliegenden Arbeit, in denen keine Erhöhung bzw. eine Reduzierung der Toxizität beobachtet wurde, könnte das entgegengesetzte Phänomen eine Rolle gespielt haben. Wie bereits bei den Versuchen zur Metabolisierung von PAK durch Streptomyceten in Anwesenheit von Huminsäuren diskutiert, hat die Bindung von PAK an die makromolekulare organische Materie des Bodens Auswirkungen auf ihre Bioverfügbarkeit und auf ihre Toxizität. Die in den Testböden enthaltenen PAK und/oder ihre Metabolite könnten so stabil mit der organischen Materie verbunden sein, dass die Anwesenheit des Isolats AP 18.1 ihre Freisetzung und damit eine potentielle Auswirkung auf die Toxizität nicht bewirken konnte. Die Bioverfügbarkeit ist also ein kontrollierender Faktor, nicht nur für den biologischen Abbau, sondern für alle Bemühungen, Gefährdungen für die Umwelt aus ökotoxikologisch bedenklichen Böden zu reduzieren.

Hinzu kommt, dass wässrige Eluate nur einen Teil einer multiplen Kontamination aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit jedes Schadstoffes in Wasser repräsentieren. Auswaschung nur mit Wasser könnte die Art und Konzentration der anwesenden bioverfügbaren organischen Schadstoffe unterschätzen. Andererseits erhöht eine Flüssigextraktion mit Lösungsmittel die Möglichkeiten für das Entfernen der organischen Schadstoffe und gibt Hinweise auf die maximal mögliche Toxizität. Ferner können sogar bei niedrigen Konzentrationen die Ergebnisse durch synergistische Wirkung zwischen Schadstoffen und Lösungsmittel beeinflusst werden.

SINDER et al. (1996) beobachteten, dass durch den bakteriellen Abbau eine Verringerung der mit Wasser eluierbaren und somit bioverfügbaren PAK einhergeht, bei gleichzeitiger Veränderung der Zusammensetzung des DOC hin zu einer Abnahme der Ökotoxizität. Die verbleibende Ökotoxizität beruht demnach offensichtlich nur noch in geringem Maße auf mit Wasser eluierbaren PAK, vielmehr aber auf bakteriellen Abbau- bzw. Humifizierungsprodukten. Als Ursache für die Abnahme der Toxizität kam für die Autoren neben dem bakteriellen Abbau sowohl eine Sorption an die Bodenmatrix als auch eine Polymerisation hin zu höhermolekularen organischen Verbindungen in Betracht.

Die Ergebnisse der Biotestverfahren in der o.g. Studie belegen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Bioverfügbarkeit von PAK im Boden und der ökotoxikologischen Wirkung über den Gefährdungspfad Wasser. Die geringe spezifische Toxizität der während des biologischen Abbaus gebildeten Verbindungen, wobei es sich überwiegend um hochmolekulare Huminstoffe handelt, ist den für natürliche Huminstoffe gewonnenen Ergebnissen vergleichbar. Damit wird deutlich, dass eine Humifizierung von PAK, welche zu hochmolekularen Verbindungen führt, mit einer deutlichen Reduzierung des ökotoxikologischen Gefährdungspotentials einhergeht. Eine Remobilisierung der ursprünglichen PAK-Verbindungen aus gebundenen Rückständen des Bodens kann jedoch wiederum in Folgerisiken für die menschliche Gesundheit resultieren [KÄSTNER et al., 1999].

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ökotoxikologische Untersuchungen für die Bewertung einer erfolgreichen biologischen Sanierung unerlässlich sind. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine endgültige Aufklärung der Rolle des Isolats AP 18.1 erfolgt ist, sind weitere Untersuchungen notwendig, um aufzuklären, worauf die beobachteten Phänomene tatsächlich beruhen. Die Notwendigkeit von detaillierten Studien für die Auswertung von Gefahren für die Gesundheit aus kontaminierten Böden wird aus diesen Ergebnissen deutlich. Toxizität könnte in Sickerwässern von Realstandorten unter natürlichen Bedingungen gemessen werden. Zusätzlich könnte die Toxizität nicht nur in Eluaten, sondern auch in der ursprünglichen Bodenmatrix bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Toxizitätsversuche mit PAK-kontaminierten Böden in dieser Arbeit empfehlen, dass die Entscheidung über das Gefährdungspotential von dekontaminierten Böden nicht nur auf chemischen Analysen basieren kann, die auf die Identifikation und Bestimmung von Konzentrationen ausgesuchter Marker für Toxizität zielen. Die Beurteilung des toxischen Risikos von kontaminierten Böden sollte dabei eine genauso wichtige Rolle spielen. Ökotoxikologische Untersuchungen können in solchen Standorten sinnvoll sein, in denen auf den ersten Blick eine erfolgreiche Dekontamination, basierend auf der Verminderung der gesamten Quantität der chemisch detektierbaren PAK, festgestellt wurde. Sollten jedoch die Ergebnisse der Toxizitätsversuche dennoch auf eine verhältnismäßig niedrige Effektivität der Sanierung in Bezug auf die Verminderung der Ökotoxizität hinweisen, sind weitere Maßnahmen zu ergreifen. Spezifische

chemische Veränderungen, die während der biologischen Sanierung durch Bakterien auftreten können, haben als Folge nicht nur eine sukzessive Verminderung des gesamten Schadstoffgehalts, sondern auch eine Veränderung im Charakter und in der Intensität von toxischen Effekten.

Die beobachteten Änderungen der Lumineszenzhemmung bei einem Teil der Bodenversuche in der vorliegenden Arbeit deuten auf eine aktive Rolle der Streptomyce-ten bei der Ausprägung der Bodentoxizität hin. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der eingesetzte Stamm AP 18.1 durch seine Fähigkeit, PAK zu transformieren und Huminsäuren abzubauen, in der Lage sein könnte, die Toxizität von PAK-kontaminierten Böden zu beeinflussen.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung

- der Elimination von ausgewählten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch *Streptomyces*-Stämme,
- des Einflusses von Huminsäuren auf die Elimination
- sowie der ökotoxikologischen Relevanz dieses Prozesses.

Aus fünf, hauptsächlich mit Fluoranthren und Pyren belasteten Böden wurden 55 phänotypisch unterschiedliche Bakterienstämme isoliert. Die Stämme wurden zunächst nach visuellen Kriterien als Streptomyceten identifiziert. Mit Hilfe von Screening-Methoden, die visuell auf den Abbau von Xenobiotika anhand der Elimination spezifischer Chemikalien hinweisen, wurde ca. ein Drittel der isolierten Streptomyceten ausgewählt. Diese waren in der Lage, PAK kometabolisch zu transformieren und diese Eigenschaft über mehrere Monate auch beizubehalten. Die eingesetzten Screening-Methoden waren zur Feststellung der Transformationsfähigkeit der PAK durch die isolierten Streptomyceten gut geeignet. Keiner der 55 Streptomyceten-Stämme war in der Lage, PAK als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Die zur Elimination von PAK fähigen Stämme wurden makroskopisch näher charakterisiert. Die Absicherung der Zuordnung der Isolate als Streptomyceten erfolgte durch Überprüfung der Anwesenheit von LL-Diaminopimelinsäure. Diejenigen Isolate, die zusätzlich zu ihrer Fähigkeit, PAK zu transformieren, auch in der Lage waren, Huminsäuren abzubauen, wurden für die weiteren Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Für die Untersuchungen zur Elimination von PAK durch die isolierten Streptomyceten wurden die in der Umwelt weit verbreiteten PAK Phenanthren, Fluoranthren und Pyren eingesetzt. Es wurden Abbauprobversuche in Flüssigkulturen durchgeführt. Der Nachweis von PAK-Metaboliten wurde anhand von UV-VIS Spektren und durch Chromatographie mit Referenzsubstanzen durchgeführt.

Folgende PAK-Metabolite konnten identifiziert werden:

- 1-, 3-, 4- und 9-Hydroxyphenanthren; *trans*-9,10-Phenanthrendihydrodiol aus Phenanthren<sup>3</sup>
- 1-, 3- und 8-Hydroxyfluoranthren aus Fluoranthren
- 1-Hydroxypyren aus Pyren<sup>4</sup>
- Eine Reihe von weiteren Metaboliten konnte aus Mangel an Referenzsubstanzen und/oder aufgrund ihrer sehr niedriger Konzentrationen nicht identifiziert werden.

Versuche zur quantitativen Bestimmung der o. g. Metaboliten konnten auf Grund der geringen Ausbeute nicht durchgeführt werden.

Über die Metabolisierung von Fluoranthren durch Streptomyceten wurde bis dato in der Literatur nicht berichtet. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Produkte der Elimination von Fluoranthren durch Streptomyceten wurden somit zum ersten Mal für Streptomyceten nachgewiesen.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass einige grundlegende Unterschiede bei der Elimination von PAK durch Streptomyceten im Vergleich zu der Elimination durch andere Bakterien bestehen. So konnte hier die Transformation der PAK ohne den Zusatz einer Energie- und Kohlenstoffquelle nicht bewerkstelligt werden. Bei den hier isolierten Streptomyceten tritt eindeutig das Phänomen Kometabolismus zu Tage. Der Nachweis von *trans*-Dihydrodiolen zeigt schließlich, dass Streptomyceten die erste Phase der Transformation von PAK mit Hilfe von Monooxygenasen beginnen.

---

<sup>3</sup> Mehrere Forscher haben in der Vergangenheit berichtet, dass Phenanthren durch Streptomyceten metabolisiert wird. Streptomyceten können Phenanthren in zwei enzymatischen Schritten an der K-Region metabolisieren, wobei *trans*-9,10-Phenanthrendihydrodiol gebildet wird [SUTHERLAND et al., 1990].

<sup>4</sup> Eine Verwertung von Pyren als alleinige Kohlenstoffquelle durch Streptomyceten wurde ebenso bereits beschrieben. Als Hauptmetabolit wurde dabei, wie in der vorliegenden Arbeit, 1-Hydroxypyren nachgewiesen [PETERS, 1999]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die von der Literatur bereits beschriebenen Beobachtungen für Phenanthren und Pyren.

Die Möglichkeit der Bildung von Sulfat-, Glukosid- und/oder Glucuronidkonjugaten bei der Elimination von PAK durch die isolierten Streptomycceten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Es konnten dabei keine Konjugate nachgewiesen werden. Es ist es daher möglich, dass die isolierten Streptomycceten die enzymatische Ausstattung für solche Metabolisierungsprozesse gar nicht besitzen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Abbaus von Huminstoffen durch die aus den PAK-kontaminierten Böden isolierten Streptomycceten. Aus den Ergebnissen sollten Rückschlüsse auf die Rolle der Streptomycceten bei der Freisetzung dieser Schadstoffe aus dem Boden gewonnen werden. Dazu wurden Isolate eingesetzt, die bereits in den Untersuchungen zuvor ein Abbaupotential für die Modellsbstanzcn Phenanthren, Pyren und Fluoranthcn zeigen konnten.

Zunächst wurden Untersuchungen mit selbst extrahierter Huminsäure auf festen Medien (Huminsäure-Agarplatten) durchgeführt. Eine Entfärbung des durch Huminsäuren braun gefärbten Agars und die Bildung von Klarhöfen wurde als Beweis für den Abbau der Huminsäuren bewertet. Lediglich ein Drittel (mit zusätzlicher C-Quelle) und ein Zehntel (ohne zusätzliche C-Quelle) der untersuchten Isolate konnten eindeutige Klarhöfe auf den Agarplatten bilden und zeigten damit ein Abbaupotential für Huminsäuren. Im Gegensatz zu selbst extrahierten wurden die kommerziell bezogenen Huminsäuren von den Bakterien nicht angegriffen, und zwar weder ohne noch mit Zusatz einer weiteren Kohlenstoffquelle. Dagegen konnten alle Isolate die selbst extrahierten Huminsäuren in Anwesenheit von Glucose verwerten. Drei der Isolate und die beiden Referenzstämme konnten sogar auf den Huminsäure-Agarplatten Klarhöfe ohne Zusatz einer weiteren Kohlenstoffquelle bilden.

Die o. g. Beobachtungen zum Abbau von Huminsäuren durch einen Teil der isolierten Streptomycceten zeigen, dass die Anwesenheit von Streptomycceten das Schicksal von in der organischen Substanz des Bodens festgelegten organischen Schadstoffen beeinflussen kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Huminsäuren auf die Elimination der ausgewählten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe durch *Streptomycces*-Stämme. In Anwesenheit von Huminsäuren konnte für keine der getesteten PAK/Streptomycceten-Kombinationen die zuvor beschriebenen

Metabolite detektiert werden. Die Bildung von PAK-Metaboliten blieb bei Streptomyceskulturen aus, denen Huminsäuren beigelegt waren.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das ökotoxikologische Verhalten von PAK-Einzelsubstanzen, von Überständen von Bakterienflüssigkulturen mit PAK-Zusatz und von wässrigen Eluaten aus PAK-kontaminierten Böden, die mit *Streptomyces*-Isolate angeimpft wurden, untersucht. Dazu wurden der Daphnien- und der Leuchtbakterientest herangezogen. Zunächst wurden Vorversuche zur Ermittlung des testrelevanten Wirkungsbereichs der Kulturüberstände durchgeführt.

Die Messung der Toxizität der Einzelsubstanzen brachte keine sowohl untereinander als auch mit der Literatur konsistente Werte hervor. Bei den Versuchen zur Untersuchung der Toxizität von PAK-Kulturüberständen mit Streptomycesen zeigte sich, dass die Kulturmedien sowohl im Daphnien- als auch im Leuchtbakterientest schon an sich toxisch waren. Eine toxische Wirkung aufgrund der metabolischen Aktivität der isolierten Streptomycesen konnte daher nicht nachgewiesen werden.

Schließlich wurden der Daphnien- und der Leuchtbakterientest bei der Untersuchung der Toxizität von wässrigen Eluaten aus Bodenproben der mit dem Isolat AP18.1 angeimpften Testböden eingesetzt. Aufgrund fehlender reproduzierbarer Ergebnisse beim Daphnientest wurden hier nur die Ergebnisse aus dem Leuchtbakterientest diskutiert.

Die nähere Betrachtung der toxischen Effekte der wässrigen Eluate zeigte zunächst, dass die Zugabe des Isolats AP 18.1 eine Änderung der Toxizität verursacht hat. Bei vier der fünf eingesetzten Böden resultierte die Zugabe des Isolats in einer Erhöhung der Lumineszenzhemmung. Nur bei einem der Böden konnte eine deutliche Reduzierung der Lumineszenzhemmung beobachtet werden. Es konnte keine schlüssige Verbindung zwischen PAK-Gehalt der Böden und gemessener Lumineszenzhemmung hergestellt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine endgültige Aufklärung der Fähigkeiten des *Streptomyces*-Isolats AP 18.1 erfolgen. Die beobachteten Änderungen der Lumineszenzhemmung deuten jedoch auf eine aktive Rolle der Streptomycesen bei der Ausprägung der Bodentoxizität hin. Der eingesetzte Stamm AP 18.1 könnte durch seine

Fähigkeit, PAK zu transformieren und Huminsäuren abzubauen, in der Lage sein, die Toxizität von PAK-kontaminierten Böden zu beeinflussen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass ökotoxikologische Untersuchungen für die Bewertung einer erfolgreichen biologischen Sanierung unerlässlich sind. Die Entscheidung über das Gefährdungspotential von dekontaminierten Böden kann nicht nur auf chemischen Analysen basieren, die auf die Identifikation und Bestimmung von Konzentrationen ausgesuchter Substanzen zielen. Die Beurteilung des toxischen Risikos von kontaminierten Böden sollte dabei eine genauso wichtige Rolle spielen.

Einige Fragen in Bezug auf die Elimination von PAK durch Streptomycceten und die darauf folgenden Wechselwirkungen mit der natürlichen Materie des Bodens konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden und bedürfen einer Vertiefung. Für die Weiterführung der Experimente der vorliegenden Arbeit sind folgende Aspekte zu nennen:

- da Streptomycceten in der Lage sind, auch höher kondensierte PAK zu eliminieren, wäre sicherlich von Interesse, die Elimination solcher PAK zu untersuchen;
- weitere Schadstoffe und Schadstoffgemische könnten außerdem in Metabolisierungsversuchen mit den hier isolierten Streptomycceten eingesetzt werden, um weitere Kenntnisse zur physiologischen Leistungsfähigkeit dieser Gattung zu gewinnen;
- um die Ausbeute an PAK-Metaboliten zu erhöhen, sollten Untersuchungen, u. a. zu den Anzuchtsbedingungen (z. B. Substrat), die eine optimale Metabolismusleistung fördern könnten, durchgeführt werden;
- ein wichtiger Aspekt wäre die weitere Aufklärung des PAK-Eliminationsweges durch Streptomycceten, speziell die Aufklärung der Enzymatik und der Regulation der Elimination von Fluoranthen;
- des Weiteren die Frage, ob die hier isolierten Streptomycceten eine aktive Rolle bei der Bildung von gebundenen Rückständen spielen. Streptomycceten sind bekannt als "Humusbildner". Sie spielen eine wichtige Rolle beim Turnover von Huminstoffen im Boden. Es sollte daher in der Zukunft untersucht werden, ob

*Streptomyces*-Stämme, die sowohl PAK eliminieren und Vorläufer von Huminstoffen bilden können, in der Lage sind, gebundene Rückstände von PAK-Metaboliten zu bilden;

- wichtig wären weitere Untersuchungen zum toxikologischen Potential der hier identifizierten PAK-Metaboliten, speziell unter Realbedingungen, die Umstände an kontaminierten Standorten simulieren;
- ebenso hinsichtlich der praktischen Anwendung könnten Untersuchungen in Bakterienmischkulturen durchgeführt werden, um die Rolle der Streptomyceten als Huminstoff-verwertende Bakteriengruppe in einem möglichen Sanierungsfall zu untersuchen;
- um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch *in situ* zu bestätigen, könnten die isolierten Streptomyceten auch als Inokulate für Boden-Bioremediationsfeldversuche eingesetzt werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- AHLF, W. (1998). Biotests an Sedimenten. In: C. Steinberg, H. Bernhardt und H. Klappner (Hrsg.), *Handbuch Angewandte Limnologie Teil Aquatische Ökotoxikologie*. Ecomed, Landsberg, 1-43.
- ALLARD, A. S. UND NEILSON, A. H. (1997). Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **39**, 253-285.
- ALMENDROS, G., GUADALIX, M. E., GONZÁLEZ-VILA, F. J. UND MARTIN, F. (1996). Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Organic Geochemistry*, **24**, 651-659.
- AMADOR, J. A. UND ALEXANDER, M. (1988). Effects of humic acids on the mineralization of low concentrations of organic compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, **20**, 185-191.
- ANDERSSON, B. E. UND HENRYSSON, T. (1996). Accumulation and degradation of dead end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, 647-652.
- ANONYMOUS (2001). Umweltbundesamt, *Altlastenspektrum*, 01, 51.
- ANONYMOUS (1998). LUMISterra Feststofftest LYW429. Bedienungsanleitung. Dr. Bruno Lange GmbH & Co. KG
- ANONYMOUS (1999). Leuchtbakterientest nach DIN 38412 L34, L341. Beuth Verlag, Berlin.
- BALLSCHMITTER, K. UND WIEDMANN, T. (1999). Welche Kriterien führen zu Grenzwerten im Umweltbereich? *GIT Labor-Fachzeitschrift*, **3**, 214-217.

- BAYERISCHES LANDESAMT FÜR UMWELTSCHUTZ (2002). Bodenbehandlung - Stand der Technik und neue Entwicklungen: Fachtagung vom 11. Juni 2002, Augsburg.
- BENDER, B., SPARWASSER, R. UND ENGEL, R. (1995). *Umweltrecht: Grundzüge des öffentlichen Umweltschutzrechts*. 3. Auflage, C.F. Müller Verlag, Heidelberg.
- BERRY, W. (1981). *Recollected Essays: 1965-1980*. North Point Press, San Francisco.
- BLAISE, C. (1998). Microbiotesting: An expanding field in aquatic toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **40**, 115-119.
- BLUMER, M. (1976). Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American*, **234**, 34-44.
- BLONDEAU, R. (1997). pers. Mitteilung
- BOGAN, B. W., LAMAR, R. T., BURGOS, W. D. UND TIEN, M. (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 250-254.
- BOUCHEZ, M., BLANCHET, D. UND VANDECASTEELE, J. P. (1995). Degradation of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons by Pure Strains and by Defined Strain Associations - Inhibition Phenomena and Cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, 156-164.
- BOYD, E. M., MEHARG, A. A., WRIGHT, J. UND KILLHAM, K. (1997): Assessment of toxicological interactions of benzene and its primary degradation products (catechol and phenol) using a *lux*-modified bacterial bioassay, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 849-856.
- CERNIGLIA, C. E., FREEMAN, J. P. UND MITCHUM, R. K. (1982). Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 1070-1075.
- CERNIGLIA, C. E., WHITE, G. L. UND HEFLICH, R. H. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic hydrocarbons. *Archives of Microbiology*, **143**, 105-110.

- CERNIGLIA, C. E., KELLY, D. W., FREEMAN, J. P. UND MILLER, D. W. (1986). Microbial metabolism of pyrene. *Chemical-Biological Interactions*, **57**, 203-216.
- CERNIGLIA, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**, 351-368.
- CHUN, U.-H., SIMOOV, N., CHEN, Y. UND BRITZ, M. L. (1996). Continuous pollution monitoring using *Photobacterium phosphoreum*. *Resources, Conservation and Recycling*, **18**, 25-40.
- COLLERAN, E. (1997). Uses of bacteria in bioremediation. In: *Methods in biotechnology*, 2: Bioremediation Protocols, 3-22, D. Sheehan (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- CORNELISSEN, G. UND SIJM, D. T. H. M. (1996). An energy budget model for the biodegradation and cometabolism of organic substances. *Chemosphere*, **33**, 817-830.
- CRAWFORD, D. L. UND SUTHERLAND, J. B. (1979). The role of actinomycetes in the decomposition of lignocellulose. *Development and Industrial Microbiology*, **20**, 143-151.
- DARI, K., BÉCHET M. UND BLONDEAU R. (1995). Isolation of soil Streptomyces strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 115-122.
- DE SCHRIJVER, A. UND DE MOT, R. (1999). Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews in Microbiology*, **25**, (2): 85-119.
- DREWS, G. (1983). Mikrobiologisches Praktikum. 4. Aufl. Springer Verlag, Berlin.
- DOTT, W., ACHAZI, R., EISENTRÄGER, A., HUND-RINKE, K., KÖRDEL, W., NEUMANN-HENSEL, H., PFEIFER, F., RÖMBKE, J., WIESNER, J., WILKE, B.-M. (2001). Biologische Testverfahren für Boden und Bodenmaterialien. DECHEMA-Arbeitsgruppe "Validierung biologischer Testmethoden für Böden", 7. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie - Boden". DECHEMA Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e. V., Frankfurt am Main.

- EBERT, K. (2000). Validierung von Immunoassay Test-Kits für die Bestimmung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Boden zum Einsatz bei der Erfassung und Bewertung von Altlasten. Dissertation, Technische Universität München.
- ELENDT B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacean; An ultra structural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasm*, 154, pp. 25-33
- ENGBRETSON, R. R. UND V. WANDRUSZKA, R. (1994). Micro organization in dissolved humic acids. *Environmental Science and Technology*, **28**, 1934-1941.
- ESCHENBACH, A. (1995). Einfluss von *Pleurotus ostreatus*, Kompost, *Sphingomonas paucimobilis* und der Kontaminationsdauer auf den Verbleib und Abbau <sup>14</sup>C-markierter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Altlastböden. Dissertation, Technische Universität Hamburg-Harburg.
- ESCHENBACH, A., WIENBERG, R. UND MAHRO, B. (1998). Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C]PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environmental Science and Technology*, **32**, 2585-2590.
- ETTLINGER, L., CORBAZ, R. UND HÜTTER, R. (1958). Zur Systematik der Actinomyceten, 4. Eine Artenteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Archiv für Mikrobiologie*, **31**, 326-358.
- FADULLON, F. S., KARNS, J. S. UND TORRENTS, A. (1998). Degradation of atrazine in soil by *Streptomyces*. *Journal of Environmental Science and Health, B*, **33**, 37-49.
- FIELD, J. A., DE JONG, E., COSTA G.F. UND DE BONT, J. A. M. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2219-2226.

- FIELD, J. A., DE JONG, E., FEIJOO-COSTA, G. UND DE BONT, J. A. M. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnology*, **11**, 44-49.
- FILIP, Z., CLAUS, H. UND DIPPELL, G. (1998). Abbau von Huminstoffen durch Bodenmikroorganismen - eine Übersicht. *Zentralblatt für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **161**, 605-612.
- FLAIG, W. (1988). Generation of model chemical precursors. In: Humic substances and their role in the environment, 75-92, F. H. Frimmel und R. F. Christman (Eds.), John Wiley & Sons Ltd, New York.
- FLIESSBACH, A. UND REBER, H. (1991): Auswirkungen einer langjährigen Zufuhr von Klärschlamm auf Bodenmikroorganismen und ihre Leistungen. In: Sauerbeck, D., Lübben, S. (Hrsg.): *Auswirkungen von Siedlungsabfällen auf Böden, Bodenorganismen und Pflanzen*. Berichte aus der Ökologischen Forschung, Band 6, Forschungszentrum Jülich GmbH, Projektträger Biologie, Energie, Ökologie.
- FOGHT, J. M., GUTNICK, D. L. UND WESTLAKE D. W. S. (1989). Effect of emulsion on biodegradation of crude oil in pure and mixed cultures. *Applied Environmental Microbiology*, **55**, 36-41.
- GAUTHIER, T. D., SEITZ, W. R. UND GRANT, C. L. (1987). Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene  $K_{oc}$  values. *Environmental Science and Technology*, **21**, 243-248.
- GOODFELLOW, M. UND WILLIAMS, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, **37**, 189-216.
- GRAY, M. R., BANERJEE, D. K., FEDORAK, P. M., HASHIMOTO, A., MASLIYAH, J. H. UND PICKARD, M. A. (1994). Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **40**, 933-940.
- GROTH, I. UND SAIZ-JIMENEZ, C. (1999). Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, **16**, 1-8.

- GRUND, E., KNORR, C. UND EICHENLAUB, R. (1990). Catabolism of benzoate and mono-hydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp., *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, (5): 1459-1464.
- GUERIN, T. F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using *ex-situ* land treatment, *Journal of Hazardous Materials B*, **65**, 305-315.
- GUERIN, T. F. (2000). The differential removal of aged PAHs from soil during bioremediation, *Environmental Science Pollution Research*, **7**, 19-26.
- GUTHRIE, E. A. UND PFAENDER, F. K. (1998). Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environmental Science and Technology*, **32**, 501-508.
- HARDER, P. A., O'KEEFE, D. P., ROMESSER, J. A., LETO, K. J., UND OMER C. A.. (1991). Isolation and characterization of *Streptomyces griseolus* deletion mutants affected in cytochrome P-450-mediated herbicide metabolism. *Molecular Genomics and Genetics*, **227**, 238-244.
- HATCHER P.G., GARY E.M. UND LARRY W.D. (1994). Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil, *Organic Geochemistry*, **21**, 1081-1092.
- HAUSER, B., SCHRADER, G. UND BAHADIR, M. (1997). Comparison of acute toxicity and genotoxic concentrations of single compounds and waste elutriates using Microtox/Mutatox test system, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 227-231.
- HAWKEN, P., LOVINS A. UND LOVINS H. (2000). *Ökokapitalismus. Die industrielle Revolution des 21. Jahrhunderts*. Riemann Verlag, One World Spirit.
- HELLMANN, H. (1998). Simultane Summenbestimmung von Mineralölen und PAK in kontaminierten Böden. *Terra Tech*, **6**, 49-52.
- HENKE, G. A. (1998). Altlastensanierung - Aus der Praxis für die Praxis. Vulkan Verlag Essen.
- HERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ, J., PÉREZ, M. I., BALL, A. S. UND ARIAS, M. E. (1997). <sup>13</sup>C NMR cross polarization and magic angle spinning (CPMAS) and gas chroma-

- tography / mass spectrometry analysis of the products from a soda pulp mill effluent decolourized by two *Streptomyces* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47**, 72-278.
- HERNANDEZ-PEREZ, G., GOMA, G. UND ROLS, J. L. (1998). Enhanced degradation of lignosulfonated compounds by *Streptomyces viridosporus*. *Water Science and Technology*, **38**, 289-297.
- HERTKORN, N., SCHMITT-KOPLIN, PH., PERMINOVA, I.V., KOVALEVSKII, D. UND KETTRUP, A.. (2001). Two-dimensional NMR spectroscopy of humic substances. In: Proceedings of the 9th International Conference of the International Humic Substances Society, „Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments and Waters“, University of Adelaide, Australien, 21–25 Sept. 1998. IHSS, St. Paul, MN.
- HULPKE, H., JORNS, A. C. UND SCHENDEL, F. A. (1998). Das Bundesbodenschutzgesetz aus industrieller Sicht. *Altlasten Spektrum*, **5**, 249-251.
- IJAH, U. J. J. UND ANTAI, S. P. (1995). The effect of nitrogen and phosphorous supplementation on crude oil degradation by *Streptomyces viridosporus*. *Discovery and Innovation*, **7**, 387-390.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (1987). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY. Isolation of IHSS Soil Fulvic and Humic Acids. <http://www.ihss.gatech.edu/>
- JACOBS, M. W., COATES, J. A., DELFINO, J. J., BITTON, G., DAVIS, W. M. UND GARCIA, K. L. (1993). Comparison of sediment extract Microtox<sup>®</sup> toxicity with semi-volatile organic priority pollutant concentrations, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **24**, 461-468.

- JENDROSSEK, D., TOMASI, G. UND KROPPESTEDT, R. M. (1997). Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiology Letters*, **150**, 179-188.
- JOHNSON, B. T., LONG, E. R. (1998). Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem in vitro testing approach, *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1099-1106.
- JONES, K. D. UND TILLER, C. L. (1999). Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid: a comparison of dissolved and clay bound humic. *Environmental Science and Technology*, **33**, 580-587.
- JONES, K. C., GEVAO, B., MORDAUNT, C., NORTHCOTT, G. UND SEMPLE, K. (2000). Editorial: Introductory remarks to the Special Issue . *Environmental Pollution*, **108**, 1-2.
- KÄSTNER, M., STREIBICH, S., BEYRER, M., RICHNOW, H. H. UND FRITSCHKE, W. (1999). Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C]anthracene in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1834-1842.
- KAISER, K. L. E. UND PALABRICA, V. S. (1991). *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. *Water Pollution Research Journal of Canada*, **26**, 361-431.
- KANALY, R. A. UND HARAYAMA, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, **182**: 2059-2067
- KANDELER, E., TSCHERKO, D., UND WESSOLEK, G. (1998). Reaktion von Mikroorganismen auf Bodenkontaminationen. *Bodenökologie & Bodengeneese*, **26**, 100-107
- KELLEY, I., FREEMAN, J.P., EVANS, F.E. UND CERNIGLIA, C.E. (1993). Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 800-806.
- KIYOHARA, H., NAGAO, K. UND YANA, K. (1982). Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 454-457.

- KNACKMUSS, H.-J. (1996). Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *Journal of Biotechnology*, **51**, 287-295.
- KÖRDEL, W., DASSENAKIS, M., LINTELMANN, J. UND PADBERG, S. (1997). The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils. *Pure & Applied Chemistry*, **69**, 1571-1600.
- KONTCHOU, C. Y. UND BLONDEAU, R. (1992). Biodegradation of soil humic acids by *Streptomyces viridosporus*. *Canadian Journal of Microbiology*, **38**, 203-208.
- KOPINKE, F.-D., GEORGI, A., MACKENZIE, K. (2001). Sorption of Pyrene to Dissolved Humic Substances and Related Model Polymers. 1. Structure-Property Correlation. *Environmental Science and Technology*, **35**: 2536-2542.
- KÜSTER, E. (1955). Humusbildung und Phenoloxidasen bei Streptomyceten. *Zentralblatt für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **69**, 137-142.
- KÜSTER, E. UND WILLIAMS, S.T. (1964). Selection of media for isolation of Streptomyces. *Nature*, **4935**, 928-929.
- KUTZNER, H.J. (1968). Über die Bildung von Huminstoffen durch Streptomyceten. *Landwirtschaftliche Forschung*, **21**, 48-61.
- LACEY, J. (1988). Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment. In: Actinomycetes in biotechnology, 359-432. M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski, (Eds.), Academic Press, London.
- LAMBERT, M., KREMER, S., STERNER, O. UND ANKE, H. (1994): Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrene quinones and their hydroxylated precursors in strain JK375. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3597-3601.
- LANGE, B., KREMER, S., STERNER, O. UND ANKE, H. (1994). Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of *trans*-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK364. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3602-3607.

- LAOR, Y., STROM, P. F. UND FARMER, W. J. (1999). Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. *Water Research*, **33**, 1719-1729.
- LECHEVALIER, M. P. UND LECEVALIER, H. A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **20**, 435-443
- LIU, K., HAN, W., PAN, W.-P. UND RILEY, J. T. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from a coal-fired pilot FBC system. *Journal of Hazardous Materials*, **84**, 175-188.
- LOCCI, R. UND SHARPLES, G.P. (1982). Morphology. In: *The Biology of the Actinomycetes*. pp. 165-191. Academic Press, London.
- LOCCI, R. (1984). Streptomycetes and Related Genera. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Section 29. p. 2451-2464. N. R. Krieg, J. G. Holt, (Eds.), Wilkins & Wilkins, Baltimore.
- LOCKHEAD, A.G. UND CHASE, F.E. (1973). Quantitative studies of soil microorganisms. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil Science*, **55**, 184-195.
- MAHRO, B. UND KÄSTNER, M. (1993). Der mikrobielle Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Böden und Sedimenten: Mineralisierung, Metabolitenbildung und Entstehung gebundener Rückstände. *BioEngineering*, **1**, 50-57.
- MAHRO, B., G. SCHAEFER, AND M. KÄSTNER (1994). Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: Hinchee, R. E., A. Leeson, L. Semprini, S. K. Ong (ed.) *Bioremediation of chlorinated and polycyclic hydrocarbon compounds*. Lewis Publishers. Boca Raton. 203-217.
- MAPLESTONE, R. A., STONE, M. J. UND WILLIAMS, D. H. (1992). The evolutionary role of secondary metabolites - a review. *Gene*, **115**, 151-157.
- MARWOOD, T. M., KNOKE, K., YAU, K., LEE, H., TREVORS, J. T., SUCHORSKI-TREMBLAY, A., FLEMMING, C. A., HODGE, V., LIU, D. L. UND SEECH, A. G. (1998). Comparison of tox-

- icity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. *Environmental Toxicology and Water Technology*, **13**, 117-126.
- MCCARTHY, A. J. (1987). Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, **46**, 145-163.
- MCCARTHY, A. J. UND WILLIAMS, S. T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene*, **115**, 189-192.
- MCCONKEY, B. J., DUXBURY, C. L., DIXON, D. G. UND GREENBERG, B. M. (1997). Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacterium *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photo-product phenanthrene quinone, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 892-899.
- MCGRODDY, S. E., FARRINGTON, J. W., GSCHWEND, P. M., (1996). Comparison of the in Situ and desorption sediment-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology* **30**, 172-177.
- MEYER, S. (1999). Mikrobieller Abbau typischer Teeröl-PAK und Hetero-PAK (N,S,O) in einem Modellbodenhorizont. Dissertation. Universität Hamburg
- MOLINA, M., ARAUJO, R. UND HODSON, R. E. (1999). Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. *Canadian Journal of Microbiology*, **45**, 520-529.
- MONIB, M., HOSNY, I., ZOHDY, L. UND KHALAFALLAH, M. (1981). Studies on humic acids decomposing Streptomyces. II. Efficiency of different species in decomposition. *Zentralblatt für Bakteriologie*, **136**, 15-25.
- MURPHY, E. M. UND ZACHARA, J. M. (1995). The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. *Geoderma*, **67**, 103-124.

- NIEDERLÄNDISCHES MINISTERIUM FÜR WOHNUNGSWESEN, RAUMORDNUNG UND UMWELT (1988). Leidradd Bodemsanering, Niederlanden.
- NOLL, H. (1996). Mikrobieller Abbau ausgewählter polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe in einer Pflanzenkläranlage - Bakterielle Populationsdynamik und Metabolitbildung. Dissertation, Technische Universität München.
- NORTHCOTT, G. L. UND JONES, K. C. (2001). Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in Soil. 1. Compound differences in aging and sequestration. *Environmental Science and Technology*, 35, 1103-1110.
- NYER, E. K., CROSSMAN, T. L. UND BOETTCHER, G. (1996). In situ bioremediation. In: In situ treatment technology, 61-100, CRC Press Inc., Boca Raton.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for testing of chemicals: *Daphnia* sp. acute immobilisation test and reproduction test. Updated guideline, 1984.
- O'KEEFE, D. P. UND LOPER, J. C. (1996). Researchers explore diversity of cytochrome P 450. *ASM News*, 62, 175-177.
- O' KEEFE, D. P., ROMESSER, J. A. UND LETO, K. J. (1988). Identification of constitutive and herbicide inducible cytochromes P 450 in *Streptomyces griseolus*. *Archives of Microbiology*, 149, 406-412.
- O' KEEFE, D. P. UND HARDER, P. A. (1991). Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 5, 2099-2105.
- O'KEEFE, D. P., LAU, S. M. UND HARDER P. A. (1993). Efficiency and substrate specificity of *Streptomyces griseolus* cytochromes P-450SUI and P-450SU2 mono-oxygenase reactions. *Biochemical Society Transactions*, 21, 1073-1077.
- ORTEGA-CALVO, J. J., LAHLOU, M. UND SAIZ-JIMENEZ, C. (1997). Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40, 101-106.

- ORTEGA-CALVO, J.-J. UND SAIZ-JIMENEZ, C. (1998). Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3123-3126.
- PETERS, K. (1999). Der Einfluss von Mineralöl- und Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen auf *Streptomyces* spp. in Rhizosphären verschiedener Pflanzen und die Fähigkeit der isolierten Streptomyzeten zur PAK-Metabolisierung. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- POGELL, B. M. (1995). Bioremediation of pesticides and herbicides by Streptomyces. In: *Environmental Biotechnology - Principles and applications*, 38-46, M. Moo-Young, W. A. Anderson and A. M. Chakrabarty, (Eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- POTHULURI, J. V., EVANS, F. E., HEINZE, T. M. UND CERNIGLIA, C. E. (1996). Formation of sulfate and glucoside conjugates of benzo[e]pyrene by *Cunninghamella elegans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 677-683.
- QIU, X. UND MC FARLAND M. J. (1991). Bound residue formation in PAH- contaminated soil composting using *Phanerochaete chrysosporium*. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*, **8**, 115-126.
- RAGLE, C. S., ENGBRETSON, R. R. UND V. WANDRUSZKA, R. (1997). The sequestration of hydrophobic micropollutants by dissolved humic acids. *Soil Science*, **162**, 106-114.
- REASONER, D. J. UND GELDREICH, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 1-7.
- REHMANN, K. (1991). Untersuchungen an Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces viridochromogenes*. Diplomarbeit, Universität Tübingen.
- REHMANN, K. (1995). Mikrobieller Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen am Beispiel des Pyrens. Dissertation, Technische Universität München.

- REHMANN K., HERTKORN N., UND KETTRUP, A. A. (2001). Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. *Microbiology*, **147**, 2783-2794.
- RENOUX, A. Y., MILLETTE, D., TYAGI, R. D. UND SAMSON, R. (1999). Detoxification of fluorene, phenanthrene, carbazole and p-cresol in columns of aquifer sand as studied by the Microtox<sup>®</sup> assay. *Water Research*, **33**, 2045-2052.
- RICHNOW, H. H., SEIFERT R., HEFTER J., KÄSTNER M., MAHRO B. UND MICHAELIS W. (1994). Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments. *Advances in Organic Geochemistry*, **22**, 671-681.
- RICHNOW, H. H., SEIFERT, R., HEFTER, J., LINK, M., FRANCKE, W., SCHAEFFER, G. UND MICHAELIS, W. (1997). Organic pollutants associated with macromolecular soil organic matter: Mode of binding. *Organic Geochemistry*, **26**, 745-758.
- RICHNOW, H. H., ESCHENBACH, A., MAHRO, B., SEIFERT, R., WEHRUNG, P., ALBRECHT, P. UND MICHAELIS, W. (1998). The Use of <sup>13</sup>C-Labelled Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for the Analysis of their Transformation in Soil. *Chemosphere*, **36**, 2211-2244.
- RUGGIERO, P. (1999). Abiotic transformations of organic xenobiotics in soils. A compounding factor in the assessment of bioavailability. In: Baveye, P. et al. (Eds.): Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- RULKENS, W. H., TICHY, R. UND GROTENHUIS, J. T. C. (1998). Remediation of polluted soils and sediment: perspectives and failures. *Water Science and Technology*, **37**, 27-35.
- SACK, U., HEINZE, T. M., DECK, J., CERNIGLIA, C., CAZAU, M. C. UND FRITSCHKE, W. (1997). Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2906-2909.

- SAMANTA, S. K., SINGH, O. V. UND JAIN, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**, 243-248
- SCHLAUTMANN, M. A. UND MORGAN J. J. (1993). Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, **27**, 961-969.
- SCHMITT, P., GARRISON, A.W., FREITAG, D. UND KETTRUP, A. (1997). Capillary Isoelectric Focusing (CIEF) for the Characterization of Humic Substances. *Water Research*, **31**, 2037-2049.
- SCHMITT-KOPPLIN, P. (1997). pers. Mitteilung
- SCHULTEN, H.-R., PLAGE, B. UND SCHNITZER, M. (1991). A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften*, **78**, 311-312.
- SCHULTEN, H.-R. UND SCHNITZER, M. (1993). A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, **80**, 29-30.
- SCHULTEN, H.-R. UND SCHNITZER, M. (1997). Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Science*, **162**, 115-130.
- SCOW, K. M. UND JOHNSON, C. R. (1997). Effects of sorption on biodegradation of soil pollutants. *Advances in Agronomy*, **58**, 1-56.
- SHELTON, D. R., KHADER, S., KARNS, J. S. UND POGELL, B. M. (1996). Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation*, **7**, 129-136.
- SHEVCHENKO, S. M. UND BAILEY, G. W. (1996). Life after death: lignin-humic relationships reexamined. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **26**, 95-153.
- SHIMP, R. J. UND PFAENDER, F. K. (1985). Influence of naturally occurring humic acids on the biodegradation of mono-substituted phenols by aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 402-407.

- SHUTTLEWORTH, K. L. UND CERNIGLIA, C. E. (1995). Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **54**, 291-302.
- SIMS, R. C. (1983). Reevaluation of partitioning as a mechanism of nonionic chemicals adsorption in soils. *Journal of Environmental Quality*, **12**, 1-11.
- SIMS, R. C. UND OVERCASH, M. R. (1988). Fate of Polynuclear Aromatic Compounds (PNA) in Soil-Plant Systems. *Residue Review*, **88**, 1-68.
- SINDER, C., MANN, V., PFEIFER, F. UND KLEIN, J. (1996). Bildung von Huminstoffen im Zuge des mikrobiellen PAK-Abbaus: Einfluss der Bodenmatrix und ökotoxikologische Bewertung. In: Neue Techniken der Bodenreinigung - Chemisch-physikalische und biologische Verfahrensentwicklung unter Berücksichtigung der bodenkundlichen und analytischen Bewertung. Dokumentation des 3. SFB 188-Seminars in Hamburg, 229-240.
- SMITH, R. V. UND ROSAZZA, J. P. (1974). Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **161**, 551-558.
- SOEDER, C. J., PAPADEROS, A., KLEESPIES, M., KNEIFEL, H., HAEGEL, F.-H. UND WEBB, L. I. (1996). Influence of Phytogenic Surfactants (*Quillaya* Saponin and *Soya* Lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**, 654-659.
- STANECK, J. L. UND ROBERTS, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Applied Microbiology*, **28**, 226-231.
- SUTHERLAND, J. B., FREEMAN, J. P., SELBY, A. L., FU, P. P., MILLER, D. W. UND CERNIGLIA, C. E. (1990). Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Archives of Microbiology*, **154**, 260-266.
- SWIFT, R.S. (1996). Organic matter characterization. Chap 35, pp. 1018-1020. In D.L. Sparks et al. (eds.) *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Soil Science Society American Book Series: 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin.

- TIEHM, A. UND FRITZSCHE, C. (1995). Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 964-968.
- TIMMIS, K. N. UND PIEPER, D. H. (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **17**, 201-204.
- TOTSCHKE, K. U. (2001). Vorlesung: Schadstoffe in Böden. Technische Universität München
- TOUSSAINT, M. W., SHEDD, T. R., VAN DER SCHALIE, W. H., UND LEATHER, G. R. (1995). A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 907-915.
- VERSTRAETE, W. UND DEVLIEGHER, W. (1996). Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation. *Biodegradation*, **7**, 471-485.
- VIGELAHN, L. UND KALNOWSKI, G. (1997). Möglichkeiten und Grenzen der Toxizitätsbelastung an stark absorbierenden Farbstofflösungen. *Schriftenreihe Biologische Abwasserbehandlung*, **9**, 267-293, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Berlin.
- WAIS, A. (1998). Non-extractable residues of organic xenobiotics in soil – a review. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft, *Pesticide Bound Residues in soil*. Senate Commission for the Assessment of Chemicals used in Agriculture, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, No. 2, 5-33.
- WEISSENFELS, W. D., BEYER, M., UND KLEIN, J. (1991). Microbial metabolism of fluoranthene: Isolation and identification of ring fission products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, 528-535.
- WEISSENFELS, W. D., KLEWER, H.-J. UND LANGHOFF, J. (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 689-696.

- WHITE, J. C., HUNTER, M., NAM, K., PIGNATELLO, J. J., UND ALEXANDER, M. (1999). Correlation between biological and physical availabilities of phenanthrene in soils and soil humin in aging experiments, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 1720-1727.
- WIESMANN, U. (1994). Der Steinkohlenteer und seine Destillationsprodukte - ein Beitrag zur Geschichte der Technik und der Bodenverschmutzung. In: *Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen*, Weigert, B. (Hrsg.), Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, **4**, 3-18.
- XU, L. H., LI, Q. R. UND JIANG, C. L. (1996). Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 244-248.
- ZIECHMANN, W. (1997). Die Humifizierung und ihre Folgen. In: Umweltbundesamt (Hrsg.) *Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten*. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", 26. und 27.02.1997 in Berlin. A1-15.

**Lebenslauf**

Name: Alexandros Papaderos  
Geburtstag: 27. Februar 1969  
Geburtsort: Thessaloniki, Griechenland  
Staatsangehörigkeit: griechisch

**Ausbildung:**

1975-1980 Grundschole in Thessaloniki, Griechenland  
1980-1986 Gymnasium der Deutschen Schule Thessaloniki  
1987-1994: Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum;  
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Zoologie, Allgemeine und  
Umwelthygiene  
1993-1994: Diplomarbeit in Mikrobiologie/Umweltbiotechnologie  
am Institut für Biotechnologie 3 des Forschungszentrums  
Jülich GmbH; Prof. Dr. C.-J. Soeder

**Berufsweg**

12/1994 - 10/1995 externer wissenschaftlicher Mitarbeiter  
am Institut für Biotechnologie 3 des Forschungszentrums  
Jülich GmbH: Ökologische Bewertung organischer  
Schadstoffbelastungen im Boden  
10/1995 - 03/1996: Praktikant am Institut für Ökologische Chemie  
des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und  
Gesundheit GmbH:  
Dekontamination und Entsorgung von Schadstoffen  
in belasteten Matrices  
04/1996 - 03/1999: Promotion in Mikrobiologie, Analytische und Ökologische  
Chemie und Ökotoxikologie am Institut für Ökologische  
Chemie des GSF- Forschungszentrums für Umwelt und  
Gesundheit GmbH; Prof. Dr. A. Kettrup  
04/1999 - 09/1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Umweltprobenbank  
des Bundes am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit GmbH: Monitoring und Bestimmung  
von Umweltschadstoffen  
01/2000 - 12/2000 Projektmitarbeiter im Vorstandssekretariat  
der Stadtsparkasse München:  
Beratung in den Bereichen Umwelt und  
Biotechnologie  
seit 04/2001 Erfinderberater der Technischen Universität München,  
Hochschulreferat 3, Wissenstransfer und Messewesen