

## ÜBER DIE BIOLOGISCHE ABBAUFÄHIGKEIT DER POLYÄTHYLENOXIDE

P. PITTER

*Institut für Wassertechnologie,  
Technische Hochschule für Chemie, 16 628 Prag 6*

Eingegangen am 1. März 1972

Die Abbaugeschwindigkeit der Polyäthylenoxide verringert sich fortschreitend mit zunehmendem mittleren Molekulargewicht in den Grenzen von 44 bis 3500. Ein anomales Verhalten zeigt bloß das Dimer, das langsamer abgebaut wird als das Trimer und Polyäthylenoxid vom mittleren Molekulargewicht 300. Die Abbaugeschwindigkeit der Polyäthylenoxide hängt ab von der Art und der Dauer der Adaptierung der Mikroben des Impfmateri als. Der Abbau der polymeren Kette verläuft wahrscheinlich wie eine Depolymerisation und nicht wie ein statistischer Abbau.

Die niederen Äthylenoxidpolymere werden für biologisch abbaubar gehalten, hingegen meist nicht die höheren Polymere<sup>1,2</sup>. Bisher ist die Molekulargewichtsgrenze für die Abbaufähigkeit dieser Polymere nicht bestimmt worden. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Ermittlung des Abbaugrads und der Abbaugeschwindigkeit der Polyäthylenoxide in Abhängigkeit von ihrem mittleren Molekulargewicht.

### EXPERIMENTELLER TEIL

*Polyäthylenoxide.* Polymere vom mittleren Molekulargewicht 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1500 und 3500 (Chemische Werke W. Pieck, Nováky, Tschechoslowakei).

*Gesamtgehalt der gelösten organischen Stoffe.* Der Gehalt der organischen Stoffe in der Probe vor und während des biologischen Abbaues wurde nach der für ihre Oxydation mit Kaliumdichromat in Schwefelsäuremedium<sup>3,4</sup> verbrauchten Sauerstoffmenge bestimmt. Er wird in mg O<sub>2</sub>/l ausgedrückt und als Oxydierbarkeit bezeichnet. Die Oxydation der Proben wurde nach ihrer Filtration über das Papierfilter zur Entfernung des suspendierten Impfmateri als von flockigem Charakter vorgenommen. Bei dispersem Wachstum der Mikroben wurde die Abtrennung durch Abschleudern in der Ultrazentrifuge bewerkstelligt.

*Spektrophotometrie im Infrarot.* Die Infrarot-Spektren der 0,4 oder 1%igen Proben in Tetrachloromethan wurden mit einem Zeiss Infrarot-Spektrophotometer, Modell UR 10, in Küvetten der Schichtdicke 1,02 mm aufgenommen. Das mittlere Molekulargewicht wurde durch Auswertung des Verhältnisses der Absorptionsintensität bei 2875 und 3500 cm<sup>-1</sup> ermittelt.

*Dünnschichtchromatographie.* Die Äthylenoxidpolymere wurden durch Umsetzung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in die entsprechenden Ester übergeführt<sup>5</sup>. Die Lösungen dieser Ester

in Benzol von der Konzentration 30 bis 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wurden in einer Menge von 2 bis 5  $\mu\text{l}$  auf eine nach Stahl mit dem Sorptionsmittel Silicagel G in einer Dicke von 0,3 mm beschichteten Platte aufgetragen nach erfolgter 30 Minuten langer Aktivierung bei 105°C. Die Chromatogramme wurden nach dem aufsteigenden Verfahren mit wassergesättigtem Äthylmethylketon entwickelt (Laufstrecke 13 bis 15 cm). Die Sichtbarmachung erfolgte mit Dragendorff-Reagens<sup>5</sup>. Die Chromatogramme sind in Abb. 1\* aufgeführt.

*Isolierung der Bakterien-Reinkultur.* Die Vorratslösungen der Polymere trübten sich nach ca. 2 Monaten durch frei dispergierte Bakterien. Ihre Züchtung auf einem mit Agar versteiften Malzwürze-Nährboden mit einem Gehalt von 10 g Polymer 800 pro Liter ergab weiße Bakterienkolonien. Die aerobe Züchtung wurde im biologischen Medium mit einem Gehalt von 2 g Polymer 800 pro Liter vorgenommen. Nach 30 Tagen wurde die Biomasse durch Abschleudern in der Ultrazentrifuge abgetrennt, gewaschen und zur Inokulierung in biologischem Medium suspendiert.

*Bestimmung der biologischen Abbaufähigkeit.* Es wurde der statische Test im offenen System herangezogen<sup>6,7</sup>. Die geprüften Verbindungen wurden in einem synthetischen biologischen Medium gelöst<sup>7</sup>. Als Impfmateriale wurde sowohl die flockige heterogene Bakterienkultur, der sog. belebte Schlamm, als auch die isolierte, auf dem bloßen Polymer 800 wachsende Bakterien-Reinkultur angewendet. Die Adaptierung des belebten Schlammes erfolgte nach dem in Mitteilung<sup>7</sup> angeführten Schema.

*Isolierung der Produkte nach dem partiellen biologischen Abbau.* Die 14 Tage am Polymer 1000 adaptierte Bakterienkultur wurde durch Filtrieren vom biologischen Medium separiert und dann in 5 l eines lediglich anorganische Nährstoffe enthaltenden biologischen Mediums suspendiert; der Trockengehalt der bakteriellen Suspension betrug 3 g/l. Dann wurden zur Suspension insgesamt 10 g Polymer 1000 zugesetzt. Durch 70 Tage lange Belüftung waren 64% der ursprünglichen Oxydierbarkeit beseitigt worden, und der gesamte Gehalt des Behälters wurde durch ein Papierfilter und anschließend noch durch ein Bakterienfilter 120 G 5 filtriert. Das Filtrat wurde eingengt und in einem Vakuumrotationsverdampfer bei 40°C zur Trockene abgedunstet. Der Rückstand wurde mit 300 ml Toluol digeriert und der Toluolextrakt zur Trockene abgedampft. Der Rückstand ergab nach Trocknen bei 110°C ca. 2 g einer weißen wachsartigen Substanz.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Tabelle I sind die durchschnittlichen spezifischen Abbaugeschwindigkeiten der Polymere mit verschieden adaptiertem Impfmateriale zusammengefaßt. Beispiele für den Verlauf des biologischen Abbaues der einzelnen Polyäthylenoxide sind in Abb. 2 aufgeführt (Versuch D in Tab. I). Die Abbaugeschwindigkeit nimmt mit steigendem mittlerem Molekulargewicht ab. In dieser Reihe weist das Dimer ein anomales Verhalten auf. Die Abbaugeschwindigkeit hängt unter sonst gleichen Bedingungen von der Art und Dauer der Adaptierung der Mikroben des Impfmateriale ab. Die Polymere des Äthylenoxids und Äthylenglykol werden langsamer abgebaut als die Saccharide, aliphatischen Säuren und Aminosäuren, deren Abbaugeschwindigkeit den Wert 1 des Maßes für die Beseitigung der Oxydierbarkeit (in Gramm pro Gramm Anfangstrockengehalt des Impfmateriale pro Tag) übersteigt<sup>8</sup>. Mit nichtadaptiertem, belebtem Schlamm ist der Abbau der Polymere mit einem Molekulargewicht von 800 und höher nicht gelungen. Mit langfristig adaptiertem, belebtem Schlamm und mit der auf dem bloßen Polymer 800 wachsenden Bakterienkultur konnten die Polymere 1000 und 1500 vollständig und das Polymer 3500 partiell abge-

\* Siehe Beilage nach Seite 2666.

P.PITTER:

## Über die biologische Abbaufähigkeit der Polyäthylenoxide

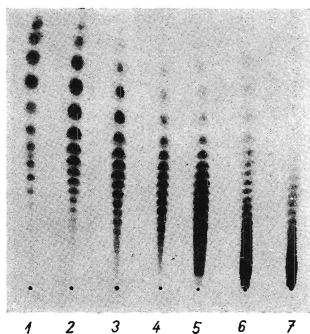


ABB. 1

Chromatogramme der Polyäthylenoxide nach der Acylierung mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid

Polymere (mittleres Molekulargewicht):  
1 400, 2 500, 3 600, 4 700, 5 800, 6 1000,  
7 1500.



ABB. 3

Chromatogramme der 3,5-dinitrobenzoylierten Polymere 1000 (1) und 1500 (2) und des isolierten Produktes nach partiellem Abbau des Polymers 1000 (3)

baut werden. Die Notwendigkeit der langfristigen Adaptierung läßt darauf schließen, daß es sich bereits nicht um eine induzierte Synthese von Enzymen, sondern eher um eine Adaptierung der Art handelt.

Die Äthylenoxidpolymere sind ein Gemisch von Polymerhomologen und verhalten sich deshalb wie ein Multikomponentensubstrat. Die Abbaugeschwindigkeit der höheren Polymere nimmt mit der Zeit allmählich ab, da die niedermolekularen Polymerhomologen schneller abgebaut werden als die hochmolekularen. Bei den chemischen Individuen — Äthandiol-1,2, 2,2'-Oxydiäthanol und 3,6-Dioxaoktan-1,8-diol — äußert sich dieses Phänom natürlich nicht, und der Abbau verläuft annähernd mit konstanter Geschwindigkeit. Dies ist auch bei den Polyäthylenoxiden vom mittlerem Molekulargewicht bis etwa 400 der Fall, da die Verteilungskurve der Polymerhomologen noch einen relativ steilen Verlauf aufweist.

Das Spektrogramm des Produktes, welches nach dem partiellen biologischen Abbau des Polymers 1000 isoliert wurde, ist in qualitativer Hinsicht mit dem Spektrogrammen der Polyäthylenoxide identisch. Durch quantitative Auswertung

TABELLE I

Durchschnittliche spezifische Abbaugeschwindigkeit der Äthylenoxidpolymere in Abhängigkeit von den verschiedenen Adaptierungsbedingungen des Impfmateri als

A Nichtadaptierter aktivierter Schlamm, B mit Glucose und Pepton genährter belebter Schlamm, der 14 Tage unter Zusatz eines Gemisches von Polyäthylenoxiden adaptiert wurde, C belebter Schlamm der 30 Tage am bloßen Polymer 1000 adaptiert wurde, D am bloßen Polymer 800 wachsende Bakterienkultur.

Maß für die beseitigte Oxydierbarkeit  
(g pro g Anfangstrockengehalt des Impfmateri als  
pro Tag)

Polymer <sup>a</sup>	Maß für die beseitigte Oxydierbarkeit (g pro g Anfangstrockengehalt des Impfmateri als pro Tag)			
	A	B	C	D
Äthandiol-1,2	0,47	1,0	—	1,17
Dimer	0,175	0,33	—	0,566
Trimer	0,28	0,66	—	0,875
300 <sup>a</sup>	0,23	0,45	—	0,875
400	0,061	0,172	—	—
500	—	0,141	—	0,72
600	—	0,129	0,115	—
700	0,021	0,097	0,124	0,37
800	—	0,070	0,097	0,246
1 000	—	0,022	0,059	0,168
1 500	—	—	0,041	0,138
3 500	—	—	—	0,016

<sup>a</sup> Die höheren Polymere werden nach ihrem mittleren Molekulargewicht bezeichnet.

des Spektrogramms des isolierten Produktes wurde sein mittleres Molekulargewicht zu 1600 ermittelt. Darauf weisen auch die Chromatogramme 1, 2 und 3 der Polymere 1000 und 1500 und des isolierten polymeren Produktes hin (Abb. 3\*). Das nach dem partiellen biologischen Abbau des Polymers 1000 verbleibende Produkt enthält weniger niedermolekulare Polymerhomologe als das Polymer 1500.

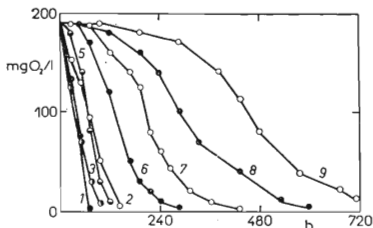


ABB. 2

Abbauverlauf der Polyäthylenoxide mit der Bakterien-Reinkultur

Trockengehalt der Impfkultur 50 mg/l.  
Kurven 1 bis 9: Äthandiol-1,2, Dimer, Trimer, Polymere 400, 500, 700, 800, 1000 und 1500; Kurve 3 ist mit Kurve 4 identisch.

Der Abbau der polymeren Kette kann entweder als Depolymerisation oder als statistischer Abbau verlaufen. Diese beiden aus der Chemie der makromolekularen Verbindungen bekannten Spaltungsweisen besitzen auch in der Biochemie eine Analogie<sup>9</sup>. Der biologische Abbau der Polyäthylenoxide verläuft wahrscheinlich wie eine Depolymerisation, denn nach dem partiellen biologischen Abbau wurde eine Anhäufung hochmolekularer Anteile beobachtet. Beim statistischen Abbau müßte gleich zu Beginn ein Absinken des Molekulargewichtes eintreten, und die Bildung von niedrigeren Polymeren müßte sich auch im Chromatogramm äußern. Beim biologischen Abbau der Polyäthylenoxide wird in der Regel eine hydrolytische Spaltung der Ätherbindung und eine Abspaltung von jeweils Zweikohlenstoff-Fragmenten vorausgesetzt<sup>1,10</sup>. Das oben erwähnte anomale Verhalten des Dimers indiziert einen wahrscheinlich andersartigen Metabolismus dieser Verbindung. Der Abbau des Dimers geht langsamer vor sich als der des Äthandiol-1,2, des Trimers und des Polymers 300. Sofern es bei der Depolymerisation der Polyäthylenoxide zur sukzessiven Abspaltung von Zweikohlenstoff-Fragmenten käme, müßte das Dimer immer eines der Abbauzwischenprodukte sein. In einem solchen Fall wäre es das limitierende Glied der Abbaugeschwindigkeit. Aus den durchgeführten Versuchen sowie aus dieser Erwägung folgt, daß die Voraussetzung einer einfachen Hydrolyse der endständigen Äthergruppe, die zur sukzessiven Abspaltung von Äthylenglykoleinheiten führen würde, den beobachteten anomalen Verhalten des Dimers widerspricht.

\* Siehe Beilage nach Seite 2666.

## LITERATUR

1. Fincher E. L., Payne W. J.: *Appl. Microbiol.* 10, 542 (1962).
2. Payne W. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 5, 355 (1963).
3. Moore W. A., Kroner R. C., Ruchhoft C. C.: *Anal. Chem.* 21, 953 (1949).
4. Moore W. A., Ludzack F. J., Ruchhoft C. C.: *Anal. Chem.* 23, 1297 (1951).
5. Bürger K.: *Z. Anal. Chem.* 224, 421 (1967).
6. Pitter P.: *Chem. listy* 65, 897 (1971).
7. Pitter P., Kozderková M.: *Chem. průmysl* 20, 279 (1970).
8. Chudoba J.: *Sborník Vysoké školy chemicko-technologické (Prag) F 12*, 39 (1967).
9. Vollmert B.: *Základy makromolekulární chemie*. Academia, Prag 1970.
10. Swisher R. D.: *Surfactant Biodegradation*. Dekker, New York 1970.

Übersetzt von M. Wichsová.