

Biochemistry

KALORIMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM MIKROBIELLEN ABBAU SCHWERLÖSLICHER SCHADSTOFFE AM BEISPIEL VON NAPHTHALIN

K. Fiebich und A. Kettrup*

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut für Ökologische Chemie, Postfach 1129, 85758 Oberschleißheim, Deutschland

Abstract

The bacterial degradation of naphthalene and other PAH in liquid media by pure cultures was investigated by an isothermic flow-calorimeter. Anabolic and catabolic processes were found to be separated distinctly. The phase of exponential heat production was developed only weakly. This was attributed to the low solubility and the dependence of the dissolving rate of substrate as the rate determining step on cristal surface and diffusion.

Methodical problems based on the local separation of the fermenter and the measuring cell. Because of the prevented gas exchange in the flow tubes and the enrichment of carbon dioxide metabolic activity of the microorganisms was lowered for times. The differences between the heat production in the fermenter and the flow tubes were reduced by developing a mathematical model.

Keywords: naphthalene

Einleitung

Durch die hohe Belastung aquatischer und terrestrischer Ökosysteme mit organischen Schadstoffen drängt sich die Frage nach dem Verhalten und dem Verbleib der Substanzen seit den 60er Jahren mehr und mehr in den Mittelpunkt der Umweltforschung und in das öffentliche Bewußtsein. Eine bedeutende Schadstoffklasse bilden die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe

* Korrespondierender Autor.

(PAKs), die auf Grund ihrer sowohl natürlichen als auch anthropogenen Quellen zu den ubiquitären Verbindungen gehören. Insbesondere der eukaryotische Abbau einer Vielzahl der PAKs führt zu mutagenen bzw. carcinogenen Dihydroxyepoxiden. Die Fähigkeit einiger Mikroorganismenstämme zum Abbau persistenter Substanzen bedingt ein hohes Potential für eine Dekontamination belasteter Umweltkompartimente, das heute bereits umfangreich genutzt wird. Nur wenige abiotische Reaktionen, die in der Natur ablaufen, verursachen vergleichbar umfassende Veränderungen an Schadstoffen wie biotische Prozesse. Kombinationen herkömmlicher mit biologischen Methoden gestatten heute kostengünstige und effektive Sanierungen von organischen Schlämme und Böden und bilden eine vielversprechende technologische Alternative zu Deponierung oder physikalisch-chemischen Technologien wie Verbrennung und Bodenwäsche, die in der Regel zu sekundären Problemen führen. Sie bedarf jedoch noch umfangreicher Untersuchungen der Abbauprozesse und der zum Abbau fähigen Mikroben.

Für die Entwicklung effektiver Technologien der biotischen Dekontamination sind empfindliche und einfach zu handhabende Analysenmethoden zur Untersuchung des Wirkungsgrades ablaufender Mineralisierungsprozesse von großem Interesse. Da alle Lebensprozesse mit Energieflüssen verbunden sind, tritt als Nebenprodukt stets Wärme auf. Die Wärmeproduktion ist stärker abhängig von der Art des Stoffwechselprozesses und der energieliefernden Reaktion in einer Bakterienkultur als vergleichsweise die Wachstumsrate oder der Sauerstoffverbrauch. Damit kann die Wärme als alternative wirkungsvolle Meßgröße für die Untersuchung des Zustandes und der Entwicklung mikrobieller Kulturen sowie des Fortschritt des Dekontaminationsprozesses dienen.

Ziel der Studie war die Erprobung der isothermen Durchflußkalorimetrie als Meßmethode zur Untersuchung des biotischen Abbaus von Naphthalin als Vertreter der PAKs.

Materialien und Methoden

Kalorimeter

Die kalorimetrischen Messungen wurden mit dem 2277 Thermal Activity Monitor (TAM) (Thermometric AB, Schweden) durchgeführt, einem isothermen Wärmeleitungs-kalorimeter. Die Nachweisgrenze für Durchflußmessungen beträgt $0.5 \mu\text{W}$ und die Reproduzierbarkeit 0.2% .

Chemikalien

Das verwendete Naphthalin ($>99\%$) wurde von der Fluka AG, Schweiz bezogen. Die anorganischen Salze und Lichrosolv-Wasser für die HPLC der Fa. Merck, Darmstadt waren vom Reinheitsgrad p.a. Es wurde Acetonitril für die HPLC von der Fa. Riedel-de-Haen, Seelze verwendet.

Kultur

Der verwendete Naphthalin-Abbauer *Pseudomonas* sp. KR3 wurde von K. Rehmann, Institut für Ökologische Chemie, GSF Neuherberg aus einem mit PAKs kontaminierten Boden isoliert. Der Stamm baut Naphthalin vollständig und aerob ab.

Kulturbedingungen

Der Stamm wurde bei 28 °C auf einem komplexen Nährboden gehalten. Dieser enthielt (Angaben g L⁻¹): Proteose-Pepton 15, Hefe-Extrakt 3, D(+)-Glukose-Monohydrat 1, NaCl 6, Agar 15; *pH* 7.4±0.1.

Die Versuche wurden in einem flüssigen Mineralsalzmedium durchgeführt. Das Medium enthielt (Angaben mg L⁻¹): NaCl 100, MgSO₄·7H₂O 200, FeCl₃·6H₂O 0.01, K₂HPO₄ 200, KH₂PO₄ 800, (NH₄)₂SO₄ 650, CaCl₂·2H₂O 100; Spurenelemente; *pH*-Wert 6.0±0.1.

200 mg L⁻¹ das entspricht 1.5 mmol L⁻¹ Naphthalin als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wurden getrennt zugegeben und in Diethylether unikristallisiert. Die Versuche wurden in einem auf 25 °C thermostatisierten, gerührten und mit befeuchteter, sterilgefilterter Luft begasten Batch-Fermenter durchgeführt. Die Wärmetönung wurde über einen by pass kontinuierlich gemessen.

Zellwachstum

Das Wachstum der Zellen wurde über die optische Dichte bei 550 nm mit einem SLT Easy Reader Spectra Plus 400 ATC bestimmt. Außerdem erfolgten Wägungen der Trockenmasse und Ermittlung der Lebendzellzahl durch Ausplattieren von verdünnten Kulturaliquoten auf Komplexnährböden und Auszählen der gebildeten Kolonien nach 36–48 h.

Ergebnisse

Der vollständige Abbau von 1.5 mmol L⁻¹ Naphthalin dauerte ca. 48 h an. Dabei wurde im zeitlichen Verlauf des Wärmeflusses die Ausbildung eines Maximums beobachtet. Bei einer Vielzahl der Messungen traten jedoch auch kleinere, lokale Maxima wie in der in Abb. 1 dargestellten Kurve auf. Das zwischenzeitliche Absinken der Aktivität der Organismen wurde auf die räumliche Trennung von Fermenter und Meßzelle zurückgeführt. Auf Grund des fehlenden Gasaustausches in den Fließlinien verursachte offensichtlich die Anreicherung von Kohlendioxid stoffwechselhemmende Verhältnisse, so daß die Messung nicht die wahren Prozesse im Fermenter widerspiegelte. Untersuchungen ergaben, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen ein Sauerstoffmangel als Hauptursache für die zwischenzeitliche Abnahme der Stoffwechse-

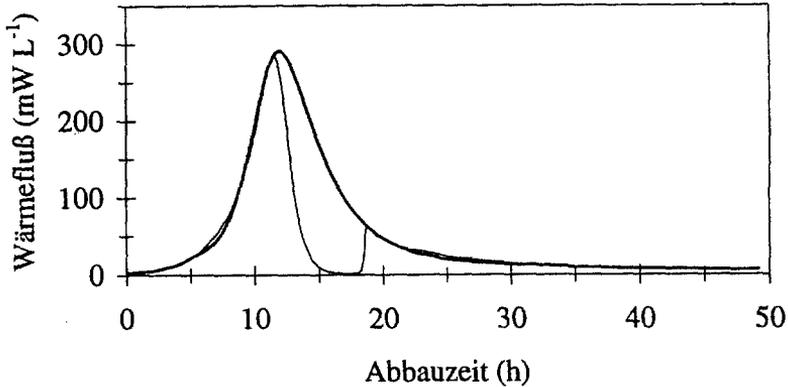


Abb. 1 — Wärme flu ßkurve beim Naphthalinabbau durch *Pseudomonas sp.* KR3 mit ausgeprägter Störung der Messung durch fehlenden Gasaustausch und Anreicherung von Kohlendioxid in den Fließlinien; --- berechnete Einhüllende der Me ßkurve

laktivität in den Fließlinien, wie in der Literatur erwähnt [1–3], weitgehend auszuschließen war [4, 5]. Um die Unterschiede der Aktivität der Mikroorganismen zwischen Fermenter und Me ßzelle auszugleichen, wurden mittels eines Kurvenanpassungsprogramms Modellkurven berechnet, die die Me ßkurve einhüllten (Abb. 1). Auf Grund der geringen Stoffwechselaktivität in der Anfangs- und Endphase des Abbauprozesses konnte hier der Einflu ß des fehlenden Gasaustausches als minimal angenommen, so daß diese Me ßpunkte die Grundlage für die Modellberechnung bildeten. Folgende Funktion fand Verwendung:

$$P_{\text{korrigiert}} = f(t) = \frac{a_0}{1 + \exp\left[-\left(\frac{t - a_1 + \frac{a_2}{2}}{a_3}\right)\right]} \left\{ 1 - \left[1 + \exp\left(-\frac{t - a_1 - \frac{a_2}{2}}{a_4}\right) \right]^{-1} \right\} \quad (6)$$

P – Wärme flu ß; t – Versuchszeit; $a_{0..4}$ – Parameter der Funktion

Durch die relativ geringe Löslichkeit des Naphthalins war während der stationären Wachstumsphase dessen Übergang in den gelösten und damit bioverfügbaren Zustand als geschwindigkeitsbestimmender Schritt zu betrachten. Die Ausprägung der Phase exponentieller Wärme produktion war sehr gering und schwer reproduzierbar. Die exponentielle Zunahme der Zellvermehrung war dagegen langanhaltender und gut bestimmbar (Abb. 2).

Man findet in der Anfangsphase des Abbaus trotz starker Wärme abgabe und rasch fortschreitender Naphthalinmetabolisierung keine me ßbare Zunahme der Zellmasse. Die exponentielle Wachstumsphase setzte zum Beginn der exponentiellen Wärme produktion um mehrere Stunden verzögert ein—etwa beim Erreichen des Wärme flu ßmaximums (Abb. 3.1).

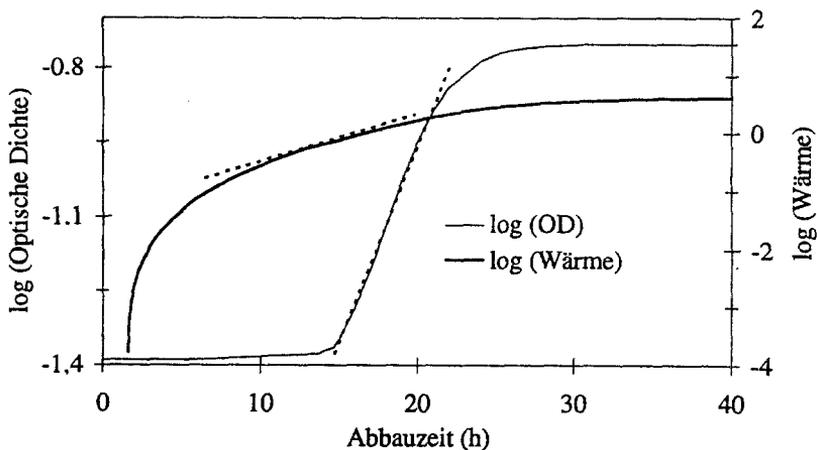


Abb. 2 Unterschiedliche Ausprägung der exponentiellen Phasen der Wärmeproduktion und Zellvermehrung beim Naphthalinabbau. Der steady state ist jeweils gekennzeichnet: -----

Wie sich aus HPLC-analytischen Untersuchungen der Medienzusammensetzung im zeitlichen Verlauf des Abbaus ergab, wurden ein Großteil der nachgewiesenen, bis dahin angereicherten Metabolite ab diesem Zeitpunkt abgebaut [5].

Erste Untersuchungen zum Abbau höherer PAKs ergaben, daß sich die zeitliche Verschiebung von Katabolismus und Anabolismus mit zunehmender Ringzahl noch verstärkt (Abb. 3.2, 3.3). Die Abbildungen zeigen Wärmeflußkurven des Abbaus von Naphthalin, Phenanthren und Pyren durch Reinkulturen sowie jeweils den Beginn der meßbaren Zunahme der optischen Dichte.

Für den Naphthalinabbau wurde mit zunehmendem Substratangebot im Mittel eine Zunahme der Dauer der exponentiellen Phase, des Wärmeffusses und der Wärmeproduktion im steady state beobachtet. Dabei strebten die Werte jeweils gegen Maxima, so daß eine weitere Erhöhung des Substratangebotes keine Verlängerung der exponentiellen Wärmeproduktionsphase mehr mit sich brachte (Tab. 1).

Tabelle 1 Einfluß des Substratangebotes auf die Ausprägung der exponentiellen Wärmeproduktionsphase beim Naphthalinabbau

$[C_{10}H_8]_0 /$ $mg L^{-1}$	$t_{exp} /$ h	$P_{exp} /$ $mW L^{-1}$	$Q_{exp} /$ $kJ L^{-1}$	n
50	9	34	0.84	1
100	14±7	200±100	2.0±0.5	4
200	17±4	220±50	3.7±0.7	36
300	18±3	260±40	5.0±1.0	6
400	19±4	260±50	4.7±0.8	13
500	18±4	440±70	7.8±0.7	5

Um den Einfluß der Abbaubedingungen auf die oft kaum bestimmbare stationäre Phase beurteilen zu können, werden verschiedene Charakteristika des steady state wie dessen Dauer, die Wärmeproduktion und deren zeitliche Ableitung der logarithmierten Form als Maß für den Wärmefluß auf eine Korrelation mit leicht ermittelbaren Eigenschaften der Wärmeflußkurve – der Zeit und der Wärmeproduktion bis zum Wärmeflußmaximum sowie dem maximalen Wärmefluß – untersucht. Dabei ergaben sich lineare Zusammenhänge zwischen folgenden Parametern:

- Zeit vom Versuchsbeginn bis zum Ende der exponentiellen Phase t_{exp} und der bis zum Wärmeflußmaximum t_{max} ;
- dem Wärmefluß in der stationären Phase P_{exp} und dem Maximalwärmefuß P_{max} ;
- der Wärmeproduktion in der stationären Phase Q_{exp} und der vom Versuchsbeginn bis zum Wärmefußmaximum Q_{max} (Tab. 2).

Tabelle 2 Korrelation von Merkmalen der Phase exponentieller Wärmeproduktion mit Eigenschaften der Wärmefußkurve. Lineare Regression ($y = b \cdot x$)

Parameter		Anstieg	r^2	σ_y^2
Wärmefußkurve (y)	steady state (x)	b		
t von t_0 bis P_{max}	t von t_0 bis Ende des st. st. t_{exp}	0.86 ± 0.07	0.94	1.2 h
t von t_0 bis P_{max}	Dauer des st. st. t'_{exp}	1.10 ± 0.02	0.65	3.0 h
Maximalwärmefuß P_{max}	$d \log Q_{\text{exp}} / dt$	0.76 ± 0.02	0.64	75 mW L ⁻¹
Wärmeproduktion bis P_{max}	Wärmeproduktion Q_{exp}	0.69 ± 0.09	0.92	0.5 kJ L ⁻¹

Diese Abhängigkeiten gestatteten vergleichende Aussagen über den steady state mit Hilfe dieser einfach zu ermittelnden Merkmale der Wärmefußkurve.

Mit zunehmendem Naphthalinangebot sank die Ausbeute an Wärme bezogen auf den Energiegehalt des Substrates kontinuierlich ab. Die Ausbeute an Zellmasse pro Substratmenge stieg erwartungsgemäß an. Bemerkenswert war, daß sie bei einem Naphthalinangebot $> 1.5 \text{ mmol L}^{-1}$ wieder geringer wurden. Entsprechend nahm der Anteil der Substratenergie, die als Wärme abgegeben wurde zunächst exponentiell ab und blieb bei höherem Substratgehalt konstant. Bei Naphthalinanfangsgehalten $> 1.5 \text{ mmol L}^{-1}$ wurden konstante Werte erreicht (Abb. 4).

Diskussion

Die Studie zeigt die vielschichtige Problematik, die sich aus der Untersuchung des Bioabbaus schwerlöslicher, höhermolekularer Verbindungen mittels isothermer Durchflußkalorimetrie ergibt.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Auflösung des Substrates in den untersuchten Flüssigkulturen ist in PAK-kontaminierten Böden vergleichbar

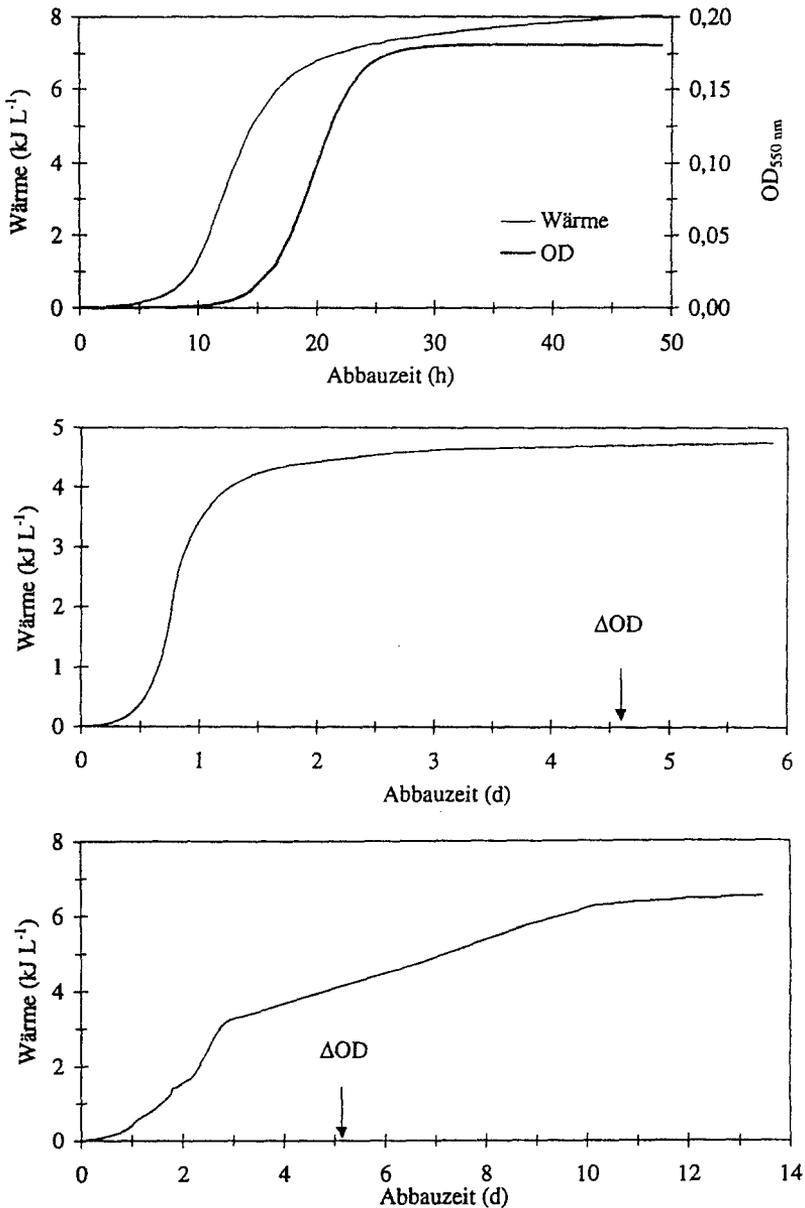


Abb. 3 Zeitliche Verschiebung zwischen Wärmeproduktion und Zellvermehrung beim mikrobiellen Abbau verschiedener PAKs. Mit ΔOD ist jeweils der Beginn meßbarer Änderung der optischen Dichte ($OD_{550 \text{ nm}}$) gekennzeichnet

3.1 Naphthalinabbau durch *Pseudomonas sp.* KR3, 200 mg L⁻¹, 25°C;

3.2 Phenanthrenabbau durch *Mycobacterium sp.* KR7, 100 mg L⁻¹, 25°C;

3.3 Pyrenabbau durch *Mycobacterium sp.* KR2, 500 mg L⁻¹, 25°C

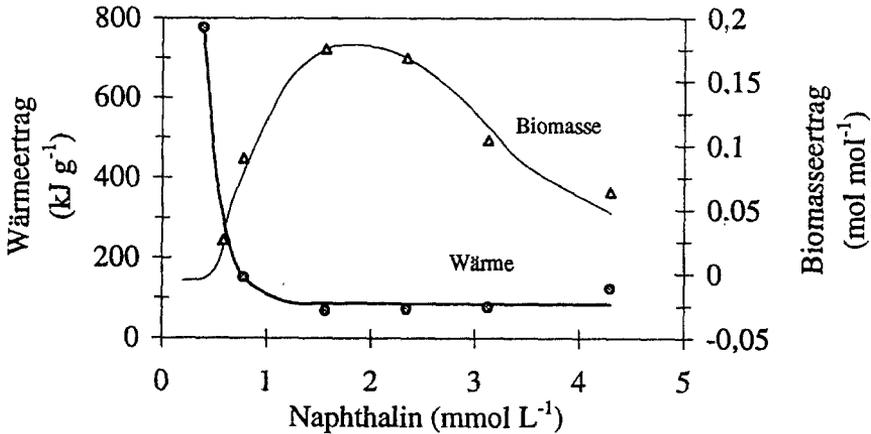


Abb. 4 Abhängigkeit des Biomasse- und Wärmeertrages vom Substratangebot. Biomasseertrag: Biomasse/Substrat; Wärmeertrag: Wärme/Biomasse

mit der Desorption der Verbindungen von Bodenbestandteilen wie Tonen und Huminstoffen. Die stationäre Stoffwechselfase derartiger Kulturen ist somit stets durch die Löslichkeitsgrenze der Schadstoffe limitiert. Da die Löseprozesse zudem von der Kristalloberfläche und der Diffusion bzw. der Rührgeschwindigkeit abhängen, ist die Reproduzierbarkeit derartiger Untersuchungen von der Standardisierung dieser Parameter abhängig. Ein zunehmendes Angebot an kristallinem Naphthalin führte auf Grund der größeren Kristalloberfläche und damit der schnelleren Nachlieferung an gelöstem Substrat zu zunehmend ausgeprägteren exponentiellen Wärmeproduktionsphasen. Günstigere Bedingungen für die Beobachtung vollständig ausgeprägter exponentieller Wärmeproduktionsphasen sind für schwerlösliche Substrate durch Verlangsamung des Stoffwechsels (z.B. durch niedrige Versuchstemperaturen) zu erreichen. Naphthalin und alle höheren PAKs sind für Mikroorganismen nicht unmittelbar als Substrat für die Biosynthese verwendbar und müssen erst zu verwertbaren Metaboliten abgebaut werden. Da der Anabolismus von diesen leichter löslichen, angereicherten Metaboliten abhängt, ist die stationäre Phase der Zellvermehrung, die nicht mehr unmittelbar mit der PAK-Verwertung zusammenhängt, deutlich ausgeprägt. Diese zeitliche Entkopplung der Vorgänge nimmt mit steigender Ringzahl der Polyzyklen stark zu, so daß anabolische Prozesse wie in Abb. 3.2 und 3.3 erst nach Abklingen der katabolen, meßbar exothermen Abbauvorgänge einsetzen und die exponentielle Phase der Zellvermehrung zu der der Wärmeproduktion um mehrere Tage verzögert wird. Damit liefert die Messung der Stoffwechselwärme ein aussagefähigeres Signal über den zeitlichen Verlauf des Abbaus höhermolekularer Schadstoffe als beispielsweise die Bestimmung der gebildeten Biomasse.

Die Abhängigkeit der Ausprägung der stationären Phase der Wärmeproduktion vom Angebot an kristallinem Naphthalin belegt den Einfluß der Kristalloberfläche auf die Löserate des Substrates als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Das Streben der Charakteristika der Wärmeflußkurven gegen Maximalwerte weist auf die Annäherung an die maximale Wärmeproduktionsrate der Kultur hin. Die linearen Zusammenhänge der Merkmale des steady state mit Eigenschaften der Wärmeflußkurve deuten auf eindeutige Zusammenhänge des Zustandes der Kultur mit dem Verlauf der kalorimetrischen Kurve hin. Wie auch die HPLC-analytischen Untersuchungen belegten, kennzeichnet das Wärmeflußmaximum einen definierten Zustand des untersuchten Systems sowohl in Hinsicht auf die Anreicherung und Verwertung von Metaboliten, das Einsetzen exponentieller Zellvermehrung als auch die Abbaugeschwindigkeit des Naphthalins, die sich auf Grund der Annäherung an die Löslichkeitsgrenze zu diesem Zeitpunkt stark ändert. Des weiteren war die Dauer der lag-Phase bei konstanten Bedingungen und gleicher Zelldichte des Inokulums reproduzierbar. Die Phase exponentieller Wärmeproduktion und die bis zum Wärmeflußmaximum waren somit vollständig miteinander verknüpft, wodurch vergleichende Aussagen über den steady state mit Hilfe der relativ einfach auszuwertenden Wärmeflußkurve möglich wurden.

Die zunehmend günstigeren Wachstumsbedingungen mit steigendem Naphthalin Gehalt sind – wie bereits im Zusammenhang mit dem steady state diskutiert – auf die bessere Verfügbarkeit des Substrates durch die wachsende Kristalloberfläche zurückzuführen. Die bei weiter ansteigendem Substratangebot wieder sinkende Stoffwechselleistung des Naphthalinabbauers wurde auf die Erschöpfung von Nährstoffen bzw. der Pufferkapazität und die Anreicherung toxischer Abbauprodukte im Medium zurückgeführt.

Die isotherme Durchflußkalorimetrie bietet eine Vielzahl von Anwendungen bei der Untersuchung des biotischen PAK-Abbaus. Sie ist eine sehr empfindliche Meßmethode und ergänzt in sinnvoller und informativer Weise klassische Verfahren wie die Bestimmung des Zellwachstums und analytische Methoden zur Messung der Konzentrationen von Substrat, Metaboliten und Enzymen.

Methodische Schwierigkeiten durch starke Gasaustausch der Kultur und hohe Flüchtigkeit des Substrates können durch geeignete Optimierung der Versuchsdurchführung und gegebenenfalls Entwicklung von mathematischen Modellen ausgeglichen werden.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
$C_{10}H_8$	Naphthalin
$[C_{10}H_8]_0$	Anfangsgehalt an Naphthalin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie

n	Anzahl der Versuche
$OD_{550\text{ nm}}$	Optische Dichte bei 550 nm
P	Wärmefluß
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
P_{exp}	Wärmefluß in der Phase exponentieller Wärmeproduktion
P_{max}	maximaler Wärmefluß
Q_{exp}	Wärmeproduktion in der Phase exponentieller Wärmeproduktion
r^2	Korrelationskoeffizient
t_{exp}	Dauer der Phase exponentieller Wärmeproduktion
Tab.	Tabelle
σ_y^2	Standardabweichung der Regression

Literatur

- 1 I. Lamprecht, B. Schaarschmidt und J. Siemens, *Thermochim. Acta*, 94 (1985) 447.
- 2 R. Hölzel, C. Motzkus und I. Lamprecht, *Thermochim. Acta*, 239 (1994) 17.
- 3 K. Fiebich, W. Thumm und A. Kettrup, *Thermochim. Acta*, 251 (1995) 29.
- 4 K. Fiebich, Dissertation, TU München 1995.
- 5 Jandel Scientific, AISN Software, Manual for Peakfit 3.0 (1991).