

Bundesminister für Bildung und Forschung

Forschungsbericht: 1460638Q6

Abfallwirtschaft und Altlastensanierung

Neue Techniken zur Kompostierung

Teilvorhaben 11

"Dünger aus Klärschlamm, Holzabfällen und Pflanzen;  
Technologieentwicklung und Koordination"

Hier: Teilvorhaben 11/3:

**"Eliminierung von chlorierten Verbindungen aus Klärschlämmen durch  
anaerobe Behandlung"**

### **Abschlußbericht**

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 146063Q6 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Forschungsnehmer:  
Martin-Luther-Universität Halle

Ausführende Stelle:  
Institut für Mikrobiologie, Kurt-Mothes-Str. 3, 06099 Halle

Projektleiter: Dr. Ute Lechner

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	1
<b>1.1 Aufgabenstellung</b>	2
<b>1.2 Ausgangssituation und Literaturübersicht</b>	2
<b>1.3 Voraussetzungen für die Bearbeitung und Ablauf des Vorhabens</b>	4
<b>1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>	4
<b>2 Beschreibung der Experimente</b>	5
<b>2.1 Probenmaterial</b>	5
<b>2.2 Kulturbedingungen</b>	5
2.2.1 Medium	5
2.2.2 MPN-Ansätze	6
2.2.3 Batch-Kulturen zur Anzucht von Chlorphenole dechlorierenden Mischkulturen	6
2.2.4 Kontinuierliche Kultivierung und Biomassegewinnung von 2,4,6-TCP dechlorierenden Bakterien	7
2.2.5 Ansätze zur Untersuchung der reduktiven Dechlorierung von Chlorcatecholen	7
2.2.6 Inkubationen von Mikroorganismen aus Klärschlämmen und Sediment mit PCDD	7
<b>2.3 Trägermaterial zur Immobilisierung von dechlorierenden Bakterien</b>	8
<b>2.4 Analytik</b>	8
2.4.1 HPLC-Analytik von Chlorphenolen und organischen Säuren	8
2.4.2 GC-Analytik von organischen Säuren, Alkoholen und Gasen	8
2.4.3 Chlorcatechole	8
2.4.4 Chlorierte Dibenzo-p-dioxine	9
<b>3 Ergebnisse</b>	9
<b>3.1 Reduktive Dechlorierung von Chlorphenolen</b>	9
3.1.1 Vorkommen von dechlorierenden Bakterien in anaeroben Habitaten	9
3.1.2 Charakterisierung von Chlorphenole dechlorierenden bakteriellen Mischkulturen	10
3.1.3 Kontinuierliche Zellanzucht	17
<b>3.2 Immobilisierung der dechlorierenden Bakterien und Zusatz zu Klärschlamm</b>	18
<b>3.3 Dechlorierung von Chlorcatecholen</b>	20
3.3.1 Anreicherung von 4,5-Dichlorcatechol dechlorierenden Kulturen	20
3.3.2 Untersuchung der Dechlorierung von Tetrachlorcatechol	21
<b>3.4 Dechlorierung von polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen</b>	24
3.4.1 Dechlorierung von 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (1,2,3,4-TCDD)	24
3.4.2 Dechlorierung von 1,2,4- und 1,2,3-TrCDD	26
3.4.3 Dechlorierungsweg von 1,2,3,4-TCDD	27
<b>4 Literatur</b>	29
<b>5 Veröffentlichungen</b>	32

# 1 Einleitung

Das Klärschlammaufkommen der Bundesrepublik wird in den nächsten Jahren 80 Millionen m<sup>3</sup> übersteigen (RABAS, 1995). Die Klärschlammverwertung erfolgt heute noch zu mehr als 50 % durch Deponierung. Spätestens ab dem Jahr 2005 wird dies jedoch nur noch in Form von Verbrennungsrückständen erfolgen können, da die TA Siedlungsabfall die Deponierung von Ablagerungen mit mehr als 5 % organischer Substanz bezogen auf die Trockenmasse verbietet. Traditionelle Formen der Klärschlammverwertung, wie die Ausbringung auf landwirtschaftliche Flächen sollten, auch im Sinne des Kreislaufwirtschaftsgesetzes, verstärkt genutzt werden. Kompostierung und Nutzung zur Rekultivierung von belasteten Flächen oder Bergbaufolgelandschaften stellen eine sinnvolle Ergänzung dar. Diese Formen der Klärschlammverwertung werden durch die Klärschlammverordnung streng kontrolliert, die vor allem Grenzwerte für Schwermetalle und organische Schadstoffe festlegt. Durch verbesserte Technologien in den Kläranlagen und durch Maßnahmen im Rahmen der Indirekteinleiterverordnung sind die Schadstoffkonzentrationen im Klärschlamm in den letzten Jahren rückläufig. So haben Untersuchungen der polychlorierten Dibenz-p-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/F) gezeigt, daß nur noch wenige Klärschlämme die zulässigen Höchstwerte überschreiten (FIEDLER, 1993). Trotzdem wird auch in den nächsten Jahren aufgrund der diffusen, schwer kontrollierbaren Eintragungspfade mit einer erhöhten Belastung durch PCDD/PCDF und PCB gegenüber den in der Umwelt meßbaren Konzentrationen zu rechnen sein. Ähnliches trifft auch für andere kompostierbare Sekundärrohstoffe wie z.B. Bioabfall zu. Um das Risiko einer Verlagerung der Schadstoffe auf landwirtschaftliche Nutzflächen zu verringern, sollte nach Möglichkeiten ihrer weiteren Reduzierung gesucht werden.

Hinsichtlich der chlorierten Schadstoffe könnte sich dafür der erst im letzten Jahrzehnt näher untersuchte mikrobielle Prozeß der reduktiven Dechlorierung anbieten. Aerobe Bakterien können aufgrund des hohen Redoxpotentials (z.B. E<sub>0</sub> der Redoxpaare Hexachlorbenzol / Pentachlorbenzol: + 478 mV; Pentachlorphenol / 2,3,4,5-Tetrachlorphenol: + 399 mV) hochchlorierte Verbindungen kaum angreifen. Andererseits sind einige anaerobe Bakterien in der Lage, die chlorierten Verbindungen unter Abspaltung von Chloratomen als Elektronenakzeptor zu nutzen und durch Elektronentransport Energie zu konservieren. Dieser Prozeß wird auch als "Chloro-Respiration" bezeichnet (DIEKERT, 1995). Es wurde geschätzt, daß unter Umweltbedingungen (Temperatur von 20 °C, pH 7, H<sub>2</sub> als Elektronendonator) eine freie Energie von 100 bis 160 kJ pro Mol abgespaltenes Chlorid verfügbar wird (DOLFING und HARRISON, 1993). Dies ist mehr als durch Methanogenese oder Sulfatreduktion erzielt werden kann. Vorausgesetzt, daß sich entsprechende mikrobielle Enzyme herausgebildet haben, sollte man daher davon ausgehen können, daß chlorierte Verbindungen unter anaeroben Bedingungen nicht stabil sind. Die Abspaltung von Chloratomen führt in der Regel

zur Verringerung der Toxizität der Verbindungen, einer besseren Wasserlöslichkeit und damit besseren Verfügbarkeit für einen weiteren mikrobiellen Abbau.

### **1.1 Aufgabenstellung**

Die Zielstellung dieses Projektes ist in das Gesamtvorhaben des Teilvorhabens 11 integriert. Mit dem Hintergrund der Klärschlammkompostierung, die vom Teilvorhaben 11/1 (Firma Grube, Land- und Umwelttechnik) durchgeführt wurde, sollte die prinzipielle Eignung des mikrobiellen Prozesses der reduktiven Dechlorierung für die Eliminierung von hochchlorierten Schadstoffen aus Klärschlämmen untersucht werden. Dabei war es das Ziel, mikrobielle Mischkulturen für die Dechlorierung von klärschlammrelevanten Schadstoffen (z.B. Chlorphenolen, PCDD) anzureichern, den Verlauf und die Produkte der Dechlorierung zu charakterisieren und die Bedingungen zu optimieren. Der Chlorierungsgrad der Schadstoffe sollte so gesenkt werden, daß sie einer nachfolgenden aeroben Mineralisierung zugänglich werden. Der aerobe Abbau der nicht oder niedrig chlorierten Verbindungen wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schauer, Universität Greifswald, im Teilvorhaben 11/2 untersucht.

### **1.2 Ausgangssituation und Literaturübersicht**

Die wissenschaftliche Ausgangssituation auf dem Gebiet der reduktiven Dechlorierung war kurz vor Beginn unserer Arbeiten in einem Review umrissen worden (MOHN und TIEDJE, 1992). Zu diesem Zeitpunkt hatten Arbeiten mit anaeroben Mischkulturen, die aus verschiedenen anaeroben Habitaten angereichert worden waren, gezeigt, daß ein breites Spektrum von Chloraromaten wie Chlorbenzole, Chlorphenole, Chloraniline, Chlorcatechole und polychlorierte Biphenyle (PCB) reduktiv dechloriert werden können. Abhängig vom Anreicherungsverfahren wurden Mischkulturen mit unterschiedlicher Regiospezifität gewonnen (BRYANT et al., 1991; YE et al., 1992). Diese Tatsache eröffnete die Möglichkeit, durch die reduktive Dechlorierung Metabolite zu erzeugen, die auf der einen Seite eine möglichst geringe Toxizität, auf der anderen Seite eine möglichst geringe Persistenz gegenüber einem weiteren aeroben oder anaeroben Abbau besitzen. Wie kürzlich für die reduktive Dechlorierung von Chlorbenzoaten gezeigt wurde, führt die Anreicherung von primär in *ortho*-Position dechlorierenden Bakterien zu vollständiger Chlorabspaltung, während *meta*-dechlorierende Kulturen Dead-end-Metabolite produzieren (VAN DER WOUDE et al., 1996).

Zu Beginn des Projektes war über die reduktive Dechlorierung von polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen und -furanen nur sehr wenig bekannt (Tagungsbeiträge von ADRIAENS und GRBIC-GALIC, 1992 und TOUSSAINT et al., 1992). Inzwischen wurde in einer begrenzten Zahl von Labor-Experimenten nachgewiesen, daß PCDD/F durch verschiedene anaerobe

Mischkulturen aus Flußsedimenten und Grundwasserleitern reduktiv dechloriert werden (ADRIAENS und GRBIC-GALIC, 1994; ADRIAENS et al., 1995; BEURSKENS et al., 1995). Die Analyse der Dechlorierungsprodukte ergab für hochchlorierte PCDD/Fs (5 bis 7 Chloratome) eine vorwiegende Dechlorierung in peri-Position, d.h. in Nachbarschaft zu den Etherbrücken (ADRIAENS und GRBIC-GALIC, 1994). Auch bei der Dechlorierung von 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (1,2,3,4-TCDD) durch eine Hexachlorbenzol-adaptierte Mischkultur wurde neben lateraler Dechlorierung die Abspaltung eines Chloratoms in peri-Position nachgewiesen (BEURSKENS et al., 1995). Diese Tatsache impliziert das Risiko, daß höher chlorierte Dioxine unter Konservierung der lateralen 2,3,7,8-Substitution dechloriert werden. Kongenere mit diesem Substitutionsmuster, insbesondere 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin, besitzen eine hohe Toxizität. Dieses Problem besteht bei den PCB nicht, da in der Regel zuerst die *meta*- und *para*-Chloratome abgespalten werden, wodurch die toxische 3,3',4,4'-Konfiguration zerstört wird.

Der biochemische Prozeß der mikrobiellen Dechlorierung von Chloraromaten ist noch wenig verstanden. NI et al. (1995) haben erstmals die membrangebundene 3-Chlorbenzoat-reduzierende Dehalogenase von *Desulfomonile tiedjei* gereinigt. Die Dehalogenasen der Tetrachlorethen dechlorierenden Bakterien *Dehalospirillum multivorans* und *Dehalobacter restrictus* sind bereits besser untersucht. Die Beteiligung von Vitamin B<sub>12</sub> an der Redox-Reaktion (NEUMANN et al., 1995) bzw. das Vorhandensein von Fe/S-Zentren (SCHUHMACHER et al., 1996) wurden beschrieben. Ein besseres Verständnis der Chloraromaten-Dechlorierung ist von der Untersuchung weiterer Reinkulturen zu erwarten, die nur sehr schwierig zu isolieren sind. Zu Beginn unserer Arbeiten waren erst zwei anaerobe Reinkulturen bekannt, die Chloraromaten reduktiv dechlorieren konnten (DE WEERD et al., 1990; MADSEN und LICHT, 1992). Inzwischen sind drei weitere Bakterienreinkulturen beschrieben worden (COLE et al., 1994; UTKIN et al., 1994; GERRITSE et al., 1996). Alle Isolate gehören zu neuen Gattungen bzw. Arten, die sich entweder in die  $\delta$ -Gruppe der Proteobakterien oder in die mit den Gram-positiven sulfatreduzierenden Bakterien verwandte neu definierte Gattung *Desulfitobacterium* einordnen lassen.

Dechlorierende Bakterien scheinen ubiquitär verbreitet zu sein. So wurden Halophenole dechlorierende Mischkulturen aus Sedimenten von Seen, Flüssen, Estuarien, Meeren, aber auch aus Faulschlamm, überflutetem Boden und Grundwasserleitern angereichert. Bei sehr persistenten Verbindungen wie den PCB und PCDD/F scheint jedoch der Erfolg der Anreicherung von der Auswahl geeigneten Probenmaterials abzuhängen. So wurden PCB-dechlorierende Bakterien aus PCB-kontaminiertem Sediment, jedoch nicht aus PCB-freiem Sediment eluiert (QUENSEN et al., 1988). Die langjährige PCB-Kontamination kann zu einer natürlichen Anreicherung dechlorierender Bakterien geführt haben, so daß sie einem Nachweis zugänglich wurden. PCDD/F dechlorierende Mischkulturen wurden bisher nur aus

anaeroben Süßwassersedimenten und Grundwasserleitern gewonnen. Es lag daher im Interesse unseres Vorhabens, das natürliche Vorkommen von PCDD/F-dechlorierenden Bakterien auch in Faulschlämmen zu überprüfen.

Anwendungsorientierte Untersuchungen zur reduktiven Dechlorierung wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen publiziert (z.B. HENDRIKSEN et al., 1992 und WU et al., 1993). UASB (Upflow anaerobic sludge blanket)-Reaktoren im Labormaßstab, die als Inokulum granulären Faulschlamm enthielten, wurden für die Dechlorierung von Pentachlorphenol verwendet. Eine Immobilisierung der dechlorierenden Bakterien im Festbett-Reaktor an Raschig-Ringe war offensichtlich nicht möglich (HENDRIKSEN und AHRING, 1993). Zur Kombination anaerober und aerober Verfahren für den Abbau hochchlorierter Verbindungen gibt es erste praxisbezogene Untersuchungen. So beschrieben GERRITSE et al. (1995) den vollständigen sequentiellen Abbau von Tetrachlorethen durch die Kombination eines anaeroben, dechlorierenden und eines aeroben, mineralisierenden Festbettreaktors. Auch für den Abbau von PCB (BEDARD et al., 1987) und Trichlorbenzol (SELENT und HEGEMANN, 1995) wurden zweistufige anaerob-aerobe Prozesse vorgeschlagen. Eine direkte Praxisanwendung des Prozesses der reduktiven Dechlorierung von Chloraromaten ist uns im Bearbeitungszeitraum nicht bekannt geworden. Dies wird auch dadurch deutlich, daß eine Patentrecherche (Chemical Abstracts) keine positiven Ergebnisse brachte.

### **1.3 Voraussetzungen für die Bearbeitung und Ablauf des Vorhabens**

Die praktischen Voraussetzungen für die benötigten anaeroben Arbeitstechniken waren im wesentlichen vorhanden, erfuhren aber mit der Berufung von Herrn Prof. Andreesen an das Institut für Mikrobiologie im Herbst 1993 weitere Verbesserungen. Die Bearbeitung des Projektes fand ein sehr gutes wissenschaftliches Umfeld und große Unterstützung durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreesen, in der Themen zum Energiestoffwechsel anaerober Bakterien bearbeitet werden. Die Zuwendung erlaubte uns die Verbesserung der Geräteausstattung, wodurch die Analytik der Proben mit Gaschromatographie und HPLC gesichert war. Die GC/MS-Analytik wurde durch Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Kraus (Institut für Analytik und Umweltchemie) realisiert. Das Vorhaben wurde im wesentlichen entsprechend dem Arbeitsplan durchgeführt.

### **1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Im Rahmen des Teilvorhabens 11 gab es eine intensive Zusammenarbeit mit den Projektpartnern Herrn Grube und seinen Mitarbeitern (Grube Land- und Umwelttechnik, Brake) und Herrn Prof. Schauer und seinen Mitarbeitern (Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald). Mehrmals im Jahr wurden auf gemeinsamen Arbeitstagen Fortschritt und Probleme bei der Bearbeitung diskutiert. Mit folgenden anderen Stellen gab es fruchtbare Zusammenarbeit und Kontakte:

- \* Umweltbundesamt Berlin, Frau Nott, Frau Penning
- \* Technische Universität Hamburg-Harburg, Herr Prof. Stegmann
- \* Universität Helsinki, Finnland, Frau Prof. Salkinoja-Salonen
- \* Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, Halle und Wittenberg, Herr Dr. Rauhut
- \* Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig, Frau Dr. Krauß

## **2 Beschreibung der Experimente**

### **2.1 Probenmaterial**

Die Inokula für das Screening auf PCDD-dechlorierende Aktivität wurden aus verschiedenen Böden, Faulschlamm und aus Sediment gewonnen. Die Bodenproben stammten aus (A) Bitterfeld, Industriestandort (PCDD/F: bis zu 50000 ng I-TE/kg Trockensubstanz [TS]), (B) Bitterfeld-Greppin, Gartenerde (PCDD/F: bis zu 5599 ng TE/kg TS), (C) Lützensdorf, Mineralölwerk, Grundwasserleiter, Tiefe 5,6 bis 5,7 m (Mineralölprodukte) und (D) von einem Herbizidlagerplatz (AOX: 1500 mg/kg TS). Die Faulschlammproben stammten aus kommunalen Abwasserwerken. Die Proben (E), (F) und (J) wurden aus Faultürmen entnommen, die Proben (G) und (H) aus Absetzbecken in Halle/Saale bzw. Eisleben. Die PCDD/F-Konzentrationen betragen 200 (E), 9 (F), 18 (J) und 124 (H) ng I-TE/kg TS. Die Probe H (TS-Gehalt: 0,7 %, organischer Kohlenstoff [ $C_{org}$ ]: 10,5 mg/g TS) wurde auch für die Experimente zur Dechlorierung von 2,4,6-TCP unter Klärschlammbedingungen verwendet. Die Sedimentprobe (I) stammte aus einem Seitenarm der Saale in Halle (PCDD/F: 0,9 - 58 ng I-TE/kg TS [DIOXINBERICHT, 1996]) und wurde aus der oberen Sedimentschicht (0-30 cm Tiefe) entnommen und kühl und anaerob gelagert. Der Trockensubstanzgehalt betrug 30 % bei einem Gehalt an  $C_{org}$  von 11 - 15 mg/g TS. Die Sedimentprobe (K) wurde aus der Zschopau etwa 1 km flussabwärts der Papierfabrik Niethammer, Kriebethal entnommen (12,4 % TS-Gehalt,  $C_{org}$  16,5 mg/g TS).

### **2.2 Kulturbedingungen**

#### **2.2.1 Medium**

Für die Kultivierung der anaeroben Bakterien wurde ein Mineralmedium (Medium 1, HOLLIGER et al., 1992) mit einem pH-Wert von 7 - 7,2 unter Zusatz von 0,01 % Hefeextrakt und einer Spurenelementlösung nach HOLLIGER et al. (1993) verwendet. Für die Versuche

mit PCDD wurde die Spurenelementelösung durch 0,01 g/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  und 0,007 g/l  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  ergänzt. Für bestimmte Versuche mit Chlorphenolen (Bestimmung des pH-, Temperaturoptimums, 3.1.3 und 3.2) wurde die Konzentration des Phosphatpuffers auf 10 mM erhöht. Die Kultivierung erfolgte unter einer Inertal-Gasatmosphäre ( $\text{N}_2/\text{CO}_2$ , 80/20). Die Sterilisation der mineralischen Bestandteile erfolgte im Autoklaven. Vitaminlösung und Cosubstrate wurden nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt.

### **2.2.2 MPN-Ansätze**

Die Zellzahlen von dechlorierenden Bakterien (Chlorphenole [a] und Chlorcatechole [b]) und der Geamtzellzahl anaerober Bakterien (c) wurden durch das most-probable-number (MPN)-Verfahren bestimmt. Für die Bestimmung der Chlorphenole dechlorierenden Bakterien und der Gesamtzellzahl wurden drei parallele Verdünnungsreihen, für die Bestimmung der Chlorcatechol-dechlorierenden Bakterien fünf parallele Verdünnungsreihen mit 5 ml je Hungate-Röhrchen angesetzt und ausgewertet (ALEF, 1991). Als organische Substrate wurden für (a) und (c) 20 mM Pyruvat und für (a) 0,1 und (c) 1 % Hefeextrakt zugesetzt. Für (b) wurden 10 mM Formiat und 5 mM Acetat verwendet und zur Hemmung methanogener Bakterien 5 mM Bromethansulfonsäure zugesetzt. Die Auswertung erfolgte bei (a) und (b) durch chromatographische Bestimmung des Umsatzes von 2,4,6-Trichlorphenol (2,4,6-TCP) bzw. 4,5-Dichlorcatechol (4,5-DCC) nach sechs- bzw. zehnwöchiger Inkubation bei 30 °C. Eine Abnahme von mehr als 60 %, die mit der Bildung von Dechlorierungsprodukten verbunden war, wurde als positives Ergebnis gewertet. Zur Bestimmung von (c) wurde als Maß eine Zunahme der Optischen Dichte (580 nm) nach achttägiger Inkubation herangezogen.

### **2.2.3 Batch-Kulturen zur Anzucht von Chlorphenole dechlorierenden Mischkulturen**

Die Batch-Kultivierung wurde in Serumflaschen (120 bis 1000 ml) in Kulturvolumina von 50 bis 750 ml durchgeführt. Als Elektronendonator für die Dechlorierung (Cosubstrat) wurde routinemäßig 25 mM Pyruvat oder 50 mM Formiat/ $\text{H}_2$  zugesetzt. Bei Verwendung von Formiat und für die Untersuchung von Wasserstoff als Elektronendonator wurde durch Begasung eine  $\text{H}_2/\text{CO}_2$ (etwa 4:1)-Gasatmosphäre hergestellt. 2,4,6-TCP wurde in einer Konzentration von 0,1 mM (30 mg/l) verwendet. Die Ansätze wurden bei 30 °C im Dunkeln als Standkulturen inkubiert. Die Chlorphenole dechlorierenden Mischkulturen wurden durch 10 %-ige Transfers in frisches Medium mit 25 mM Pyruvat bzw. 50 mM Formiat und 100  $\mu\text{M}$  2,4,6-TCP aus Saalesediment angereichert. Diese Kulturlinien dienten als Ausgangsmaterial für die durchgeführten Experimente. Die Zellen wurden durch Zentrifugation unter anaeroben Bedingungen geerntet und für die Experimente in frisches Medium überführt.



### **2.2.4 Kontinuierliche Kultivierung und Biomassegewinnung von 2,4,6-TCP dechlorierenden Bakterien**

Die kontinuierliche Kultivierung von Chlorphenole dechlorierenden Bakterien erfolgte im Biostat M-Fermenter (Braun, Melsungen) in einem 1 l-Kulturgefäß (Arbeitsvolumen 0,8 l) bei 30 °C und einer Rührerdrehzahl von 50 rpm. Frisches Medium mit 10 mM Pyruvat und 2,4,6-TCP in Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,2 mM wurde über eine Peristaltik-Pumpe mit Flußraten von 4 bis 80 ml/h zugeführt. Als Reduktionsmittel wurde hier anstelle von Na<sub>2</sub>S Titan(III)citrat (1 mM) verwendet. Das Redoxpotential wurde über eine Redox-Elektrode (Braun, Melsungen) im Kulturgefäß *on line* kontrolliert und lag zwischen -420 und -500 mV. Der Ablauf wurde in einem 10 l-Gefäß zur anschließenden Ernte der Zellen gesammelt. Nach dem Fed-Batch-Prinzip wurden die aufgefangenen Zellen weiterhin mit Pyruvat (10 bis 50 mM) und 2,4,6-TCP (0,5 - 2 mM) versorgt, um sie bis zur Ernte in aktivem Zustand zu erhalten. Das gesamte Fermentationssystem wurde mit Inertal (0,5 bar) überlagert, um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten. Die Zellen aus dem Sammelgefäß wurden in einer Durchflußzentrifuge (Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech) bei 4 °C und 15000 rpm geerntet und bei - 80 °C eingefroren und gelagert.

### **2.2.5 Ansätze zur Untersuchung der reduktiven Dechlorierung von Chlorcatecholen**

Die primären Anreicherungskulturen zur Untersuchung der reduktiven Dechlorierung von Chlorcatecholen wurden mit 10 % (v/v) Saale- (I) bzw. Zschopausediment (K) oder Klärschlamm (G) beimpft. Unterschiedliche Mischungen von Cosubstraten (Formiat + Acetat; Formiat + Pyruvat + 0,2 % Hefeextrakt; Acetat + Fumarat) wurden, wie in den einzelnen Kapiteln vermerkt, in niedrigen Konzentrationen (5 - 10 mM) eingesetzt.

### **2.2.6 Inkubationen von Mikroorganismen aus Klärschlämmen und Sediment mit PCDD**

Das Screening auf Dechlorierungsaktivität gegenüber 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (1,2,3,4-TCDD, Endkonzentration 50 µM) wurde in 125 ml-Serumflaschen mit 80 ml Kulturvolumen durchgeführt. Der Mineralnährlösung wurde 5 % (v/v) filtersterilisiertes Kulturmedium einer 2,4,6-TCP dechlorierenden Kultur zugesetzt. Nach Zusatz von Inokulum (Sediment und Klärschlämme jeweils 50 %, v/v; Eluate aus Boden 20 %, v/v) wurden je 5 mM Pyruvat, Acetat, Benzoat und Fumarat und 0,1 mM unchloriertes Dibenzo-p-dioxin und zugegeben. TCDD und dessen Dechlorierungsprodukte wurden nach bestimmten Zeiten in 2 g-Proben identifiziert und quantitativ analysiert. Für die Analyse der Dechlorierung von 1,2,4- und 1,2,3-Trichlordibenzo-p-dioxin (TrCDD) wurden parallele Ansätze (3 bis 5 ml in Hungate-Röhrchen) inkubiert. Die Ansätze wurden mit 10 % (v/v) der primären Anreicherungskultur beimpft. Als komplexes Cosubstrat wurde sterilisiertes Saalesediment (50 % v/v;  $\gamma$ -Strahlung, 35 kGy) zugesetzt. Zur statistischen Absicherung wurden pro Probe drei Röhrchen entnommen und getrennt für die Analyse aufgearbeitet.

### **2.3 Trägermaterial zur Immobilisierung von dechlorierenden Bakterien**

Folgende Trägermaterialien wurden verwendet: Zeolith (Zeogranul, Hydrochem, Heidelberg), Polyurethan-Schaumstoffe (Bayer, Leverkusen) mit (PUR-s) und ohne eingelagerte Aktivkohle (PUR-w) und die Wofatit-Adsorberpolymere EP 60, EP 62 und EP 63 (Chemie GmbH, Bitterfeld-Wolfen).

## **2.4 Analytik**

### **2.4.1 HPLC-Analytik von Chlorphenolen und organischen Säuren**

2,4,6-TCP und die Intermediate 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) und 4-Chlorphenol (4-CP) und die organischen Säuren Fumarat, Benzoat und Pyruvat wurden nach Zentrifugation der Proben im Überstand mit einem HPLC-System (Kontron, Neufahrn) analysiert. Die Trennung erfolgte an einer LiChrospher 100 RP18-Säule (244 x 4 mm, 10 µm) durch Gradienten-Elution bzw. im Falle der Säuren isokratisch mit Methanol/Wasser (1 g/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)-Gemischen mit einer Flußrate von 1 ml/min und Detektion bei 280 bzw. 220 nm.

### **2.4.2 GC-Analytik von organischen Säuren, Alkoholen und Gasen**

Acetat, Propionat, Butyrat und kurzkettige Alkohole wurden im Kulturüberstand nach Ansäuern mit Schwefelsäure auf pH 2 gaschromatographisch (Shimadzu-Gaschromatograph 14A) an einer polaren HP-Innowax-Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,25 µm) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) analysiert. Wasserstoff und Methan wurden in der Gasphase der Kulturen gaschromatographisch (GCHF 18.3, Chromatron, Berlin) mit Hilfe eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors bestimmt. Die Wasserstoffbestimmung erfolgte mit Stickstoff als Trägergas an einer Aktivkohle-gepackten Säule, die Methanbestimmung mit Wasserstoff als Trägergas an einer Porapak Q-Säule.

### **2.4.3 Chlorcatechole**

Die Bestimmung von Tetra- und Trichlorcatecholen erfolgte gaschromatographisch nach Extraktion (n-Hexan/*t*-Butylmethylether) der mit Ascorbinsäure versetzten Proben nach REMBERGER et al. (1986). Anschließend wurden die Chlorcatechole acetyliert (ALLARD et al., 1985), am GC 14A (DB5-Kapillarsäule [30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke]) getrennt und mit einem <sup>63</sup>Ni-Elektroneneinfangdetektor (ECD) analysiert. 4,5- und 3,5-Dichlorcatechol (DCC), sowie 4-Chlorcatechol (4-CC) und Catechol wurden nach Derivatisierung (APAJALAHTI und SALKINOJA-SALONEN, 1986) in der Kulturflüssigkeit bestimmt. Die Trennung erfolgte ebenfalls auf der DB5-Säule und die Detektion am FID. Die Identifizierung von Intermediaten erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeiten mit denen von authentischen Standards und durch GC/MS (siehe 2.4.3).

#### **2.4.4 Chlorierte Dibenzo-p-dioxine**

Die eingesetzten PCDD und ihre Dechlorierungsprodukte wurden gaschromatographisch nach Extraktion der gefriergetrockneten Proben mit n-Hexan, Reinigung der Hexan-Extrakte über Silbernitrat-Kieselgel-Säulchen (nach Klärschlammverordnung) und Einengen der Extrakte im Stickstoffstrom analysiert. Als Wiederfindungsstandard wurde 2,4,8-Trichlordibenzofuran und als Surrogat-Standard für die GC-Analyse 5,6-Dibromacenaphthen verwendet. Die Analysen wurden am Shimadzu Gaschromatograph 14A unter Nutzung eines AOC 14-Probengebers, eines C-R4 AX Chromatopac-Integrators, einer DB5-Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,25 µm) und eines ECD durchgeführt. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand des Vergleichs ihrer Retentionszeiten mit denen von externen Standards und durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie (Varian GC 3400 mit Finnigan MAT-Detektor ITD 800) nach Trennung an einer DB-5-Kapillarsäule (60 m x 0,25 mm I.D., Filmdicke 0,25 µm) mit Helium als Trägergas. Die Identifizierung von 1- und 2-Monochlordibenzo-p-dioxin erfolgte durch Kombination der Massenspektren mit den relativen Retentionswerten im Verhältnis zu 1,3- und 2,3-Dichlordibenzo-p-dioxin (DCDD).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Reduktive Dechlorierung von Chlorphenolen**

Für die Untersuchungen wurde 2,4,6-Trichlorphenol (2,4,6-TCP) als Modellverbindung ausgesucht, u.a. deshalb, weil diese Verbindung von praktischer Bedeutung ist. Sie wurde als Ersatzstoff für Pentachlorphenol im Holzschutz verwendet und als Konservierungsmittel in der Leder- und Textilindustrie eingesetzt. Die relativ gute Wasserlöslichkeit (800 mg/l) ließ eine gute Bioverfügbarkeit erwarten und prädestinierte 2,4,6-TCP als Elektronenakzeptor für Anreicherungsexperimente.

##### **3.1.1 Vorkommen von dechlorierenden Bakterien in anaeroben Habitaten**

Drei verschiedene Klärschlämme (E, F, J) mit unterschiedlicher PCDD/F-Belastung und Sediment der Saale wurden auf den Gehalt dechlorierender Bakterien untersucht. Für die MPN-Bestimmung wurde 2,4,6-TCP als Modellverbindung in Kombination mit 20 mM Pyruvat verwendet. Während in dem relativ hoch belasteten Klärschlamm (E) keine dechlorierenden Bakterien nachweisbar waren, wurden in den Klärschlämmen (F) und (J) geringe Zellzahlen ermittelt (Tab. 1). Eine höhere Zahl wurde im Saalesediment nachgewiesen. Auch in späteren Untersuchungen mit Chlorcatecholen und Dioxinen wurde bestätigt, daß Sediment der Saale ein natürliches Habitat für dechlorierende Bakterien darstellt und daher sehr gut für das Anlegen von Anreicherungskulturen geeignet ist. Nachdem die primären Anreicherungskulturen zweimal mit je 10 % (v/v) Inokulum unter

Erhalt der Dechlorierungsaktivität transferiert worden waren (= 3. Passage) wurden erneut die Zellzahlen der dechlorierenden Bakterien ermittelt, um den Anreicherungsprozess zu dokumentieren. In der aus dem Sediment stammenden Kultur wurde eine Vermehrung der dechlorierenden Bakterien beobachtet, während dies für die Klärschlamm-Ansätze nicht zutraf. Die Zellzahl der durch Gärung auf Pyruvat und Hefeextrakt-Bestandteilen wachsenden anaeroben Bakterien hatte sich dagegen im Anreicherungsprozess nicht wesentlich verändert. Diese Ergebnisse bestärkten uns in der weiteren Untersuchung der aus Flußsediment angereicherten Kulturen, mit dem Ziel der späteren Verwendung als Inokulum für Experimente mit Klärschlamm.

Tab. 1: Vorkommen von 2,4,6-TCP dechlorierenden Bakterien in Sediment der Saale und in Klärschlammproben. Bestimmung der Zellzahl durch das MPN-Verfahren in der Originalprobe (a) und der 3. Passage (b).

Probe	Zellzahl anaerober, Pyruvat und Hefeextrakt verwertender Bakterien (ml <sup>-1</sup> )	Zellzahl dechlorierender Bakterien (ml <sup>-1</sup> )
Klärschlamm J (a)	3,9 · 10 <sup>8</sup>	9/9*
(b)	2,1 · 10 <sup>7</sup>	4
Klärschlamm F (a)	n.b.	4/40*
(b)	n.b.	n.b.
Saalesediment (a)	4,3 · 10 <sup>6</sup>	23/90*
(b)	2,3 · 10 <sup>7</sup>	400

n.b.: nicht bestimmt, \* Ergebnisse von zwei unabhängigen Untersuchungen.

### 3.1.2 Charakterisierung von Chlorphenole dechlorierenden bakteriellen Mischkulturen

Es wurden zwei unterschiedliche 2,4,6-TCP-dechlorierende Mischkulturen durch Weiterführung der Passagen mit Formiat/H<sub>2</sub> bzw. Pyruvat als Cosubstrate erhalten (Formiat-, Pyruvatkultur). Die Mischkulturen hatten folgende Eigenschaften: Mikroskopisch bestanden sie vorwiegend aus Gram-positiven Stäbchen und Kokken. Sporenbildung wurde beobachtet. Methanogenese wurde gaschromatographisch nachgewiesen. Die Acetatbildung war generell auf verschiedenen Cosubstraten in der Formiatkultur weniger ausgeprägt als in der Pyruvatkultur, was auf ein unterschiedliches Verhältnis von acetogenen und methanogenen Populationen hindeutet. Untersuchungen mit dem Hemmstoff Bromethansulfonsäure hatten gezeigt, daß die methanogenen Bakterien für die Dechlorierung nicht essentiell sind. Beide Kulturen dechlorierten 2,4,6-TCP auch in Anwesenheit des jeweils anderen Cosubstrates und weiterer Cosubstrate.

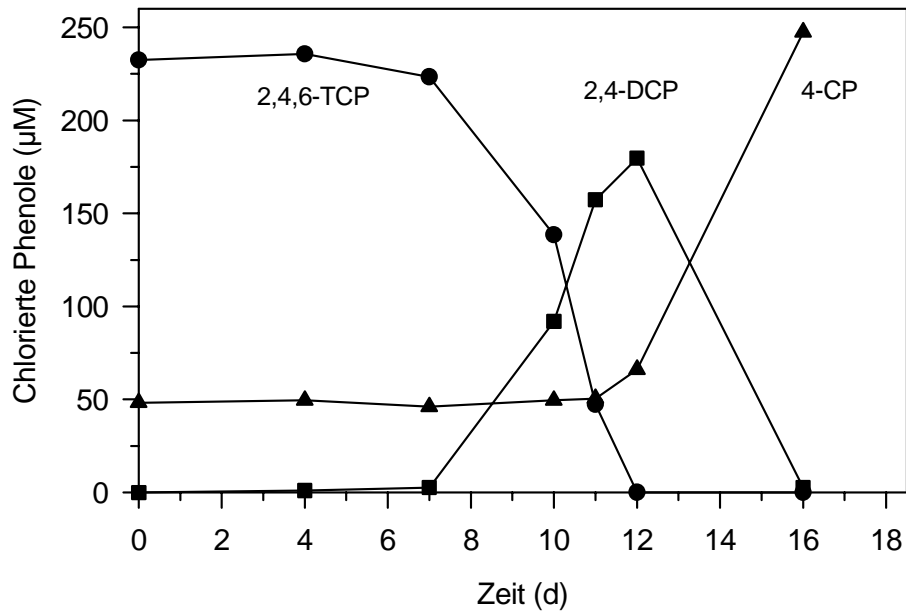


Abb. 1: Reduktive Dechlorierung von 2,4,6-TCP über 2,4-DCP zu 4-CP mit  $H_2$  als Elektronendonator.

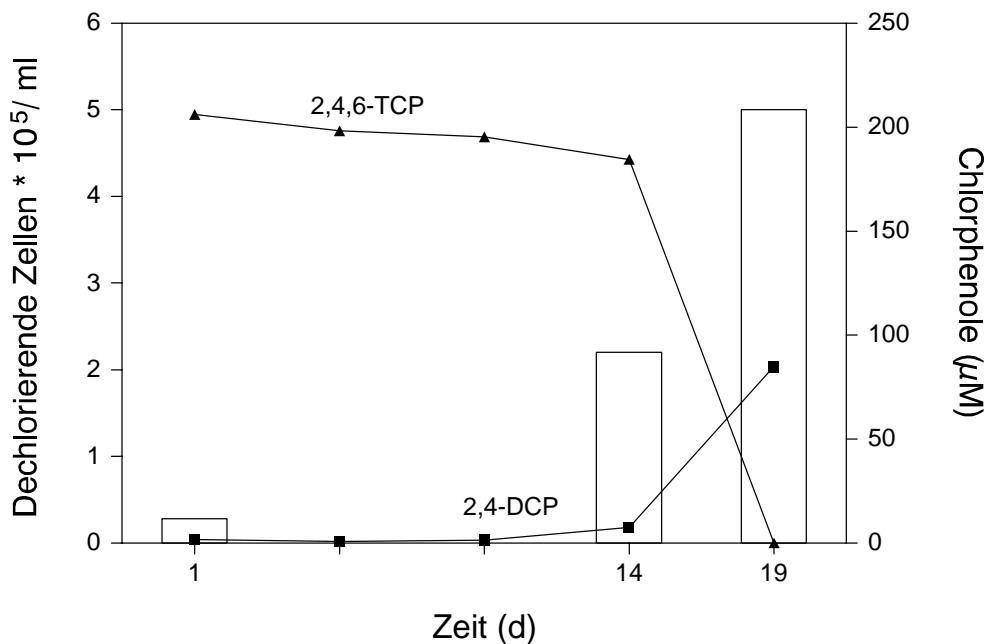


Abb. 2: Zunahme der Zellzahl dechlorierender Bakterien in der Mischkultur während des Dechlorierungsprozesses mit  $H_2$  als Elektronendonator. Die Zellzahl (Balken) wurde mit dem MPN-Verfahren (5 parallele Verdünnungsreihen in Mineralmedium mit 50 mM Formiat, 0,01 % Hefeextrakt und 100  $\mu$ M 2,4,6-TCP) bestimmt.

Die Dechlorierung erfolgte stets in *ortho*-Position unter Bildung von 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) und 4-Chlorphenol (4-CP), das nicht weiter umgesetzt wurde. In Abb. 1 ist der Dechlorierungsverlauf in der Formiatkultur unter chemolithoautotrophen Bedingungen ( $H_2/CO_2$ , über die Gasphase dosiert) dargestellt. Eine Vermehrung der dechlorierenden

Bakterien während des Dechlorierungsprozesses von  $0,5 \cdot 10^5$  auf  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml wurde mit der MPN-Methode nachgewiesen (Abb. 2).

Der Einfluß der Cosubstrate auf die Dechlorierungsgeschwindigkeit wurde mehrfach untersucht. Am wirksamsten waren neben anderen Substraten D,L-Lactat und Pyruvat. Als Schwierigkeit für die Interpretation erwies sich, daß stets auch in den Kontrollansätzen (ohne Cosubstratzusatz oder mit Zusatz von 0,01 % Hefeextrakt) Dechlorierung auftrat, was möglicherweise auf das Vorhandensein intrazellulärer Speicherstoffe zurückgeführt werden könnte. Zur Verarmung der Zellen an Speicherstoffen, wurde eine Pyruvatkultur mit 0,01 % Hefeextrakt und  $100 \mu\text{M}$  2,4,6-TCP solange inkubiert, bis eine vollständige Umwandlung zu 4-CP erfolgt war (34 Tage). Versuchansätze mit diesen Zellen zeigten den Einfluß der Cosubstrate deutlicher (Abb. 3). Die Dechlorierung wurde am stärksten durch D,L-Lactat stimuliert. Für den Einsatz in der Praxis wäre D,L-Lactat aufgrund seiner Wirkung und relativ geringen Kosten empfehlenswert und wurde daher auch für die mit originalem Klärschlamm durchgeführten Versuche verwendet (3.1.5).

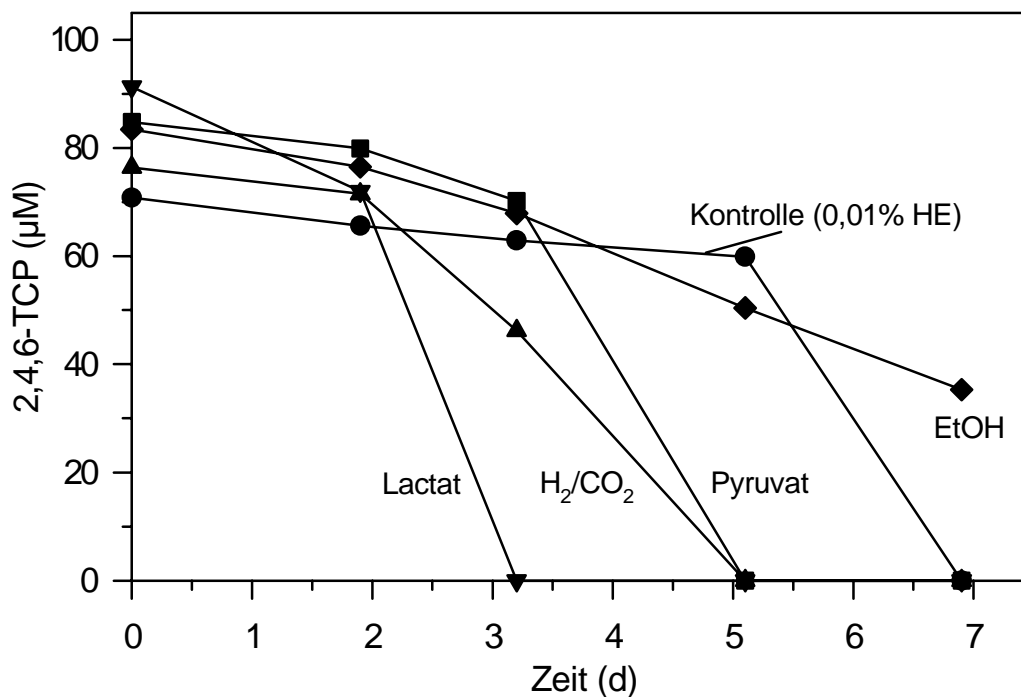


Abb. 3: Einfluß verschiedener Cosubstrate (25 mM) auf die Dechlorierung von 2,4,6-TCP.

Die Spezifität der Dechlorierungsreaktion wurde gegenüber 14 verschiedenen Chlorphenolen mit 2,4,6-TCP-adaptierten Zellen untersucht. Bei den identifizierten Dechlorierungsprodukten handelte es sich meist um in *ortho*-Position zur OH-Gruppe dechlorierte Phenole. Dechlorierung in *meta*-Position wurde bei dem Umsatz von 3,5-Dichlorphenol und 2,3,5-Trichlorphenol beobachtet. Abb. 4 zeigt beispielhaft die Dechlorierung von 2,3,4,6-Tetrachlorphenol zu 2,4,5-Trichlor- und 3,4-Dichlorphenol. In Tab. 2 ist der

prozentuale Umsatz der Ausgangsverbindungen und das Spektrum der identifizierten Intermediate nach dreiwöchiger Inkubation der Formiatkultur unter chemolithoautotrophen Bedingungen dargestellt. Die Abb. 5 faßt die beobachteten Dechlorierungswege zusammen. Die Mischkultur ist außerdem in der Lage, 2,4,6-Tri- und 2,4-Dibromphenol zu dehalogenieren. Die häufig als Modellverbindung für die Untersuchung von reaktiv *ortho*-dechlorierenden Kulturen verwendete 3-Chlor-4-hydroxyphenyllessigsäure wurde durch die Mischkulturen nicht angegriffen.

Eine hoch angereicherte Pyruvatkultur, die auch für die weiteren praxisorientierten Untersuchungen (3.1.3 und 3.2) Anwendung fand, wurde zur Bestimmung von pH- und Temperaturoptimum verwendet. Das pH-Optimum lag bei 7,3 bis 7,5 und entsprach den in der Literatur berichteten Werten. Bei 30 bis 37 °C war die Dechlorierungsgeschwindigkeit am höchsten (Abb. 6). Bei 8, 15, 20, 50 und 70 °C war innerhalb von 16 Tagen keine Dechlorierung zu beobachten. Interessanterweise überlebten die dechlorierenden Bakterien nicht nur die Inkubation bei 15 und 20 °C sondern auch bei 50 °C. Nach ihrer anschließenden Testung bei 30 °C zeigten insbesondere letztere eine sehr hohe Dechlorierungskapazität.

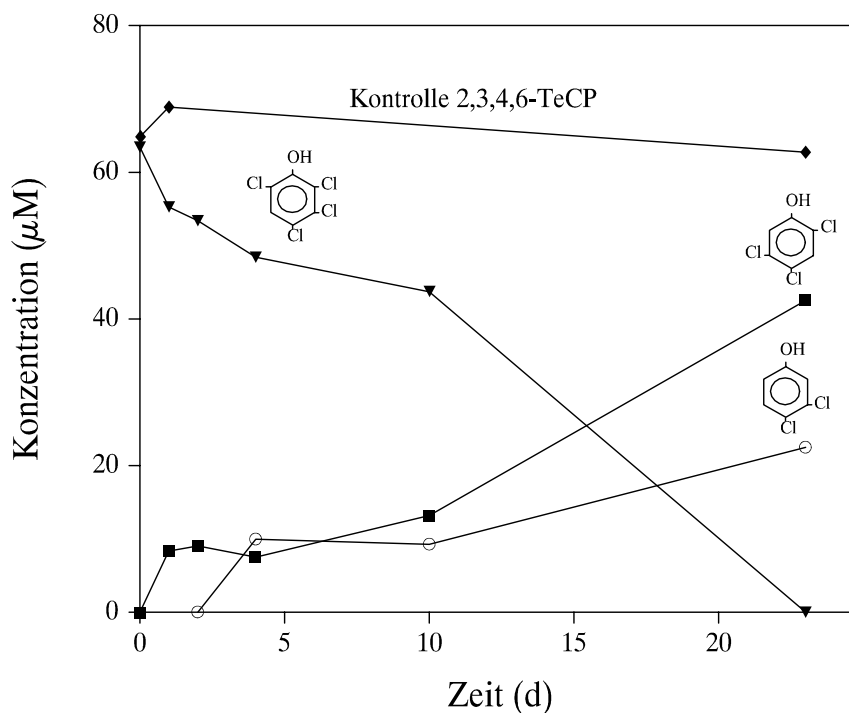


Abb. 4: Dechlorierung von 2,3,4,6-Tetrachlorphenol zu 2,4,5-Tri- und 3,4-Dichlorphenol durch 2,4,6-TCP-adaptierte Zellen. Cosubstrate: H<sub>2</sub> (Elektronendonator) und 0,01 % Hefeextrakt.

Tab. 2: Substratspektrum und Zwischenprodukte der Dechlorierung nach Adaptierung an 2,4,6-TCP unter chemolitho autotrophen Bedingungen. Substratkonzentration: 50 -100  $\mu\text{M}$ . Nachweis am GC/ECD, Identifizierung nach der Retentionszeit von Standards bzw. mit GC/MS. DCP,TCP,TeCP, PCP: Di-, Tri-, Tetra-, Pentachlorphenol

Substrat	% Umsatz der Ausgangsverbindung nach 23 Tagen	nachgewiesene Dechlorierungsprodukte
PCP	58	2,3,4,5-TeCP
2,3,4,6-TeCP	100	2,4,5-TCP; 3,4-DCP
2,3,5,6-TeCP	93	2,3,5-TCP; 2,5-DCP; 3,5-DCP
2,4,6-TCP	100	2,4-DCP; 4-CP
2,3,6-TCP	100	2,5-DCP
2,3,5-TCP	49	2,5-DCP; 3,5-DCP
2,3,4-TCP	27	2,3-DCP; 3,4-DCP
2,4,5-TCP	100	3,4-DCP
2,4-DCP	100	4-CP
2,3-DCP	100	3-CP
2,6-DCP	100	2-CP
3,5-DCP	100	3-CP
2,5-DCP	0	keine
3,4-DCP	0	keine

Weitere Untersuchungen mit pasteurisierten (1 h, 80 °C) Kulturen bestätigten, daß es sich bei den Dechlorierern um hitzeresistente Bakterien handelt, was gut mit der häufig beobachteten Endosporenbildung übereinstimmt.

Aus der Mischkultur wurde ein stäbchenförmiges Bakterium isoliert, das 2,4,6-TCP dechloriert und Eigenschaften besitzt, die auf eine Verwandtschaft zu der neu beschriebenen Gattung *Desulfitobacterium* hindeuten (Tab. 3), was jedoch durch weitere Untersuchungen wie z.B. durch Sequenzvergleich der 16S rRNA bestätigt werden muß.



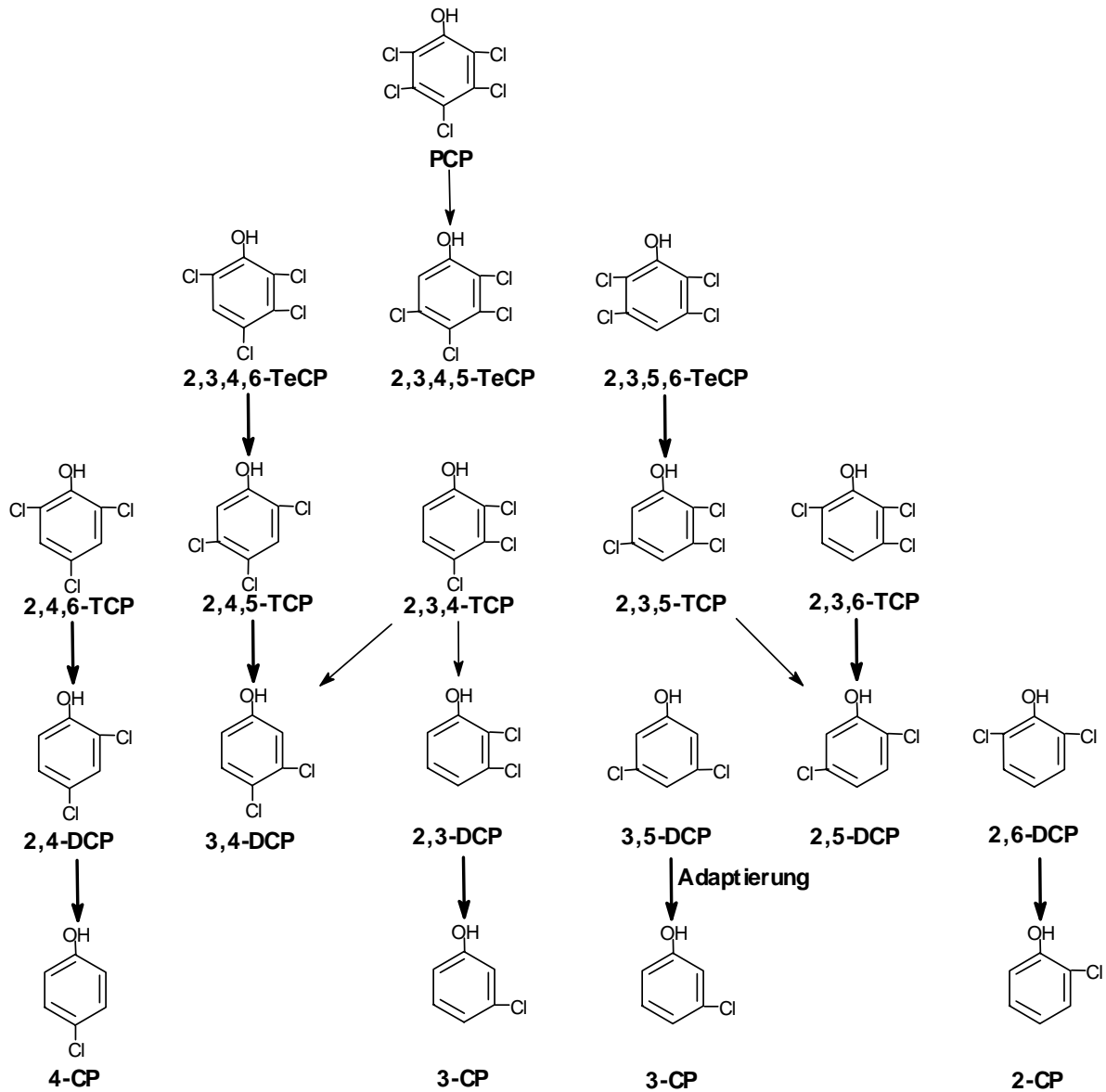


Abb. 5: Beobachtete Dechlorierung verschiedener Chlorphenole durch 2,4,6-TCP-adaptierte Zellen mit  $H_2$  als Elektronendonator und 0,01 % Hefeextrakt als Cosubstrat. Abkürzungen siehe Tab. 2.

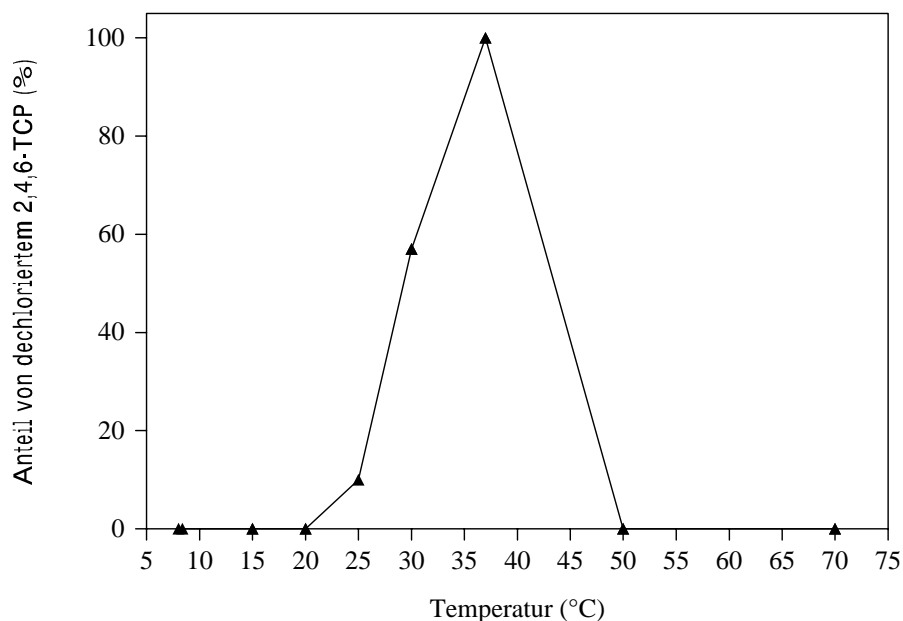


Abb. 6: Temperaturabhängigkeit der Dechlorierung von 2,4,6-TCP. Die Ansätze wurden mit 25 mM Pyruvat und 100  $\mu$ M 2,4,6-TCP inkubiert. Nach 9 Tagen wurde der Gehalt von 2,4,6-TCP und seinen Dechlorierungsprodukten (Summe = 100 %) ermittelt. Der prozentuale Umsatz von 2,4,6-TCP ist dargestellt.

Tab. 3: Vergleich der Eigenschaften des 2,4,6-TCP dechlorierenden Isolats W mit der Gattung *Desulfitobacterium*<sup>1</sup>

Organismus	Sporen- bildung	Wachst. mit Pyruvat <sup>2</sup>	Elektronenakzeptoren				
			Nitrat	Sulfat	Sulfit	Thiosulfat	Fumarat
Isolat W	+	+	+	-	+	+	+
<i>Desulfito- bacterium</i>	-/+	+	+/-	-	+	+	+

<sup>1</sup>: Zusammenfassung der publizierten Eigenschaften von *D. dehalogenans* (UTKIN et al., 1994), *D. hafniense* (CHRISTIANSEN und AHRING, 1996) und *D. sp. PCE1* (GERRITSE et al., 1996).

<sup>2</sup>: Wachstum fermentativ ohne Elektronenakzeptor.

### 3.1.3 Kontinuierliche Zellanzucht

In einer Vielzahl von Batch-Kulturen waren zwar hohe Dechlorierungsraten (bis zu 0,12 mmol 2,4,6-TCP/l·d) erreicht worden, als problematisch erwies sich aber das geringe Wachstum der Kulturen. Die Gewinnung von aktivem Impfmateriale ist eine wichtige Voraussetzung für die biotechnologische Anwendung der reduktiven Dechlorierung. Daher prüften wir die Möglichkeit einer Kultivierung der Mischkultur im Chemostaten unter Verwendung von 2,4,6-TCP als Elektronenakzeptor und Pyruvat als Elektronendonator.

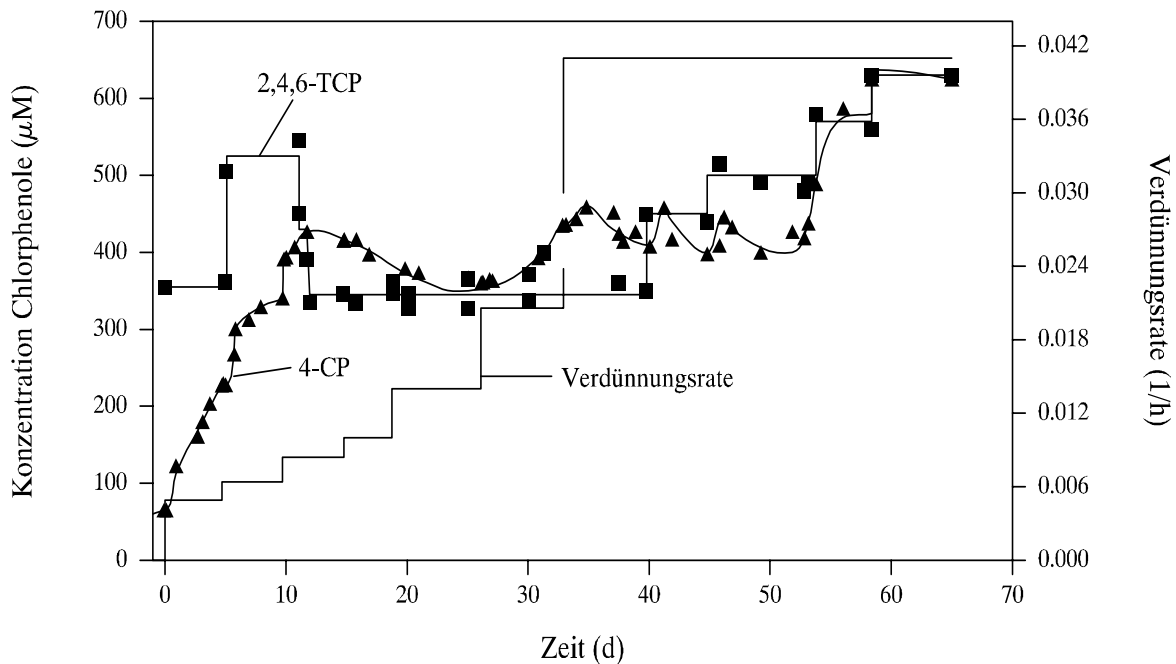


Abb. 7: Reduktive Dechlorierung von 2,4,6-TCP zu 4-CP in kontinuierlicher Kultur. 2,4,6-TCP: Konzentration im Zulauf; 4-CP: Konzentration im Fermenter.

Um zu gewährleisten, daß sich keine toxischen Konzentrationen von Substrat (2,4,6-TCP) oder Produkt (4-CP) im Fermenter akkumulierten, wurde (a) die Verdünnungsrate in kleinen Stufen erhöht und (b) die Zulaufkonzentration von 2,4,6-TCP vorsichtig von anfangs 350  $\mu\text{M}$  (70 mg/l) auf maximal 1,2 mM (234 mg/l) gesteigert. Unter diesen Bedingungen erfolgte stets vollständiger Umsatz von 2,4,6-TCP zu 4-CP (Abb. 7). Nach etwa 4 Monaten wurde bei einer Verdünnungsrate von 0,1  $\text{h}^{-1}$  eine maximale Dechlorierungsrate von 566 mg 2,4,6-TCP/l·d (2,8 mmol/l·d) erreicht (Tab. 4). Im Auslauf wurden die produzierten Zellen gesammelt und die Dechlorierungsaktivität wurde durch Fed-Batch-Zuführung von geringen Mengen 2,4,6-TCP und Pyruvat bis zur Zellernte erhalten. Der Biomassertrag betrug bei der höchsten im Fermenter erreichten Verdünnungsstufe (0,1  $\text{h}^{-1}$ ) etwa 0,85 g/l (Feuchtwicht).

Tab. 4: Dechlorierungsrate der Mischkultur im Chemostaten. Cosubstrate: 10 mM Pyruvat, 0,01 % Hefeextrakt.

Laufzeit des Fermenters (d)	Verdünnungsrate (h <sup>-1</sup> )	Konzentration von 2,4,6-TCP im Zulauf (mg/l)	Dechlorierungsrate (mg 2,4,6-TCP/l·d)
96	0,04	99	96
100	0,05	99	113
106	0,06	98	144
117	0,08	87	157
120	0,09	111	323
122	0,10	111	267
125	0,10	173	419
127	0,10	234	566

### 3.2 Immobilisierung der dechlorierenden Bakterien und Zusatz zu Klärschlamm

Das Trägermaterial für die Immobilisierung der anaeroben Mischkultur sollte folgende Eigenschaften aufweisen:

- geringe Sorption der Chlorphenole, um die Akkumulation toxischer Verbindungen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Zellen zu vermeiden und um analytisch den Dechlorierungsprozeß verfolgen zu können
- keine Beeinträchtigung der Dechlorierungsaktivität
- leichte Handhabbarkeit

Es wurden ein keramischer Träger (Zeolith, Korngröße etwa 1 mm), zwei großporige Polyurethan-Schaumstoffe (PUR-s, PUR-w, 0,5 bis 1 cm<sup>3</sup>-Würfel) und drei Wofatit-Adsorberpolymere (EP 60, EP 62, EP 63) untersucht. In Vorversuchen wurde die Sorption von 400 µM 2,4,6-TCP an 20 % (v/v) der verschiedenen Träger ermittelt. Von den Adsorberpolymeren und von PUR-s wurden jeweils mehr als 98 % sorbiert und schieden damit als Trägermaterial aus. PUR-w sorbierte 94 % des zugesetzten 2,4,6-TCP. Es wurde in die Untersuchungen einbezogen, da durch SELENT und HEGEMANN (1995) die Eignung als Trägermaterial bei der reduktiven Dechlorierung von Chlorbenzolen nachgewiesen worden war. Die Chlorphenole dechlorierenden Bakterien wuchsen auf dem Schaumstoff auf und ließen sich mit den verwendeten 1 cm<sup>3</sup>-Würfeln in frisches Medium unter Erhalt der Dechlorierungsaktivität überführen. Die Bilanzierung der Dechlorierungsprodukte war jedoch nicht möglich. Zeolith entsprach den Anforderungen am besten, da es zum einen die Chlorphenole nicht sorbierte, zum anderen von den Bakterien bewachsen wurde, wie auf rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen war. Bei Übertragung der bewachsenen Zeolithkörper in frisches Medium setzte die Dechlorierung sofort ein. Nach

mehrmaligem Zusatz von 2,4,6-TCP und dessen Dechlorierung zu 4-CP wurden die bewachsenen Träger in Klärschlamm überführt. Durch Zusatz von 100  $\mu\text{M}$  2,4,6-TCP wurde eine Belastung mit chlorierten Verbindungen simuliert. In Klärschlamm ohne Zusätze von Immobilisat oder Cosubstraten wurde keine Dechlorierung beobachtet (Abb. 8). Allerdings wurden autochthone Bakterien des Klärschlammes durch Zusatz von D,L-Lactat und Acetat zur Dechlorierung angeregt. Sie verlief langsam, was vermutlich auf die prinzipiell geringe

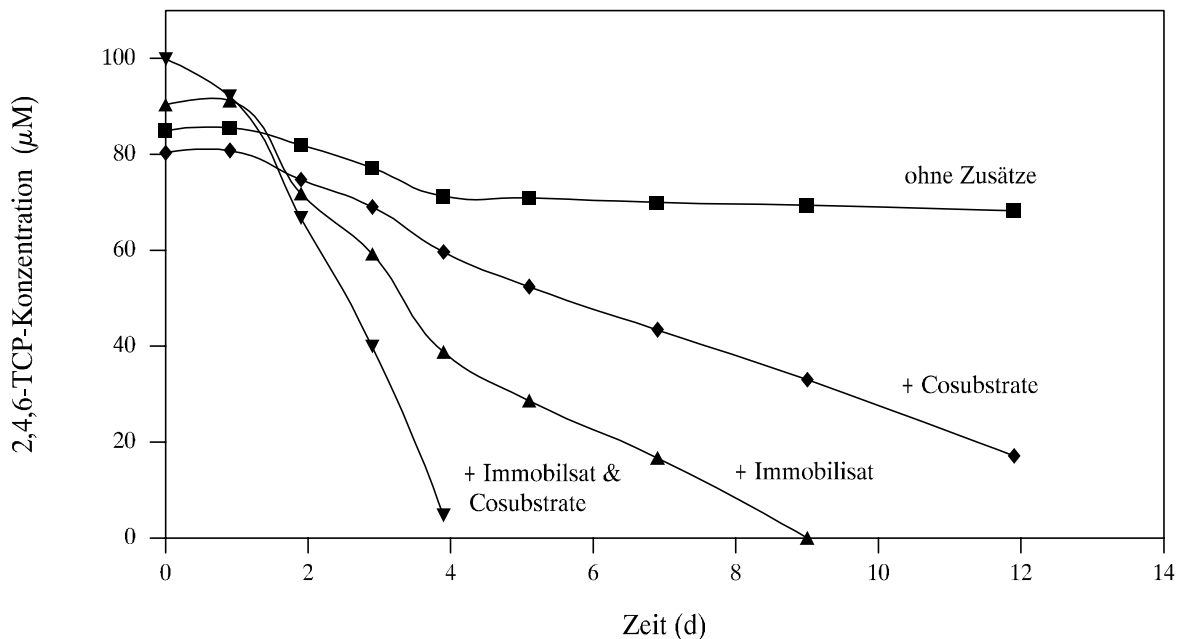


Abb. 8: Dechlorierung von 2,4,6-TCP in Klärschlamm unter Zusatz von Cosubstraten (10 mM D,L-Lactat und 5 mM Acetat) oder/bzw. und eines Immobilisates (auf Zeolith-Träger aufgewachsene dechlorierende Bakterien, 20 % v/v).

Zellzahl dechlorierender Bakterien in Klärschlämmen zurückzuführen ist (siehe auch Tab. 1). Durch Zusatz von 20 % (v/v) bewachsenem Zeolithmaterial zu Klärschlamm wurde eine schnelle Dechlorierung erzielt. Die Dechlorierung wurde zusätzlich durch Gabe von D,L-Lactat und Acetat beschleunigt.

Aus den Experimenten zur reduktiven Dechlorierung von Chlorphenolen konnten folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- Eine Anreicherung dechlorierender Bakterien aus anderen Habitaten als Klärschlamm scheint erfolgversprechender zu sein. Das deckt sich auch mit Literaturangaben, die belegen, daß dechlorierende Bakterien in Flußsedimenten natürlich vorkommen.
- Die angereicherte Mischkultur konnte ein breites Spektrum von Halogenphenolen einschließlich Pentachlorphenol dehalogenieren. Prinzipielle Möglichkeiten der Zellanzucht von dechlorierenden Bakterien wurden durch Chemostatenexperimente aufgezeigt. Lösungsvorschläge für die Trägerfixierung und damit leichte Handhabbarkeit dechlorierender Kulturen wurden erarbeitet.

### 3.3 Dechlorierung von Chlorcatecholen

Chlorierte Catechole spielten in unserem Verbundvorhaben eine besondere Rolle, da bekannt ist, daß sie als Intermediate beim aeroben mikrobiellen Abbau von Dioxinen auftreten können. Als solche können sie den vollständigen Abbau der Dioxine durch Hemmung von Enzymen verhindern. 4,5-Dichlorcatechol (4,5-DCC) wurde als Intermediat beim aeroben Abbau von 2,3-Dichlordibenzo-p-dioxin beschrieben (WITTICH, 1994). Es hemmte die *ortho*-spaltende Dioxygenase möglicherweise durch Komplexierung des Eisens im aktiven Zentrum (HIRATA, 1971). Außerdem stellen Chlorcatechole geeignete monoaromatische Modellverbindungen für chlorierte Biarylverbindungen dar, da sie ebenfalls zwei benachbarte C-O-Bindungen im Molekül enthalten. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf die reduktive Dechlorierung von 4,5-DCC und Tetrachlorcatechol.

#### 3.3.1 Anreicherung von 4,5-Dichlorcatechol dechlorierenden Kulturen

Für die Gewinnung von Anreicherungskulturen mit 4,5-DCC wurde von Proben aus Sediment (I) und Klärschlamm (G) ausgegangen. In den Klärschlammansätzen und in den mitgeführten Kontrollen (autoklavierte Ansätze) war keine Dechlorierung anhand gebildeter Zwischenprodukte nachweisbar. Dagegen wurden in den Ansätzen mit Saalesediment und unterschiedlichen Cosubstrat-Kombinationen (2.2.5) 200 µM 4,5-DCC zu 4-CC dechloriert. Die Dechlorierung zu 4-CC setzte erst nach einer lag-Phase ein. Erste Dechlorierungsprodukte wurden nach 5 bis 6 Wochen nachgewiesen. Unabhängig von den verwendeten Cosubstraten dauerte die vollständige Dechlorierung 6 bis 7 Wochen. Abb. 9 zeigt beispielhaft den Verlauf der Dechlorierung und die Bildung von 4-CC und Catechol in einer Kultur, die für die weitere Anreicherung ausgewählt wurde. Weitere Zusätze von 4,5-DCC wurden sofort ohne erkennbare Verzögerung umgesetzt und resultierten in der vorübergehenden Akkumulation von Catechol (240 µM), das danach innerhalb weniger Tage eliminiert wurde. Neben dechlorierenden Bakterien wurden also auch Catechol verwertende Bakterien angereichert. Diese arbeiteten so effizient, daß auch bei späteren Zusätzen von 4,5-DCC und nachfolgender Bildung und Abnahme von 4-CC keine nachweisbaren Mengen an Catechol auftraten. In dieser Kultur wurde die Zellzahl an 4,5-DCC dechlorierenden Bakterien durch MPN-Versuche (2.2.2) in einer Phase schneller Dechlorierung ermittelt. Sie betrug  $2,5 \cdot 10^7$  pro ml. Bakterien dieser Kultur wurden zu 10 % in Passagen überführt, um die Rolle von Acetat (5 mM), Formiat (10 mM) bzw. Sediment (5 %, v/v, autoklaviert) als Cosubstrat für die Dechlorierung zu untersuchen. Allen Varianten wurde 5 mM Bromethansulfonsäure zugesetzt, um methanogene Bakterien als mögliche Konkurrenten um die zugesetzten Elektronendonatoren zu hemmen. Einen fördernden Einfluß auf die Dechlorierung ließ nur der Zusatz von Sediment erkennen, denn nur in diesen Ansätzen verlief die Dechlorierung mit gleichbleibender Geschwindigkeit bis zum vollständigen Umsatz zu 4-CC. Es ist daher zu vermuten, daß aus Flußsediment stammendes komplexes

organisches Material die Elektronendonatoren für die Dechlorierung der Chlorcatechole liefert, die durch langsame Abbauprozesse freigesetzt werden.

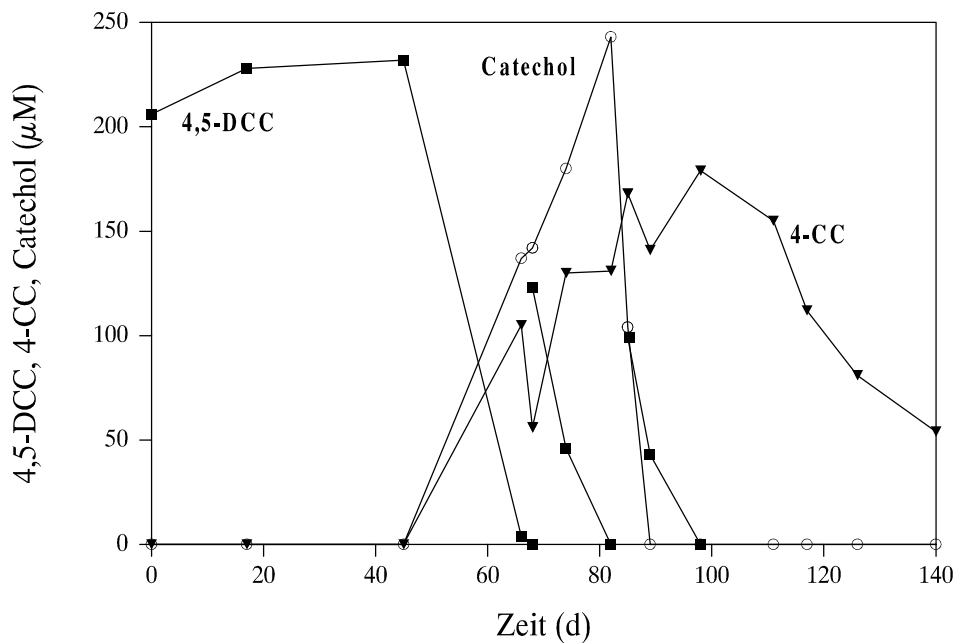


Abb. 9: Verlauf der Dechlorierung und des Abbaus von 4,5-DCC (■) über 4-CC (▼) und Catechol (○) in einer Anreicherungskultur aus Saalesediment (10 % v/v) in Gegenwart von 10 mM Formiat, 5 mM Acetat und 5 mM Bromethansulfonsäure. 4,5-DCC wurde zweimal (nach 68 und 85 Tagen) nachdosiert

### 3.3.2 Untersuchung der Dechlorierung von Tetrachlorcatechol

Tetrachlorcatechol (TeCC) ist eine schwer wasserlösliche Verbindung und zeigt eine hohe Tendenz zur Sorption an Sedimentmaterial. Dies erklärt sich sowohl aus der Lipophilie der chlorierten Verbindung als auch aus der Tendenz der vicinalen OH-Gruppen, Chelatkomplexe mit Metallionen einzugehen. Durch diese Eigenschaften stellt Tetrachlorcatechol ein gutes Modell für die ebenfalls schlecht löslichen und stark zur Sorption neigenden PCDD dar. Tetrachlorcatechol wurde in der Umgebung von Zellstoffabriken aber auch in besonders verkehrsbelasteten Gebieten nachgewiesen (z.B. BROWNLEE et al., 1993).

Zur Untersuchung der reduktiven Dechlorierung wurden Sedimente aus der Wilden Saale und der Zschopau (I bzw. K, siehe 2.1) verwendet, die 10 %ig zu anaerobem Medium gegeben wurden. TeCC wurde in einer Konzentration von 150 µM eingesetzt. Als Cosubstrate wurden folgende Mischungen verwendet: 2 mM Pyruvat + 2 mM Formiat oder 5 mM Fumarat + 1 mM Acetat. Die quantitative Analytik war durch die Notwendigkeit der Extraktion und Derivatisierung erschwert (2.4.2). Die Wiederfindungsrate betrug nach 24-stündiger Inkubation mit Sediment durchschnittlich 60 %. In einem autoklavierten Kontrollansatz

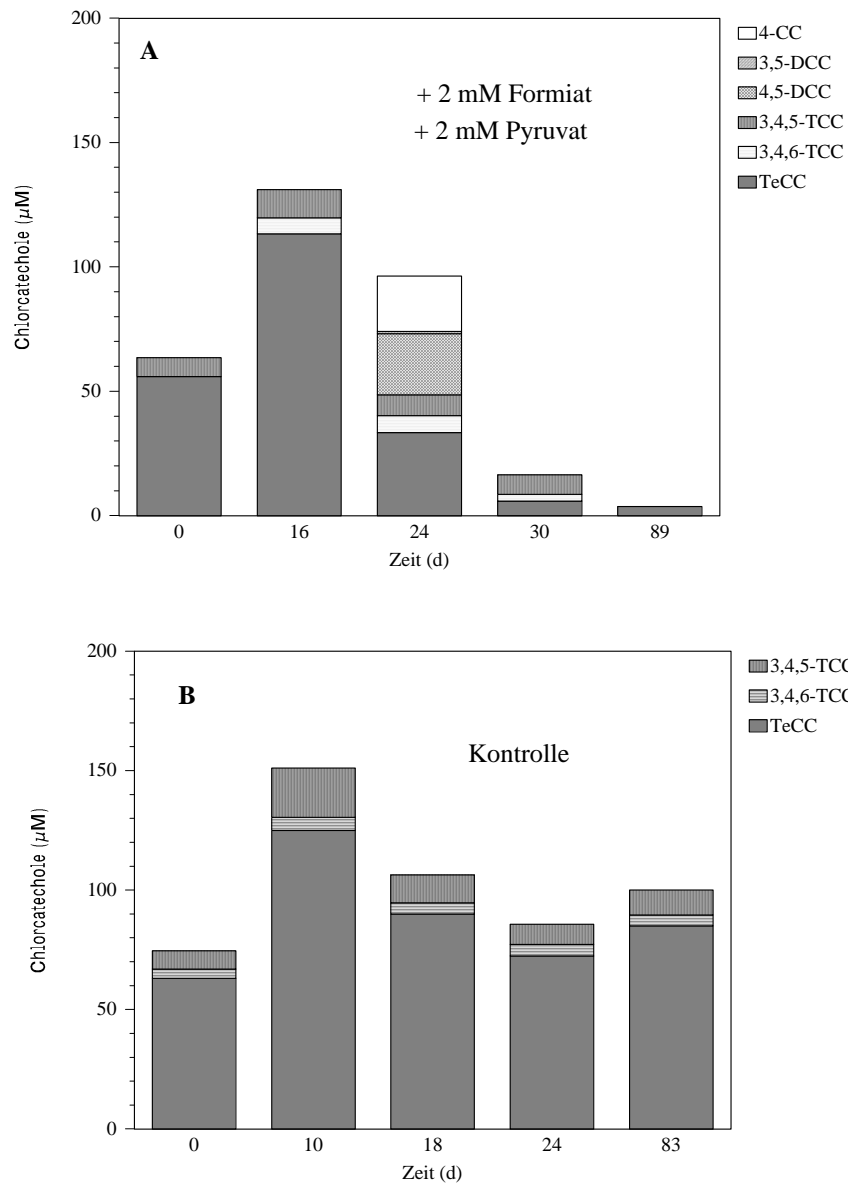


Abb. 10: Dechlorierung von Tetrachlorocatechol durch anaerobe Kulturen aus Saalesediment (10 % v/v) nach Zusatz von 2 mM Formiat und 2 mM Pyruvat (A). Kontrolle (B): Nach dem Zusatz von Sediment und TeCC zweimal (an aufeinanderfolgenden Tagen) autoklavierter Ansatz.

wurden bei Messungen über einen Zeitraum von drei Monaten zwischen 42 und 85 % der zugesetzten Menge wiedergefunden (Abb. 10B). Bereits in den Nullproben, wie auch in den sterilisierten Kontrollen, traten neben dem eingesetzten TeCC geringe Mengen von 3,4,5- und 3,4,6-Trichlorocatechol (TCC) auf, die entweder Verunreinigungen der Ausgangsverbindung oder spontane (nichtbiologische) Dechlorierungsprodukte darstellen. Biologische Dechlorierungsreaktionen wurden nach 24-tägiger Inkubation in allen Saalesediment-Ansätzen durch Verringerung der TeCC-Konzentration und gleichzeitige Bildung weiterer Dechlorierungsprodukte nachgewiesen. Nach 3 Monaten waren nur noch Spuren von TeCC und 3,4,5-TCC nachweisbar, die möglicherweise zwar extrahierbar aber nicht bioverfügbar waren. Abb. 10A zeigt die Dechlorierung in einem Ansatz mit 2 mM Pyruvat + 2 mM



Formiat. In den Ansätzen mit Zschopau-Sediment wurde keine Dechlorierung beobachtet. In Abb. 11 sind die aus den aufgetretenen Intermediaten abgeleiteten Dechlorierungswege dargestellt. Der Nachweis von verschiedenen Di- und Trichlorcatecholen macht es wahrscheinlich, daß Chloratome in unterschiedlichen Positionen am Ring gleichzeitig eliminiert werden und *ortho*- und *meta*-dechlorierende Aktivitäten in der Mischkultur vorhanden sind. Die Massenbilanzen konnten nicht geschlossen werden, denn die Summe der Chlorcatechole nahm stark ab. Das weist darauf hin, daß ähnlich wie bei 4,5-DCC eine vollständige Dechlorierung ohne Akkumulation einer niedrig chlorierten Verbindung erfolgt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß im anaeroben Saalesediment ein relativ hohes Dechlorierungspotential gegenüber Chlorcatecholen vorhanden ist. Es konnte hier nach unserem Wissen erstmals gezeigt werden, daß 4,5-DCC unter anaeroben Bedingungen einem vollständigen Abbau durch Dechlorierung und weiteren Abbau des intermediär gebildeten Catechols unterliegt. Während der Dechlorierung von TeCC traten beide möglichen Trichlorcatechole und zwei Dichlorcatechole auf. Bisher wurden als Dechlorierungsprodukte in einer Anreicherungskultur aus Klärschlamm nur 3,4,5-TCC, 4,5-DCC und 4-CC (WOODS et al., 1989), und in einer Suspensionskultur nur 3,4,6-TCC (NEILSON et al., 1987) nachgewiesen. Die relativ schnelle Adaptierung der komplexen Mischkulturen an die z.T. hoch chlorierten Substrate ließ hoffen, daß auch PCDD von diesen Mischkulturen angegriffen werden.

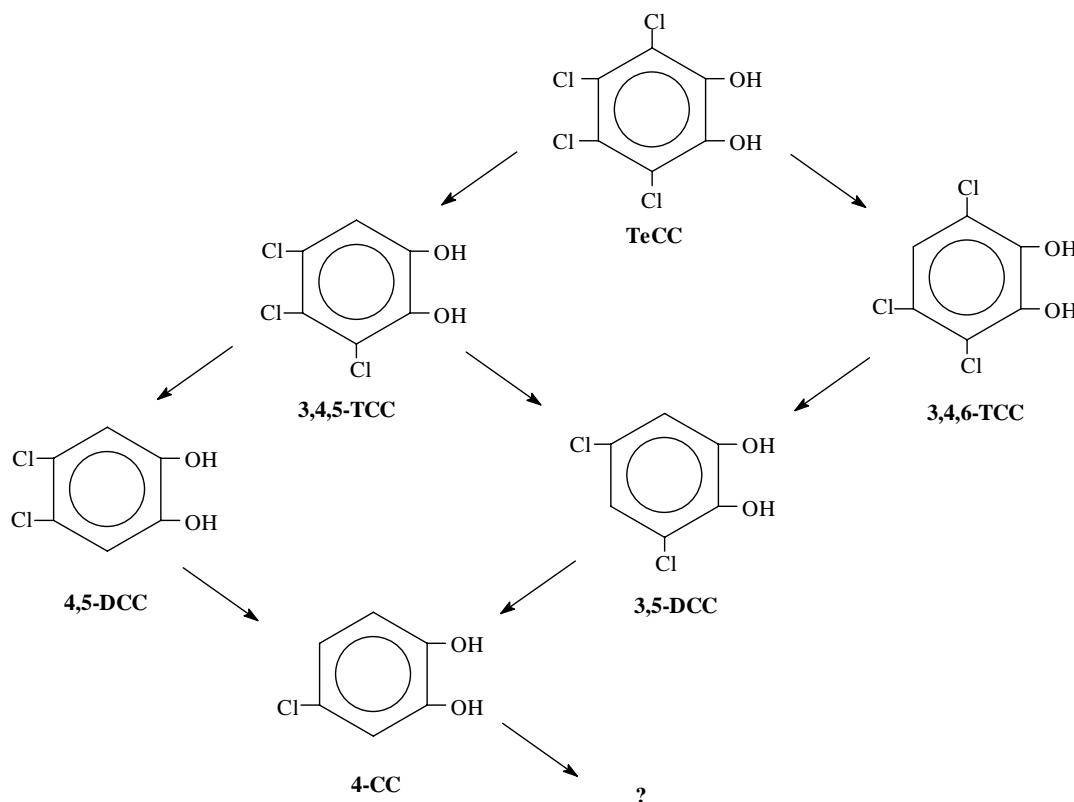


Abb. 11: Postulierte Dechlorierungswege von Tetrachlorcatechol

### 3.4 Dechlorierung von polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen

#### 3.4.1 Dechlorierung von 1,2,3,4-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (1,2,3,4-TCDD)

Zur Suche nach dioxindechlorierenden Aktivitäten wurde ein breites Spektrum von Proben aus Klärschlämmen, Böden und Sediment der Saale als Inokulum für anaerobe Kulturen eingesetzt, die teilweise hohe Belastungen mit PCDD/F oder anderen Xenobiotika aufwiesen. Dazu wurden die Mikroorganismen aus den hochbelasteten Böden eluiert und erst dann als Inokulum verwendet (20 % v/v), während Sediment und Klärschlamm direkt eingesetzt wurden (50 % v/v). Als Modell-Kongener wurde 1,2,3,4-TCDD ausgewählt, das keine hohe Toxizität besitzt, aber an einem Ring vollständig chloriert ist. Die angesetzten Kulturen wurden über 13 Monate verfolgt und monatlich analysiert. Eine Abnahme von 1,2,3,4-TCDD und die Bildung von niedriger chlorierten Dioxinen wurde nur in den beiden mit Saalesediment angeimpften Kulturen beobachtet. Weder in den mitgeführten Kontrollen (chemische Kontrolle: unbeimpfte Kulturen, biologische Kontrolle: beimpfte, aber anschließend autoklavierte Ansätze) noch in einer der mit Klärschlämmen oder Boden-Eluaten beimpften Kulturen wurde eine Dechlorierung beobachtet. In den Sediment-Ansätzen traten Spuren der beiden möglichen Trichlordibenzo-p-dioxine (TrCDD) 1,2,4- und 1,2,3-TrCDD auf. Das Hauptprodukt der Dechlorierung wurde durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie als 1,3-Dichlordibenzo-p-dioxin (1,3-DCDD; Abb. 12) identifiziert.

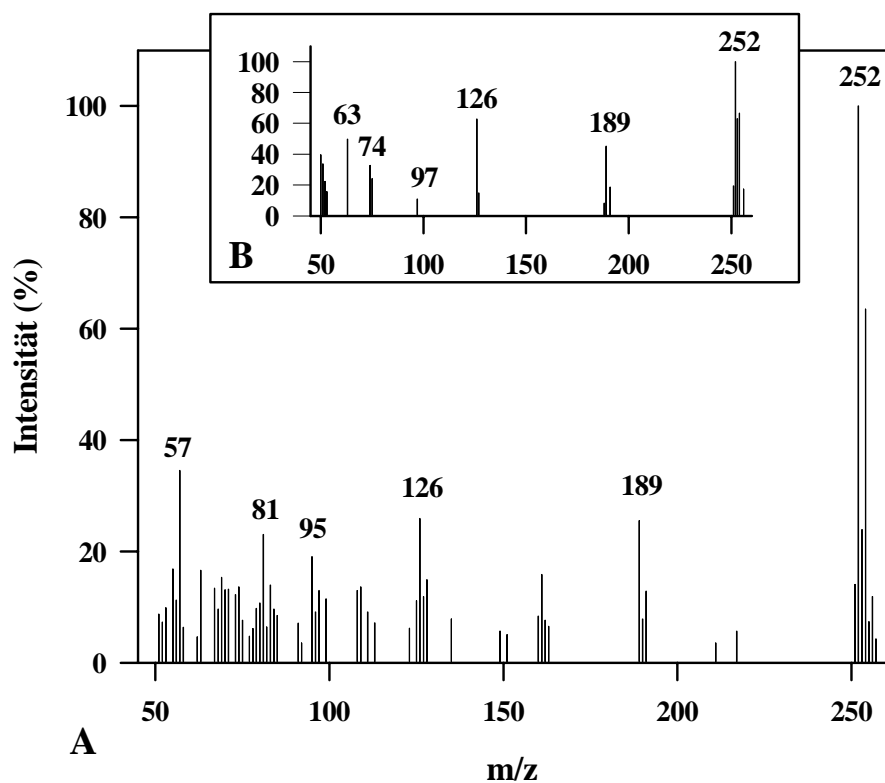


Abb. 12: Vergleich der Massenspektren des Hauptdechlorierungsproduktes 1,3-Dichlordibenzo-p-dioxin in der primären Anreicherungskultur (A) mit dem authentischen Standard (B).

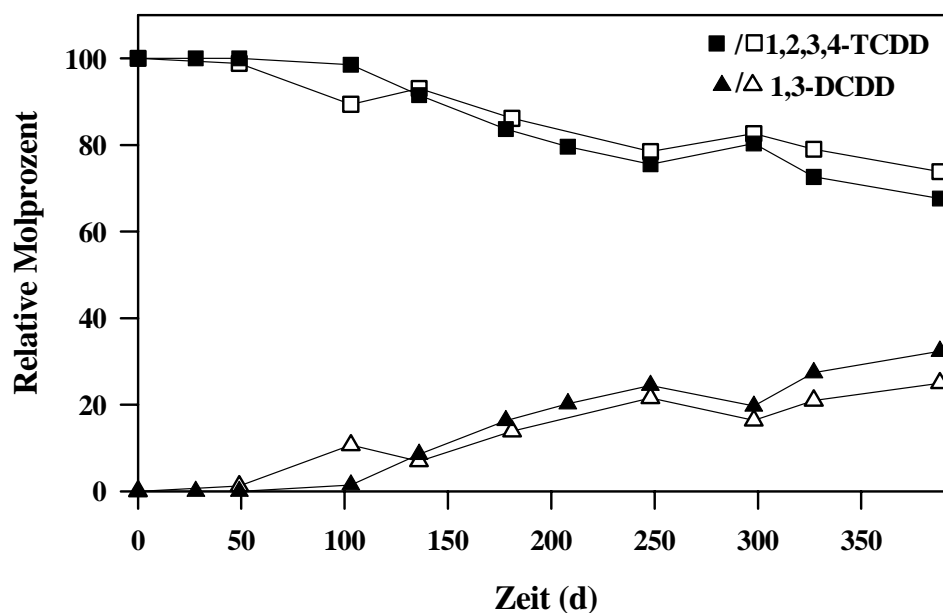


Abb. 13: Relative molare Verteilung von 1,2,3,4-TCDD (Anfangskonzentration 50  $\mu\text{M}$ ) und seines Dechlorierungsproduktes 1,3-DCDD während der Inkubation mit Saalesediment. Darstellung der Werte von zwei parallelen Kulturen. Die Konzentrationen von 1,2,4- und 1,2,3-TrCDD betragen stets weniger als ein Molprozent.

Es akkumulierte in den Kulturen (Abb. 13). In der Phase der höchsten Dechlorierungsaktivität (zwischen 50 und 250 d) wurde eine Umsatzrate von  $0.06 \mu\text{mol}/\text{l}\cdot\text{d}$  ( $r^2 = 0,97$ ) aus der Zunahme an 1,3-DCDD durch lineare Regression ermittelt.

Nach 256 Tagen wurden alle primären Anreicherungskulturen auf die Anwesenheit mikrobieller Stoffwechselprodukte untersucht (Tab. 5). Die hohen Konzentrationen an Methan und Spuren von Wasserstoff, die in allen Kulturen mit Ausnahme der Kontrollen gefunden wurden, zeigten, daß sich anaerobe Bedingungen etabliert hatten. Zusätzlich trat eine Mischung von Gärungsprodukten (Acetat und ein probenspezifisches Spektrum von organischen Säuren und kurzkettigen Alkoholen) in allen mit Böden (Proben A-D) und fast allen mit Klärschlämmen (Proben E-G) beimpften Ansätzen auf. Die mit Sedimenten und Klärschlamm H beimpften Ansätze enthielten keine organischen Säuren und Alkohole, was auf die Existenz einer kompletten anaeroben Nahrungskette hindeutet, die, wenn acetogene und methanogene Bakterien in einem ausgeglichenen Verhältnis vorhanden sind, zu Methan und  $\text{CO}_2$  als metabolischen Endprodukten führt. Möglicherweise sind diese Bedingungen günstig für die Entwicklung von dechlorierenden Bakterien.

Tab. 5: Stoffwechselendprodukte der anaeroben Testansätze nach 256 tägiger Inkubation. Als Inocula dienten Boden- (A,B,C,D), Klärschlamm- (E,F,G,H), und Sedimentproben (Saale) (I).

Produkte des anaeroben Stoffwechsels	Probe (Inocula)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
niedrig-chlorierte Dioxine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Methan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetat	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Propionat	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Butyrat	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Kurzkettige Alkohole	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-

### 3.4.2 Dechlorierung von 1,2,4- und 1,2,3-TrCDD

Bei der Dechlorierung von 1,2,3,4-TCDD zu 1,3-DCDD traten die intermediären TrCDDs nur in Spuren auf. Um die Position des primären Dechlorierungsschrittes zu ergründen, wurden die TrCDD getrennt zu Subkulturen, die mit 10 % (v/v) der Ausgangskultur beimpft waren, in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Um weiterhin einen hohen Gehalt an komplexem organischen Material zu sichern, wurde 50 % (v/v)  $\gamma$ -sterilisiertes Saalesediment zugegeben. Unter diesen Bedingungen wurde 1,2,4-TrCDD relativ schnell dechloriert (ca. 6  $\mu\text{M}$  in 58 Tagen, Abb. 14). Neben Spuren von 2-Monochlordibenzo-p-dioxin (2-MCDD; nicht

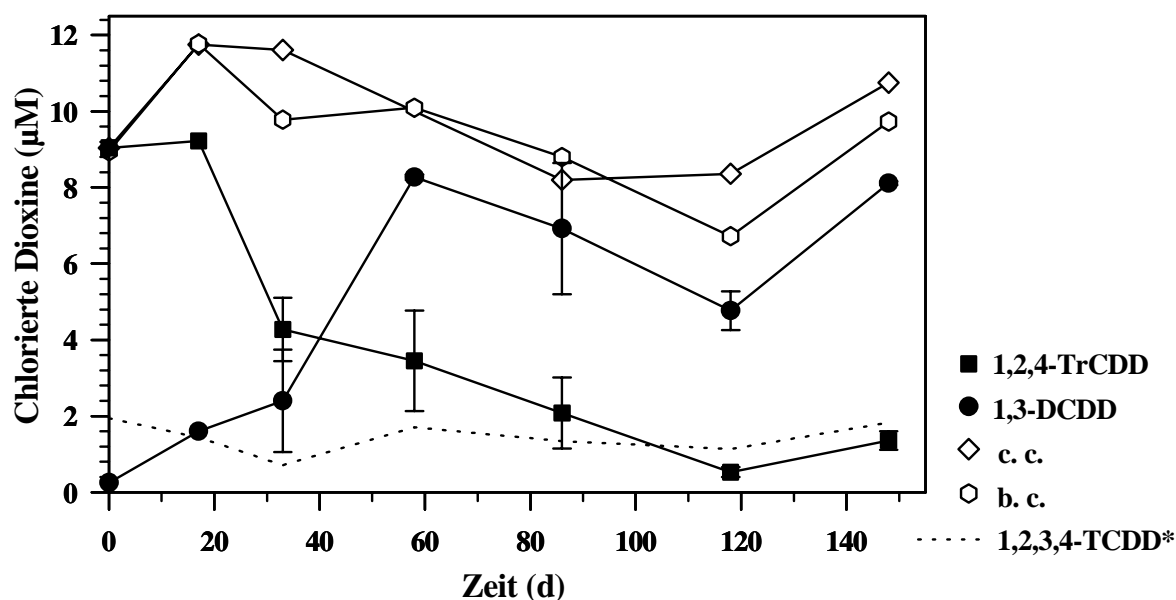


Abb. 14: Reduktive Dechlorierung von 1,2,4-TrCDD. Die Kultur wurde aus der primären Sedimentkultur durch 10 %igen (v/v) Transfer beimpft. \* 1,2,3,4-TCDD wurde mit dem Inokulum aus der Primärkultur eingetragen. b.c.: 1,2,4-TrCDD in der biologischen Kontrolle und c.c.: in der chemische Kontrolle.

dargestellt) wurde als Hauptprodukt 1,3-DCDD gebildet. Gemessen an dessen Zunahme wurde eine Dechlorierungsrate von  $0,14 \mu\text{mol/l}\cdot\text{d}$  durch lineare Regression ( $r^2 = 0.9$ , 0 bis 58 d) ermittelt. Der Umsatz der zugesetzten Cosubstrate erfolgte innerhalb von 33 Tagen.

Dagegen erfolgte der Umsatz von 1,2,3-TrCDD langsamer (Abb. 15). Innerhalb von 148 d waren etwa 60 % des eingesetzten 1,2,3-TrCDD zu 1,3- und 2,3-DCDD in etwa gleichen Anteilen dechloriert. In Spuren wurde auch 2-MCDD nachgewiesen. Hier waren die Cosubstrate erst nach 58 Tagen verbraucht. Das beobachtete Produktspektrum stimmte nicht mit dem Dechlorierungsmuster von 1,2,3,4-TCDD überein.

### 3.4.3 Dechlorierungsweg von 1,2,3,4-TCDD

Aus den analysierten Dechlorierungsprodukten wurde ein Dechlorierungsweg für 1,2,3,4-TCDD und die TrCDDs abgeleitet (Abb. 16). Der primäre dechlorierende Angriff erfolgt an einem lateralen Chloratom des 1,2,3,4-TCDD. Das dabei intermediär entstehende 1,2,4-TrCDD wurde schneller als die Ausgangsverbindung zu 1,3-DCDD dechloriert, so daß 1,2,4-TrCDD nur in geringen Konzentrationen meßbar war. Die Bildung von 1,2,3-TrCDD scheint eine geringere Nebenreaktion zu sein, da nur Spuren auftraten und keine 1,2,3-TrCDD-typischen Dechlorierungsprodukte nachweisbar waren.

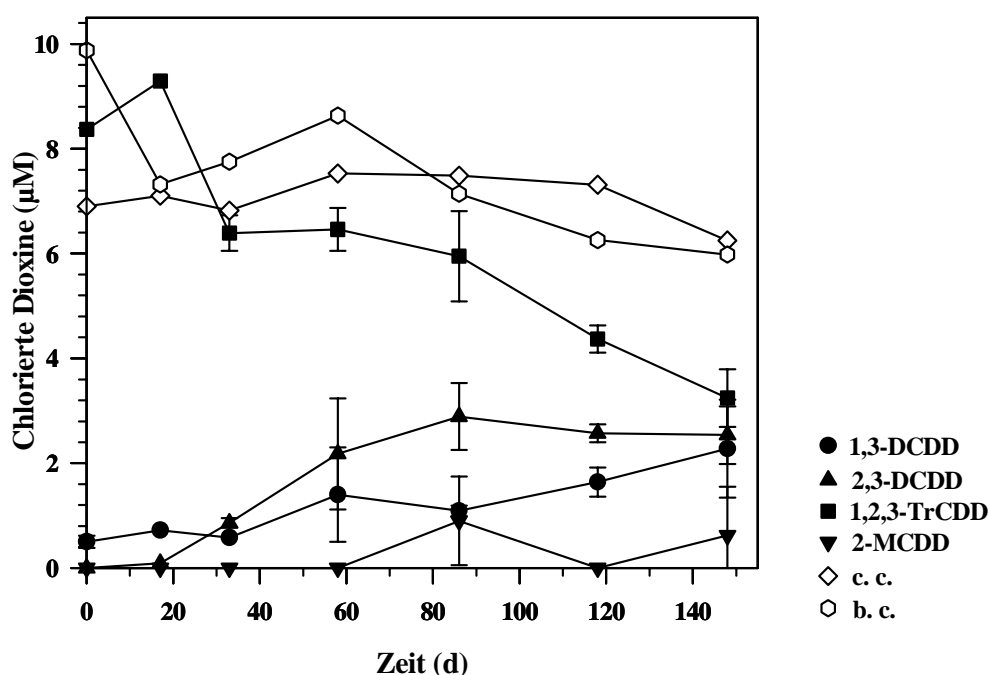


Abb. 15: Reduktive Dechlorierung von 1,2,3-TrCDD. Die Kultur wurde aus einer primären Anreicherungskultur durch 10 %igen (v/v) Transfer beimpft. b.c.: 1,2,3-TrCDD in der biologischen Kontrolle und c.c.: in der chemische Kontrolle.

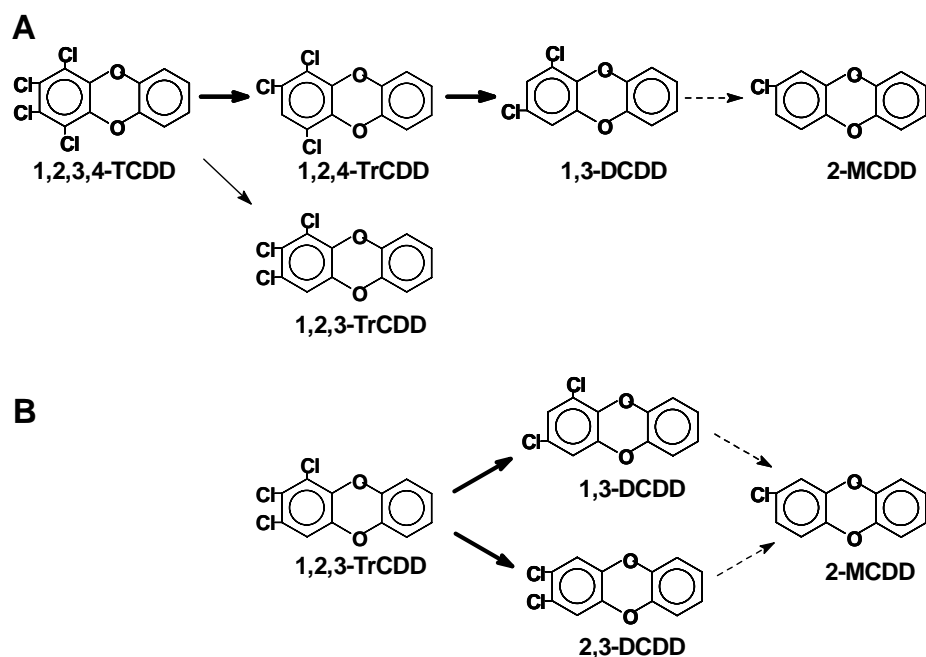


Abb. 16: Vorgeschlagener Dechlorierungsweg von 1,2,3,4-TCDD (A) und 1,2,3-TrCDD (B) durch anaerobe Bakterien aus Saalesediment.

Bei Zusatz von 1,2,3-TrCDD zu einer Kultur erfolgte ebenfalls Dechlorierung, wobei in etwa gleichen Verhältnissen ein laterales ( $C_2$ -Position) und ein peripheres ( $C_1$ -Position) Chloratom abgespalten wurden.

Die hier beobachtete ausschließliche Umsetzung des TCDD zu 1,3-DCDD bietet sehr günstige Voraussetzungen zur Vermeidung hochtoxischer Intermediate bei der reduktiven Dechlorierung höher chlorierter Dioxine, wenn man annimmt, daß auch bei an beiden Ringen substituierten Dioxinen der primäre Angriff lateral erfolgt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, bevor diese Beobachtungen nutzbringend angewandt werden können. Die geringe Wasserlöslichkeit der Verbindungen (bei 20°C z.B. 2 bzw. 30 nM für 1,2,3,4-TCDD und 1,2,4-TrCDD) bewirkt auch eine geringe Bioverfügbarkeit. Daher waren langsame Umsätze zu erwarten. Es war jedoch überraschend, daß die ermittelten Dechlorierungsraten höher waren als die bisher für Suspensionskulturen beschriebenen (BEURSKENS et al., 1995).

## 4 Literatur

- ADRIAENS, P.; GRBIC-GALIC, D. 1992: **Fate of highly chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in anaerobic soils and sediments.** S. 79-82. In: Proc. Int. Symp. "Soil decontamination using biological processes", 6.-9. Dez. 1992, Karlsruhe, DECHEMA, Frankfurt/Main.
- ADRIAENS, P.; GRBIC-GALIC, D. 1994: **Reductive dechlorination of PCDD/F by anaerobic cultures and sediments.** In: Chemosphere, 29, S. 2253-2259.
- ADRIAENS, P.; FU, Q.; GRBIC-GALIC, D. 1995: **Bioavailability and transformation of highly chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in anaerobic soils and sediments.** In: Environ. Sci. Technol., 29, S. 2252-2260.
- ALEF, K. 1991: **Methodenbuch Bodenmikrobiologie**, Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg/Lech.
- ALLARD, A.-S.; HYNNING, P.-A.; REMBERGER, M.; NEILSON, A. H. 1985: **Bacterial O-methylation of chloroguaiacols: effects of substrate concentration, cell density, and growth conditions.** In: Appl. Environ. Microbiol., 49, S. 279-288.
- APAJALATHI, J. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. 1986: **Degradation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenicus*.** In: Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, S. 62-67.
- BEURSKENS, J. E. M.; TOUSSAINT, M.; DE WOLF, J.; VAN DER STEEN, J. M. D.; SLOT, P. C.; COMMANDEUR, L. C. M.; PARSONS, J. R. 1995: **Dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic microbial consortium from sediment.** In: Environ. Toxicol. Chem., 14, S. 939-943.
- BEDARD, D. L.; WAGNER, R. E.; BRENNAN, M. J., HABERL, M. L.; BROWN, J. F. 1987: **Extensive degradation of aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850.** In: Appl. Environ. Microbiol., 53, S. 1094-1102.
- BROWNLEE, B. G.; MACINNIS, G. A.; NOTON, L. R. 1993: **Chlorinated anisoles and veratroles in a Canadian river receiving bleached kraft pulp mill effluent. Identification, distribution, and olfactory evaluation.** In: Environ. Sci. Technol., 27 S. 2450-2455.
- BRYANT, F. O.; HALE, D. D.; ROGERS, J. E. 1991: **Regiospecific dechlorination of pentachlorophenol by dichlorophenol-adapted microorganisms in fresh-water, anaerobic sediment slurries.** In: Appl. Environ. Microbiol., 57, S. 2293-2301.
- CHRISTIANSEN, N.; AHRING, B. K. 1996: ***Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium.** In: Int. J. Syst. Bacteriol., 46, S. 442-448.

- COLE, J. R.; CASCARELLI, A. L.; MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. 1994: **Isolation and characterisation of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol**. In: Appl. Environ. Microbiol., 60, S. 3536-3542.
- DE WEERD, K. A.; MANDELCO, L.; TANNER, R. S.; WOESE, C. R.; SUFLITA, J. M. 1990: ***Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium**. In: Arch. Microbiol., 154, S. 23-30.
- DIEKERT, G. 1995: **Reduktive Dechlorierung als respiratorischer Prozeß in anaeroben Bakterien**. In: Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 6: Mikrobielle Eliminierung chlororganischer Verbindungen, Kolloquium an der TU Berlin, 20.-21. November 1995, Berlin 1995, S. 149-158.
- DIOXINBERICHT des Landes Sachsen-Anhalt. 1996, Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt: Halle (Saale), S. 68-87.
- DOLFING, J.; HARRISON, B. K. 1993: **Redox and reduction potentials as parameters to predict the degradation pathway of chlorinated benzenes in anaerobic environments**. In: FEMS Microbiol. Ecol., 13, S. 23-30.
- FIEDLER, H. 1993: **PCDD/PCDF und PCB: Quellen, Vorkommen in der Umwelt**. In: HUTZINGER, O.; FIEDLER, H. (Hrsg.) Seminar Dioxine, PCB, AOX im Klärschlamm: Gesetzliche Grundlagen, Umsetzung, Analytik und Verwertung. Organohalogen Compounds, 16, Ecoinforma-Press Bayreuth, S. 7-38
- GERRITSE, J.; RENARD, V.; VISSER, J.; GOTTSCHAL, J. C. 1995: **Complete degradation of tetrachloroethene by combining anaerobic dechlorinating and aerobic methanotrophic enrichment cultures**. In: Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, S. 920-928.
- GERRITSE, J.; RENARD, V.; GOMES, T. M. P.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D.; GOTTSCHAL, J. C. 1996: ***Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols**. In: Arch. Microbiol., 165, S. 132-140.
- HENDRIKSEN, H. V.; AHRING, B. K. 1993: **Anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in fixed-film and upflow anaerobic sludge blanket reactors using different inocula**. In: Biodegradation, 3, S. 399-408.
- HENDRIKSEN, H. V.; LARSEN, S.; AHRING, B. K. 1992: **Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge**. In: Appl. Environ. Microbiol., 58, S. 365-370.
- HOLLIGER, C.; SCHRAA, G.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. 1992: **Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene**. In: Appl. Environ. Microbiol., 58, S. 1636-1644.



- HOLLIGER, C.; SCHRAA, G.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. 1993: **A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth.** In: Appl. Environ. Microbiol., 59, S. 2991-2997.
- MADSEN, T.; LICHT, D. 1992: **Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium.** In: Appl. Environ. Microbiol., 58, S. 2874-2878.
- MOHN, W. W.; TIEDJE, J. M. 1992: **Microbial reductive dechlorination.** In: Microbiol. Rev., 56, S. 482-507.
- NEILSON, A. H.; ALLARD, A. S.; LINDGREN, C.; REMBERGER, M., 1987: **Transformations of chloroguaiacols, chloroveratroles, and chlorocatechols by stable consortia of anaerobic bacteria.** In: Appl. Environ. Microbiol., 53, S. 2511-2519.
- NEUMANN, A.; WOHLFAHRT, G.; DIEKERT, G. 1995: **Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*.** In: Arch. Microbiol., 163, S. 276-281.
- NI, S.; FREDRICKSON, J. K.; XUN, L. 1995: **Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1.** In: J. Bacteriol., 177, S. 5135-5139.
- QUENSEN III, J. F.; TIEDJE, J. M.; BOYD, S. A. 1988: **Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments.** In: Science, 242, S. 752-754.
- RABAS, K. 1995: **Perspektiven der Klärschlammverwertung aus der Sicht eines Dienstleistungsanbieters.** In: Abfallwirtschafts Journal, Heft 3, S. 135-136.
- REMBERGER, M.; ALLARD, A. S.; NEILSON, A. H. 1986: **Biotransformations of chloroguaiacols, chlorocatechols, and chloroveratroles in sediments.** In: Appl. Environ. Microbiol., 51, S. 552-558.
- SCHUMACHER, W., HAGEN, W. R.; VAZQUEZ, F.; HOLLIGER, C. 1996: **Biochemical and spectroscopic characterization of the tetrachloroethene reductase of "*Dehalobacter restrictus*".** In: BIOSpektrum, Sonderausgabe März 1996, S. 37.
- SELENT, B.; HEGEMANN, W. 1995: **Anaerob-aerober Abbau von Chlorbenzolen.** In: Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 6: Mikrobielle Eliminierung chlororganischer Verbindungen, Kolloquium an der TU Berlin, 20.-21. November 1995, Berlin 1995, S. 105-118.
- TOUSSAINT, M., COMMANDEUR, L. C. M.; PARSONS, J. R. BEURSKENS, J. E. M., DE WOLF, J. 1992: **Reductive dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by a bacterial consortium isolated from Lake Ketelmeer sediment: Preliminary results.** S. 578-585. In: Proc. Int. Symp. "Soil decontamination using biological processes", 6.-9. Dez. 1992, Karlsruhe, DECHEMA, Frankfurt/Main.

- UTKIN, I.; WOESE, C.; WIEGEL, J. 1994: **Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds.** In: Int. J. Syst. Bacteriol., 44, S. 612-619.
- VAN DER WOUDE, B. J.; GERRITSE, J.; PRINS, R. A.; GOTTSCHAL, J. C. 1996: **Extent of reductive dechlorination of chlorobenzoates in anoxic sediment slurries depends on the sequence of chlorine removal.** In: Environ. Sci. Technol., 30, S. 1352-1357.
- WITTICH, R.-M. 1994: **Der mikrobielle Abbau von Dibenzo-p-dioxinen, Dibenzofuranen, Diphenylethern und ihren Derivaten.** In: BioEngineering Heft 1, 1994, S. 33-40.
- WOODS, S. L., FERGUSON, J. F.; BENJAMIN, M. M. 1989: **Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment.** In: Environ. Sci. Technol., 23, S. 62-68.
- WU, W.-M.; BHATNAGAR, L.; ZEIKUS, J. G. 1993: **Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol.** In: Appl. Environ. Microbiol., 59, S. 389-397.
- YE, D.; QUENSEN III, J. F.; TIEDJE, J. M.; BOYD, S. A. 1992: **Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments.** In: Appl. Environ. Microbiol., 58, S. 1110-1114.

## 5. Veröffentlichungen

### Schriftliche Veröffentlichungen

- RISTAU, D., U. LECHNER, M. WAGNER, E. HAMMER und F. SCHAUER (1996) Anaerobe und aerobe mikrobielle Eliminierung organischer Schadstoffe aus Klärschlämmen und Komposten. In: ANS-Forum 2, S. 21-28.
- LECHNER, U., R. BAUMBACH, D. BECKER, V. KITUNEN, G. AULING and M. SALKINOJA-SALONEN (1995) Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. In: Biodegradation 6, S. 83-92.
- BALLERSTEDT, H., A. KRAUS and U. LECHNER (1996) Reductive dechlorination of chlorinated dibenzo-p-dioxins by anaerobic mixed cultures from Saale river sediment. In: Environ. Sci. Technol., eingereicht.
- JOHN, A., G. SCHUFFENHAUER, H. BALLERSTEDT and U. LECHNER (1995) Reductive dechlorination of chlorophenols by a formate-utilizing anaerobic consortium. In: BIOSpektrum 1, Sonderausgabe, S. 70 (VAAM-Tagung, Poster).
- BALLERSTEDT, H., A. KRAUS und U. LECHNER (1996) Reductive dechlorination of chlorinated dibenzo-p-dioxins by anaerobic bacteria from Saale river sediment. In: BIOSpektrum, Sonderausgabe März 1996, S. 107 (VAAM-Tagung, Poster).

- KRAUS, A., H. BALLERSTEDT und U. LECHNER (1995) Untersuchungen zur Erhöhung der Löslichkeit chlorierter Biarylverbindungen in wäßrigen Mineralsalzlösungen durch Zusatz von Lösungsvermittlern, Münster, 10.-16. September 1995 (25. GDCh-Hauptversammlung, Poster).
  - SCHUFFENHAUER, G. (1994) Anreicherung und Charakterisierung von 2,4,6-TCP dechlorierenden Mischkulturen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle.
  - JOHN, A. (1994) Dechlorierung von 2,4,6-TCP durch eine Formiat-verwertende anaerobe Mischkultur und Charakterisierung ihres Substratspektrums. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle.
  - BREITENSTEIN, A. (1995) Isolierung von vier 2,4,6-Trichlorphenol dechlorierenden Reinkulturen aus anaeroben Mischkulturen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle.
  - KUHNKE, G. (1995) Reduktive Dechlorierung von Chlorcatecholen durch anaerobe Mikroorganismen. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle.
- RUTSCH, S. (1996) Entfernung von chlorierten Phenolen aus Klärschlämmen durch mikrobielle reduktive Dehalogenierung. Diplomarbeit. Technische Fachhochschule Berlin.

#### Vorträge, Kolloquien und Besprechungen

Im Rahmen der Arbeitsbesprechungen des TV11 sind in halbjährlichem Abstand Fachvorträge über den Stand der Arbeiten gehalten worden (30./31. 3. 1994, Universität Greifswald; 20.-22. 10. 94, Universität Halle; 14. 3. 95 Firma Grube, Land- und Umwelttechnik, Brake; 6. 10. 1995, Universität Greifswald; 17. 6. 95, Universität Halle). Die Ergebnisse wurden außerdem auf der 7. und 8. Koordinierungssitzung des Verbundvorhabens "Neue Techniken der Kompostierung" vorgestellt.

Außerdem wurden folgende Vorträge gehalten:

LECHNER, U.: "Analyse der Dechlorierung organischer Schadstoffe durch Mikroorganismen aus Klärschlämmen". 2. Forum Umweltanalytik/Umweltbiochemie der Firma MERCK, 29. 9. 1994, Martin-Luther-Universität Halle

LECHNER, U.: "Die reduktive Dechlorierung von polychlorierten Verbindungen durch anaerobe Bakterien. Eine neue Möglichkeit zur Eliminierung von organischen Schadstoffen?" Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, 5. 4. 1995, Bad Lauchstädt