



---

**Fakultät Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften Institut für  
Abfallwirtschaft und Altlasten**

---

Lehrstuhl Altlasten, Prof. Dr. rer. nat. Peter Werner

Abschlußbericht zum Max-Buchner-Forschungsstipendium, Themenkennziffer 2535:

**„Benzinadditiv MTBE: Untersuchungen zum natürlichen Abbau in  
verschiedenen Grundwassersedimenten“**

**(Förderperiode 1.7.04 – 30.6.06)**

Bearbeiter: Dipl.-Ing. Jens Fahl

**1. Zusammenfassung:**

Ziel der Arbeiten war die Durchführung aerober batch-Versuche in der Form von Mikrokosmen, die mit realen Sedimentproben aus dem Grundwasserbereich gefüllt wurden.

In diesen Laborexperimenten wurde die Fähigkeit von Grundwassersedimenten und der in ihnen angesiedelten Mikroorganismen zum biologischen in-situ Abbau des Benzinadditivs Methyl-tertiär-Butylether (MTBE) untersucht.

Die Proben sowohl von bereits MTBE-kontaminierten als auch von unkontaminierten Standorten wurden hinsichtlich ihrer Abbaupazität für MTBE verglichen. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass nur die Mikrokosmen mit Sedimentproben kontaminierter Standorte über effektive Abbauleistungen verfügten. Diese ersten Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass zum MTBE-Abbau befähigte Biozönosen im Grundwasser nicht ubiquitär verbreitet sind, oder diese sich erst nach Jahren des Kontaktes mit dem Schadstoff herausbilden.

Zusätzliche Experimente dienten zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf den biologischen Abbau von MTBE. Dabei konnte die deutliche Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit von der Gelöst-Sauerstoffkonzentration im Versuchswasser gezeigt werden. Jedoch kommt der MTBE-Abbau bei  $O_2$ -Konzentrationen unter 1 mg/l keineswegs zum Erliegen, findet jedoch signifikant verzögert statt. Für die Praxis bedeutet das unter anderem die prinzipielle Möglichkeit des aeroben biologischen Abbaues von MTBE (als „Natural Attenuation“ - Prozess) auch an kontaminierten Standorten mit  $O_2$ -Konzentrationen im Grundwasser von weniger als 2 mg/l.

## 2. Verwendete Materialien, Methoden:

### 2.1. Chemische Analytik:

Messung von MTBE und möglichen Metaboliten über Gaschromatographie mit Flammen-Ionisations-Detektor (GC/FID - HEWLETT-PACKARD GC/FID 6890 verbunden mit Autosampler PERKIN-ELMER HS40XL). Überwachung der pH-Werte mit Sonde WTW pH340. Anionen-Kontrollanalysen mit Ionenchromatograph Metrohm IC-System 733. Messung der optischen Dichte (OD) der Zellsuspensionen mit Zweistrahlsspektrophotometer SPECORD 50, Analytik Jena. Sauerstoffmessung über Faseroptischen Mikrosensor PRESENS Microx TX3, Nadeltyp, in Kanüle mit Durchmesser 0,4 mm (Messung der O<sub>2</sub>-abhängigen dynamischen Fluoreszenz-Auslöschung nach Anregung mit  $\lambda = 505$  nm)

### 2.2. Aerobes Kultivierungs-Medium:

(Gehalte in g/l) NH<sub>4</sub>Cl 0.25, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0.2, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0.05; Wolfe's Spurenminerallösung 10 ml/l (NTA 1.5, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 3.0, MnSO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0.5, NaCl 1.0, FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0.1, CoSO<sub>4</sub> 0.1, CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0.1, ZnSO<sub>4</sub> 0.1, CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O 0.01, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.01, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 0.01); Wolfe's Vitaminlösung 10 ml/l ([Gehalte in mg/l] Biotin 2, Folsäure acid 2, Pyridoxin-Hydrochlorid 10, Thiamin-Hydrochlorid 5, Riboflavin 5, Nicotinsäure 5, DL-Calcium-Pantothenat 5, Vitamin B12 0.1, p-Aminobenzoensäure 5, Liponsäure 5)

### 2.3. Gefäße

#### Versuche mit Aquifersedimenten:

500 ml Duran-Flaschen (250 ml Duran-Flaschen für weitere Versuche mit Raffinerie-Bodenprobe KR) gefüllt mit ca. 100 g Sedimentprobe (Feuchtmasse). Flaschen zur Hälfte ihres Volumens mit aerobem Kultivierungsmedium aufgefüllt. Luftraum über der Flüssigkeit als Sauerstoffreservoir, 250 ml Luft enthalten 52,5 ml O<sub>2</sub> (= 2,3 mmol O<sub>2</sub>) die theoretisch zur Bio-Oxidation von 0,3 mmol MTBE (= 26,4 mg MTBE) reichen. Verschluss durch Schraubkappe mit Butylgummi-PTFE-Septum für Probenahmen mit Spritzen und Kanülen.

Lagerung dunkel, bei 20°C. MTBE-Zugabe zu allen Experimenten auf Start-Konzentrationen zwischen 250 und 800 µg/l. Die Mikrokosmen mit Raffinerie-Proben KR erhielten bis bis 25 mg/l, was einer MTBE-Menge von ca. 3 mg im Mikrokosmos entspricht. Das 125 ml Luftreservoir dieser Flaschen enthält ca. 1,2 mmol O<sub>2</sub>, theoretisch ausreichend zur Oxidation von 14 mg MTBE. Zu jedem batch-Versuch wurde eine parallele Sterilkontrolle angesetzt (erkenntlich am Suffix "St"), die mit Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) als Biostatikum versetzt war (Konzentration NaN<sub>3</sub> = 1 g/l).

#### Versuche mit Bakteriensuspensionen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen:

100 ml Duran-Flaschen, befüllt in O<sub>2</sub>-freier Atmosphäre (Anaerobbox, N<sub>2</sub> / H<sub>2</sub> – Atmosphäre, 97 Vol.% N<sub>2</sub> / 3 Vol.% H<sub>2</sub>) mit je 50 ml Kultivierungsmedium + 5 ml Bakteriensuspension (MTBE-abbaufähige Mischkultur aus Vorversuch) + MTBE (Startkonzentration ca. 8 mg/l). Verschluss durch Schraubkappe mit Butylgummi-PTFE-Septum.

Nach Ausschleusen aus der Anaerobbox Zugabe unterschiedlicher, definierter Luftmengen (als O<sub>2</sub>-Quelle) mit Spritze und Kanüle (0,4 mm) durch das Septum der Einzelgefäße, wodurch O<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Gefäßen von 0,2 / 0,4 / 0,7 / 1,5 mg/l [bei T=20 °C] eingestellt wurden.

Eine weitere Versuchreihe wurde durch Öffnen der Verschlüsse komplett mit Raumluft überschichtet und im O<sub>2</sub>-gesättigten Bereich [8 mg/l] gestartet. Innerhalb jedes Sauerstoff-Konzentrationsbereiches wurden zwei parallele Versuche A und B gefahren, außerdem wurden weitere parallele Kontrollen für die Versuche mit O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,2 mg/l und 8 mg/l angesetzt und als abiotische Sterilkontrollen (Suffix "St", Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) als Biostatikum, Konzentration NaN<sub>3</sub> = 1 g/l) durchgeführt.

Lagerung der Versuche dunkel, temperiert bei 20°C, zum Ausschließen eines möglichen unkontrollierten O<sub>2</sub>-Zutritts durch undichter werdende Septen wurden die „semi-anaeroben“ Flaschen (mit O<sub>2</sub>-Konzentrationen < 2 mg/l) in Anaerobtopfen unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gelagert.

Kontrolle und Nachjustierung (sofern nötig) der O<sub>2</sub>-Konzentrationen erfolgte bei jeder Probenahme (Nachdotierung für verbrauchte O<sub>2</sub>-Mengen durch definierte Luftzugabe über Kanülen durch die Septen der Gefäße auf die gewünschten O<sub>2</sub>-Konzentrationen).

#### 2.4. Bodenproben

Die für die Versuche verwendeten Boden-/Sedimentproben stammten von 7 verschiedenen Standorten, wobei 4 davon über eine Vorkontamination mit MTBE verfügen (Proben KB, KK, KW, KR). Die anderen 3 Standorte (Proben UP, UH, UD) sind nicht MTBE belastet. Alle Proben wurden aus Wassergesättigten Bereichen (unterhalb des Grundwasserspiegels) entnommen. Vor Versuchsbeginn wurden die Sedimentproben bei 4°C im Kühlraum lichtgeschützt gelagert. Bodenart, Entnahmetiefe und Grundwasserspiegellage der Proben (alle Tiefenangaben in m unter Geländeoberkante): KB – Schluff feinsandig, 7-8 m (GW- 6,45 m); KK – Schluff tonig, 6-7 m, (GW – 6 m); KW – Grobsand kiesig, 5,3-5,9 m (GW – 4,2 m); KR – Feinsand schluffig, 3,5-5 m (GW – 3,2 m); UD – Kies grobsandig, 10-12 m (GW – 2,8 m); UH – Grobsand, 12-14 m, (GW - ca. 6 m); UP – Feinsand schluffig, 2,5-3,5 m (GW – 2,5 m)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Abbauversuche mit Aquifer-Sedimentproben

Über den Versuchszeitraum von 250 Tagen zeigten die Mikrokosmen mit Sedimentproben kontaminierter Standorte einen deutlichen Rückgang der MTBE-Konzentrationen. Dieser betrug bis zu 90% bezogen auf die Ausgangskonzentration.

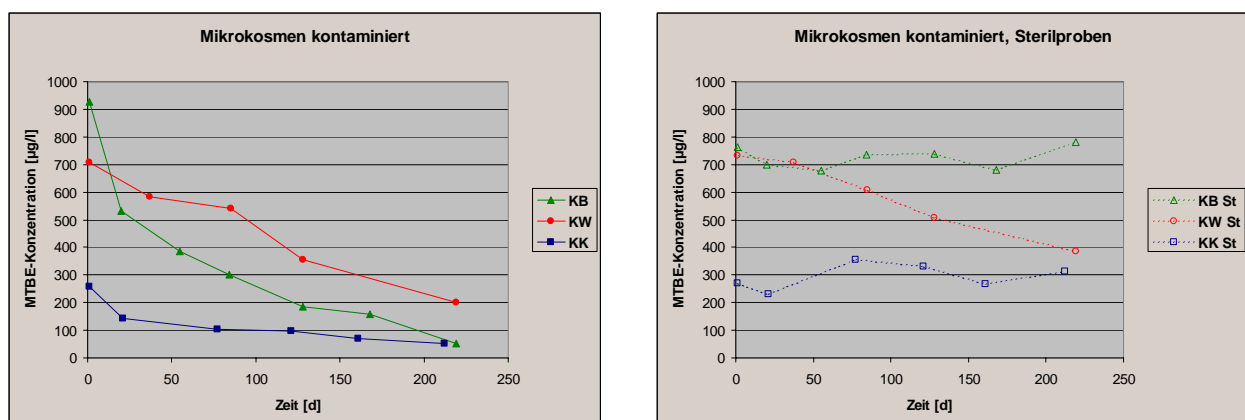


Abb. 1, Abb. 2: Konzentrationsverlauf MTBE in Mikrokosmen mit Aquifersedimenten MTBE-kontaminierter Standorte (KB, KW, KK; im linken Diagramm die aktiven Versuche, rechts die vergifteten Parallelansätze)

Ein vollständiger Abbau konnte in einer Sedimentprobe von einem Raffineriestandort (Probe KR) beobachtet werden. An diesem Standort sind MTBE-Konzentrationen im Grundwasser bis zu 50 mg/l vorhanden. Daher wurden die KR – Mikrokosmen mit höheren Startkonzentrationen (ca. 15 mg/l) begonnen als die anderen Versuche.

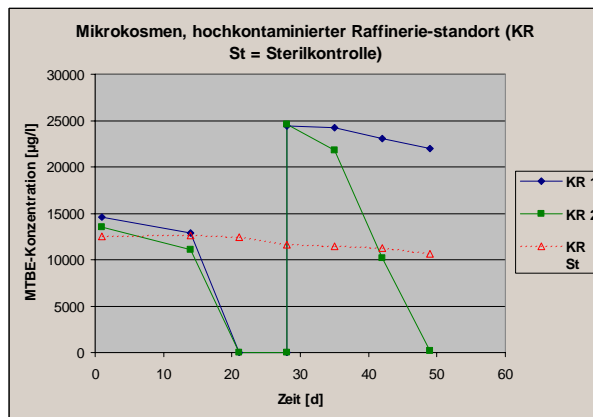


Abb. 3: Konzentrationsverlauf MTBE in Mikrokosmen mit Aquifersediment eines Raffineriestandes

Nach bereits 25 Tagen konnte in diesen Flaschen kein MTBE mehr nachgewiesen werden. Auch nachdosiertes MTBE (Konzentration von 25 mg/l) wurde nach weiteren 20 Tagen abgebaut (Mikrokosmos KR 2). In den aktiven, MTBE-abbauenden Versuchen fand keine Bildung oder Akkumulation der klassischen MTBE-Metabolite TBA (tertiär-Butylalkohol) und TBF (tertiär-Butylformiat) statt (Nachweisgrenze TBA – 50 µg/l, TBF – 150 µg/l).

Im Gegensatz dazu zeigten die Mikrokosmen mit Sedimentproben unkontaminierter Standorte keine Abbaukapazität für MTBE. Alle 3 Sedimentproben (UP, UH, UD) blieben während der Versuchsdauer von 250 Tagen inaktiv, die MTBE-Konzentrationen der zugehörigen Versuche bewegten sich zum Versuchsende im Bereich der Startwerte. Daraus kann geschlossen werden, dass MTBE-abbaufähige Biozönosen im Grundwasser nicht ubiquitär verbreitet sind.

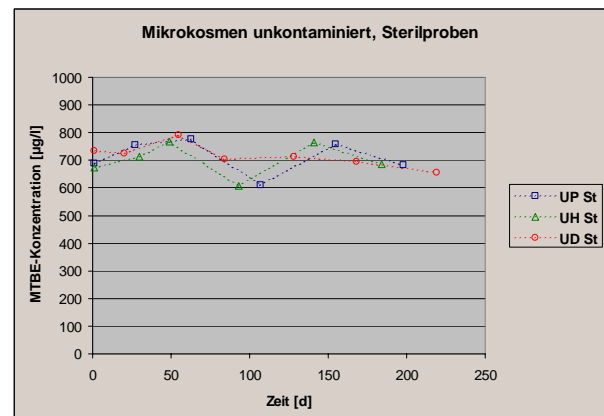
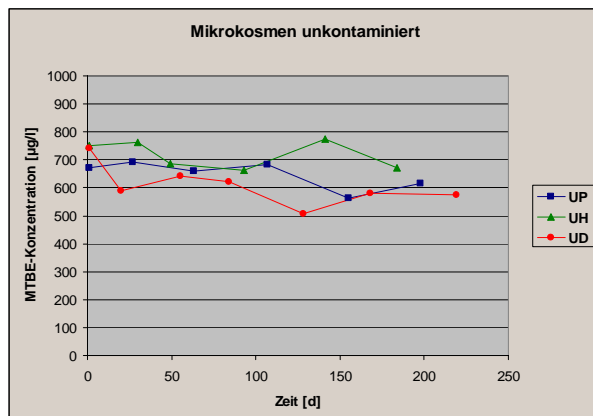


Abb. 4, Abb. 5: Konzentrationsverlauf MTBE in Mikrokosmen mit Aquifersedimenten unbelasteter Standorte (UP, UH, DU; im linken Diagramm die aktiven Versuche, rechts die vergifteten Parallelansätze)

### 3.2. Abbauversuche bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen

In weiteren Laborexperimenten wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Kinetik des biologischen Abbaus des Benzinadditivs MTBE untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse sind relevant für Gefährdungsabschätzungen von MTBE-Kontaminationen im Grundwasser und können Anhaltspunkte für reale Sanierungsfälle liefern.

Diese Versuche sollten zur Klärung der Frage beitragen, bei welchen Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff im Grundwasser noch ein signifikanter MTBE-Abbau möglich ist. Sie zielen

auf Informationsgewinn für Praxislösungen die sowohl in situ- Sanierungen von MTBE-Kontaminationen im Grundwasser (wie ENA -enhanced natural attenuation- Ansätze u.a. mit Einblasung von Luft / Sauerstoff, "Air - sparging"-, „Bioventing“- Systeme) als auch on site-Reinigungstechnologien (wie "pump and treat" – Systeme mit oberirdischen Bioreaktoren) einbeziehen.

Bei der Planung und dem Aufbau dieser Laborversuche bestand das besondere Problem in der Auswahl geeigneter Versuchgefäße, die einerseits das Merkmal tragen mussten, gasdicht zu sein, andererseits aber die Möglichkeit der erstmaligen Befüllung mit kleinen Sauerstoffmengen sowie der fortlaufenden Beprobung und Flüssigkeitsentnahme (für die GC-FID – Analytik) aufweisen mussten.

Ein erster Versuch, diese Experimente direkt in vercrimpten (mit Aluminium-Bördelkappe und Butylgummi / PTFE -Septum ) Headspace-Gefäßen (Volumen 22 ml) in hoher Parallelen-Stückzahl durchzuführen, scheiterte an der Luft- / bzw. Gasdurchlässigkeit der nur ca. 0,8 mm dünnen Septen. Um die Start- O<sub>2</sub>-Konzentration in den Gefäßen einzustellen, war es notwendig, nach dem Befüllen mit Mineralsalzmedium und dem Bakterien-Inokulum unter O<sub>2</sub>-freier Atmosphäre (in Anaerobbox) anschließend definierte O<sub>2</sub>-Mengen durch das Septum hinzuzugeben. Dabei musste das Septum mit einer Kanüle durchstoßen werden.

Es zeigte sich, dass die dünnen Butylgummi / PTFE – Septen nach dieser Prozedur nicht mehr dicht genug sind, um das Eindringen von Luftsauerstoff aus der Umgebung zu verhindern. Möglicherweise dringt dieser durch die winzige Perforation des Kanüleneinstichs (d = 0,4 mm) in das Gefäß ein, u.U. aber auch unabhängig von diesem Einstich direkt über Diffusion durch das nur ca. 0,8 mm starke Septenmaterial. Die Vorversuche zeigten einen Anstieg der O<sub>2</sub>-Konzentration von anfänglich 0,3 mg/l auf 1,2 mg/l im Headspace-Vial innerhalb von 6 Tagen. Eine Lagerung der Gefäße unter Schutzatmosphäre (O<sub>2</sub>-frei) hätte das Problem in die gegensätzliche Richtung verschoben und einen unerwünschten O<sub>2</sub>-Austrag aus den Versuchsgefäßen in die Umgebungsatmosphäre ermöglicht.

Daraufhin erfolgte ein Test, die initiale Sauerstofflieferung nicht über Luftzugabe über eine Kanüle (mit der unangenehmen Folge der Septenperforation) durchzuführen, sondern durch flüssige Zugabe in der Form von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) noch während der Befüllungsphase in der Anaerobbox. Die Ergebnisse erwiesen sich jedoch als nicht zufriedenstellend, die Umwandlung in messbaren molekularen Sauerstoff erfolgt bei dem kommerziell erhältlichen, stabilisierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu langsam, die Einstellung definierter Startkonzentrationen an Gelöst-Sauerstoff war auf diesem Wege nicht möglich.

Aus diesen Gründen fiel die Entscheidung für die Verwendung der unter 2.3. beschriebenen Gefäße, die mit deutlich dickeren Septen (Butylgummi-Dicke 5 mm) als die vorher erwähnten Headspace-Vials verschlossen wurden. Vortests ohne Bakterien-Zugabe zeigten hier das zuverlässige Verhindern von O<sub>2</sub>-Zutritten aus der Umgebungsluft und eine Stabilität der O<sub>2</sub>-Konzentrationen über mehrere Wochen auch nach mehreren Kanüleneinstichen.

Als Inokulum für die durchgeführten Versuche diente eine Bakterien-Mischkultur, die aus dem Aquifer-Sediment eines Raffinerie-Standortes angereichert wurde und über eine gute MTBE-Abbaufähigkeit verfügte. Je 5 ml Inokulum wurden mit 50 ml Mineralsalzmedium verdünnt (s. 2.2) und durch Zugabe einer MTBE-Stammlösung wurde die MTBE-Startkonzentration von ca. 8 mg/l in den Gefäßen eingestellt.

Die zu Versuchsbeginn in den Gefäßen eingestellten  $O_2$ -Konzentrationen in der wässrigen Phase [normiert auf 20 °C] betragen:

- 0,2 mg / l - Parallelflaschen 0,2 A / 0,2 B / 0,2 St („St“ = Sterilkontrolle)
- 0,4 mg / l - Parallelflaschen 0,4 A / 0,4 B
- 0,7 mg / l - Parallelflaschen 0,7 A / 0,7 B
- 1,5 mg / l - Parallelflaschen 1,5 A / 1,5 B
- 8,0 mg / l - Parallelflaschen 8 A / 8 B / 8 St („St“ = Sterilkontrolle)

Jede Einzel-Probenahme bestand aus der Messung der aktuellen  $O_2$ -Konzentration im Versuchsgefäß über das Einstechen des in einer Kanüle eingebetteten faseroptischen Microsensors TX3 und der anschließenden Entnahme von 2 ml wässriger Probe für die GC-FID-Analyse der MTBE-Konzentrationen mit Hilfe einer Kanüle und Spritze (Austausch des entnommenen Wasservolumens durch Zugabe von 2 ml Stickstoff mit Spritze/Kanüle). Zur Vermeidung von  $O_2$ -Limitation (durch biologische Zehrung) wurden die  $O_2$ -Konzentrationen in den Gefäßen nach jeder Probenahme, so fern nötig, durch definierte Luftzugabe über Kanüle / Spritze auf die gewünschten Werte nachjustiert. Auf diese Weise konnten die  $O_2$ -Konzentrationen über einen längeren Zeitraum in den gewünschten Bereichen gehalten werden (0,2 / 0,4 / 0,7 / 1,5 / 8 mg/l) Die mitgeführten abiotischen Sterilkontrollen ( 0,2 St; 8 St) dienten der Überwachung möglicher physikalischer  $O_2$ - Ein- oder Austräge in die Gefäße sowie zur Kontrolle der MTBE-Austräge durch die Probenahmepezedur.

Um den im ungünstigsten Falle möglichen unkontrollierten  $O_2$ -Zutritt durch ein undicht gewordenes Septum auszuschließen, wurden die „semi-anaeroben“ Flaschen (mit  $O_2$ -Konzentrationen < 1,5 mg/l) annähernd über die gesamte Versuchszeit in Anaerobtöpfen unter  $N_2$ -Atmosphäre gelagert.

Die durchgeführten Versuche zeigten deutlich die Abhängigkeit des biologischen MTBE-Abbaus von der Konzentration des Elektronenakzeptors  $O_2$  im Versuchssystem:

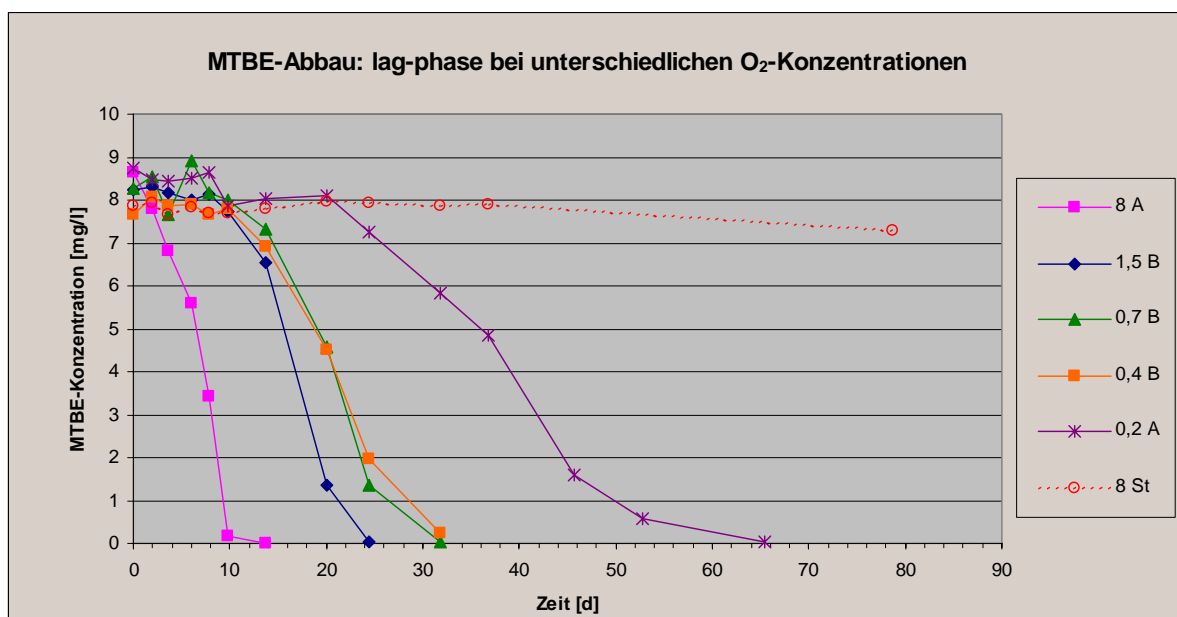
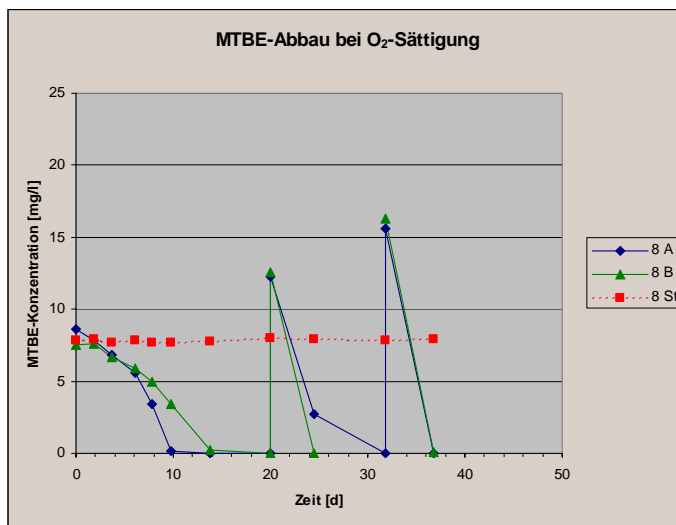


Abb. 6: Konzentrationsverlauf MTBE in Gefäßen mit Gelöst-Sauerstoffkonzentrationen von 0,2 bis 8 mg/l (Suffix „St“ = Sterilkontrollen)

Die Zeit bis zum vollständigen Abbau des in den Gefäßen vorhandenen MTBEs betrug bei voller Sauerstoffsättigung (8 mg/l O<sub>2</sub>, Versuche 8 A, 8 B) ca. 12 Tage, bei O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,2 mg/l (Versuch 0,2 A) jedoch 65 Tage.



In den folgenden Zyklen (nach einer Nachdosierung des verbrauchten MTBE) verkürzten sich diese Zeitspannen beträchtlich. So lag die Zeitdauer bis zum vollständigen MTBE-Abbau unter voller O<sub>2</sub>-Sättigung (Versuche 8 A, 8 B) bei der 3. MTBE-Nachdotierung schon unter 6 Tagen.

Abb. 7: Konzentrationsverlauf MTBE in den Versuchen 8 A, 8 B, 8 St

Im stark sauerstofflimitierten Versuch 0,2 A, der aus Zeitgründen nur einmalig mit MTBE nachdotiert wurde, zeichnete sich ein vollständiger MTBE-Abbau in diesem 2. Zyklus in weniger als 25 Tagen ab, sichtbar ist auch das Wegfallen der anfänglichen lag-Phase von ca. 20 Tagen:

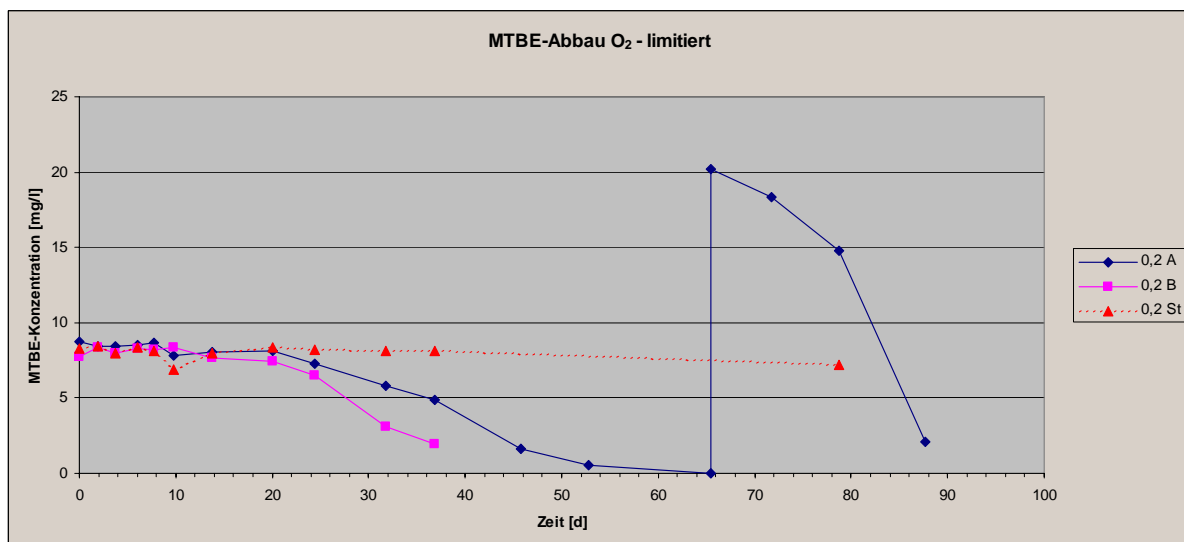


Abb. 8: Konzentrationsverlauf MTBE in den Versuchen 0,2 A / 0,2 B / 0,2 St (Suffix „St“ = Sterilkontrolle), Versuch 0,2 B wurde wegen undichtem Septum abgebrochen (kurzzeitige Lagerung zwischen Tag 6 und 8 außerhalb Anaerobtopf, dabei Anstieg der O<sub>2</sub>-Konz. von 0,2 auf 0,9 mg/l, deshalb Aussonderung)

Bei Beendigung der Versuche (78. Versuchstag) wurden zur Plausibilitätsprüfung in 3 Gefäßen die Dichten der Zellsuspensionen als indirektes Maß der Zellmasse und Bakterienzahl über die Messung der optischen Dichte (OD, Extinktion bei 600 nm Lichtwellenlänge) verglichen. Ausgewählt dafür wurden die aktiven Versuche 8 B sowie 0,7 B und als Vergleichswert die abiotische Sterilkontrolle 8 St. Zu Versuchbeginn erhielten alle Gefäße die gleiche Menge Inokulum (5 ml aus homogenisierter Mischkultur), so dass die Bakterienzahl am Anfang überall etwa gleich war.

Die Extinktion der Sterilkontrolle betrug am 78. Tag 0,031 ( $OD_{600}$ ), die des Versuchs 0,7 B betrug 0,071 ( $OD_{600}$ ), die  $OD_{600}$  des Versuchs 8 B lag bei 0,078. Zur Berechnung des Zellwachstums während der Versuchsdauer wurde die  $OD_{600}$ -Differenz der beiden aktiven Versuche 8 B und 0,7 B zur vergifteten, inaktiven Sterilkontrolle 8 St ermittelt, in welcher durch das Biostatikum Natrium-Azid kein Zellwachstum möglich war.

Die Zellzuwächse betragen bei Versuch 8 B 0,047 ( $OD_{600}$ ) und bei Versuch 0,7 B 0,04 ( $OD_{600}$ ). Über typische Werte der optischen Dichte bei Grundwasserbakterien und des Bereichs typischer Zellmassen derartiger Organismen lässt sich mit Hilfe des im Versuch quantifizierten MTBE-Verbrauchs der Biomassertrag bzw. die Zellausbeute (engl. „yield“) bezogen auf den Substratverbrauch (MTBE) abschätzen.

Für diese Berechnung wurde der an Grundwasserbakterien ermittelte Erfahrungswert einer  $OD_{600}$  von 0,001 bei einer Zellzahl von  $10^6$  Zellen pro ml Suspension verwendet. Typische Massen einzelner Zellen von Boden- und Grundwasserbakterien liegen z.B. bei  $1,7 \cdot 10^{-13}$  g DW pro Einzelzelle [DW = dry weight, Trockenmasse, (OGRAM ET AL, 1995)] oder  $3,5 \cdot 10^{-13}$  g DW pro Zelle (gemessen beim Boden- und Wasserbakterium *Acinetobacter calcoaceticus*, persönliche Mitteilung H. Lorbeer). Gerechnet wurde mit einem Durchschnittswert von  $2 \cdot 10^{-13}$  g DW pro Zelle der Mischkultur.

Versuch 8 B:

$$\begin{aligned} \text{Zellzuwachs} &= OD_{600}\text{-Zuwachs } 0,047 / 0,001 * 10^6 \text{ Zellen / ml} &&= 4,7 * 10^7 \text{ Zellen / ml.} \\ \text{Zellmassezuwachs} &= 4,7 * 10^7 \text{ Zellen} * 2 * 10^{-13} \text{ g DW / Zelle} &&= 9,4 * 10^{-6} \text{ g DW / ml.} \\ &&&= 9,4 \text{ mg DW / l} \end{aligned}$$

*Biologisch verbrauchtes MTBE in wässriger Phase:* = 54 mg / l  
(berücksichtigt wurden alle MTBE-Entnahmen aus der System über Probenahmen und Erhöhung des Volumens der Luftphase mit der Folge der Einstellung neuer Konzentrationsgleichgewichte gemäß HENRY-Verteilung sowie die MTBE-Zugaben während der Nachdotierungen)

$$\begin{aligned} \text{Biomassertrag} &= \text{Zellmassezuwachs} / \text{Substratverbrauch} &&= 9,4 \text{ mg DW / l} / 54 \text{ mg / l} \\ &&&= \underline{0,17 \text{ g DW / [g MTBE]}.} \end{aligned}$$

Versuch 0,7 B:

$$\begin{aligned} \text{Zellzuwachs} &= OD_{600}\text{-Zuwachs } 0,040 / 0,001 * 10^6 \text{ Zellen / ml} &&= 4,7 * 10^7 \text{ Zellen / ml.} \\ \text{Zellmassezuwachs} &= 4 * 10^7 \text{ Zellen} * 2 * 10^{-13} \text{ g DW / Zelle} &&= 8 * 10^{-6} \text{ g DW / ml.} \\ &&&= 8 \text{ mg DW / l} \end{aligned}$$

*Biologisch verbrauchtes MTBE in wässriger Phase:* = 70 mg / l

$$\begin{aligned} \text{Biomassertrag} &= \text{Zellmassezuwachs} / \text{Substratverbrauch} &&= 8 \text{ mg DW / l} / 70 \text{ mg / l} \\ &&&= \underline{0,11 \text{ g DW / [g MTBE]}.} \end{aligned}$$

Die auf diese Weise ermittelten substratspezifischen Biomasserträge von 0,17 bzw. 0,11 g DW / [g MTBE] stimmen gut mit den in Veröffentlichungen angegebenen Wertebereichen überein. So ermittelten FORTIN ET. AL. (2001) ebenfalls einen Biomassertrag (yield) von 0,11 g DW / [g MTBE] an einer Mischkultur, die an Proben eines MTBE kontaminierten Standortes gewonnen wurde. SALANITRO ET. AL. (1994) fanden für Ihre Mischkultur, die aus dem Belebtschlamm einer Industriekläranlage stammte, Werte zwischen 0,21 bis 0,28 g DW / [g MTBE].



Die im Experiment ermittelte Differenz im Biomassertrag zwischen dem sauerstoffgesättigten Versuch (8 B) und dem Versuch mit deutlich niedrigerer Sauerstoff-Konzentration (0,7 B) könnte auf eine effizientere Substratverwertung bei höheren Sauerstoffkonzentrationen hindeuten, jedoch wären zur Validierung dieser These Versuche mit regelmäßiger Messung der Biomasseentwicklung nötig.

Ähnlich wie auch von SALANITRO ET. AL. (1994) beobachtet, fiel in der hier untersuchten Mischkultur eine intensiv ablaufende Nitrifikation des im Kulturmedium enthaltenen Ammoniums zu Nitrat auf. Bemerkte wurde diese durch zusätzlichen Sauerstoffverbrauch in den Gefäßen, welcher stöchiometrisch nicht dem chemoorganotrophen Stoffwechsel mit MTBE als Elektronendonator zuzuordnen war. Spätere ionenchromatografische Messungen belegten den vollständigen Umsatz von  $\text{NH}_4^+$  aus dem Kulturmedium zu  $\text{NO}_3^-$  durch eine parallel abgelaufene chemolithotrophe Ammoniumoxidation (Nitrifikation).

### **Literatur:**

FORTIN, N. Y.; MORALES, M.; NAKAGAWA, Y.; FOCHT, D.; DESHUSSES, M. A.: (2001): „Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium“. *Environ. Microbiol.* (2001) 3(6), 407-416.

OGRAM, A.; SUN, W.; BROCKMAN, FJ.; FREDRICKSON, JK.: (1995) Isolation and characterization of RNA from low-biomass deep-subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, Feb 1995, Vol 61, 763-768.

SALANITRO, J. P.; DIAZ, L. A.; WILLIAMS, M. P.; WISNIEWSKI H. L.: (1994) „Isolation of a Bacterial Culture that Degrades Methyl t-Butyl Ether“. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994 July; 60(7): 2593-2596