

z 802

Berichte
Aus dem Institut für Meereskunde an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Nr. 214

DOI 10.3289/IFM_BER_214



UNTERSUCHUNGEN ZUM ABBAU
VON FREMDSTOFFEN
IN UMWELTRELEVANTEN KONZENTRATIONEN
DURCH MIKROBIELLE MISCHPOPULATIONEN
AUS DER WESTLICHEN OSTSEE

INVESTIGATIONS OF THE DEGRADATION
OF XENOBIOTICS
IN CONCENTRATION LEVELS RELEVANT TO THE
ENVIRONMENT BY MICROBIAL COMMUNITIES
FROM THE WESTERN BALTIC SEA

von

JOHANNA B. WESNIGK

Kopien dieser Arbeit können bezogen werden von:

Abt. Marine Mikrobiologie
Institut für Meereskunde
Düsternbrooker Weg 20
D 2300 Kiel 1, Germany

ISSN 0341 - 8561

Dissertation
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität Kiel, 1990

*Geheimnisvoll am lichten Tag
Läßt sich Natur des Schleiers nicht berauben,
Und was sie deinem Geist nicht offenbaren mag,
Das zwingst du ihr nicht ab mit Hebeln und mit Schrauben.*

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor G. Rheinheimer für die Überlassung des interessanten Themas sowie die freundliche und geduldige Anteilnahme an allen Problemen.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Meereskunde, die mir geholfen haben, insbesondere den Mitarbeitern der Abteilung Marine Mikrobiologie und der Mannschaft des Forschungsschiffs "Poseidon".

Namentlich möchte ich Regine Koppe und besonders Frau Boß für die praktische Unterstützung danken. Petra Krischker und Uwe Rabsch haben mir die Arbeit im Isotopenlabor ermöglicht und Herr Künnemann die HPLC-Untersuchung, herzlichen Dank. In der Hohenbergstraße waren Marion Köster, Rolf Schmaljohann und Ralf Vetter besonders hilfsbereite Kollegen, sodaß ich Ihnen an dieser Stelle danken möchte. Ohne Helena Galvao wären die Versuche mit Diffusionskammern nicht zustande gekommen, vielen Dank für die "Flagellaten-Beratung". Ich möchte mich auch bei Sören Ullrich für seine allgemeine Hilfe und bei Maike Langenfeld für die vielen "Fachsimeleien" bedanken.

Weitere hilfreiche, auswärtige Kollegen waren Manfred Höfle, Ingrid Brettar und Christiane Krambeck vom Max-Planck-Institut in Plön.

Für ihre Hilfe mit dem Lay-out danke ich Beate Knuth, und für die ausdauernden Korrekturvorlesungen gilt viel Dank meiner Mutter.

Besonders positiv auf den Verlauf meiner Dissertation hat sich ein dreimonatiger Aufenthalt an der Cornell-Universität, Ithaca, New York, in den USA ausgewirkt. Dafür möchte ich besonders Professor M. Alexander, Kate Scow und Rochelle Araujo danken. Für die Überlassung des MARQFIT-Kurvenanpassungsprogramms sei Dr. S. Simkins und Dr. S.K. Schmidt gedankt.

Der Aufenthalt in den USA und die Dissertation wurden im Rahmen eines Projekts des Umweltbundesamtes durchgeführt. In diesem Projekt wurden mit technischer Hilfe von E. Boß Untersuchungen des Fremdstoffabbaus im Elbeästuar, der Nordsee und der westlichen Ostsee durch Heike Gericke und mich durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	BESONDERHEITEN BEIM FREMDSTOFFABBAU IM MEER.....	1
1.2	BESONDERHEITEN DER OSTSEE	2
1.3	AKKLIMATION VON MIKROBIELLEN BIOZÖNOSEN	3
1.4	FAKTOREN, DIE DAS WACHSTUM BEEINFLUSSEN	5
1.5	ABBAU IM SEDIMENT	7
1.6	AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN	7
1.7	ZIEL DIESER ARBEIT	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND DOSIERUNGEN.....	11
2.2	PROBENENTNAHMEN	12
2.3	GESAMTBAKTERIENZAHLE UND MITTLERES ZELLVOLUMEN	12
2.4	FLAGELLATENZÄHLUNG	16
2.5	SAPROPHYTENZAHLE	16
2.6	ANZAHL DER 2- UND 4-NITROPHENOLABBAUER AUF NITROPHENOL-HALTIGEM AGAR.....	17
2.7	VERSUCHE MIT REINKULTUREN.....	17
2.8	INKUBATIONEN	17
2.9	PHOTOMETRIE.....	18
2.10	MESSUNG DES PARTIKULÄREN ORGANISCHEN KOHLEN- STOFFGEHALTS (POC), DES PARTIKULÄREN ORGANISCHEN STICKSTOFFGEHALTS (PON) UND DES TROCKENGEWICHTS VON SEDIMENTEN	19
2.11	BESTIMMUNG VON TEMPERATUR, SALZGEHALT UND NÄHRSALEN	19
2.12	VERSUCHE MIT ¹⁴ C-MARKIERTEN VERBINDUNGEN.....	19
2.12.1	VERATMUNG ZU KOHLENDIOXID	20
2.12.2	INKORPORATION IN DIE BIOMASSE	21
2.12.3	MESSUNG VON ABBAURATEN.....	21
2.12.4	BESTIMMUNG DES ABIOTISCHEN ABBAUS UND DES NICHT ABGEBAUTEN ANTEILS	21
2.13	HPLC-ANALYTIK ZUR ERFASSUNG VON VERUNREINIGUNGEN DES RADIOAKTIV MARKIERTEN 4-NITROPHENOLS	22
2.14	VERSUCHE ZUR AKKLIMATION VON MISCHKULTUREN	24
2.15	QUANTIFIZIERUNG DER ABBAUER MIT EINER MPN-METHODEN	25
2.16	VERSUCHE MIT SEDIMENTSUSPENSIONEN.....	26
2.17	VERSUCHE MIT BIOMETERFLASCHEN.....	27
2.18	VERSUCHE MIT DIFFUSIONSKAMMERN	28
2.19	DATENAUSWERTUNG MIT EINEM KURVENANPASSUNGS- PROGRAMM	30

3.	ERGEBNISSE	31
3.1	VORVERSUCHE ZUM ABBAU ORGANISCHER CHEMIKALIEN IN BRACK- UND SALZWASSER.....	31
3.1.1	EINFLUSS AUF GESAMTBAKTERIEN- UND SAPROPHYTENZAHL.....	32
3.1.2	ANREICHERUNG VON ABBAUERN AUF NITROPHENOL-HALTIGEM AGAR.....	34
3.1.3	ABBAU VON 2- UND 4-NP DURCH REINKULTUREN.....	35
3.1.4	ERGEBNIS DER HPLC.....	36
3.2	ABBAU VON 4-NITROPHENOL.....	38
3.2.1	ABBAU BEI NIEDRIGEN TEMPERATUREN.....	39
3.2.2	ABBAU BEI UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN.....	40
3.2.2.1	ENTWICKLUNG DER 4-NP ABBAUER.....	43
3.2.3	EINFLUSS EINER VORAKKLIMATION.....	44
3.2.4	SIMULATIONSVERSUCH ZUM 4-NITROPHENOL-ABBAU.....	45
3.2.4.1	EINFLUSS DES WASSERKÖRPERS.....	46
3.2.4.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR UND EINFLUSS EINER NÄHRSAZZUGABE.....	49
3.2.4.3	REAKTION DER BAKTERIEN- UND FLAGELLATENPOPULATION.....	49
3.2.5	VERSUCHE ZUR VERKÜRZUNG DER AKKLIMATIONSPHASE.....	54
3.2.5.1	EINFLUSS DES ZUSATZES VON NÄHRSAZZEN ODER DOC.....	54
3.2.5.2	ABBAU NACH ZUSATZ VON CYCLOHEXIMID.....	55
3.3	VORVERSUCHE ZUM ABBAU VERSCHIEDENER SUBSTANZEN.....	55
3.3.1	EDTA UND DIETHYLENGLYCOL.....	55
3.3.2	PHENOL UND NAPHTHALIN.....	57
3.3.3	VORVERSUCHE IN BIOMETERFLASCHEN MIT HOHEM SEDIMENTANTEIL.....	58
3.4	VERGLEICH DES ABBAUS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN IN WASSER- UND SEDIMENTPROBEN AUS DER WESTLICHEN OSTSEE.....	59
3.4.1	ABBAURATEN VON PHENOL UND NAPHTHALIN.....	60
3.4.2	EDTA.....	65
3.4.3	DIETHYLENGLYCOL.....	66
3.4.4	THIOUREA.....	67
3.4.5	ABBAU VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN AN 4-NITROPHENOL..	69
3.4.6	VERGLEICH DES ABBAUS IN BIOMETERFLASCHEN UND SUSPENSIONEN.....	77
3.4.7	QUANTIFIZIERUNG DER ABBAUER MIT EINER MPN-METHODE.....	78
3.4.8	2-NITROPHENOL.....	80
3.4.9	ENTWICKLUNG DER ZAHL DER ABBAUER IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION AN ZUGESETZTEM SUBSTRAT.....	82
3.5	ABBAU VON 4-NITROPHENOL IN SITU DURCH EINE REINKULTUR.....	84
3.6	ÜBERLEBEN UND WACHSTUM EINER AN DEN ABBAU VON 4-NP ANGEPAßTEN UND DANN IN SITU GEHÄLTERTEN MISCHKULTUR.....	86

4.	DISKUSSION	87
4.1	ABBAU VON 4-NITROPHENOL.....	87
4.1.1	VORVERSUCHE	87
4.1.2	EINFLUSS DER KONZENTRATION AUF DEN ABBAU.....	88
4.1.3	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN ABBAU.....	91
4.1.4	ROLLE DER BIOZÖNOSE.....	91
4.1.4.1	POPULATIONSVERSCHIEBUNGEN	92
4.1.4.2	WACHSTUM DER ABBAUER.....	93
4.1.5	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN KONZENTRATION, AKKLIMATION UND WACHSTUM.....	94
4.1.6	EINFLUSS BIOTISCHER UND ABIOTISCHER FAKTOREN AUF DEN 4-NP ABBAU DURCH AKKLIMATISIERTE BIOZÖNOSEN.....	96
4.1.6.1	ABBAURATEN, -KINETIK UND AUSMASS DER MINERALISIERUNG	99
4.1.6.2	EINFLUSS AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG DER BIOZÖNOSE	100
4.1.7	EINFLUSS BIOTISCHER UND ABIOTISCHER FAKTOREN AUF DIE AKKLIMATION VON NATÜRLICHEN BIOZÖNOSEN.....	102
4.1.7.1	EINFLUSS VON NÄHRISALZEN	103
4.1.7.2	TEMPERATUR-ABHÄNGIGKEIT UND KONZENTRATIONS- EINFLUSS.....	103
4.1.7.3	FÖRDERUNG DURCH HEMMUNG DES GRAZING	104
4.2	VERGLEICH DES ABBAUS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN IN NIEDRIGEN KONZENTRATIONEN.....	104
4.2.1	PHENOL	105
4.2.2	NAPHTHALIN.....	106
4.2.3	EDTA.....	107
4.2.4	DIETHYLENGLYCOL	108
4.2.5	THIOUREA	109
4.2.6	2-NITROPHENOL.....	111
4.3	ABBAU IM SEDIMENT	113
4.3.1	ANDERE C-QUELLEN.....	115
4.3.2	EINFLUSS DER MIKROBIELLEN BIOZÖNOSE IN SEDIMENTEN AUF DEN ABBAU.....	116
4.4	AKKLIMATION UND ABBAU IN DER NATUR	117
5.	FAZIT	120
6.	ZUSAMMENFASSUNG	121
7	LITERATUR	123

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Substanzen:

DEG	Diethylenglycol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
2-NP	2-Nitrophenol
4-NP	4-Nitrophenol
NAP	Naphthalin
NTA	Nitrilotriacetat
THIO	Thioharnstoff
TBA	Tetrabutylammoniumhydroxid
Tris	Trihydroxyaminomethan

Sonstiges:

Akp	Akklimationsperiode
BW	Ansatz mit Brackwasser
BBM	Bakterielle Biomasse
C	Kohlenstoff
CPM	Counts per minute
CY	Ansatz mit Cycloheximid
d	Tage
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff
DPM	Decays per minute
FF	Ansatz mit frischem, unbehandeltem Fördewasser
FZ	Flagellatenzahl
GBZ	Gesamtbakterienzahl
HPLC	High performance liquid chromatography
MPN	Most Probable Number Methode
MZV	Mittleres Zellvolumen
N	Stickstoff
NA	Nicht anwendbar
ND	Nicht durchgeführt
NV	Nicht vorhanden
P.	Parallelen
POC	Partikulärer organischer Kohlenstoff
PON	Partikulärer organischer Stickstoff
ST	Ansatz mit sterilfiltriertem Fördewasser
Stdabw.	Standardabweichung
SZ	Saprophytenzahl
TG	Trockengewicht
UL	Uniformely labelled

LEBENS LAUF

Am 29. April 1960 wurde ich, Johanna Barbara Wesnigk, in Lübeck als zweites Kind der Studienrätin Käte Wesnigk, geb. Lindemann und des Gartenarchitekts Christian Wesnigk geboren.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit. Mein Heimatort ist Kiel.

Von 1966 bis 1969 besuchte ich die Grundschule in Bad Schwartau und anschließend das staatliche Gymnasium Bad Schwartau. Dort erwarb ich 1978 das Abitur im neusprachlichen Zweig.

1979 nahm ich das Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen auf bis zum Bestehen des Vordiploms im Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Botanik, allgemeine und physikalische Chemie im Sommersemester 1981. Vom Wintersemester 1981 bis 1986 studierte ich an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel. 1985 bestand ich die Diplomprüfungen in Mikrobiologie, Zoologie, Biochemie und Lebensmittelkunde. Nach Durchführung der Diplomarbeit unter Prof. Dr. G. Rheinheimer in mariner Mikrobiologie am Institut für Meereskunde beendete ich das Diplom-Studium im Mai 1986.

Ab Januar 1987 bis Ende März 1987 begann ich die Promotion als Stipendiatin der Kieler Universität im Rahmen der Promotionsförderung in derselben Abteilung bei Prof. Dr. G. Rheinheimer. Als Hauptfach wählte ich Mikrobiologie, als Nebenfächer Meereschemie und Toxikologie.

Von April 1987 bis zum März 1990 war ich als wissenschaftliche Angestellte in einem Projekt des Umweltbundesamtes über die Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Chemikalien im umweltrelevanten Konzentrationsbereich beschäftigt.

1. EINLEITUNG

Ständig gelangen Chemikalien anthropogenen Ursprungs in die Atmosphäre, in den Boden und im Endeffekt in die Gewässer. Über ihren weiteren Verbleib ist nur in Einzelfällen etwas bekannt, wie z.B. beim DDT und den PCBs, die sich über die Nahrungskette in Organismen anreichern und kaum mikrobiell abbaubar sind. Es ist nun fraglich, ob all die anderen Chemikalien nur deswegen nicht gefunden werden, weil man nicht nach ihnen sucht, oder ob sie durch Abbauprozesse, z.B. von Mikroorganismen, zu Kohlendioxid und Wasser umgesetzt werden. Die Hoffnung, daß die Fremdstoffe in der Natur mineralisiert werden, resultiert aus positiven Laborversuchen zum mikrobiellen Abbau. In diesen Tests werden häufig die Fremdstoffe als Einzelsubstanzen und in hohen Konzentrationen eingesetzt. Ferner werden geeignete Reinkulturen oder spezialisierte Mischkulturen, z.B. aus Klärwerken, als Inoculum eingesetzt. Derartige Untersuchungen können zu einer Überschätzung der Abbaukapazitäten der Bakterienlebensgemeinschaften in natürlichen Biotopen führen.

Das Hauptdepot für Fremdstoffe, die in Klärwerken und Flüssen nicht abgebaut werden, sind die Küstenmeere und ihre Sedimente. Zusätzlich gelangt auch ein beträchtlicher Anteil an flüchtigen Substanzen über die Atmosphäre und durch trockene und feuchte Deposition ins Meer. Z.B. betragen die flüchtigen organischen Emissionen in der BRD 1986 2.5 Mio t und lagen damit mengenmäßig zwischen Stick- und Schwefeldioxyden (4.Immissionsschutzbericht der Bundesregierung 1988). Auch direkte Einträge durch Pestizideinsatz in der Landwirtschaft sowie Unfälle in Industriewerken und Schiffskollisionen müssen als Quellen für einen Fremdstoffeintrag angesehen werden.

1.1 BESONDERHEITEN BEIM FREMDSTOFFABBAU IM MEER

Wenn das Meer als Vorfluter für ungeklärte und geklärte Abwässer benutzt wird, ergeben sich folgende Probleme:

- Durch die schnelle Verdünnung der abzubauenen Substanzen werden die Konzentrationen verringert, dadurch ist oft für die im Abwasser enthaltenen Abbauer kein Wachstum mehr möglich.
- Die Affinität der mitgeführten Enzyme ist nicht auf niedrige Konzentrationen ausgelegt, so daß kein optimaler Umsatz erfolgt
- Die in Meeresgebieten vorherrschende Salinität von im Durchschnitt 15 ‰ in der westlichen Ostsee und 35 ‰ in der Nordsee hemmt das Wachstum viele Süßwasserbakterien.

In Meeresgebieten ist ein Großteil der vorhandenen Bakterien oligotroph, d.h. sie können nicht mit den herkömmlichen Kultivierungsmethoden erfaßt werden. Oligotrophe Bakterien zeichnen sich durch Enzyme mit hohen Affinitäten und geringen Substratspezifitäten aus. Damit können sie auch geringste Substratkonzentrationen nutzen. Durch hohe Konzentrationen wird ihr Transportsystem allerdings gehemmt (FLETCHER & MARSHALL 1982). Um dieses Potential auszunutzen, sollte mit natürlichen Mischpopulationen und niedrigen Fremdstoffkonzentrationen gearbeitet werden, wenn der Abbau von Chemikalien im Meer untersucht wird.

1.2 BESONDERHEITEN DER OSTSEE

Die Ostsee ist ein Nebenmeer, das teilweise von dicht besiedeltem Land umgeben ist. Der allochthone Eintrag ist groß, denn sie dient als Vorfluter für Klärwerke und als Medium für einen intensiven Schiffsverkehr. Einträge über die Atmosphäre und durch Flüsse, die sich vor allem in den Sedimenten anreichern, sind ebenfalls erheblich (MADSEN & LARSEN 1986). Z.B. konnten Halkiewicz et al. (1987) in marinen Aerosolen aus der südlichen Ostsee viele z.T. carcinogene polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe in beträchtlichen Mengen quantifizieren.

Eine Besonderheit der Ostsee ist die in der Regel geringere Salinität als in den Weltmeeren, die die Diversität von Flora und Fauna stark einschränkt; es konnten aber halophile Bakterien isoliert werden, die in Brackwasser am Besten wachsen (RHEINHEIMER 1981). Aus der stark schwankenden Salinität, die durch den windabhängigen Einstrom von Nordseewasser gesteuert wird, kann eine Schichtung des Wasserkörpers resultieren (MAGAARD & RHEINHEIMER 1974). Sie fördert eine Eutrophierung und als Folge davon eine starke Sauerstoffzehrung im Sediment und in tiefen salzreicheren Zonen. Der allochthone Beitrag zur Eutrophierung ist eine inzwischen wissenschaftlich anerkannte Tatsache (BMB-SYMPOSIUM 1989).

Bei einem Vergleich der Cadmium-Belastung zahlreicher küstennaher Wasserproben aus weltweit verteilten Meeresgebieten zeigte die Ostsee mit 16 - 58 ng/l Oberflächenwasser die höchste Belastungen an (COSSA 1988). Bei Untersuchung des weichen Muschelgewebes von *Mytilus edulis* Proben wurde mit 2.7 µg Cadmium pro g TG (Bereich 0.7 - 12.9) der zweithöchste Wert ermittelt (ebd.). Über die Belastung mit organischen Substanzen ist wenig bekannt, da zuwenig Verbindungen analysiert werden, die Öl-Konzentrationen liegen z.T. bereits nahe an der Toxizitätsgrenze (EHRHARDT 1981). Die Daten beschränken sich hauptsächlich auf Kohlenwasserstoffe, PCB's, DDT und einige wenige chlorierte Verbindungen (GRANBY 1987, OLSSON & REUTERGARDH 1986).

1.3 AKKLIMATION VON MIKROBIELLEN BIOZÖNOSEN

Die Akklimation einer mikrobiellen Biozönose ist definiert als die Entwicklung der Fähigkeit zum schnellen Abbau einer Substanz (WIGGINS 1987). Synonym wird auch der Begriff Adaptation in der Literatur benutzt, der aber in der Regel auf Veränderungen in der Physiologie von Organismen bezogen wird. Um einen Fachausdruck für die komplexen Veränderungen einer mikrobiellen Biozönose nach Exposition an einen Fremdstoff und dessen Abbau zu haben, wurde in der vorliegenden Arbeit der Begriff Akklimation vorgezogen.

Die Akklimationsperiode (Akp) stellt die Zeit dar, die zwischen dem Zusatz einer Substanz zu einem System und der Detektion ihrer Mineralisierung vergeht. Diese Periode kann Stunden bis Tage dauern und ist sowohl bei aerobem wie auch anaerobem Abbau festgestellt worden. (SPAIN et al. 1980, WIGGINS et al. 1987, LINKFIELD et al. 1989). Akklimationsperioden sind beim Abbau der verschiedensten Verbindungen beobachtet worden, wie z.B. bei Chlorphenolen (KUIPER & HANSTVEIT 1984), Aminosäuren (HOLLIBAUGH 1979) und Nitrilotriacetat (PFAENDER et al. 1985), um einige Beispiele aus dem marinen Bereich zu zitieren. Schon in Klärwerken treten Akklimationsperioden auf, wenn die Bakterien nicht auf die entsprechende Substanz oder ihre Konzentration eingestellt sind, sodaß ein Abbau bei kurzer Durchflußzeit nicht gewährleistet ist (PAGGA et al. 1982, WIGGINS & ALEXANDER 1988a). Auf diese Weise gelangen Fremdstoffe in die Natur, wo sie akkumulieren und toxisch wirken können.

Es gibt viele Hypothesen darüber, welche Faktoren für das Auftreten und die Dauer einer Akklimationsperiode wichtig sind. Mit Sicherheit spielt die eingesetzte Chemikalie eine Rolle, denn ihre chemisch-physikalischen Eigenschaften bestimmen letztlich, ob ein Abbau gar nicht, sehr schnell oder erst nach Induktion spezifischer Enzyme möglich ist. Die Induktion von nicht konstitutiven Enzymen wird von vielen Autoren (SPAIN et al. 1980, HOLLIBAUGH 1979) als mögliche Erklärung für eine Akklimationsperiode genannt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Konzentration des eingesetzten Fremdstoffes für die erfolgreiche Enzyminduktion (BUTTON & ROBERTSON 1985). Diese Autoren zeigten, daß die Induktion eines Toluol-Abbaus in Meerwasser bei Konzentrationen ab $7.5 \mu\text{g/l}$ circa 50 h dauerte. Bei der Bestimmung einer Schwellenkonzentration für die Induktion ermittelten sie eine Halbsättigungskonstante von $1.9 \mu\text{g/l}$ für einen Toluol-Abbau. Andere Autoren fanden Induktionsphasen von weniger als 4 h bis zu 2 d Dauer bei Reinkulturen, die 4-Nitrophenol abbauen konnten (ZEYER et al. 1986, WIGGINS et al. 1987). Diese kurzen Zeiträume zeigen, daß eine Akklimationsperiode von mehreren Tagen nicht durch Enzyminduktion allein erklärt werden kann.

Ein anderer möglicher Grund für das Auftreten von Akklimationsperioden kann sein, daß die Fähigkeit zum Abbau in der Biozönose nicht vorhanden ist und daher erst durch Mutation oder Gen-Transfer entstehen muß. Zusätzlich muß dieser neue Organismus dann zu einer Populationsgröße heranwachsen, die einen nachweisbaren Abbau hervorruft (WIGGINS 1987). So stellte WYNDHAM (1986) die Entwicklung einer Mutante während der kontinuierlichen Inkubation von Flußwasser fest, die Anilin schneller und bei höherer Konzentration abbaute, als der Elternstamm. Beide Phänotypen wurden während einer Akklimationsperiode selektiert. SCHMIDT et al. (1983) beobachteten, daß in einer definierten Mischkultur während der Akklimation an Chlorphenole durch Gen-Transfer ein neuer Phänotyp entstand.

Oft ist eine Akklimationsperiode aber durch ein reproduzierbares Zeitintervall gekennzeichnet, das bei mehreren Parallelen und in verschiedenen Versuchen immer wieder beobachtet werden kann (SPAIN et al. 1984). In diesen Fällen ist sicher keine Mutation beteiligt, sondern die abbauenden Bakterien sind schon in sehr geringer Zahl in der untersuchten Probe vorhanden. Außerdem ist es sehr schwierig, zwischen dem Heranwachsen eines sehr kleinen, schon von Anfang an vorhandenen Teils der Biozönose und dem Auftreten einer Mutation zu unterscheiden. Eine Voraussetzung, um Mutationen z.B. mit dem Luria-Delbrück-Test in flüssigem Medium nachzuweisen, ist aber, daß am Anfang des Tests die gesuchte Eigenschaft noch nicht vorhanden sein darf (STANIER et al. 1976). Ob diese Bedingung erfüllt war, wurde in den meisten Fällen nicht untersucht. Zusätzlich gibt es eine Nachweisgrenze, unterhalb derer ein spezielles Bakterium in einer Matrix von vielen anderen Bakterien nicht mehr nachweisbar sein kann.

Die Diauxie bietet eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Akklimationsperioden. Diauxie ist ein zweiphasiges mikrobielles Wachstum durch sequentielle Verwertung von zwei Substraten (STANIER et al. 1976). Es ist denkbar, daß zuerst leichter abbaubare natürlich vorkommende Verbindungen abgebaut werden, bevor Fremdstoffe angegriffen werden. Allerdings setzt der Abbau in Sedimenten und geklärtem Abwasser oft schneller ein als in weniger nährstoffreichem Wasser (SPAIN et al. 1984, NYHOLM et al. 1984). Zudem ist bei niedrigen eingesetzten Konzentrationen eine simultane Nutzung mehrerer Substrate festgestellt worden (LAW & BUTTON 1977, SCHMIDT & ALEXANDER 1985).

Eine wichtige Rolle zur Erklärung von Akklimationsperioden kommt mit Sicherheit der Zusammensetzung der jeweiligen Biozönose zu, die in der untersuchten Probe am Anfang vorhanden ist. Wenn die Anzahl der zum Abbau befähigten Bakterien klein und also Wachstum für eine quantitative Mineralisierung nötig ist, haben das Wachstum beeinflussende Faktoren eine wichtige Funktion für das Einsetzen und die Geschwindigkeit des Abbaus.

Spain et al. (1980,1984) konnten zeigen, daß die Zahl der Abbauer während der Akklimationsperiode an Nitrophenol um mehrere Größenordnungen zunahm. Nachdem Biozönosen aus Flußsedimenten an mindestens 60 µg/l akklimatisiert waren, verlief der Abbau einer zweiten Fremdstoffzugabe sehr viel schneller. Aelion et al. (1987) konnten 4-NP Abbauer erst nach erfolgter Akklimation mit einer MPN-Methode nachweisen.

1.4 FAKTOREN, DIE DAS WACHSTUM BEEINFLUSSEN

In einem ungestörten System sollte exponentielles Wachstum von mineralisierenden Bakterien bis zur Substraterschöpfung möglich sein. Als Folge wäre keine Akklimationsperiode festzustellen, sondern nur eine Lag-Phase mit geringerem Umsatz am Anfang, da die kleine Population das Substrat noch nicht quantitativ umsetzen kann. Mit empfindlichen Meßmethoden kann in dieser Phase bereits ein Umsatz des Fremdstoffs gemessen werden.

Eine Störung des Abbaus wird durch toxische Konzentrationen des zugesetzten Fremdstoffes hervorgerufen. So konnte Wyndham (1986) die Selektion einer Anilin abbauenden Mutante feststellen, die bei höheren Anilinkonzentrationen den Elternstamm ersetzte, der diese Konzentration nicht umsetzte. Nyholm et al. (1984) fanden eine Verlängerung der Akklimationsperiode beim Abbau von 4-Nitrophenol, wenn die Konzentration beim Abbau in geklärtem Wasser von 1 auf 40 mg/l gesteigert wurde.

Auf der anderen Seite kann auch eine sehr niedrige Konzentration den Abbau negativ beeinflussen. So erwies es sich als schwierig, den Abbau von Schadstoffen bei niedrigen Konzentrationen aus Versuchen mit höheren, leichter chemisch erfaßbaren Konzentrationen zu extrapolieren. Es konnte ein Schwellenwert aufgezeigt werden, unter dem bei einigen Chemikalien keine Mineralisierung zu verzeichnen war (BOETHLING & ALEXANDER 1979, ZEHNDER & SCHRAA 1988), bei anderen war der Abbau bei Konzentrationen im Mikrogramm-Bereich deutlich verlangsamt (HOOVER et al.1986). Ein möglicher Grund für die Änderung der Abbaukinetik bei sehr niedrigen Konzentrationen (SUBBA-RAO et al.1982) kann das fehlende Wachstum der Bakterien auf dem zugesetzten Substrat sein.

Gerade der Abbau von Fremdstoffen in Konzentrationen im Mikrogramm-Bereich spielt im Meer eine bedeutende Rolle. Hier liegen durch die starke Verdünnung nur selten Einzelstoffe in höheren Konzentrationen vor und oligotrophe Bakterien bilden einen beträchtlichen Anteil der mikrobiellen Biozönose.

In diesem Zusammenhang ist besonders darauf hinzuweisen, daß einige Autoren eine Schwellenkonzentration gefunden haben, unterhalb derer keine Akklimation erfolgt (SPAIN & VAN VELD 1983, AELION et al.1987)

Es wäre auch eine Verlangsamung des Wachstums durch fehlende anorganische Nährstoffe denkbar. So vermuteten Kuiper & Hanstveit (1984), daß die niedrigen Konzentrationen an Phosphat und Nitrat in Meerwasser ($<0.1 \mu\text{M}$) das Wachstum von Bakterien limitieren kann, die Chlorphenole abbauen. Bruns (1986) stellte einen stimulierenden Effekt durch die Zugabe von Spurenelementen auf den Naphthalin-Abbau in Meerwasser fest, während N- und P-Salze die Toxizität des Naphthalins erhöhten.

Beim Fremdstoff-Abbau in niedrigen Konzentrationen ist anzunehmen, daß andere Substrate für ein Wachstum genutzt werden. Schmidt & Alexander (1985) konnten eine simultane Nutzung des vorhandenen DOC während der Mineralisierung von Phenol und Anilin feststellen, wenn die Konzentration 2 - 3 $\mu\text{g/l}$ betrug.

Eine Verkürzung der Akklimationsperiode bei 2,4-Dichlorphenoxyacetat durch Zugabe von chemisch ähnlichen Verbindungen wurde von Wang et al. (1984) beschrieben. Diese Autoren fanden keine Stimulierung durch die Zugabe von Hefeextrakt, die auch bei Spain et al. (1980) keine Verkürzung der Akklimationsperiode an 4-Nitrophenol bewirkte. Horowitz et al. (1983) konnten zeigen, daß in anaeroben Sedimenten, die an Bromphenole akklimatisiert waren, Chlorphenole schneller abgebaut werden konnten. Beim anaeroben Abbau von Phenol war dagegen ein inhibierender Effekt von Cresolen und vor allem Ethylphenolen zu beobachten (WANG et al. 1988).

Als letzter und gerade in Ökosystemen relevanter Punkt soll noch der Wegfraß von Bakterien durch Protozoen angeführt werden, der ein Wachstum und damit den effektiven Abbau von Fremdstoffen verlangsamen kann. In Klärwerken dominieren besonders Ciliaten, die sich überwiegend von nicht angehefteten Bakterien ernähren und damit die Qualität des abfließenden Wassers verbessern (CURDS 1982). Für marine Systeme konnte von mehreren Autoren gezeigt werden, daß die bakterielle Biozönose durch Ciliaten oder vor allem kleine heterotrophe Flagellaten kontrolliert wird (RASSOULZADEGAN & SHELDON 1986, GONZALEZ et al. 1990).

Protozoen scheiden Phosphat und Exsudate aus, die ein Bakterienwachstum stimulieren, und damit z.B. bei auxotrophen Stämmen einen Abbau von Schadstoffen erst ermöglichen (JOHANNES 1965, HUANG et al. 1981). Außerdem werden die Bakterien durch den Wegfraß ständig in einer aktiven Wachstumsphase gehalten, sodaß ein vollständigerer Abbau organischer Substanz möglich ist (JOHANNES 1965, KOSFELD 1989).

Bei Huang et al. (1981) war die Akklimationsperiode durch Predation um einen Tag verlängert. In einem Versuch mit Abwasser (WIGGINS & ALEXANDER 1988b) wurde die Akklimationsperiode beim 4-NP Abbau durch Hemmung des Grazing verkürzt oder der der Abbau setzte ganz ohne Verzögerung ein, und die Zahl der Abbauer nahm zu. Die Mineralisierung war aber weniger vollständig, nachdem die Protozoenaktivität in Abwasser inhibiert wurde.

1.5 ABBAU IM SEDIMENT

Als Folge eines verzögerten Abbaus im Wasser erhält das Sediment eine wichtige Funktion beim Abbau auch gut wasserlöslicher Verbindungen. Mehrere Autoren konnten zeigen, daß der Abbau diverser Schadstoffe in Systemen mit Sediment im Vergleich zu reinen Wasserproben besser oder überhaupt erst erfolgte (LEE & RYAN 1979, SPAIN et al.1984). Die letztgenannten Autoren zeigten, daß die Akklimationsperiode für 4-NP im System ohne Sediment dreimal länger dauerte. Sedimente enthalten mit ca 10^9 Bakterien/g Trockengewicht ein großes Potential an verschiedenen Stoffwechseltypen, die die diversen Mikro-Nischen nutzen oder nur überdauern bis für sie optimale Bedingungen entstehen.

Die Verweildauer von Substanzen ist durch verminderte Diffusion und Verdünnung im Porenwasser oder durch Sorption an Partikel verlängert. Deshalb bieten sich bessere Möglichkeiten für eine Akklimation. Die Bakterien werden nicht ausgewaschen und weggespült und über eine Desorption können Substanzen langsam freigesetzt werden.

Allerdings kann durch eine Adsorption die Verfügbarkeit eingeschränkt und so der Abbau verlangsamt oder unvollständig sein (STEEN et al.1980, SHIMP & YOUNG 1988). Aus diesen Gründen sind auch das Verhältnis Sediment zu Wasser, die Struktur und Menge des Sediments sowie Mischungsvorgänge entscheidend für Rate und Ausmaß des Abbaus (PRITCHARD et al.1979). Im Sediment liegen mehr Nährstoffe organischer und anorganischer Natur vor, die einen Abbau z.B. durch Cometabolismus fördern können. Es herrschen aber gerade in Küstennähe häufig anaerobe Verhältnisse vor, die das Abbaupotential wieder einschränken (HAMBRICK et al.1980, BAUER & CAPONE 1985). Die Vorbelastung hat einen deutlichen Einfluß auf die Abbauraten, wie Bauer und Capone (1985,1988) und Shiaris (1989) für polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen zeigen konnten. Obwohl in Sedimenten bei vielen Fremdstoffen natürliche Abbauraten gemessen werden können, finden sich auch hier Akklimationsperioden, z.B. bei 4-NP (SPAIN et al. 1984).

1.6 AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN

Es wurde mit Fremdstoffen gearbeitet, die sich in Tests, die einen Abbau in Klärwerken oder Flüssen simulieren, als nicht oder nur teilweise mineralisierbar erwiesen (GERICKE & FISCHER 1979). Diese Substanzen können also ins Ökosystem Meer gelangen. Weil im Untersuchungsgebiet wenig industrielle Ansiedlungen sind, wurden vor allem Substanzen ausgewählt, die in der Landwirtschaft, Kleinindustrie oder in privaten Haushalten eingesetzt werden. So ist 4-Nitrophenol ein Hydrolyseprodukt des Insektizids Parathion, Trichlorphenol wird ebenfalls als Pestizid verwendet, Tetrapropylenbenzolsulfonat (TPBS) und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) kommen in Waschmitteln vor und EDTA wird zusätzlich in diversen Haushaltsprodukten, der Landwirtschaft und Kleinindustrie-Betrieben benutzt. Naphthalindisulfonsäure, 2-NP und Thioharnstoff werden in der Pharmazeutikaherstellung, der Photochemie und z.T. der Farbstoffchemie angewandt. Diethylenglycol (DEG) ist ein weitverbreitetes Frost-

schutzmittel für PKW und Sportboote. (RÖMPP, BEILSTEIN diverse Jahrgänge). Außerdem wird DEG als Bestandteil von Kühlschmiermitteln und Militärkraftstoffen eingesetzt (KAPLAN et al. 1982, STUDDT et al. 1988), und es entsteht beim Propylen-glycol-Abbau (HAINES & ALEXANDER 1975).

Gericke und Fischer (1979) konnten bei der Durchführung einer Reihe von Standardtests wie dem OECD Confirmatory Test und den Zahn-Wellens Test zeigen, daß EDTA und TPBS in keinem Test abgebaut wurden und somit als relevante Umweltchemikalien gelten müssen. Dietz (1987) konnte im Wasser der Ruhr und in daraus gewonnenem Trinkwasser EDTA-Konzentrationen von 10 - 45 $\mu\text{g/l}$ feststellen. Das Schweizer Institut EAWAG (1987) fand keinen Abbau von EDTA bei der Klärwerkspassage, es wurde in Konzentrationen von 30 - 150 $\mu\text{g/l}$ mit einer rund vierstündigen Verschiebung im Ein- und Auslauf gemessen. Der Verbrauch an EDTA in West-Europa wurde für 1981 mit 13600 t angegeben, in der BRD werden schätzungsweise ca 7500 t/Jahr verbraucht (EGLI 1988, LEYMANN 1988).

4-NP und Diethylenglycol konnten im MITI Test, bzw. 4-NP auch im Closed Bottle Test nicht abgebaut werden (GERICKE & FISCHER 1979). Bei Verwendung eines akklimatisierten Inoculums und Zugabe von Vitaminen und Spurenelementen wurde auch in diesem Test ein Abbau erreicht. 2-NP konnte besonders in solchen Tests nicht oder kaum angegriffen werden, in denen hohe Konzentrationen eingesetzt wurden (40 - 50 mg C/l), sodaß eine toxische Wirkung diskutiert werden muß. Da es aber im Test mit der höchsten Konzentration (Zahn-Wellens Test, 400 mg C/l, Inoculum Klärschlamm) gut abgebaut wurde, und im Flußwasser simulierenden Closed Bottle Test bei 1 - 2 mg C/l gar nicht, scheint das Vorhandensein einer akklimatisierten Mischkultur zusätzlich eine Rolle zu spielen (ebd.). Eine Erhöhung der Konzentration von 4-NP, das in diversen Tests nur etwas weniger toxisch war als 2-NP (BRINGMANN & KÜHN 1982, ZEYER et al. 1986) konnte bei Nyholm et al. (1984) eine starke Verlängerung der Akklimationsperiode hervorrufen. Beide Nitrophenole sowie Dinitrophenol stehen in den USA auf der Liste der "Priority Pollutants". Sie sind in 2 % von 2600 Proben geklärten Abwassers nachgewiesen worden und werden in 9 - 11 von 32 verschiedenen Industriezweigen benutzt (KEITH & TELLIARD 1979). 2- und 4-Nitrophenol sind darüberhinaus in Regen- und Nebelwasser nachgewiesen worden, sie können wahrscheinlich durch photochemische Reaktionen aus Autoabgasen entstehen (LEUENBERGER et al. 1988). Es wird eine Mitverantwortung dieser Verbindungen an Waldschäden diskutiert (RIPPEN et al. 1987, TRAUTNER et al. 1989).

Um auch eine Verbindung zu untersuchen, die mit Sicherheit ins Meer gelangt, wurde Naphthalin ausgewählt, das ein wichtiger Bestandteil von Rohöl ist. Naphthalin kann durch chronische Ölverschmutzung, Ölunfälle sowie atospärischen Eintrag durch unvollständige Verbrennung in Heizungsanlagen, PKWs oder Schiffen ins Meer gelangen (GSCHWEND et al. 1982). Es gilt in den USA als wichtige Umweltchemikalie und konnte in 11 % der Proben industriellen Abwassers nachgewiesen werden (KEITH & TELLIARD 1979). Da es relativ gut wasserlöslich ist, verbleibt es zum Teil in der Wassersäule; zum Teil wird es z.B. durch Adsorption an Partikel ins Sediment einge-

tragen (GSCHWEND et al.1982, HINGA 1988). Über den Abbau höherer Konzentration in Sedimenten ist viel gearbeitet worden (HERBES & SCHWALL 1978, BAUER & CAPONE 1985 und 1988, HEITKAMP et al. 1987, SHIARIS 1989), über den Abbau sehr niedriger Konzentrationen in der Wassersäule ist dagegen wenig bekannt.

Als letzte Substanz soll noch Phenol angeführt werden, als eine Verbindung, die auch in natürlichen Prozessen entstehen kann, z.B. sind in Huminstoffen Polyphenole enthalten. Phenol ist aber auch eine der 50 wichtigsten Industriechemikalien der USA. 3.53 Mrd. lb. wurden 1988 dort produziert, und 26 % aller Industrieabwässer enthielten Phenol (MARTINETZ 1989, KEITH & TELLIARD 1979). Es wurde als relativ leicht abbaubare Mustersubstanz eingesetzt, um Methoden zur Abbauratenbestimmung zu überprüfen und von verschiedene Orten stammende Proben auf ihre Abbaupotenz hin zu untersuchen. Der Phenolring ist ein Grundkörper aller aromatischen Verbindungen. Das heißt, daß der Abbau von 2- und 4-NP, Trichlorphenol und Naphthalin eingeschränkt sein sollte, wenn Phenol in einer natürlichen Probe nicht oder nur langsam mineralisiert werden kann.

Weitere Kriterien für die Auswahl der untersuchten Substanzen war neben ihrer Relevanz fürs Meer die Möglichkeit, ¹⁴C-markierte Verbindungen zu erhalten. Außerdem mußte der vollständige Abbau zu CO₂ und natürlichen Zellinhaltsstoffen möglich sein. Diese Einschränkungen waren nötig, um den Abbau bei niedrigen Konzentrationen zu erfassen. Beim Arbeiten mit natürlichen Wasser- oder Sedimentproben ist eine Identifizierung von Abbauprodukten fast unmöglich. Nur wenn eine Mineralisierung zu Kohlendioxid, N- und P-Salzen erfolgt, ist die vollständige Überführung evtl. toxischer Fremdstoffe oder Abbauprodukte in natürliche Verbindungen sichergestellt.

4-Nitrophenol wurde für einen Hauptteil der Experimente verwendet, denn der vollständige Abbauweg ist für Reinkulturen beschrieben (SPAIN et al.1979, NYHOLM et al.1984). Die Nitrogruppe wird stöchiometrisch als Nitrit freigesetzt und dann erfolgt die Ringspaltung. Es ist aber auch möglich, daß beim Abbau in der Natur andere Mechanismen eine Rolle spielen, wie z.B. die Umwandlung zum Anilin mit nachfolgender Freisetzung von Ammonium, die für 3-NP beschrieben ist (ZEYER & KEARNEY 1984), oder die Detoxifizierung zu Huminsäure-ähnlichen Polymeren, die insbesondere bei Anilinen beobachtet werden kann (ZEYER 1987). Kürzlich wurde bei 2-, 3- und 4-NP auf eine Umwandlung in Aminophenole durch konstitutive Enzyme von Pseudomonaden aufmerksam gemacht (SCHACKMANN et al., Poster auf der DGHM/VAAM Tagung 1990). 4-NP bot sich als Mustersubstanz an, weil es in Vorversuchen einen Abbau nach einer Akklimationsperiode zeigte, weil es vielfältig als Insektizid, für Farben, Arzneimittel und in Photochemikalien Anwendung findet und weil seine Toxizität nicht unbeträchtlich ist.

1.7 ZIEL DIESER ARBEIT

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, daß überwiegend mit Chemikalien gearbeitet wurde, bei denen ein Abbau durch Reinkulturen unter optimalen Bedingungen beschrieben ist, denn es sollte geklärt werden, ob:

- Fremdstoffe, die durch verschiedenartigste Einträge ins Meer gelangen, unter naturnahen Bedingungen in absehbaren Zeiträumen abgebaut werden können
- Fremdstoffe bei niedrigen Konzentrationen vollständig mineralisiert werden
- standortspezifische *in situ* Abbauraten gemessen werden können
- im Meerwasser oder Sediment spezifische Biozönosen vorkommen, die schwerabbaubare Verbindungen mineralisieren können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND DOSIERUNGEN

1) nicht radioaktiv markierte Verbindungen

Chemikalie	Firma	Qualität	eingesetzte Konz. [mg/l]
Diethylenglycol	Fluka	puriss.p.a.	0.10
Ethylendiamin- tetraacetat	Fluka	puriss.p.a.	0.10 - 0.25
2-Nitrophenol	Fluka	puriss.p.a.	0.25 - 5
4-Nitrophenol	Fluka	puriss.p.a.	0.25 - 5
Thioharnstoff	Fluka	puriss.p.a.	0.25
2,4,6-Trichlorphenol	TCI	>98 % rein	0.25
1,5-Naphthalindisulfonat, Dinatriumsalz	TCI	kein Angabe	0.25

Tetrapropylbenzolsulfonat war nur als 5 % Lösung von der Firma Merck als Standard zur Bestimmung anionaktiver Detergentien erhältlich

2) radioaktiv markierte Verbindungen

Chemikalie	Firma	Reinheit [%]	spez.Aktivität [mCi/mmol]	Label
Diethylenglycol	Amersham	96 - 97	8.6	2(3)
Ethylendiamintetraacetat, Na-Salz	Amersham	97	40.0	2
Naphthalin	Amersham	97	4.5	1
2-Nitrophenol	Sigma	>98	10.6	UL
4-Nitrophenol	Amersham	96	79.0	UL
Phenol	Sigma	>98	213.0	UL
Thioharnstoff	NEN	98	55.0	1

Alle anderen benutzten Chemikalien waren soweit nicht gesondert angegeben von der Firma Merck in der Qualität p.A..

2.2 PROBENENTNAHMEN

Alle Wasserproben wurden mit einem Bach-Schöpfer und sterilen 1 oder 2 l Glasflaschen genommen, nur bei der Forschungsfahrt im August 1989 fanden mit Alkohol gespülte, hydrographische Schöpfer Verwendung, da große Wasservolumina benötigt wurden. Die Probe sedimentnahen Wassers wurde mit einem speziell konstruierten, mit Stickstoff gefüllten Schöpfer genommen, der durch Kugelventile Wasser aus 4 definierten Tiefen langsam einsaugt (RITZRAU 1990). Es wurde eine Mischprobe hergestellt, bei der das Wasser von 20 und 40 cm über dem Sediment vereinigt wurde.

Sandsediment für die Vorversuche konnte am Falckensteiner Strand nahe dem Nord-Ostsee-Kanal aus der Zone gewonnen werden, die ständig vom Wasser überspült wird. Sedimente aus größeren Wassertiefen konnten entweder bei hohem Sandanteil mit einem Van Veen Backengreifer oder bei schlickigem Sediment mit einem Rumohr-Lot genommen werden. Es wurde überwiegend mit sandigen Oberflächensedimenten gearbeitet, um von aeroben Verhältnissen ausgehen zu können und um die Adsorption der eingesetzten Chemikalien so gering wie möglich zu halten.

Die genaue Lage der Stationen, bei denen Proben entnommen wurden, und Grunddaten zur Charakterisierung des Wasserkörpers und des Sediments sind in Tabelle 1 und Abbildung 1 dargestellt.

2.3 GESAMTBAKTERIENZAHLE UND MITTLERES ZELLVOLUMEN

Die Gesamtbakterienzahl (GBZ) wird durch Epifluoreszenzmikroskopie ermittelt und erfaßt alle vorhandenen Bakterien. Der Abbau einer Substanz kann indirekt über das Wachstum von Bakterien im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Zusatz dieser Substanz erfaßt werden. Dies gilt ebenfalls für toxische Wirkungen auf die Biozönose.

Die GBZ wurde nach der Methode von Zimmermann & Meyer-Reil (1974) ermittelt. Dafür wurden mindestens 400 mit Acridinorange gefärbte und abfiltrierte Zellen gezählt und z.T. nach Größenklassen differenziert. Für die Berechnung des mittleren Zellvolumens wurden zuerst die für die Kieler Bucht repräsentativen Zellvolumina nach Zimmermann (1977) benutzt. Später wurde ein Porton-Grid (G12-19mm, Graticules LTD, Tonbridge, Kent) verwendet, mit dem die Länge und der Durchmesser von 50 oder 100 Zellen durch das Einpassen in Kreise verschiedenen Durchmessers bestimmt wurde. Die Berechnung der Zellvolumina erfolgte über ein Computerprogramm (KUPARINEN, pers. Mitteilung). Für die Bestimmung der GBZ in Sedimentproben wurde die Methode nach Meyer-Reil (1984) benutzt, bei der die Bakterien durch Ultraschall von den Partikeln abgetrennt werden.

Tabelle 1: Daten aller Probenentnahmen

Station	Datum	Koordinaten		Temperatur [°C]	Salinität [ppt]	Tiefe [m]	GBZ x10 ⁶ /ml./cm ³
		[°N]	[°E]				
Kieler Förde(KF)	1.4.87	Institutsanleger		1.4	14.2	7	1.44
Atlantik	27.4.87	36°48.95 15°40.29		NV	NV	°22	NV
Mittelmeer	30.4.87	36°05.06 04°59.65		13.1	38.2	°119	NV
Atlantik	2.5.87	36°14.15 06°59.95		16.2	36.3	°50	NV
Ausstrom	2.5.87	36°14.15 06°59.95		12.7	36.8	°700	NV
Faro,Lagune	11.5.87	36°57.45 07°51.45		19.0	NV	41	NV
Kieler Förde	13.7.87	Institutsanleger		16.9	15.4	7	5.43
NW Helgoland	25.8.87	54°15.02 7°29.70		16.0	32.5	38	NV
Elbe 1	25.8.87	54°00.00 8°04.30		15.5	31.5	25	NV
Kieler Förde	3.12.87	Institutsanleger		7.0	15.1	7	0.25
Kieler Förde	8.2.88	Institutsanleger		4.5	18.8	7	1.67
Gabelsflach(G)	8.2.88	54°32.70 10°16.56		3.8	17.5	10	0.69
Kieler Förde	19.4.88	Institutsanleger		7.5	14.1	7	0.25
Friedrichsort	25.4.88	54°23.60 10°11.80		5.9	15.2	17	0.61
Boknis Eck	25.4.88	54°31.30 10°02.50		5.7	15.4	25	0.11
Kappeln(Ka)	25.4.88	54°39.60 9°56.30		7.8	12.5	11	2.00
Schleimünde(S)	25.4.88	54°42.90 10°08.00		6.4	15.0	25	1.00
Kieler Förde	30.5.88	Institutsanleger		12.0	13.4	7	0.31
Kieler Förde	29.8.88	Institutsanleger		13.6	21.1	7	NV
Kieler Förde	16.1.89	Institutsanleger		5.1	18.4	7	NV
Kieler Förde	8.2.89	Institutsanleger		4.3	19.6	7	NV
Kieler Förde	15.2.89	Institutsanleger		4.4	20.0	7	NV
Kieler Förde	6.3.89	Institutsanleger		4.7	19.1	7	1.40
Kieler Förde	6.6.89	Institutsanleger		14.2	13.4	7	4.59
Bülk (Bü)	6.6.89	54°27.92 10°12.26		13.5	11.9	8	2.41
Kieler Förde	10.7.89	Institutsanleger		19.4	12.9	7	NV
Mölnort(Mö)	11.7.89	54°22.94 10°11.65		19.7	12.8	2	NV
Falkenstein(Fa)	3.8.89	Strand Falckenstein		14.5	13.9	0	NV
Station A	21.8.89	53°58.16 10°54.09		17.9	14.1	°1	3.47
A, 5.3m	21.8.89	53°58.16 10°54.09		17.8	14.2	8	3.34
Station B	22.8.89	54°18.51 11°34.26		19.5	11.7	°1	9.45
Stat.B,Sediment	22.8.89	54°18.51 11°34.26		13.9	18.0	25	2370.00
Stat.C,Sediment	23.8.89	54°22.34 11°53.90		14.5	16.8	19	1400.00
Station D	24.8.89	54°31.47 14°24.20		17.9	7.9	°1	3.55
Stat.D,Sediment	24.8.89	54°31.47 14°24.20		17.9	7.9	15	940.00
Station KBM	26.8.89	54°36.03 10°27.08		NV	NV	18	NV
Bülk	27.8.89	54°26.85 10°13.48		16.9	15.2	18	NV
Kieler Förde	23.10.89	Institutsanleger		NV	NV	7	0.42
Kieler Förde	24.10.89	Institutsanleger		12.6	15.7	7	0.74
Falkenstein	7.11.89	Strand Falckenstein		9.5	17.1	0.2	260.00
Kieler Förde	20.11.89	Institutsanleger		8.8	17.7	7	NV

° = Entnahmetiefe

() = Abkürzungen in Abbildung 1

Fortsetzung Tabelle 1

Nährsalze

Station	Datum	Phosphat [$\mu\text{mol/l}$]	Ammonium [$\mu\text{mol/l}$]	Nitrit [$\mu\text{mol/l}$]	Nitrat [$\mu\text{mol/l}$]
Mittelmeer	30.04.87	0.40	2.70	0.14	7.80
Atlantik	02.05.87	0.11	0.00	0.01	0.30
Ausstrom	02.05.87	0.52	0.00	0.03	11.00
Faro, Lagune	11.05.87	0.20	1.70	0.04	0.24
Kieler Förde	13.07.87	1.18	2.31	0.26	31.44
Kieler Förde	30.05.88	0.65	2.50	0.09	0.89
Kieler Förde	16.01.89	0.76	8.01	0.64	28.88
Kieler Förde	08.02.89	0.68	7.23	1.00	11.26
Kieler Förde	15.02.89	0.44	6.07	0.78	12.22
Kieler Förde	06.03.89	0.57	5.82	0.99	12.27
Kieler Förde	10.07.89	0.35	3.91	0.29	1.46
Station A, 1m	21.08.89	0.95	0.00	0.23	0.53
Station B, 1m	22.08.89	0.19	0.04	0.11	0.23
Stat. B, 22m	22.08.89	0.99	0.10	0.17	0.32
Station D, 1m	24.08.89	0.65	6.94	0.44	2.89
Kieler Förde	24.10.89	0.63	6.70	0.41	2.65

Sedimente

Station	TG [g/cm ³]	GBZ [$\mu\text{g TG/g}$] $\times 10^5$	POC [mgC/g TG]		PON [mgC/g TG]		C:N Verhältnis atomar	
			Mittel	Stdabw	Mittel	Stdabw	Mittel	Stdabw
Mölnort	1.84	NV	1.52	0.12	0.30	0.01	5.88	0.26
Station B	0.29	81.72	43.84	0.08	5.92	0.06	8.65	0.09
Station C	1.44	9.72	2.26	0.02	0.37	0.00	7.15	0.09
Station D	1.48	6.35	0.48	0.05	0.10	0.00	5.74	0.28
Falkenstein	1.70	1.53	0.20	0.01	0.06	0.01	3.80	0.38

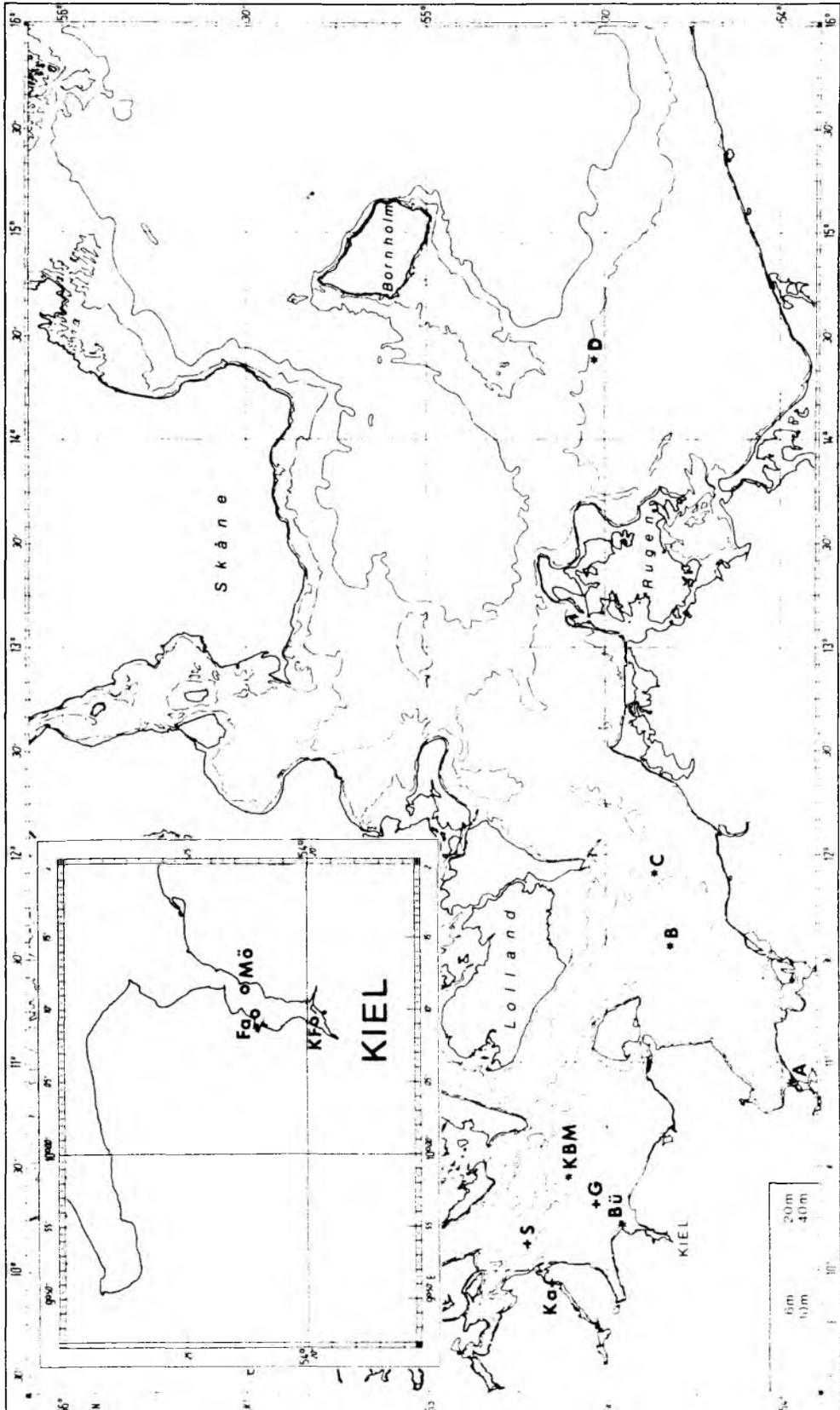


Abb. 1: Karte des Hauptuntersuchungsgebiets in der westlichen Ostsee

2.4 FLAGELLATENZÄHLUNG

Die Zählung von Flagellaten (FZ) erfolgte meist zusammen mit der GBZ. Es wurden wenn möglich 5 ml filtriert und eine 16 x 63 Vergrößerung gewählt. Mit dieser Methode wird die FZ in der Regel unterschätzt, weil eine Fixierung von GBZ-Proben mit 2 % Formol für Flagellaten nicht optimal ist und sie ihre Geißel durch das Einwirken von Acridinorange verlieren können. In Versuchen, in denen es besonders auf die quantitative Erfassung der Flagellaten ankam, wurde die Methode von Haas (1982) verwendet, und die Proben wurden innerhalb von 3 Wochen bearbeitet.

2.5 SAPROPHYTENZAHL

Die Saprophytenzahl (SZ) ist ein Maß für den aktiven heterotrophen Anteil einer Biozönose; oligotrophe Keime werden nicht erfaßt. Als Medium diente ZoBell-Brackwasser-Agar, in einigen Fällen wurde Leitungswasser oder Meerwasser verwendet. Für Brack- und Meerwassermedien wurde natürliches, gealtertes Atlantikwasser verwendet, das zur Mineralisierung der organischen Substanz mindestens 3 Monate dunkel aufbewahrt worden war. Je 0.1 ml verschiedener Verdünnungsstufen wurden in 3 Parallelen ausgespatelt. Die Inkubation erfolgte bei 20°C, nach 7 und 14 Tagen wurden die Platten ausgezählt.

Brackwassermedium in Anlehnung an Oppenheimer & ZoBell (1952):	
Bacto-Pepton	5 g/l
Bacto-Hefeextrakt	1 g/l
Bacto-Agar	15 g/l
Gealtertes Seewasser	250 ml
Aqua.dest	750 ml
pH-Wert 7.2	

Das Medium wird 20 min bei 120°C und 1.2 atm autoklaviert.

Für das Meerwassermedium wurden 750 ml gealtertes Atlantikwasser und 250 ml Aqua.dest genommen (pH 7.6) und für Leitungswassermedium 1000 ml Leitungswasser (pH 6.9).

2.6 ANZAHL DER 2- UND 4-NITROPHENOLABBAUER AUF NITROPHENOLHALTIGEM AGAR

Zur Anreicherung und Quantifizierung von Bakterien, die 2- oder 4-NP in möglichst niedrigen Konzentrationen abbauen, wurde ein nährstoffarmes Agarmedium durch 1:1000 Verdünnung aus dem oben genannten ZoBell-Agar hergestellt. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf weniger als 60°C wurde sterilfiltriertes Nitrophenol in einer Endkonzentration von 6 mg/l zugesetzt. Der pH-Wert mußte bei diesen wenig gepufferten Medien steril auf Werte über pH 7.5 eingestellt werden, damit die Gelbfärbung der Nitrophenole deutlich zu erkennen war. Ein Problem bei der Auswertung war die Bildung sehr kleiner Kolonien, die nicht unbedingt Abbauer zu sein brauchten, da dem Agar geringe Mengen an Hefeextrakt und Pepton zugesetzt wurden. Eine Quantifizierung erfaßte also auch Nitrophenol-tolerante Bakterien. Es wurde z.T. eine Entfärbung des gesamten gelb gefärbten Agars beobachtet, die nicht einzelnen Kolonien zugeordnet werden konnte. Eine Abschätzung der Größenordnung der Abbauzahlen ließ sich über die Verdünnungsstufe vornehmen, bei der die Entfärbung auftrat.

2.7 VERSUCHE MIT REINKULTUREN

Von den Saprophyten- und Schadstoff-Agarplatten konnten diverse Reinkulturen isoliert werden. Ihre Fähigkeit zum Wachstum und Abbau von 2- und 4-NP wurde auf weiteren Nitrophenol-Agarplatten untersucht. Da es durch sehr geringes Wachstum auf den Agarplatten nicht deutlich zu sehen war, ob beide Fremdstoffe von einigen Kulturen abgebaut werden konnten, wurden weitere Versuche in flüssigen Medien durchgeführt. Dabei besteht der Vorteil, daß geringere Konzentrationen eingesetzt werden können und der natürliche Lebensraum der aus Wasserproben isolierten Reinkulturen besser simuliert wird. Es wurden gealtertes, autoklaviertes Brackwasser und z.T. auch Meerwasser oder Leitungswasser als Medium verwendet. Als einzige Kohlenstoff-Quelle wurden die Nitrophenole in einer Konzentration von 500 oder 1000 µg/l nach dem Autoklavieren steril zugesetzt. Ein Auswertungsproblem war die pH-Erniedrigung durch bakterielle Aktivität, durch die ein Abbau vorgetäuscht werden konnte. Zur Endauswertung wurde deshalb der pH-Wert zuerst mit Natronlauge und später mit Puffer (pH 10, Borat-Natronlauge) in den alkalischen Bereich gebracht.

2.8 INKUBATIONEN

Es wurde in der Regel bei 20°C auf einem Schütteltisch (Finfors RC 1TK, Basel) bei 50 U/min oder der Firma Bühler (SM 25, Tübingen) bei 100 - 150 U/min inkubiert. Einige Versuche wurden bei 10 oder 4°C in temperaturkonstanten Räumen ohne Schütteln durchgeführt. Bei Ausfahrten wurden zur Ratenbestimmung Schüttelwasserbäder auf die gerade herrschende *in situ* Temperatur (+2°C) eingestellt. Bei der Ausfahrt im August 1989 versagten die Bäder wegen zu hoher Außentemperaturen, sodaß die Ratenbestimmungen in Kühlbrutschränken ohne Schütteln inkubiert werden mußten. Wegen der geringen inkubierten Volumina von 10 und 20 ml für die Ratenbestimmung war aber eine gute Durchmischung gewährleistet. Alle Inkubationen wurden im

Dunkeln durchgeführt, um Algenwachstum und Photo-Oxidation zu vermeiden. Die Fremdstoffe wurden in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/l}$ zugesetzt, wenn mit unmarkierten Verbindungen gearbeitet wurde. Der Zusatz radioaktiv markierter Verbindungen erfolgte in Konzentrationen von 0.08 - 50 $\mu\text{g/l}$, höhere Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit nicht markierter Substanz erreicht. Kontrollen bekamen die gleichen Zusätze und darüber hinaus 2 % Formol (37 % konzentriert, Endkonzentration 0.74 %), oder sie wurden vor Zusatz des Fremdstoffs autoklaviert.

Für einige Versuchsansätze wurde Cycloheximid (Aldrich) in einer Endkonzentration von 250 mg/l nach Wiggins et al. (1987) zugesetzt. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 5 g/l. Sie wurde in sehr sauberem destilliertem Wasser angesetzt (Milli-Q Reagent-Grade Watersystem, Millipore Corp., Bedford, Mass.). Durch vorsichtiges Erwärmen wurde das Cycloheximid ohne Lösungsvermittler aufgelöst. Der Stamm wurde tiefgefroren aufbewahrt.

2.9 PHOTOMETRIE

Für die Quantifizierung eines Fremdstoffabbaus in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/l}$ wurde zunächst die UV-Photometrie verwendet. Es wurde ein Photometer der Firma Perkin-Elmer (Lambda 15 UV-Vis Spektrophotometer) eingesetzt, das im Zweistrahlverfahren mißt und eine Scan-Einstellung hat, sodaß das ganze Absorptionsspektrum von 180 - 900 nm erfaßt werden kann. Das Zweistrahlverfahren ermöglicht die automatische Subtraktion eines Blindwerts von der Probe, die eigentlich gemessen werden soll, sodaß auch natürliche Wasserproben eingesetzt werden konnten, die schon von Anfang an absorbierende Substanzen enthalten. Zur Erhöhung der Meßempfindlichkeit wurde mit 5 cm Küvetten gearbeitet. Es wurden Eichreihen von 50 - 250 $\mu\text{g/l}$ bei 2-, 4-Nitrophenol, 1.5 Naphthalindisulfonsäure, Thiourea, 2.4.6-Trichlorphenol, Tetrapropylbenzolsulfonat und EDTA in natürlichem, filtriertem Ostseewasser im Scan-Betrieb erstellt, um auch einen nicht quantitativen Abbau sowie das Entstehen von absorbierenden Abbauprodukten zu erfassen. Bei den beiden letztgenannten Verbindungen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verringerung der Absorption in Ostseewasser, die bei Eichreihen in destilliertem Wasser nicht auftrat. Bei EDTA ist der Grund wahrscheinlich eine Maskierung von positiv geladenen Ionen wie Calcium, Magnesium und auch Spurenmetallen, die komplexiert werden (GARDINER 1976). Um Veränderungen der Absorption während der Inkubation Rechnung zu tragen, wurden als Vergleichsproben für die Zweistrahlmessung Wasserproben (sogenannte Nullwerte) genommen, die genau wie die zu untersuchenden Proben behandelt und inkubiert wurden, außer daß ihnen kein Fremdstoff zugesetzt wurde.

2.10 MESSUNG DES PARTIKULÄREN ORGANISCHEN KOHLENSTOFFGEHALTS (POC), DES PARTIKULÄREN ORGANISCHEN STICKSTOFFGEHALTS (PON) UND DES TROCKENGEWICHTS VON SEDIMENTEN

Im Meer haben Partikel eine wichtige Funktion, sei es als Anheftungssubstrat für Bakterien, sei es als Reservoir für Nährstoffe. Bakterien können geeignete Partikel abbauen, aber auch gelöstes in partikuläres Material überführen (MUSCHENHEIMER et al. 1989). Im Sediment befindet sich oft ein Großteil der aktiven Bakterienpopulation auf Partikeln (RHEINHEIMER 1979).

Im Verlauf längerer Inkubationen war häufig die Bildung von partikulärem Material in den Probenflaschen zu beobachten. Daher wurde in einigen gezielten Versuchen mit höheren Konzentrationen an 4-NP gemessen, ob im Vergleich zu Nullwerten vermehrt Huminstoff ähnliche Verbindungen synthetisiert werden, wie es bei Zeyer et al. (1986) erwähnt wird. Die Bildung von Humus aus Fremdstoffen wird sogar industriell zur Entgiftung von Xenobiotika eingesetzt (HÖFLE, pers. Mitteilung). Die Huminstoffe wurden durch Absaugen und Zentrifugieren (20.000 U/min, 20 min, Sigma Tischzentrifuge 202 MK) geerntet und gewaschen.

Außerdem wurden unterschiedliche Sedimentmengen (50 - 200 mg) getrocknet, um das Trockengewicht zu bestimmen. Für eine POC/PON Messung wurde ein Teil dieser Probe zum Austreiben des Carbonats angesäuert, wieder getrocknet und im CHN-Analyzer (Perkin-Elmer, Model 240 C, Elemental Analyzer) verbrannt. Es wurde die Methode nach Van Iperen & Helder (1985) benutzt, nach einer von M. Köster modifizierten Anleitung (pers. Mitteilung).

2.11 BESTIMMUNG VON TEMPERATUR, SALZGEHALT UND NÄHRSALEN

Während der Probennahme wurden die Temperatur und der Salzgehalt mit einer TS-Sonde (Conduktometer LF 191, WTW, Weilheim) gemessen. Die anorganischen Nährstoffe konnten nach folgenden Methoden bestimmt werden: Ammonium und Phosphat nach den von Koroleff beschriebenen Methoden, Nitrat und Nitrit nach Grasshoff (alle beschrieben in GRASSHOFF et al. 1983).

2.12 VERSUCHE MIT ^{14}C -MARKIERTEN VERBINDUNGEN

Um die vollständige Mineralisierung geringer Konzentrationen an Fremdstoffen zu erfassen, wurde im Hauptteil dieser Arbeit mit ^{14}C -markierten Verbindungen gearbeitet. Es wurden wässrige Stammlösungen der verschiedenen ^{14}C -markierten Verbindungen in hochreinem deionisiertem Wasser angesetzt (Milli-Q Reagent-Grade Watersystem, Millipore Corp., Bedford, Mass.) und durch Polycarbonatfilter (Nuclepore, Tübingen) sterilfiltriert. Die Filter wurden vorher dreimal in dem oben genannten hochreinen Wasser ausgekocht und montiert in gut gereinigten Polycarbonat Filtrations-Spritzenvorsätzen (Sartorius), autoklaviert. Alle Radiochemikalien wurden pur oder in wässriger Lösung bezogen, Phenol war nur in Toluol gelöst erhältlich.

beprobte, um eine abiotische Zersetzung der Substrate im Laufe der Zeit zu messen. Am Ende des jeweiligen Versuchszeitraums wurde ein Aliquot von 1 - 10 ml vor und nach dem Ansäuern entnommen, um eine Bilanzierung vornehmen zu können. Der im Wasser verbleibende Rest nach Austreiben des CO_2 setzt sich zusammen aus dem Anteil, der von den Zellen aufgenommen worden oder an sie adsorbiert ist (s.o.), den ausgeschiedenen Abbauprodukten und dem nicht abgebauten unverbrauchten Substrat. Zusammen mit dem gemessenen CO_2 muß sich 100 % ergeben, sonst ist entweder ein Teil der Radioaktivität aus dem System entwichen oder durch Sorption, wie es z.B. bei Sedimentproben vorkam, der Wasserphase entzogen worden. Da aber die Kontrollwerte für abiotischen Abbau und Adsorption an die Zellen bei der Berechnung der DPM abgezogen wurden, sowie ein geringer Teil des gebildeten CO_2 sich im Luftraum über der Wasserprobe befand, konnten i.d.R. nur 90 - 95 % in der Bilanz ermittelt werden. Auch ein Einbinden radioaktiver Verbindungen in partikuläres Material oder kolloidale Huminstoffe, die nur z.T. bei den durchgeführten Filtrationen erfaßt werden konnten, führte zum Verlust eines Teils der zugegebenen Substanzen.

2.13 HPLC-ANALYTIK ZUR ERFASSUNG VON VERUNREINIGUNGEN DES RADIOAKTIV MARKIERTEN 4-NITROPHENOLS

Um das radioaktiv markierte 4-NP auf Reinheit zu überprüfen, wurde eine HPLC-Analytik zur Trennung von Phenol, 2-,4-NP und 2,4-Dinitrophenol erarbeitet. Die Herstellung des 4-NP erfolgt laut Amersham durch Nitration von Phenol und nachfolgende Säulenchromatographie und Sublimation. Dabei liegen die oben genannten Verbindungen durch den Syntheseweg als Verunreinigungen nahe. Besonders eine Verunreinigung durch Phenol ist für Abbauuntersuchungen kritisch, weil dieses leichter abbaubar ist. Da in den ersten Versuchen ein zweiphasiger Abbau festgestellt werden konnte, mit nur 4 - 10 % Mineralisierung in der ersten Phase, erschien eine Identifikation und Quantifizierung der Verunreinigungen des 4-NP als unabdingbar. Im Hinblick auf die erstrebte Messung von Abbauraten, die nur im Bereich weniger Prozent oder sogar darunter liegen können (URSIN & PHEIFFER MADSEN 1983), mußte sichergestellt werden, ob es überhaupt ein 4-NP Abbau ist, der gemessen wird. Nach Angaben des Herstellers beträgt die Reinheit 96 %, Auskunft über die Natur der Verunreinigungen wurde nicht gegeben.

Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma Varian (5000 Liquid Chromatograph) mit einer RP-18 Säule (Mikro-Pak MCH-10, 300 x 4 mm) verwendet. Als Detektor diente eine Varian UV-50 Detektor oder ein Radioaktivitätsdurchflußzähler (Berthold LB 506B, HPLC Radioactivity Monitor). Außerdem wurden ein Integrator (Hewlett Packard 3390 A), ein Schreiber für die UV-Messung (PM 8251 single pen recorder, Philips), ein Schreiber für die Radioaktivitätsmessung (Berthold) und ein Fraktionssammler (Pharmacia, Redi Frac) verwendet. Die Probe wurde in eine 100 μl Probenschleife gegeben und bei einer Durchflußrate von 1 ml/min durch die Säule gepumpt. Nach mehreren vergeblichen Versuchen durch in der Literatur beschriebene Gradienten und Puffer Phenol und 4-NP aufzutrennen, wurde ein Ion-Pairing des 4-NP mit Tetrabutylammoniumhydroxid (TBA, Merck 818759) durchgeführt. Dieses Reagenz maskiert die

negativ geladene Nitro-Gruppe und sorgt damit für eine verstärkte Wechselwirkung des 4-NP mit der RP-18 Säule, während Phenol relativ schnell eluiert wird. Leider rücken die Peaks von 4- und 2-NP bei dieser Behandlung dicht zusammen. Durch einen ausgeklügelten Gradienten konnten die 4 Verbindungen aufgetrennt werden. Am Anfang wurden Tris/TBA (2mM) und Methanol in einem Verhältnis von 92 : 8 % verwendet, am Ende wurde der Gradient auf 75 : 25 abgesenkt.

% Tris/TBA	% Methanol	Zeit [min]
92	8	0
90	10	0 - 5
90	10	5 - 10
75	25	10 - 20
75	25	20 - 25
92	8	25 - 30

Selbst wenn die Verbindungen im Verhältnis 24 : 1 gemischt wurden, was 4 % pro Verunreinigung entspricht, konnten noch deutlich 4 Peaks unterschieden werden. Die Wellenlänge des Detektors wurde auf 270 nm eingestellt, weil dort das Phenol sehr gut, das dominierende 4-NP aber weniger gut absorbiert.

Zuerst wurde das System mit nicht radioaktiv markierten Standards an Einzelsubstanzen erprobt. Dann wurden die Substanzen in Verhältnis 24 : 1 gemischt und die Auftrennung der Mischung optimiert. Nachdem die Meßeffizienz des Radioaktivitätszählers mit Glucose bekannter spezifischer Aktivität geeicht worden war, konnte 0.1 μ Curie des radioaktiven 4-NP zusammen mit der Mischung an inaktiven Verbindungen aufgetragen werden. Die Zugabe inaktiver Substanzen ist nötig, um einen Verbleib der kleinen Mengen an radioaktiven Substanzen in der Säule zu verhindern. Es wurden i.d.R. 0.6 μ mol/ml 4-NP und je 0.025 μ mol/ml der anderen Phenole eingesetzt. Bei diesen Messungen wurden sowohl die UV-Absorption als auch die Radioaktivität durch eine in Serie geschaltete Meßkette gemessen. Ein Nachteil dieser Anordnung waren die verzögerten Retentionszeiten beim 2. Schreiber, der die Signale des Radioaktivitätsdurchflußzählers erhielt. Um noch eine zweite unabhängige Messung zu erhalten, denn eine Verwirbelung in der Meßzelle konnte nicht ausgeschlossen werden, wurde das Eluat in 90 Fraktionen direkt nach der UV-Messung aufgefangen. Diese Fraktionen konnten im Szintillationszähler gemessen werden. Durch Berechnung der Summen DPM der zusammen gehörenden Fraktionen wurde der prozentuale Beitrag einzelner Verunreinigungen ermittelt, soweit dies möglich war. Eine Integration der Detektorsignale erwies sich durch die Vielzahl an Verunreinigungen als unmöglich.

2.14 VERSUCHE ZUR AKKLIMATION VON MISCHKULTUREN

Es wurde eine natürlichen Wasserprobe aus der Kieler Förde genommen, mit 250 µg/l 4-NP versehen, und so lange bei Zimmertemperatur inkubiert, bis ein 4-NP Abbau festgestellt werden konnte. Zunächst wurde dieser Probe direkt 8 µg/l radioaktives 4-NP zugesetzt, um den Abbau zu CO₂ zu verfolgen.

In folgenden Versuchen wurde 5 vol% (0.5 ml) dieser Abbauer-mischkultur mit verschieden behandeltem Wasser, das überwiegend frisch aus der Kieler Förde gewonnen wurde, auf 10 ml aufgefüllt, um eine Einleitung zu simulieren. Pro Probe waren ca 10² - 10³ Abbauer vorhanden. Das Wasser wurde mit radioaktivem Nitrophenol (8 µg/l) versehen und dessen Abbau über die CO₂-Produktion, die Aufnahme und den in Lösung verbleibenden Rest bestimmt.

Das zugegebene Wasser wurde im Simulationsversuch folgendermaßen behandelt, um den Gehalt an Nährstoffen, Protozoen und konkurrierenden Bakterien zu variieren. Gealtertes autoklaviertes Brackwasser (BW) wurde eingesetzt, da es kaum organische Nährstoffe und keine Organismen enthält, aber alle für das Wachstum von marinen Mikroorganismen nötigen anorganischen Bestandteile (vgl.2.5).

Cycloheximid (CY) diente zur selektiven Hemmung von Eukaryonten und sollte daher ein Grazing unterdrücken (Menge s. 2.8). Zur Unterdrückung von Protozoen und konkurrierenden Bakterien wurde das frische Fördewasser sterilfiltriert (ST). Natürlich können im zugesetzten Inoculum schon Protozoen sowie mit Sicherheit andere Bakterien neben den Abbauern vorhanden gewesen sein. Da Protozoen längere Inkubationen im Labor aber in der Regel nur als Dauerstadien überstehen, sind die akklimatisierten schadstoffabbauenden Bakterien im Vorteil. Eine Filtration der akklimatisierten Mischkultur zur selektiven Eliminierung der Protozoen wurde nicht durchgeführt, weil der Verdacht bestand, daß die Abbauer an Partikeln sitzen, und weil einige heterotrophe Nanoflagellaten kaum größer als Bakterien sind.

Im frischen, unbehandelten Fördewasser (FF) sollten alle 3 Faktoren zusammen auf die Abbauergemeinschaft einwirken. Eine Inkubation bei *in situ* Temperatur (10°C) sollte das Protozoenwachstum fördern (GALVAO, pers. Mitteilung) und erste Ergebnisse über den 4-NP Abbau bei niedrigeren Temperaturen erbringen.

Eine Serie wurde erst nach 3 Tagen begonnen (3D) und ebenfalls bei 10°C durchgeführt, nachdem festgestellt worden war, daß sich Protozoen entwickelt hatten. Die Abbauer wurden für diesen Ansatz separat an 10°C gewöhnt, ohne daß erneut 4-NP zugesetzt wurde.

In der Regel wurden zu 10 Zeiten je 3 Parallelproben (10 ml) genommen, z.T. wurde eine davon für GBZ und/oder Protozoen Zählungen benutzt. Durch die technisch bedingten, kleinen Volumina war eine relativ große Streuung der Protozoenzahl zu erwarten, da Flagellaten nur zu ca 10³/ml in küstennahem Meerwasser vorkommen.

Für weitere Ansätze wurden 4 x 250 ml frisches Fördewasser mit 5 % akklimatisiertem Inoculum mit 250 µg/l unmarkiertem 4-NP versehen. Zu je einer der 4 Flaschen wurden 3 µmol/l KH_2PO_4 , 50 µmol/l NH_4NO_3 oder beides zugegeben. Es wurde bei 20°C auf dem Schütteltisch inkubiert.

Weitere Versuche sollten zeigen, ob eine Akklimation an 1 µg/l auch einen schnelleren Abbau von 250 µg/l 4-NP bewirken kann, und wie der Abbau nach einem zweiten Zusatz von 1 oder 5 µg/l abläuft. Dafür wurden entweder 100 ml abgefüllt und direkt mit neuem Schadstoff versetzt, bei 250 µg/l unmarkiert, sonst radioaktiv markiert. Oder die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 20 min bei 13.000 U/min (Sigma 202 MK, Tischzentrifuge) in sterilen 30 ml Polycarbonat Zentrifugenröhrchen geerntet, 2 x mit gealtertem Brackwasser oder autoklaviertem Ostseewasser gespült und am Ende wieder auf 10 ml aufgefüllt. Durch eine GBZ-Zählung von 5 ml des Überstands und einer nicht zentrifugierten Probe konnte festgestellt werden, daß nur ca 10 % der Bakterien auf diese Weise verloren gehen. Es wurde frisches Medium zugegeben, um festzustellen, ob der Zweitabbau durch organische oder anorganische Zusätze gefördert werden kann. Diese könnten nach der in diesem Fall 3 Monate langen Inkubation aufgezehrt gewesen sein.

2.15 QUANTIFIZIERUNG DER ABBAUER MIT EINER MPN-METHODEN

Zunächst wurde die Zahl der 4-NP AbbaUER durch eine MPN-Methode mit 3 Parallelen in Röhrchen mit 500 µg/l 4-NP in Brackwasser (12 °/∞) erfaßt. Es konnte mit bloßem Auge kontrolliert werden, ob eine Entfärbung erfolgte. Am Ende der Inkubation (i.d.Regel nach 6 - 8 Wochen) wurde der pH-Wert durch Pufferzugabe (Borat-Natronlauge, pH 10) in den alkalischen Bereich gebracht, um eine Entfärbung durch Säurebildung auszuschließen. Da teilweise in der ursprünglichen Wasserprobe kein AbbaUER in 1 ml Wasser nachzuweisen war, wurden später auch 10 und 100 ml der Wasserprobe direkt mit 4-NP versetzt und z.T. in 5 Parallelen inkubiert. Es zeigte sich, daß die Bakterien, die niedrige Konzentrationen an 4-NP mineralisierten, nicht mit der beschriebenen Methode erfaßbar waren. Daher wurde in Anlehnung an die von Wiggins (1987) verwendete Methode mit radioaktiven Substraten gearbeitet, und die DPM in 1 ml des nach Austreiben des CO_2 verbleibenden Rests quantifiziert. Als positiv wurde gewertet, wenn mindestens 15 % DPM weniger als bei entsprechenden, unbeimpften oder Formol fixierten Kontrollen vorhanden waren. Auf 5 Parallelen kam jeweils eine Kontrolle. Es wurde in Gewebekulturplatten (Bibby, Stone, Staffordshire) mit 24 Kavitäten in 4 Reihen gearbeitet, die ca 1.5 - 2 ml Medium enthielten. Als Medium wurde gealtertes Brackwasser (12 °/∞) genommen, die Konzentrationen an zugesetztem Substrat betragen 1 µg/l für Phenol und 4-NP, sowie 5 µg/l bei 2-NP. Zusätzlich wurde weiter mit 0.5 bzw. 1 mg/l bei den beiden Nitrophenolen gearbeitet, um eventuelle Unterschiede im Abbau von höheren und niedrigeren Konzentrationen festzustellen. Im Diffusionskammer-Versuch (2.18) wurde mit natürlichem Ostseewasser gearbeitet, um die Bedingungen möglichst ähnlich zur *in situ* Inkubation zu gestalten. Für die Inkubation wurden die Platten zugeklebt und im Exsikkator inkubiert,

damit möglichst wenig Verdunstung auftrat, denn es mußte z.T. 3 Monate bei 20°C bebrütet werden.

Die ermittelten Werte dienen nur zur Abschätzung der Größenordnungen der Abbauraten. Zur Ermittlung des 95 % Vertrauensbereichs müssen sie mit 3.3 multipliziert bzw. durch 3.3 dividiert werden. Wenn zwei Ablesemöglichkeiten gegeben waren, wurden beide Werte angegeben, zusätzlich müßte der Vertrauensbereich entsprechend erweitert werden. Wenn die Bakterien an Partikeln haften, ist eine statistisch gleichmäßige Verteilung nicht gewährleistet. Dies spielte mit Sicherheit bei den Sedimentproben eine Rolle. Bei den anfänglichen Proben wurde daher eine ständig gerührte 1:5 Suspension, die auch für die Abbauratenbestimmung von Phenol und Naphthalin benutzt wurde, zur Anfertigung der Verdünnungsreihen herangezogen. Während der Inkubation wurden die Proben ständig geschüttelt. Es wurde angenommen, daß sich dadurch eine gleichmäßige Verteilung der Abbauer einstellen müßte.

Bei MPN-Reihen mit 2-NP traten z.T. Probleme auf, weil dieser Stoff leicht flüchtig ist. Außerdem war die Verschleppung von Radioaktivität aus der Anreicherungsprobe in die ersten MPN-Verdünnungsstufen kritisch. Es wurde versucht, durch formolfixierte Kontrollen einen Wert zu ermitteln, der 100 % der Aktivität ohne Abbau entsprach. Umbeimpfte Kontrollen waren bei diesen Proben nicht sinnvoll, weil der Eintrag von Radioaktivität durch das Impfgut von 0.1 - 10 ml quantifiziert werden mußte. Das Formol trieb aber, obwohl es gepuffert war, einen Teil des 2-NP aus der Lösung aus. Daher ergaben z.T. die Meßwerte, in denen 2-NP abgebaut, also die verbleibenden DPM nach Ansäuerung niedriger sein sollten, höhere DPM als die Kontrollen. So mußte oft die geringste Verdünnungsstufe als negativ gewertet werden, obwohl in höheren Verdünnungsstufen ein deutlicher Abbau zu verzeichnen war, folglich sind die MPN-Ergebnisse wahrscheinlich zu niedrig und auf jeden Fall fehlerbehaftet. Da 2-NP sehr viel stärker flüchtig ist als 4-NP - es kann eine Wasserstoffbrücke zwischen Nitro- und Hydroxylgruppe bilden - konnten z. T. die Mikrotiterplatten mit 1 mg/l nicht ausgewertet werden, da keine Gelbfärbung mehr zu erkennen war. Bei den festverschließbaren Röhrchen mit 1 - 10 ml Probe waren dagegen die Proben z.T. entfärbt und die Kontrollen immer gelb.

2.16 VERSUCHE MIT SEDIMENTSUSPENSIONEN

In der letzten Phase dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob das Sediment beim Abbau der untersuchten, relativ gut wasserlöslichen Verbindungen einen Beitrag leistet. Besonders bei einer langen Verweilzeit in der Wassersäule aufgrund einer Akp können Fremdstoffe durch Diffusion, Adsorption und Eintrag mit Partikeln ins Sediment gelangen. Um die gleiche Methodik anwenden zu können und einen ersten Einblick zu gewinnen, wurde mit Suspensionen gearbeitet. 5 oder 10 cm³ Sediment (Feuchtgewicht) wurden mit 500 oder 1000 ml sterilfiltriertem oder autoklaviertem Wasser verdünnt, das nach Möglichkeit vom Standort genommen wurde.

Für die Bestimmung der Abbauraten von Phenol und Naphthalin wurde eine 1 : 5 Suspension unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer hergestellt. Mit abgeschnittenen 1 ml Pipettenspitzen wurde immer aus der gleichen Schicht direkt über den schweren Quarzkörnern ein Aliquot entnommen und in kleine Schraubdeckel- oder Serumflaschen gegeben, die mit sterilem Standortwasser bei *in situ* Temperatur vorgekühlt worden waren und das Substrat enthielten. Die Endverdünnung betrug ebenfalls 1 : 100. Diese Proben wurden vollständig angesäuert, um das entstandene CO₂ zu messen, bei den oben beschriebenen größeren Volumina konnten Unterproben ohne Sedimentanteil von 10 - 20 ml genommen werden, bis das Volumen 20 % geringer war als am Anfang. Es wurde die gleiche Methodik benutzt, wie unter 2.12 beschrieben.

Zur Bestimmung der Adsorption der eingesetzten Fremdstoffe an das Sediment wurde am Ende der Versuche die in Lösung verbleibende Radioaktivität der Proben, in denen Abbau stattgefunden hatte, sowie der Kontrollen bestimmt. Besonders an den Kontrollen konnte der Einfluß von Adsorption ans Sediment im Vergleich zu Kontrollen mit Wasserproben quantifiziert werden. Um eine Bilanz aufzustellen, wurde zusätzlich bei einigen Versuchen mit 4-NP versucht, direkt einen kleinen Teil gewaschenen und getrockneten Sediments feinverteilt in einem 1:1 Gel aus Wasser und Szintillationscocktail (Lumagel, Baker) zu messen (SHIMP & YOUNG 1988). Die Meßeffizienz war allerdings schon durch das hohe Wasservolumen sehr gering. Die Proben wurden mit einem Umrechnungsfaktor multipliziert, der über das Quenching einer bekannten Menge an Toluol-Standard im System mit Wasser und Sediment ermittelt werden konnte.

2.17 VERSUCHE MIT BIOMETERFLASCHEN

In der Literatur werden oft Biometer-Flaschen (Bellco Glass, Inc., Vineland, N.J.) erwähnt, die zur Untersuchung des Abbaus organischer Chemikalien zu CO₂ eingesetzt werden können. Sie ermöglichen eine häufige Entnahme des gebildeten Kohlendioxids durch einen Seitenarm ohne Beeinflussung der Wasser-, Boden- oder Sedimentprobe im Hauptteil. Als CO₂-Adsorbens wird eine anorganische Base verwendet, sodaß eine Anreicherung flüchtiger organischer Substrate sehr unwahrscheinlich ist. In dieser Arbeit wurden 2.5 ml 0.5 N Natronlauge verwendet, die täglich oder seltener durch eine Metallkanüle mit stumpfem Ende mit einem Stück Silikonschlauch, der bis zum Boden des Seitenarms reichte, quantitativ ausgetauscht wurden. Sämtliche Stopfen waren aus Silikongummi. Zu Belüftung diente eine mit Watte verschlossene Kanüle. Als Szintillationscocktail wurden 3.5 ml Ultima Gold (Packard) verwendet, weil dieser Cocktail reproduzierbarere Werte und kaum Lumineszenz nach Zugabe von NaOH ergab. Die Berechnung der CO₂-Produktion erfolgte durch Aufsummieren aller gemessenen DPM. Eine Subtraktion von Kontrollwerten über den Blindwert hinaus erwies sich beim 4-NP als unnötig, da in über 3 Monaten weniger als 1 % in der Natronlauge aufgefangen wurde.

Ein Vorteil dieser Methode ist die Probennahme ohne Beeinflussung der Wasser- oder Sedimentprobe, sodaß sie vor allem bei Versuchen eingesetzt wurde, in denen die Länge der Akklimationsperiode unbekannt war. Eindeutige quantitative Ergebnisse sind aber bei Seewasserproben nicht zu bekommen, da theoretisch zwar das gebildete CO_2 des gesamten Wasserkörpers (100 ml) ausgetrieben werden kann, aber durch die große Pufferkapazität des im Seewasser enthaltenen Carbonat-Puffers ohne Ansäuerung ein Großteil in Lösung bleibt. Es wird also immer nur ein Bruchteil des gebildeten CO_2 über Diffusion und Austausch mit dem atmosphärischen CO_2 in die Gasphase und in die Natronlauge gelangen, somit ist die genaue Abbaukinetik nicht festzustellen. Zur Ermittlung der gesamten Mineralisierung wurden alle Proben am Ende der Versuche angesäuert. Die Biometerflaschen wurden in erster Linie zur qualitativen Beschreibung des Abbaus benutzt, und um das überwiegend verwendete System mit Ethanolamin als CO_2 -Adsorbens zu kontrollieren.

Es konnten einige Vorversuche mit hohem Sedimentanteil durchgeführt werden, um den Einfluß einer Adsorption abzuschätzen. Es wurden 4 cm^3 Sediment (Trockengewicht $7.34 \pm 0.3 \text{ g}$) in ein 20 ml Glasgefäß gegeben, und mit einem Glaspatel konnte das radioaktive Substrat gründlich im Sediment verteilt werden. Dann wurde der Stab mit 4 ml Standortwasser abgespült, das Gefäß auf den Boden der Biometerflasche gestellt und dort bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei allen weiteren Versuchen wurden 1 cm^3 Sediment zu 100 ml sterilem Standortwasser gegeben oder 100 ml Standortwasser genommen. Alle Biometerflaschen wurden bei Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) inkubiert.

2.18 VERSUCHE MIT DIFFUSIONSKAMMERN

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob ein Abbau von Fremdstoffen, die eine Akklimationsperiode zeigen, in der Natur möglich ist. Zur Annäherung an diese Fragestellung wurden zwei Versuche mit sogenannten Diffusionskammern durchgeführt, die *in situ* inkubiert werden können (McFETERS & STUART 1972, VASCONCELOS & SWARTZ 1976). Sie bestehen aus einem Polycarbonat Hohlzylinder mit 9.5 cm Innendurchmesser und 170 ml Volumen. Über die Öffnungen können mittels Dichtungen aus Viton, Auflegscheiben und Flügelschrauben Polycarbonatfilter (Nuclepore, Tübingen) verschiedener Porenweiten montiert werden. So steht die Wasserprobe in der Kammer in direkter Verbindung zum umgebenden Wasser. Durch geeignete Porengrößen kann der Austausch von Bakterien oder Protozoen gesteuert werden. Es wurde die Porengröße $0.2 \mu\text{m}$ benutzt, sodaß nur niedermolekulare Verbindungen ausgetauscht werden konnten. Eine Beprobung erfolgte mit 20 ml Spritzen durch einen Silikonstopfen, der mit einer Kanüle durchstoßen wurde. Während der Inkubation wurde er durch einen Schraubdeckel gesichert. Es wurden maximal 20 ml pro Tag entnommen. Um den Abbau von 4-NP unter *in situ* Bedingungen zu untersuchen, wurde $220 \mu\text{g}$ 4-NP zusammen mit gewaschenem in hochreinem Aqua dest. gelösten Agar in Dialyseschläuche (Spektra-Por, No.3) gegeben. Auf diese Weise konnte in der Kammer eine maximale Konzentration von 1.3 mg/l 4-NP erreicht werden. Diese

Reservoirs wurden mit Bindfaden in die Kammern gehängt, sodaß sie in der Mitte frei schwebten. Alles wurde bei 110°C 30 min autoklaviert. Kontrollen zeigten, daß das 4-NP quantitativ erhalten blieb. Die Diffusionsverzögerung durch Agar und Dialyseschlauch bewirkte, daß den Bakterien für ca 8 - 12 h 4-NP zur Verfügung stand. Daher wurden z.T. die Reservoirs während des Versuchs durch neue ersetzt.

Im ersten Versuch wurde eine Reinkultur, die 1 mg/l 4-NP bei 10°C im Labor in 5 Tagen abgebaut hatte, zu einer natürlichen Wasserprobe gegeben. Sie wurde in einer Diffusionskammer 1 Woche in der Kieler Förde am Institutssteg in ca 1 m Tiefe inkubiert, während die Temperatur von 16 auf 14°C abnahm. Als Vergleich diente eine Kammer in der sich nur die Wasserprobe befand. Es wurden 575 µl der Reinkultur zugesetzt, so daß die Zahl der zugesetzten Zellen 5 % der Gesamtbakterienzahl einer natürlichen Wasserprobe aus der Kieler Förde vom Vortag entsprach. Die Entwicklung der Abbauerpopulation konnte über Verdünnungsreihen (MPN) mit 1 mg/l 4-NP und Inkubation bei 20°C verfolgt werden, zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Proben zur Ermittlung der GBZ und für photometrische Messungen genommen. Nach 3 Tagen konnte zu beiden Kammern durch Auswechseln des Dialysesäckchens erneut 4-NP zugesetzt werden.

Der zweite Diffusionskammer-Versuch wurde mit Zusatz einer akklimatisierten Mischkultur durchgeführt und dauerte 14 Tage. Es konnte mit insgesamt 5 Kammern gearbeitet werden. Alle Kammern enthielten eine natürliche Biozönose. Zu 3 Kammern wurden zusätzlich je 11 ml (ca 5%) einer Mischkultur zugesetzt, die bereits zweimal 500 µg/l 4-NP bei z.T. 20 und z.T. 10°C abgebaut hatte. Die Wassertemperatur zu Beginn des Freilandversuches betrug 8.8°C und am Ende nur noch 6.1°C. Zu einer Kammer ohne und zu zwei Kammern mit akklimatisierter Mischkultur wurden am 4.Tag erneut 4-NP zugesetzt. Der 4-NP Abbau und die Entwicklung der Abbauer in der Biozönose wurden über photometrische Messungen und über MPN-Reihen verfolgt. Die Kammern wurden 2 Wochen wie oben beschrieben inkubiert. Vor allem die erste Woche wurde intensiv beprobt, um die Entwicklung der Abbauer mit und ohne 4-NP Zusatz über die MPN-Methode zu verfolgen. Nach zwei Wochen wurden zusätzlich zum Wasser auch MPN-Reihen von den Filtern angefertigt, da im ersten Versuch mikroskopisch ein starker Bewuchs festgestellt worden war. Dafür wurden steril Stücke definierter Fläche (4.52 cm²) ausgestanzt, dreimal durch Spülen in sterilem bidestillierten Wasser von lose anhaftenden Zellen befreit und in Verdünnungswasser aufgenommen. Diese Proben wurden 3 x 5 sec mit 10 s Pause bei 50 Watt mit Ultraschall behandelt (Labsonic 1510), wobei der Ultraschallstab mit Alkohol desinfiziert wurde. Danach wurden sie wie Wasserproben verdünnt und MPN-Reihen durchgeführt. Eine mikroskopische Kontrolle der so behandelten Filter zeigte nur noch vereinzelt Kolonien sehr kleiner Kokken.

Die gesamte Filterfläche der Kammer betrug 113.5 cm², zusätzlich gehörte die innere Oberfläche der Polycarbonatkammer mit 80.21 cm² dazu, die vermutlich ebenso dicht besiedelt werden konnte, wie die PC-Filter. Das Volumen der Kammern betrug 170 ml,

sodaß die mit der MPN-Methode ermittelten Zahlen pro ml oder cm^2 ungefähr miteinander verglichen werden können.

Filter, die nicht mit Ultraschall behandelt worden waren, wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (Nanolab, Zeiss) auf ihren Bewuchs hin untersucht. Die Proben wurden vorher mit Alkohol entwässert, einer Kritisch-Punkt-Trocknung unterzogen und mit Gold-Palladium besputtert.

2.19 DATENAUSWERTUNG MIT EINEM KURVENANPASSUNGSPROGRAMM

Es ist möglich den zeitlichen Verlauf von vielen Kurven zum Schadstoffabbau durch Modelle zu beschreiben, die auf den zwei omnipräsenten Variablen Substratkonzentration und Zahl der Abbauer basieren (SIMKINS & ALEXANDER 1984). So kann man indirekt Informationen über das zugrundeliegende Verhalten der Population gewinnen und z.B. feststellen, ob eine kleine Anfangspopulation vorhanden ist, die erst wachsen muß, oder ob der Abbau unabhängig von der Bakterienzahl ist. Auch der Einfluß der eingesetzten Konzentration, die schnelles, langsames oder gar kein Wachstum ermöglichen kann, ist mit von Modellen abgeleiteten Kurven erfaßbar. Über Ratenkonstanten, die gleichartige Kurvenverläufe mit einer Kennzahl versehen, kann der Abbau in unterschiedlichen Biotopen, bei unterschiedlichen Verbindungen und z.T. in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander verglichen werden, da diese Konstanten unabhängig von Bakterienzahl und Konzentration sind. Auch eine Einbeziehung des Wachstums auf anderen C-Quellen ist möglich (SCHMIDT, Dissertation 1986).

In dieser Arbeit konnte mit einem Computerprogramm gearbeitet werden, das Parameter für exponentielles, logistisches, logarithmisches und lineares Wachstum aus Meßwerten ableitet. Außerdem konnte es für das Monod-Modell mit Wachstum sowie das Michaelis-Menten-Modell und ein First-Order-Modell ohne Wachstum benutzt werden (SCHMIDT et al. 1985). Durch nichtlineare Regression erfolgt eine Annäherung an die aus den Meßwerten erstellte Kurve über Algorithmen nach der Methode von Marquardt (ROBINSON 1985). Das MARQFIT-Programm minimiert die Summe der Fehlerquadrate zwischen den Meßdaten und der Modellkurve (SIMKINS & ALEXANDER 1984). Die von diesen Modellen abgeleiteten Parameter lassen Schlüsse auf die Größe der Anfangspopulation zu, die mit den durch die MPN-Methode ermittelten Werten verglichen werden können.

Simulations-Modelle für den Verbleib von Fremdstoffen in der Natur brauchen Ratenkonstanten, die zu den oben genannten Parametern gehören, um den mikrobiellen Abbau als quantitative Größe einbeziehen zu können.

Das Vorkommen einer Akklimationsperiode können die Modelle allerdings nicht einbeziehen, hier kann die Länge der Akklimationsphase als quantitatives Beschreibungsmerkmal dienen. Für den Einfluß einer Adsorption müssen andere Modelle benutzt werden, die von zwei Kompartimenten ausgehen (SCOW et al. 1986).

3. ERGEBNISSE

3.1 VORVERSUCHE ZUM ABBAU ORGANISCHER CHEMIKALIEN IN BRACK- UND SALZWASSER

In ersten Vorversuchen konnte der Abbau von 2- und 4-Nitrophenol, das in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/l}$ zugesetzt worden war, in küstennahem Brack- und Meerwasser nachgewiesen werden. Bei Thiourea war unter den gleichen Bedingungen keine Abnahme festzustellen. Daraufhin wurde der Abbau der Nitrophenole (im weiteren mit 2- und 4-NP abgekürzt) intensiver untersucht.

Bei einer Forschungsfahrt in den Atlantik konnte der Abbau von 2- und 4-Nitrophenol in verschiedenen, auch küstenfernen Wasserkörpern untersucht werden. Es wurden 4 Stationen beprobt: küstenfernes Nordatlantikwasser, freies Mittelmeerwasser, küstennahe Überlagerungszone von Mittelmeer- und Atlantikwasser und Tidenausstromwasser vor Faro (Portugal). Nur bei einer Station konnte ein Abbau des zugesetzten 2-Nitrophenols zwischen 2 und 3 Monaten Versuchsdauer unter den gleichen Bedingungen wie bei den oben angeführten Vorversuchen festgestellt werden. Es handelt sich um eine Station im Mittelmeer (nahe Gibraltar), das 4-NP war nach 5 Monaten noch nicht abgebaut. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß in diesen gering bis gar nicht belasteten Wasserkörpern kaum Bakterien vorkommen, die Nitrophenole abbauen können. Evtl. waren die Bedingungen zum Abbau ungünstig, z.B. könnten im Atlantikwasser Nährstoffe gefehlt haben (Tab.1, 2.2).

Bei einem Versuch mit Nordseeproben, in dem eine küstennähere Station (Feuerschiff Elbe 1) und eine küstenfernere Station (nordwestlich von Helgoland) auf ihr Potential zum Nitrophenol-Abbau hin verglichen wurden, konnte nach 5 - 6 Wochen Dauer eine Abnahme des 2- und 4-NP in den Proben der küstennahen Station festgestellt werden. Bei der küstenfernen Station trat nur sehr selten ein Abbau auf. Weitere Untersuchungen von Nordseeproben zeigten in der Regel in allen Proben einen Abbau von 4-NP, der aber mit zunehmender Entfernung von der Küste langsamer und weniger intensiv verläuft (RHEINHEIMER et al.1990).

Bei den folgenden Substanzen konnte nach 12 Wochen Dauer kein Abbau in Brack- und Salzwasser festgestellt werden: Ethylendiamintetraacetat, Naphthalindisulfonsäure, 2,4,6-Trichlorphenol, Tetrapropylenbenzolsulfonat und Thiourea. Bei EDTA und Trichlorphenol zeigten sich Veränderungen der Peakformen und -lage bei den photometrischen Messungen, jedoch kein deutlicher Rückgang.

Zwei weitere Versuche mit Brackwasser aus der Kieler Förde, die sehr intensiv auf den Abbau und die Entwicklung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften untersucht wurden, zeigten einen Abbau der Nitrophenole in jeweils sehr ähnlichen Zeiträumen. 2-Nitrophenol wurde zwischen 7 und 11 Tagen abgebaut, 4-Nitrophenol zwischen 11

und 15 Tagen. Abbau bedeutet hier, daß der photometrisch erfaßbare Peak vollständig verschwunden ist, die Nitrophenole dürften also zumindest von den Bakterien aufgenommen worden sein. Evtl. wurden sie auch durch Detoxifizierungsmechanismen in huminstoffähnliche Verbindungen überführt (ZEYER et al.1986).

Die Veratmung zu Kohlendioxid, die allein einen vollständigen Abbau beweist, wurde in späteren Versuchen erfaßt. Ein chemischer Abbau, der nicht auf Mikroorganismen zurückzuführen ist, kann ausgeschlossen werden, weil sich die Substanzen in sterilen Kontrollen nicht veränderten. Die Entwicklung der Mikroorganismen wurde über folgende Parameter verfolgt: Gesamtbakterienzahl, Biomasse, mittleres Zellvolumen, Längensklassenzusammensetzung, Zahl der Saprophyten und die Anwesenheit von Nitrophenolabbauern bzw.-toleranten Bakterien.

3.1.1 EINFLUSS AUF GESAMTBAKTERIEN- UND SAPROPHYTENZAHL

Die Gesamtbakterienzahl (GBZ) veränderte sich im Versuchsverlauf kaum im Vergleich zur Nullprobe, der keine Fremdstoffe zugesetzt wurden. Sie zeigte eine starke Zunahme auf max. 8×10^6 /ml in den ersten 3 Tagen bei allen 3 Ansätzen. Danach ergab sich eine Abnahme auf 0.5×10^6 /ml, die gleichzeitig zur Entwicklung einer starken Flagellatenblüte mit maximal 2×10^4 Flagellaten/ml nach 3 - 4 Tagen stattfand. Dann gingen die Flagellaten stark zurück; nach 6 - 12 Tagen waren wieder vereinzelt Flagellaten vorhanden. Nach Abbau von 250 µg/l 2-NP war nur eine sehr geringfügige, statistisch nicht signifikante Zunahme der GBZ erkennbar. Nach Abbau von 4-NP ergab sich keine Zunahme.

Die Saprophytenzahl (SZ) zeigte einen kleinen Anstieg in der 2-NP-Probe nach 270 h von 5×10^4 auf 9.7×10^4 /ml, der schon nach 340 h beendet war. Dieser Peak könnte insofern von Bedeutung sein, als zwischen 220 und 270 h das 2-NP abgebaut wurde. Im zweiten Versuch konnte ein geringfügiger Saprophytenpeak (von 12 auf 22×10^4 /ml) bei der 4-NP Probe beobachtet werden, nachdem das 4-NP abgebaut worden war. Beim 2-NP wurde der Peak in diesem Fall nicht beobachtet. Die SZ schien also kein zuverlässiger Indikator für den NP Abbau bei niedrigen Konzentrationen zu sein.

Das mittlere Zellvolumen zeigte in beiden Versuchen einen Anstieg bei der Anreicherungskultur mit 2-Nitrophenol, nachdem dieses abgebaut worden war. Die Längensklassen zeigten vor allem Unterschiede zwischen den Kulturen mit 2-Nitrophenol vor dem Abbau (Abb.2) und nach dem Abbau (Abb.3). Vor dem Abbau lag eine relativ gleichmäßige Verteilung über die verschiedenen Längensklassen vor, die bei allen drei Inkubationen ähnlich war. Nach dem Abbau dagegen unterschied sich die 2-NP-Probe deutlich von den anderen beiden. Es dominierten stäbchenförmige Bakterien von 2 und 3 µm Länge, die vorher stark vertretenen Kokken mit 0.5 µm Durchmesser waren nur beim 2-NP in ihrem prozentualen Anteil zurückgegangen. Dieser Befund deutet auf ein Wachstumsereignis typischer heterotropher Formen aufgrund einer neu erschlossenen C-Quelle in der 2-NP-Probe hin.

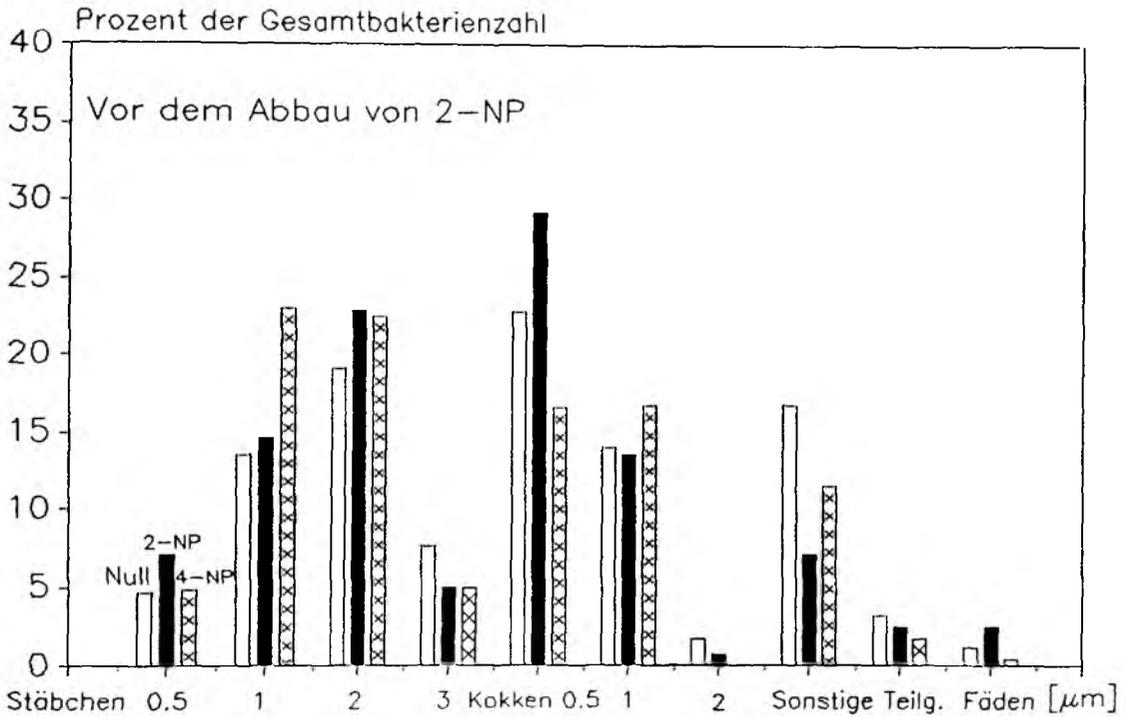


Abb.2: Aufteilung der mikrobiellen Biozönose in Längenklassen vor dem Abbau von 2- und 4-NP. Außer zum Nullwert waren je 250 $\mu\text{g/l}$ Fremdstoff zugesetzt worden.

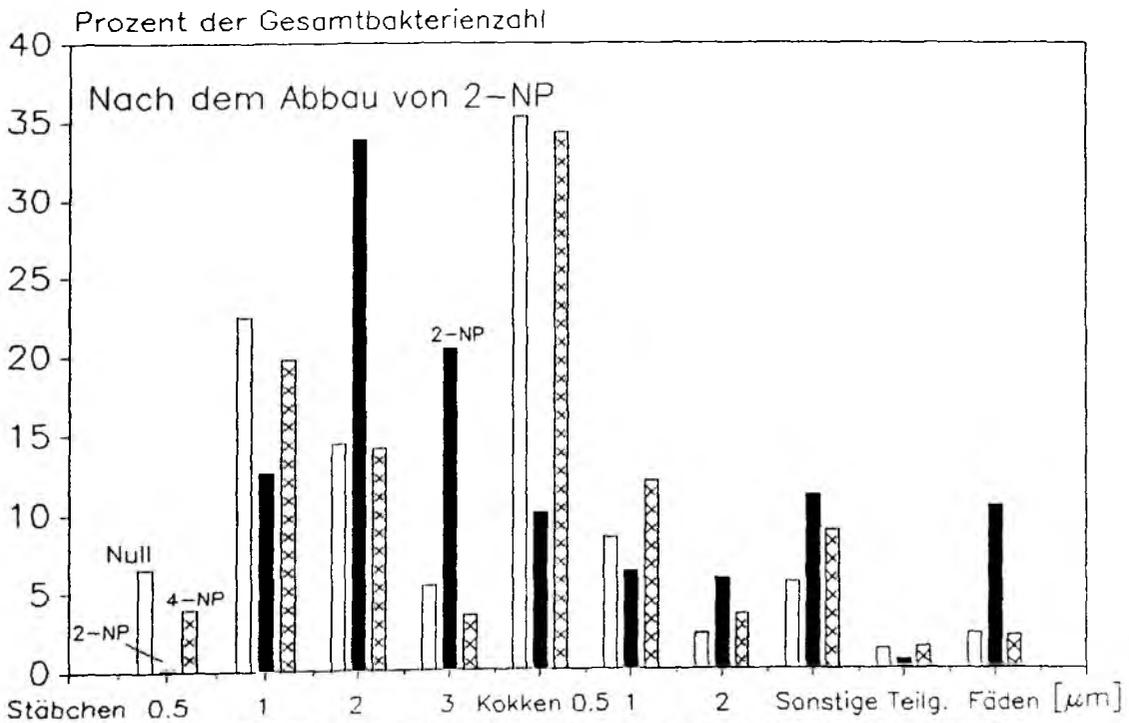


Abb.3: Längenklassen der mikrobiellen Biozönose nach dem Abbau von 2-NP.

3.1.2 ANREICHERUNG VON ABBAUERN AUF NITROPHENOL-HALTIGEM AGAR

Die Zahl der Nitrophenol abbauenden Bakterien auf einem festen Medium kann nur zusammen mit der Zahl NP-toleranter Bakterien ermittelt werden, da diese sich ebenso gut auf den Agarplatten entwickeln können, wenn die Konzentration des Fremdstoffs noch nicht toxisch ist (es wurden 6 mg/l zugesetzt). Es ließ sich aber zeigen, daß nur dann das durch Nitrophenol gelb gefärbte Medium entfärbt werden konnte, wenn auf ihm Bakterien aus einer Anreicherungskultur wuchsen, in der auch gerade Nitrophenol abgebaut wurde.

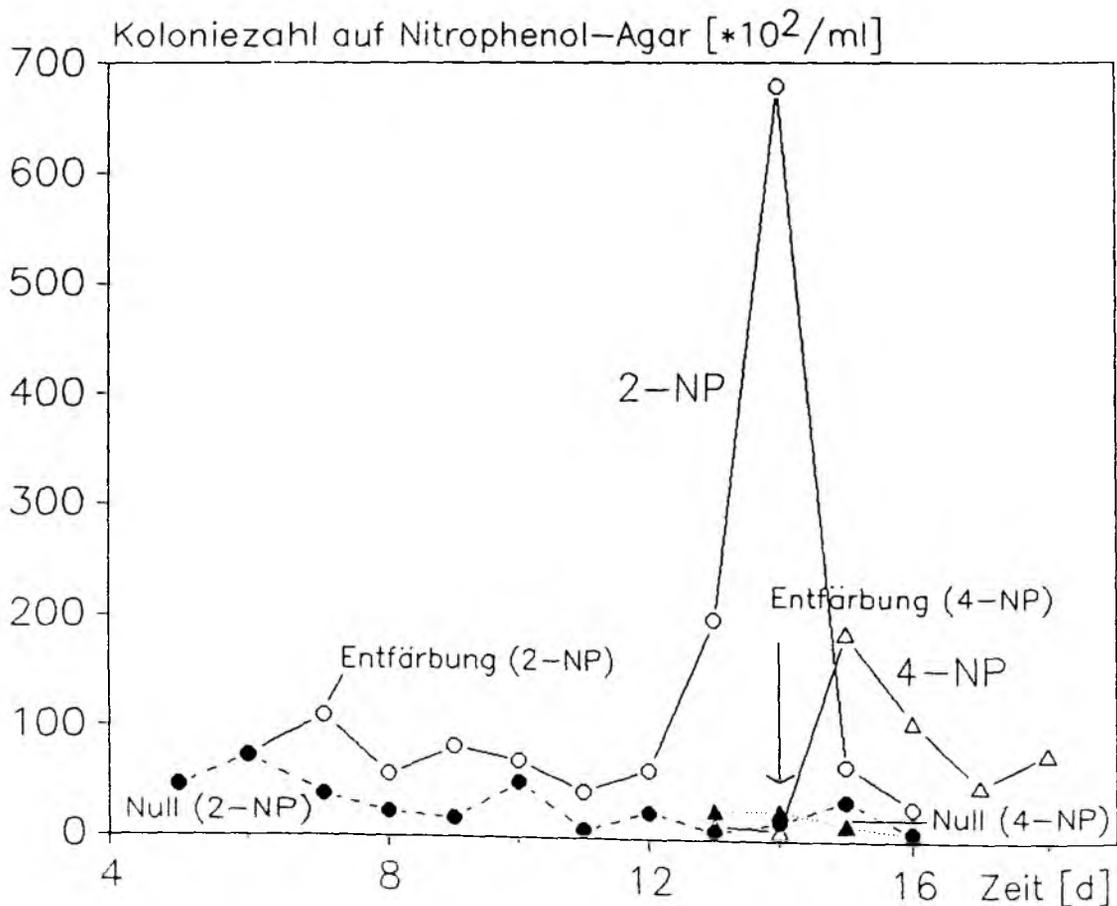


Abb.4: Entwicklung der Nitrophenol abbauenden Bakterien sowie der NP toleranten Bakterien auf NP-Agar. Der Abbau in den Kolben mit 250 µg/l Fremdstoff und die Entfärbung der entsprechenden Agarplatten erfolgte bei 2-NP nach 7 und bei 4-NP nach 14 Tagen. 2- und 4-NP-Agarplatten mit Proben aus dem Nullwert (vgl. Abb.2) blieben bis zum Ende des Versuchs gelb gefärbt.

Zu Beginn der Versuche wurden keine Agarplatten entfärbt, obwohl Koloniewachstum sichtbar war. Bei ausplattierten Unterproben aus den Nullproben (ohne NP-Zusatz) trat während der ganzen Zeit keine Entfärbung des NP-Agars auf und es war nur geringfügiges Koloniewachstum zu erkennen. In den Ansätzen mit 2- und 4-NP konnte eine Entfärbung nach 7 bzw. 14 Tagen und eine z.T. verzögert nachfolgende Zunahme der Koloniezahlen festgestellt werden (Abb.4). Die Zunahme wurde sowohl beim 2-NP als auch beim 4-NP festgestellt, ging aber sehr schnell wieder zurück, während die Entfärbung bis zum Ende des Versuchs erhalten blieb. Von den entfärbten Platten konnten Reinkulturen isoliert werden, die 2- oder 4-NP abbauten.

3.1.3 ABBAU VON 2- UND 4-NP DURCH REINKULTUREN

Die isolierten Reinkulturen konnten die Nitrophenole sowohl in Agar als auch in flüssigem Medium abbauen, dem keine weitere Kohlenstoffquelle zugesetzt worden war. Der Abbau scheint also kein cometabolischer Prozeß zu sein. 28 Reinkulturen konnten isoliert und näher untersucht werden. Sie stammten überwiegend aus der Kieler Förde und wurden zu unterschiedlichen Jahreszeiten mit 250 µg/l 2- oder 4-NP angereichert. 7 Stämme konnten beide Nitrophenole abbauen, einer auch 2,4-Dinitrophenol. 3 Stämme bauten 2- oder 4-NP in Süß-, Brack- und Salzwasser ab, die meisten Stämme waren jedoch an den Abbau in Brackwasser angepaßt. Bei 8 Stämmen wurde Nitrophenol ebenfalls in Süßwasser abgebaut. Alle getesteten Stämme konnten den Abbau auch bei 10°C durchführen.

Im Rahmen einer Diplomarbeit (MEUTER 1989) konnten 15 dieser Stämme taxonomisch eingeordnet werden. Es zeigte sich, daß 10 der Abbauerstämme *Pseudomonaden* waren, wobei 2 verschiedene Typen der Art *Pseudomonas fluorescens* identifiziert werden konnten. Außerdem konnten die Gattungen *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* und wahrscheinlich *Achromobacter* mit 2 verschiedenen Identifizierungsmethoden bestimmt werden.

Ein Versuch wurde durchgeführt, um den Abbau von 4-NP in niedrigen Konzentrationen durch eine Reinkultur zu überprüfen. Es wurde eine Reinkultur genommen, die 4-NP bei 250 - 1000 µg/l in Süß-, Salz- und Brackwasser abbauen konnte. Bei einer Konzentration von 8 µg/l wurde in 10 Tagen weniger als 1 % zu CO₂ umgesetzt, die Aufnahme in die Zellen war ebenfalls zu vernachlässigen. Es zeigte sich also, daß eine Konzentration von 250 µg/l noch zu hoch sein kann, um die Bakterien anzureichern, die 4-NP im unteren Mikrogramm-Bereich abbauen.

Bei allen untersuchten Reinkulturen wurde beim Abbau von 2-NP und 4-NP Nitrit in annähernd stöchiometrischer Menge freigesetzt.

3.1.4 ERGEBNIS DER HPLC

Nur mit der Ionenpaar-Chromatographie konnte eine befriedigende Trennung von Phenol, 2-, 4-Nitrophenol und 2,4-Dinitrophenol erreicht werden. Selbst wenn die Verbindungen im Verhältnis 1 : 24 gemischt wurden - dies entspricht 4 % Verunreinigung pro Substanz - waren noch alle 4 Peaks deutlich zu erkennen, wenn auch der 2-NP Peak von dem sehr großen 4-NP Peak nicht mehr ganz sauber abgetrennt werden konnte. Die Retentionszeiten (in Minuten) für die einzelnen Substanzen bei Messung der UV-Absorption betragen:

Phenol	4.8 - 5
4-NP	17.6 beim Verhältnis 24:1, 15.0 beim Verhältnis 1:1, Dauer des ganzen Peaks 13.7 - 18.6
2-NP	20.0 - 20.1
2,4-DNP	25.0 - 25.5

Eine Eichung des Systems zur Messung der Radioaktivität mit ^{14}C -Glucose ergab eine minimale Durchflußzeit von 4 min für diese Substanz, die keine Wechselwirkung mit der HPLC-Säule eingeht. In der UV-Meßzelle war Glucose nicht meßbar. Es wurden 2 verschiedene Lieferungen an radioaktivem 4-NP überprüft, die eine war ca 1 Jahr alt und wurde in den 1988 durchgeführten Versuchen benutzt, die andere war gerade neu gekauft worden. Eine Quantifizierung der Verunreinigungen ergab sich wie folgt.

Tabelle 2: Alte ^{14}C -4-Nitrophenol-Lösung:

Fraktionszeit [min]	Retentionsz. [min]	Versuch einer Identifikation	Anteil [%]
3.2- 7.4	6.2	polare Substanz	1.8
7.5- 8.2	7.8	Phenol	0.9
8.3-14.0	kein Peak	evtl. noch Phenol	2.4
14.5-24.0	18.5	4-NP	91.1
24.5-27.0	26.0	2-NP	1.3
27.5-29.2	27.5	unbekannt	1.2
29.5-38.2	30.5	2,4-DNP	1.3

Tabelle 3: Neue ¹⁴C-4-Nitrophenol-Lösung:

Fraktionszeit [min]	Retentionsz. [min]	Versuch einer Identifikation	Anteil [%]
0.0-11.5	5.2	polare Substanz	3.9
11.5-15.0	12.7	Phenol?	0.7
15.0-25.0	19.2	4-NP	83.7
25.0-28.0	27.0	2-NP,zweigipflig	6.0
28.0-32.0	30.0	2,4-DNP	4.9
32.0-40.0	34.0	unbekannt	0.9

Beim Auftragen von 0.1 μ Ci des 4-NP auf die Säule ergab sich bei der alten Probe ein 4-NP Peak bei 18.5 min (von 14.5 - 24.5), der 91.1 % der zugesetzten DPM ausmachte. Diese Zahl wurde über ein Aufsummieren aller Fraktionen ermittelt, die nach zeichnerischer Darstellung den 4-NP Peak ausmachten. Ein mögliches "Tailing" konnte nicht berücksichtigt werden. Die genauere Auswertung mit einem Integrator war wegen der starken Schwankung der Basislinie, die wahrscheinlich eine Vielzahl von kleinen Peaks darstellt, nicht möglich. Von diesen vielen Peaks konnten einige tentativ den oben angeführten Verbindungen zugeordnet werden, indem zur UV-Retentionszeit 4 min addiert wurden.

Leider blieb eine Unsicherheit, da der 4-NP Peak, der als einziger mit Sicherheit bei beiden Messungen zu finden sein muß, bei der Probe, die in Fraktionen aufgefangen wurde, etwas früher seine Retentionszeit hatte (18.5 statt 17.6 + 4 min). In diesem Fall konnte die Radioaktivität nicht direkt gemessen werden, da eine Verwirbelung in der Meßzelle ausgeschlossen werden sollte. Eine Fehlerquelle war der Fraktionssammler, seine Zeiteinstellung war ungenau, der Beginn wurde nicht ganz erfaßt und es wurde während dieses Laufs von einer Fraktion pro 0.1 min auf 1/0.5 min umgeschaltet. Von den eingesetzten 223900 DPM konnten nur 204000 DPM in 84 Fraktionen wiedergefunden werden, trotzdem wurde von jeder Fraktion ein Blindwert von 50 DPM abgezogen, um das Rauschen der Basislinie wegzufiltern.

Mit der neuen Probe wurden mehrere Läufe durchgeführt, einige mit angeschlossenem Durchflußzähler und Schreiber und einer, bei dem die Fraktionen gesammelt wurden. Im Schreiberdiagramm konnten keine Peaks außer dem des 4-NP quantifiziert werden, weil die Empfindlichkeit zu gering war. Da im Lauf mit der alten Probe der 4-NP Peak sehr dominierte und dadurch sehr breit war, wurde in diesem Lauf mit der neuen Probe unmarkiertes Gemisch im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Außerdem wurde weniger Aktivität benutzt, um eine Verschleppung durch Festhaften an den Schläuchen der Apparatur zu verringern. Als die Aktivität in 76 Fraktionen aufgefangen wurde, konnten 30450 DPM insgesamt gemessen werden, obwohl nur

27790 DPM eingesetzt wurden. Entweder war die 20 μ l Pipette, mit der der Standard pipettiert wurde, ungenau, oder es wurde 4-NP durch Desorption freigesetzt, das bei vorherigen Läufen in der Apparatur adsorbiert war. Nach Subtraktion eines Blindwerts von 10 DPM ergeben sich noch 29690 DPM.

Bei diesem Lauf konnte deutlich gezeigt werden, daß eine polare Substanz ca 4 % der Radioaktivität der neuen 4-NP Lösung ausmachte. Sie trat in keinerlei Wechselwirkung mit der Säule und eluierte sofort, wie Glucose im Probelauf. Phenol schien nicht wie befürchtet eine Rolle zu spielen, es stellte maximal 1 % der radioaktiven Verbindungen dar. Die Verunreinigungen, die erst nach dem 4-NP eluierten, waren problematisch zu quantifizieren. Denn evtl. lag der 4-NP Peak, der nicht wieder zur Basislinie zurückging, noch darunter und machte damit bis zur Hälfte der ermittelten Werte aus. Trotzdem blieben noch mindestens 6 % der Radioaktivität übrig, die mit Sicherheit durch Verunreinigungen bedingt waren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß beide getesteten Chargen bis zu 10 % Verunreinigungen enthalten, obwohl das 4-NP laut Hersteller Amersham zu 96 % rein ist. Besonders bei der Ermittlung von natürlichen Abbauraten muß also über eine längere Zeit verfolgt werden, ob die anfänglich meist sehr geringe Mineralisierung von 4-NP 10 % überschreitet. Erst wenn sichergestellt ist, daß 4-NP und keine Verunreinigung abgebaut worden ist, kann aus dem anfänglichen linearen Teil der CO₂-Zunahme mit der Zeit eine Abbaurrate ermittelt werden. Wenn dagegen, wie es häufig beobachtet werden konnte, ein zweiphasiger Abbau vorliegt, wird höchstwahrscheinlich in der ersten Phase eine andere Verbindung mineralisiert und nicht das eingesetzte 4-NP. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, das 4-NP zu reinigen und damit diese Frage endgültig zu klären. Es konnte nur eine analytische HPLC-Säule benutzt werden und die Möglichkeit zur Präparation einer hochreinen, radioaktiven Substanz war nicht gegeben.

3.2 ABBAU VON 4-NITROPHENOL

In einem ersten Versuch zur Erfassung der Mineralisierung von 4-NP wurde eine Konzentration von 8 μ g/l eingesetzt, und es wurde bei 20°C inkubiert. Während der ersten 4 - 5 Tage stieg das gemessene CO₂ linear um 1 % pro Tag an. Danach flachte der Kurvenverlauf im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Induktions- und Wachstumsphänomenen ab, und erst nach 16 Tagen waren 10 % zu CO₂ veratmet (Abb.5). Ein gleichzeitig inkubierter Kolben mit 250 μ g/l unmarkiertem 4-NP war schon nach 14 Tagen vollständig entfärbt (vgl.3.2.3). Zwischen 16 und 35 Tagen stieg die Mineralisierung bei allen 3 Parallelen mit 8 μ g/l 4-NP auf über 50 % an, um nach 38 Tagen bei 61 % zu stagnieren. Zur Aufnahme durch die Zellen kann bei diesem Versuch nichts ausgesagt werden, weil die Eigenadsorption durch die verwendeten Filter (Celluloseacetat, Sartorius) zu groß war. Die in Lösung verbleibende Radioaktivität betrug nur 23.1 % der eingesetzten Menge, dieser Wert schließt von den Zellen in Biomasse umgewandeltes 4-NP, sowie im Medium befindliche Abbauprodukte ein. In der abiotischen Kontrolle wurden bis zum Ende des Versuchs nur 0.7 % mineralisiert.

3.2.1 ABBAU BEI NIEDRIGEN TEMPERATUREN

Bei einem Vergleich des Abbaus in Wasserproben von zwei Stationen aus der Kieler Bucht wurde bei *in situ* Temperatur ($4 \pm 1.5^\circ\text{C}$) inkubiert und vor allem die Anfangsphase intensiv beprobt, um dem Abbau unter natürlichen Winter-Bedingungen nahe zu kommen. Die Probenentnahme erfolgte am 8.2.1988. Die Station Gabelsfach liegt abseits von direktem Landeinfluß (Abb.1, 2.2). Ab dem 18.2. wurde die Inkubation bei Zimmertemperatur fortgesetzt, da das Kühlsystem seit dem 15.2. langsam aussetzte. Ein Kolben wurde von Anfang an bei Zimmertemperatur inkubiert, um einen Vergleich mit dem vorhergehenden Versuch zu haben, sonst konnte mit zwei Parallelen gearbeitet werden. Es wurden sehr niedrige Abbauraten von 4-NP in den ersten 8 Stunden von ca 1 ng/lxh (ca 0.01 %) ermittelt, wobei sich die beiden Stationen nur geringfügig unterschieden. Bei 20°C betrug die Abbauraten ca das Doppelte. Über MPN-Reihen waren jedoch nur Abbauer in der Probe aus der Kieler Förde nachzuweisen und zwar nur im größten eingesetzten Volumen von 1 ml, eine Vermehrung trat in 10 Tagen nicht auf.

Nach 4 Tagen flachte die CO_2 -Entwicklung bei 20°C ab, wie schon vorher beobachtet (vgl. Abb.5). Bei diesen anfänglichen Abbauraten wäre das gesamte 4-NP ($8\mu\text{g/l}$) erst in ca 11 Monaten bei 4°C und in ca 5.5 Monaten bei 20°C abgebaut. Es bleibt aber zu bedenken, daß die Abbauraten während der Inkubation z.T. noch geringer wurde und daß es nicht sicher war, ob wirklich 4-NP oder ob nur Verunreinigungen mineralisiert wurden.

Nach insgesamt 38 Tagen wurde untersucht, ob eine Akklimation aufgetreten war. Es zeigte sich, daß in der bei 20°C inkubierten Probe 43 % mineralisiert waren, die anderen beiden Proben aus der Förde hatten 17 bzw. 4 % CO_2 gebildet, die Proben von Gabelsfach nur 2.9 und 3.6 %.

Die Gesamtbakterienzahl hatte in allen Proben aus der Förde von 1.70×10^6 auf $0.10 - 0.16 \times 10^6/\text{ml}$ abgenommen, bei der Gabelsfach Station lag sie am Anfang bei 0.70×10^6 und sank auf $0.18 - 0.36 \times 10^6/\text{ml}$.

Bei einer Forschungsfahrt im April 1988 fand sich bei 6.5°C Wassertemperatur als höchste Abbauraten $0.028\%/h$ in der Schlei bei Kappeln, d.h. die eingesetzte Konzentration von $8\mu\text{g/l}$ wäre bei dieser Temperatur und sonst gleichbleibenden Bedingungen in der Schlei in ca 6 Monaten abgebaut. Bei einer im freien Wasser gelegenen Station betrug die Abbauraten nur noch ein Drittel.

Bei weiteren Versuchen zum Abbau bei niedrigen Temperaturen konnte gezeigt werden, daß in 3.5 Monaten kein Abbau bei Konzentrationen an 4-NP von 0.8 und $8\mu\text{g/l}$ bei 4°C erfolgte. Bei 10°C wurde in 3 Parallelen mit $250\mu\text{g/l}$ 4-NP und 50 ml Wasser aus der Kieler Förde in 3 Monaten kein Abbau festgestellt, während bei 20°C ein Abbau nach 4 - 9 Wochen erfolgte. In einem weiteren Versuch mit 5 Parallelen und 100 ml Wasser konnte nur in einer Parallele mit $500\mu\text{g/l}$ 4-NP nach 8 Wochen bei 10°C eine vollständige Entfärbung festgestellt werden, die weiteren Parallelen zeigten in

4.5 Monaten keinen Abbau. Bei 20°C wurde 4-NP in allen 5 Parallelen nach 22 - 40 Tagen abgebaut.

Es zeigte sich in Versuchen mit akklimatisierten Mischkulturen, daß ein Abbau bei 10°C möglich war. Der Abbau von 250 - 500 µg/l dauerte 6 Tage bei 10°C und 3 Tage bei 20°C (vgl. 3.2.4). Es schien also hauptsächlich die Akklimation bei 10°C eingeschränkt zu sein.

3.2.2 ABBAU BEI UNTERSCHIEDLICHEN KONZENTRATIONEN

Bei Untersuchung der Mineralisierung einer größeren Spannbreite an Konzentrationen von 0.08 - 250 µg/l konnten zwei verschiedene Kurventypen beobachtet werden. Bei den beiden höheren Konzentrationen setzte die Entfärbung zwischen 7 und 10 Tagen, die Mineralisierung erst nach 10 bis 13 Tagen ein. Sie war nach 23 - 30 Tagen mit einer Veratmung zu 68 - 72 % abgeschlossen. Im niedrigen Konzentrationsbereich setzte eine signifikante Mineralisierung erst nach 17 Tagen ein und erreichte erst nach 34 Tagen 51 - 52 % CO₂ (Abb.6). Wahrscheinlich war der Abbau hier noch nicht ganz zum Erliegen gekommen.

Die Aufnahme durch die Zellen war in allen Ansätzen am Ende des Versuches kleiner als 6 %. Direkt nachdem die CO₂-Produktion auf über 50 % gestiegen war, konnte eine Aufnahme von 8 - 12 % bei den beiden höheren Konzentrationen festgestellt werden. Die in Lösung verbleibende Radioaktivität betrug 42.5 % bei 0.08 µg/l, 29.6 % bei 0.8, 89.7 % bei 8, 21.2 % bei 80 und 21.7 % bei 250 µg/l. Versuche, das Filtrat gesondert aufzufangen, da die genannten Werte die Aufnahme in die Zellen enthalten, ergaben nur um 1 - 2.6 % erniedrigte Werte für das reine Filtrat, obwohl die Filter eine Inkorporation von 3 - 5.4 % zeigten. Als Bilanz ergab sich, daß am Ende des Versuchs 84 - 97 % der eingesetzten Radioaktivität in den verschiedenen Fraktionen wiedergefunden werden konnten.

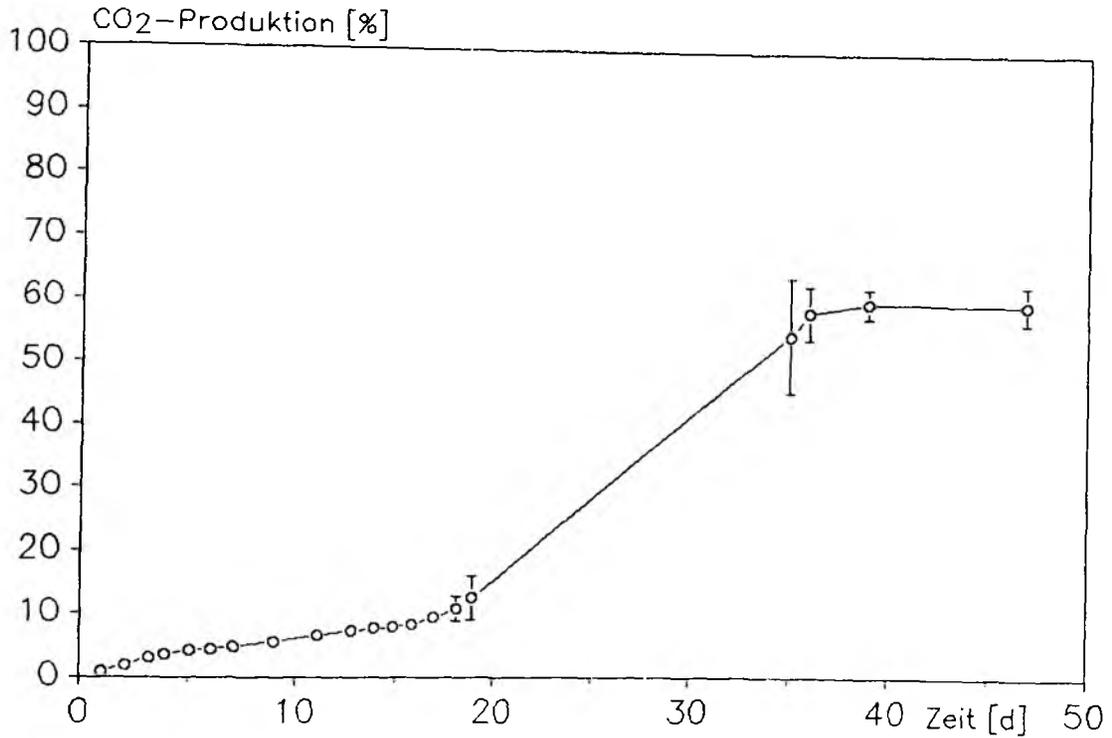


Abb.5: Mineralisierung von 8 µg/l 4-Nitrophenol in Wasserproben aus der Kieler Förde. Die Standardabweichung ist in allen Abbildungen, für die 3 Parallelen herangezogen werden konnten, nur gezeigt, wenn sie mehr als 1.5 % ausmacht.

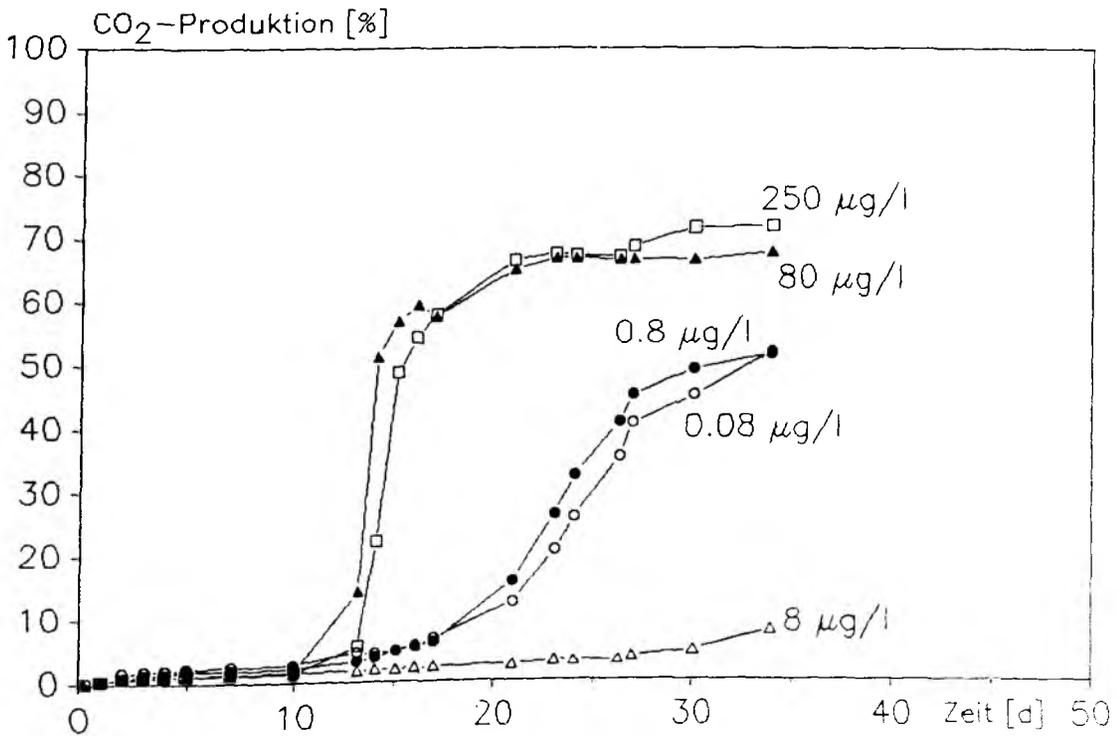


Abb.6: Mineralisierung von 4-NP in einer Konzentrationsreihe von 0.08 bis 250 µg/l in Wasserproben aus der Kieler Förde.

Tabelle 4: Abbauraten nach erfolgter Akklimation

Abbaurate [ng/lxh]	Abbaurate [%/h]	Konzentration [µg/l]
0.17	0.21	0.08
1.65	0.21	0.80
494.46	0.62	80.00
1914.54	0.77	250.00

Es zeigte sich ein proportionaler Anstieg bei den niedrigen Konzentrationen, bei 80 und 250 µg/l war die Abbaurate jedoch höher, als nach Extrapolation erwartet werden konnte (Tab.4). Ein Grund hierfür war die Zunahme der 4-NP abbauenden Bakterien in diesen beiden Ansätzen (vgl. 3.2.2.1). Bei Ermittlung der GBZ konnte nur bei der höchsten Konzentration eine Zunahme der bakteriellen Biomasse auf das Doppelte des Nullwerts festgestellt werden, die sich kurz nach erfolgtem Abbau zeigte (Tab.5). Nach 16 Tagen lag diese Zunahme z.T. an einer Erhöhung der GBZ, aber überwiegend an der Vergrößerung des mittleren Zellvolumens; am Ende des Versuchs nach 35 Tagen war nur noch eine deutlich gegen den Nullwert erhöhte GBZ festzustellen.

Tabelle 5: Entwicklung von Gesamtbakterienzahl (GBZ), mittlerem Zellvolumen (MZV) und bakterieller Biomasse (BBM) nach Abbau von 4-NP in Konzentrationen von 0.08 - 250 µg/l.

Proben-Typ	Tage	GBZ Stdabw [10 ⁶ /ml]		MZV Stdabw [µm ³]		BBM Std. Kokken [µgC/l]		Kokken [%]
Urprobe	0	0.308	0.044	0.103	0.024	3.32	1.32	26
Null	0.22	0.551	0.084	0.198	0.081	12.55	7.02	22
250	0.22	0.563	0.134	0.104	0.026	7.14	4.01	30
Null	16	0.554	0.045	0.108	0.029	5.94	2.18	20
8	16	0.669	0.091	0.099	0.024	6.81	2.68	28
80	16	0.579	0.107	0.094	0.035	4.20	1.88	32
250	16	0.821	0.143	0.154	0.044	12.33	4.86	22
Null	35	0.382	0.058	0.132	0.030	5.32	1.94	24
0.08	35	0.155	0.081	0.095	0.025	1.36	0.65	20
0.8	35	0.540	0.049	0.070	0.022	3.81	1.41	22
8	35	0.211	0.093	0.090	0.021	1.44	0.63	20
80	35	0.816	0.094	0.071	0.023	5.65	1.78	32
250	35	1.310	0.205	0.070	0.022	10.83	5.28	22

Leider fehlen in dieser Konzentrationsreihe, in der nur mit jeweils einer Parallele pro Konzentration gearbeitet werden konnte, die Daten für die mittlere Konzentration von 8 $\mu\text{g/l}$. Im gesamten Versuchsverlauf konnte hier kein vollständiger Abbau festgestellt werden, nach 34 Tagen waren erst 8 % abgebaut. Wenn man die Ergebnisse, die in Abbildung 5 dargestellt sind, in diese Graphik (Abb.6) übertrüge, könnte man die Entwicklung bei 8 $\mu\text{g/l}$ als ähnlich mit den beiden niedrigeren Konzentrationen ansehen. Bei keiner dieser 3 Konzentrationen scheint Wachstum möglich gewesen zu sein.

Ein interessantes Phänomen, das indirekt den Abbau von Verunreinigungen beweist, wurde zu Beginn der Inkubation festgestellt. Bei den 3 höheren Konzentrationen waren jeweils nur 8 $\mu\text{g/l}$ radioaktiv markiert, der Rest wurde in unmarkierter Form zugegeben. Beim Vergleich der CO_2 -Produktion in den ersten Tagen fiel auf, daß sie für alle 3 Ansätze identisch war, obwohl eine geringere Produktion an markiertem CO_2 bei den höheren Konzentrationen durch die Verdünnung zu erwarten wäre. Bei ihnen ist das radioaktive 4-NP mit der 10 - 30 fachen Menge an unmarkiertem 4-NP verdünnt, sodaß aus dem Abbau stammendes $^{14}\text{CO}_2$ entsprechend durch unmarkiertes CO_2 verdünnt sein müßte, das nicht gemessen werden kann. Die Ausbeute an $^{14}\text{CO}_2$ müßte also geringer sein, wenn nicht die Abbauraten bei den höheren Konzentrationen proportional ansteigt. Dies ist aber bei 80 oder 250 $\mu\text{g/l}$ nicht zu erwarten, die begrenzte Enzymmenge der Anfangspopulation müßte gesättigt sein. Eine Erklärung, die durch die HPLC Ergebnisse bestätigt wurde (3.1.4), bietet die Möglichkeit, daß eine radioaktive Verunreinigung und nicht das 4-NP selbst abgebaut wurde. Diese Verunreinigung ist in allen Ansätzen mit gleicher Konzentration an radioaktivem 4-NP in gleicher Menge vorhanden, und kann also in gleichem Ausmaß mineralisiert werden, unabhängig von der Verdünnung des 4-NP durch inaktives 4-NP. Letzteres war in der Reinheitsstufe purissimum p.A. erhältlich und war zu 99,99 % rein (siehe 2.1), das radioaktive 4-NP war nur zu 90 - 94 % rein (vgl.3.1.4).

3.2.2.1 ENTWICKLUNG DER 4-NP ABBAUER

Nach Abbau der höheren Konzentrationen an 4-NP (16 Tage) wurden MPN-Röhrchen mit 500 $\mu\text{g/l}$ 4-NP vom Nullwert und den Konzentrationen 8, 80 und 250 $\mu\text{g/l}$ angefertigt. Es zeigte sich eine Zunahme der Bakterien um mehr als 3 Zehnerpotenzen bei 80 und 250 $\mu\text{g/l}$ (Ablesewert: $>2400/\text{ml}$). Bei 8 $\mu\text{g/l}$ und der Nullprobe konnten keine Abbauer nachgewiesen werden (Ablesewert: $<3/\text{ml}$). Nach 35 Tagen, als der Versuch beendet wurde, konnten von allen 6 Ansätzen Verdünnungsreihen hergestellt werden. Es waren keine Abbauer in den Ansätzen mit 0 - 8 $\mu\text{g/l}$ nachweisbar, bei 80 $\mu\text{g/l}$ waren sie auf 10^1 pro ml zurückgegangen (15/ml), bei 250 $\mu\text{g/l}$ waren noch 10^3 Abbauer/ml vorhanden (2400/ml).

3.2.3 EINFLUSS EINER VORAKKLIMATION

Am Beispiel des 4-NP wurde untersucht, welchen Einfluß es hat, wenn eine an 4-NP gewöhnte bakterielle Lebensgemeinschaft mit neuem Fremdstoff in anderer Konzentration versehen wird. Es wurde ein schneller Abbau von $8 \mu\text{g/l}$ nach Akklimation an $250 \mu\text{g/l}$ beobachtet, d.h. die Enzyme arbeiteten gut mit $1/30$ der Konzentration. Ohne vorherige Akklimation an 4-NP schien sich eine "falsche" Lebensgemeinschaft entwickelt zu haben, denn auch in 28 Tagen setzte kein Abbau ein (Abb.7).

Bei Zusatz von $250 \mu\text{g/l}$ zu einer Kultur, die bereits $1 \mu\text{g/l}$ abgebaut hatte, dauerte es mehr als 16 Tage bis zur Entfärbung, die Bakterien waren also nicht optimal an diese Konzentration angepaßt.

Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt, um die Akklimation an sehr geringe Konzentrationen zu untersuchen. Zu einer Wasserprobe von der Oderbank, in der nach 3 Monaten in 3 Parallelen $1 \mu\text{g/l}$ abgebaut worden war, wurden erneut $5 \mu\text{g}$ 4-NP gegeben. Außerdem wurde nach Waschen der Zellen durch mehrfaches Zentrifugieren und Aufnehmen in gealtertem Brack- oder frischem Ostseewasser erneut $1 \mu\text{g/l}$ 4-NP zugesetzt (2.14). Bei keinem der Ansätze konnte eine erneute quantitative Mineralisierung von 4-NP in den folgenden 38 Tagen festgestellt werden (Abb.8). Maximal 6 % wurden im Ansatz mit frischem Ostseewasser mineralisiert.

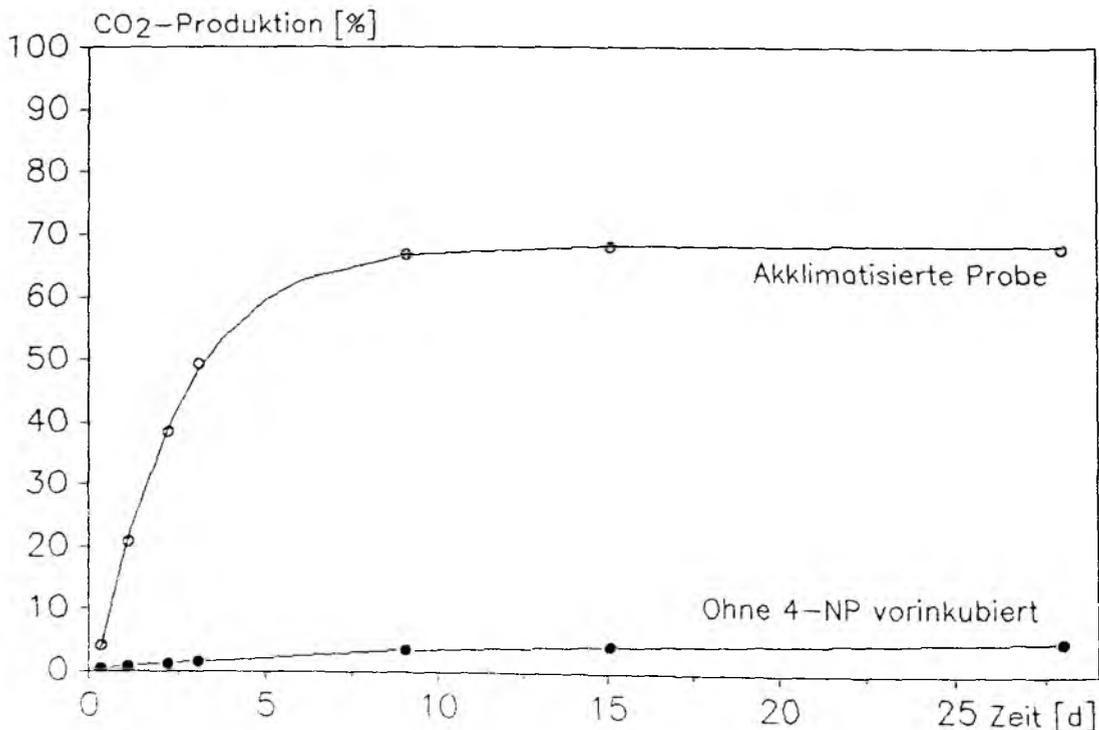


Abb.7: Mineralisierung von $8 \mu\text{g/l}$ 4-Nitrophenol in vorinkubierten Wasserproben aus der Kieler Förde. Die Kurve für die akklimatisierte Probe wurde mit einem First-Order-Modell (3) angepaßt.

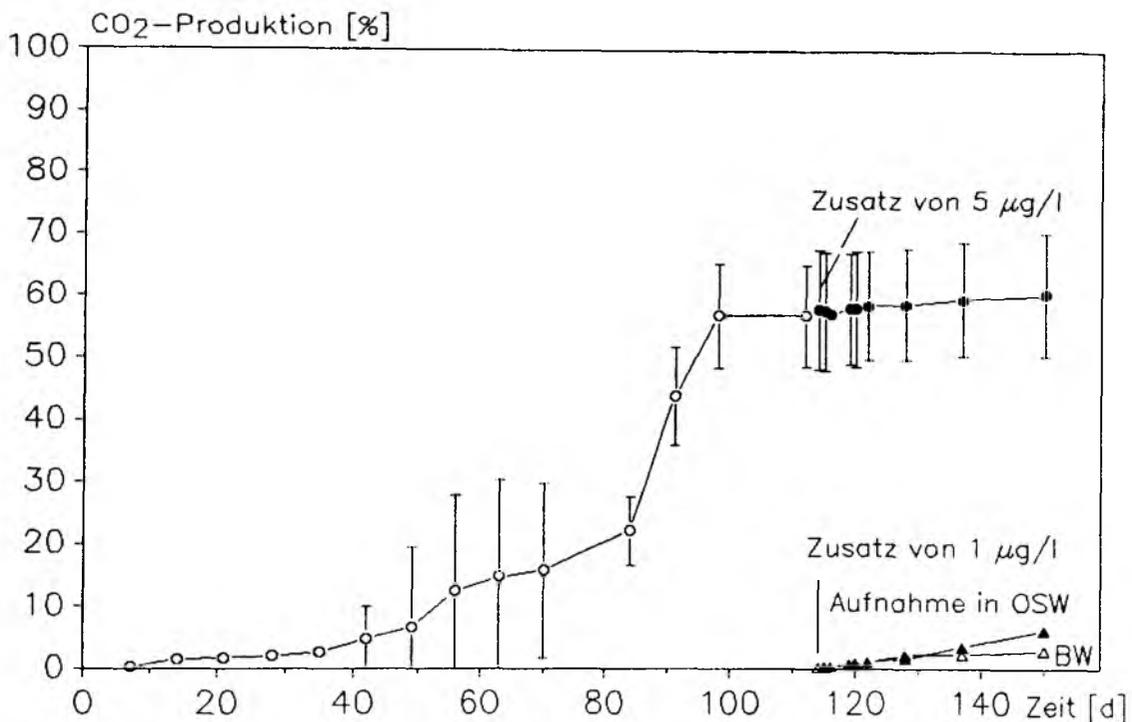


Abb.8: Mineralisierung von 1 µg/l 4-Nitrophenol in Wasserproben von Station D (Oderbank). Nach 110 Tagen wurden erneut 5 µg/l zugesetzt oder die gewaschenen Proben wurden in gealtertem Brack- (BW) oder frischem Ostseewasser (OSW) mit 1 µg/l inkubiert.

3.2.4 SIMULATIONSVERSUCH ZUM 4-NITROPHENOL-ABBAU

Es wurde versucht eine Situation zu simulieren, in der Abbauer und Fremdstoff in ein Gewässer eingeleitet werden. Es wurden 5 % einer an den Abbau von 4-NP akklimatisierten mikrobiellen Lebensgemeinschaft zu verschiedenen behandelten Wasserproben gegeben (vgl.2.14), um herauszufinden, ob folgende Faktoren den Abbau, bzw. das Wachstum der Abbauer fördern oder verlangsamen:

- organische Nährstoffe
- anorganische Nährsalze
- Protozoen
- konkurrierende Bakterien
- unterschiedliche Temperaturen

3.2.4.1 EINFLUSS DES WASSERKÖRPERS

Bei allen Proben setzte der Abbau fast ohne Verzögerung ein, aber es waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen zu beobachten (Abb.9 und Abb.10). Am schnellsten erfolgte der Abbau im gealterten Brackwasser (BW), das kaum organische Nährstoffe, keine konkurrierenden Bakterien und keine Protozoen enthält. In den ersten 100 h verhielten sich die 3 weiteren Ansätze gleich, es zeigte sich ein langsamer Anstieg der CO₂-Produktion beim frischen, sterilfiltrierten und mit Cycloheximid versehenen Wasser. Danach näherte sich der Ansatz mit Cycloheximid (CY) in den nächsten 100 h dem mit Brackwasser und lief ab ca 200 h mit ihm parallel.

Beim sterilfiltrierten Wasser (ST) zeigte sich diese Annäherung nicht, sondern der Abbau verlief langsam und bis nach 170 h fast linear. Danach nahm die Steigung deutlich ab. Die stärkste Verlangsamung des 4-NP Abbaus zeigte sich bei den Proben, denen unbehandeltes, frisches Fördewasser (FF) zugesetzt worden war. Nach 100 h trat eine Stagnation des Abbaus auf. Kurz vor dem Ende des Versuchs holte der Abbau den im sterilen Wasser ein, um dann bei ca 56 % mindestens 2 Tage zu stagnieren, während er beim sterilen Wasser noch bis auf 64 % CO₂ anstieg (Abb.10). Es ist nicht sicher, ob der Abbau bei diesen beiden Ansätzen bei Versuchsende schon abgeschlossen war.

Die Inkorporation in die bakterielle Biomasse bot bei den 20°C Ansätzen ein interessantes Bild: nach 70 h gab es beim Ansatz mit gealtertem Brackwasser (BW) einen Peak (Abb.11). Die Proben mit Cycloheximid (CY) hatten über die ganze Zeit eine relativ hohe Aufnahme mit einem Peak nach 170 h. Die Ansätze mit sterilfiltriertem und unbehandeltem, frischem Wasser (ST und FF) zeigten zu beiden Zeitpunkten je einen kleinen Peak, die Aufnahme bewegte sich jedoch bei diesen beiden Probentypen nur zwischen < 1 und maximal 2.3 %. Die Standardabweichung war i.d.Regel unter 0.5 %.

Eine Bilanzierung am Ende ergab, daß bei den Brackwasser und Cycloheximid Ansätzen nur noch 12 % der Radioaktivität in der Lösung waren. 1 - 2 % davon befanden sich in den Zellen, es wurden aber nur 72 - 74 % als CO₂ wiedergefunden. Evtl. wurde ein kleiner Teil in partikuläre Substanz überführt, die sich am Boden der Versuchsgefäße ablagerte. Beim Filtrieren könnte sie mit erfaßt worden sein, weil die Gefäße ausgespült wurden, kleinere Partikel können aber die Filter mit 0.2 µm Porenweite passieren. Die Filtrationsgeschwindigkeit verringerte sich häufig im Laufe von Inkubationen, und es konnte bei höheren eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden, daß sich partikuläre Substanz bildete (vgl.3.4.5).

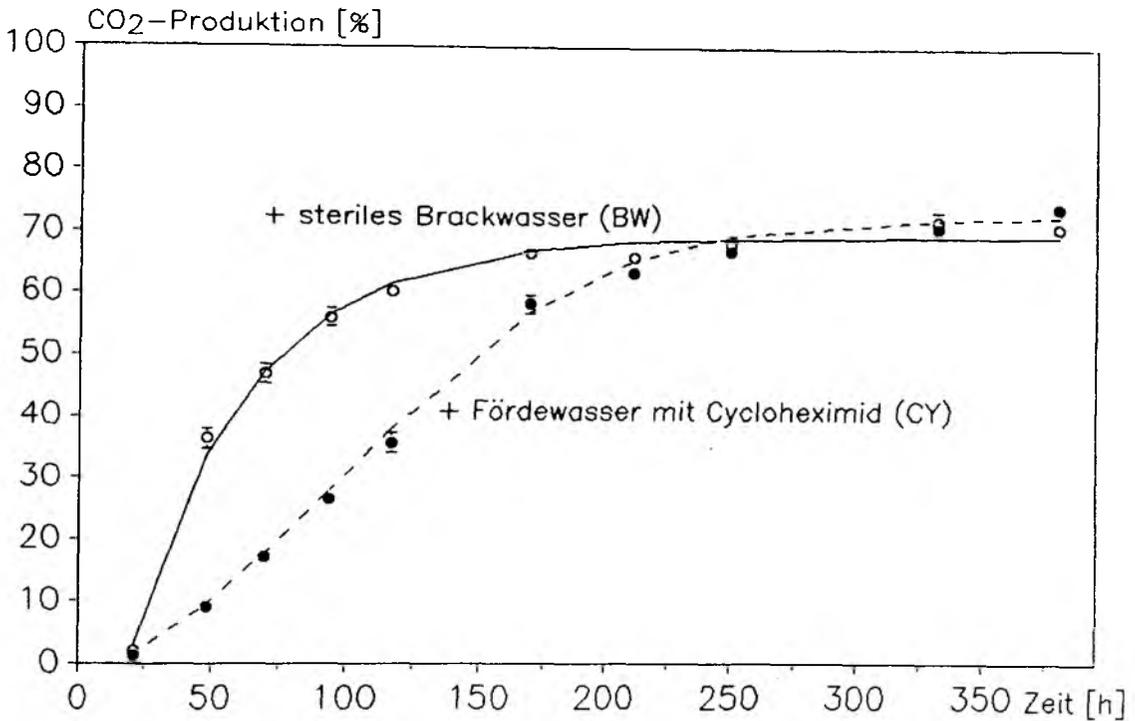


Abb.9: Mineralisierung von 8 $\mu\text{g/l}$ 4-NP bei 20°C durch eine akklimatisierte Mischkultur aus der Kieler Förde, die auf 5 % verdünnt wurde. Die Kurven wurden mit Modell 3 (siehe Abb.7) und 4 (für logistisches Wachstum) angepaßt.

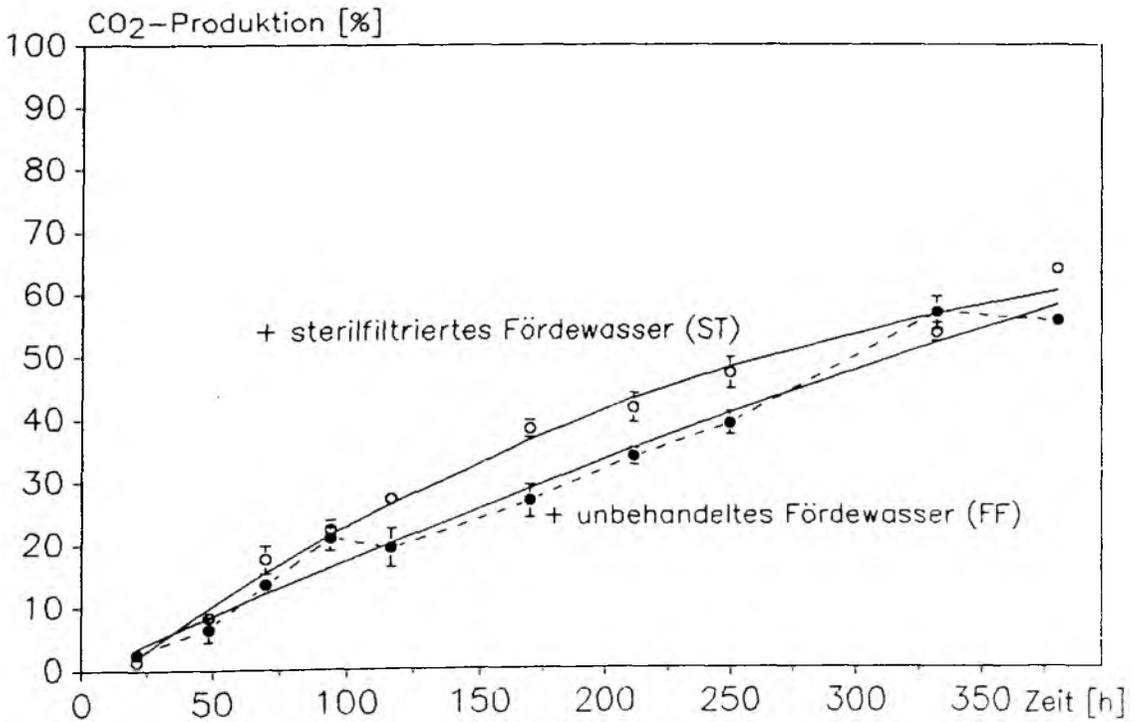


Abb.10: Legende siehe Abb.9. Die Kurven wurden mit Modell 4 angepaßt. Die gestrichelte Linie verbindet die Meßwerte beim unbehandelten Fördewasser.

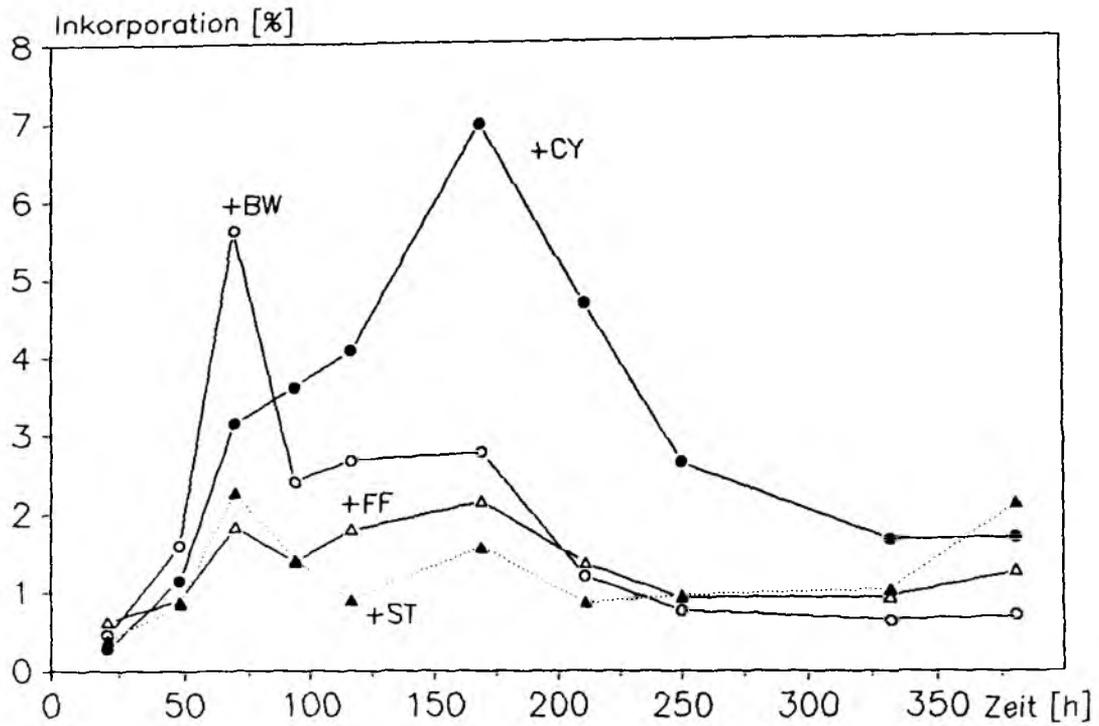


Abb.11: Inkorporation der Radioaktivität in die bakterielle Biomasse beim 4-NP Abbau durch eine akklimatisierte Mischkultur. Abkürzungen siehe Abb.9 und 10.

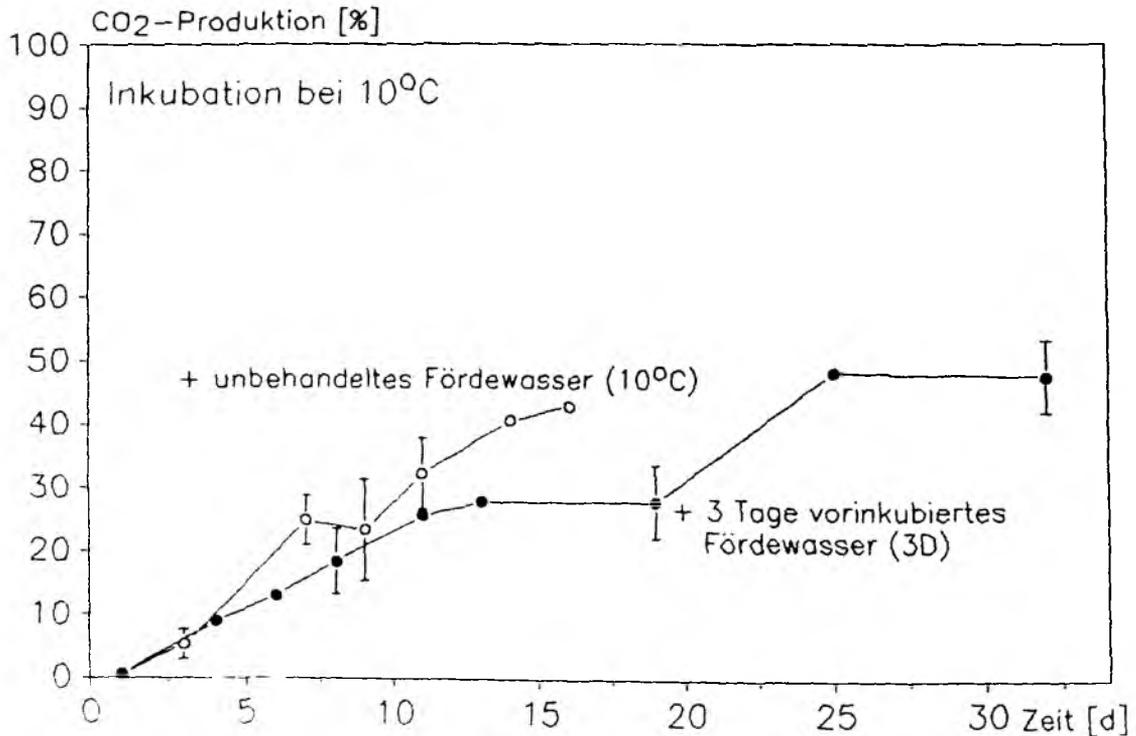


Abb.12: Mineralisierung von 4-NP bei 10°C durch eine akklimatisierte Mischkultur. Legende siehe Abb.9. Es wurde keine Kurvenanpassung durchgeführt.

3.2.4.2 EINFLUSS DER TEMPERATUR UND EINFLUSS EINER NÄHRSAZZUGABE

Die beiden Ansätze, die bei 10°C inkubiert wurden, hatten einen annähernd ähnlichen Abbauverlauf. Der Abbau von 4-NP setzte bei 10°C fast sofort ein, verlief allerdings etwa halb so schnell wie bei 20°C. Es zeigten sich Plateaus in der CO₂-Produktion nach 7 bzw. 11 Tagen (Abb.12). Bei der 10°C-Inkubation stagnierte der Abbau für ca 2 Tage. Bei der Inkubation, die erst nach beobachteter Protozoenblüte (3D) begonnenen wurde, blieb das produzierte CO₂ für ca 8 Tage bei 23 - 28 %. Danach stieg die CO₂-Produktion in beiden Fällen wieder an, mit 43 % war sie beim 10°C-Ansatz sicher noch nicht ganz beendet, bei "3D" schien sie bei 48 + -6 % zu bleiben.

Weitere Gründe für eine Verlangsamung des Wachstums einer Abbauer-population können fehlende anorganische Nährstoffe sein. Die Zugabe von N-und P-Salzen konnte bei akklimatisierten Kulturen, denen unbehandeltes, frisches Wasser zugesetzt wurde, den Abbau nicht stimulieren. Er war nach 3 - 4 Tagen mit und ohne Zusatz von Nährsalzen abgeschlossen.

3.2.4.3 REAKTION DER BAKTERIEN- UND FLAGELLATENPOPULATION

Beim Brackwasser und Cycloheximid Ansatz trat wahrscheinlich Wachstum der 4-NP Abbauer auf, denn die GesamtbakterienzahL stieg beim Ansatz mit Cycloheximid maximal auf das 6.5 fache. Im Brackwasser stieg sie auf das Doppelte (Tabelle 6). Es wurden im Gegensatz zur Cycloheximid Probe einige Flagellaten nach 7 Tagen Versuchsdauer beobachtet, die aus der zugesetzten Abbauerprobe stammen müßten.

Im Ansatz mit sterilfiltriertem Fördewasser konnten in der Anfangsprobe 840 Flagellaten/ml beobachtet werden. Auch die GesamtbakterienzahL war signifikant höher als bei der Brackwasserprobe. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet die Annahme, daß die Sterilfiltration (0.2 µm Nuclepore-Filter) nicht sehr erfolgreich war. Es konnte zwar keine Flagellatenblüte mit resultierendem extremen Rückgang der GBZ nach 4 Tagen wie beim frischen Wasser festgestellt werden, aber die GBZ ging in 7 Tagen auf ein Drittel zurück (Tab.6).

Im Ansatz mit unbehandeltem, frischen Fördewasser sanken GesamtbakterienzahL und bakterielle Biomasse zweimal stark ab, das mittlere Zellvolumen vergrößerte sich bis zum Versuchsende. Es waren die ganze Zeit Flagellaten vorhanden mit zwei Maxima am Anfang und nach 7 Tagen.

Tabelle 6: Entwicklung der Flagellatenzahl (FZ), der Gesamtbakterienzahl (GBZ), des mittleren Zellvolumens (MZV) und der bakteriellen Biomasse (BBM) im Simulationsversuch

Probe	Tage	FZ [10 ³ /ml]	GBZ Stdabw. [10 ⁶ /ml]	MZV Stdabw. [μm ³]	Kokken [%]	BBM Stdabw. [μgC/l]			
Brackwasser (BW)	0	0.27	0.21	0.05	0.42	0.11	20.00	10.35	4.99
	4	NV	0.23	0.02	NV	NV	NV	NV	NV
	7	1.37	0.42	0.05	0.83	0.20	18.00	33.95	13.77
	16	0.00	0.32	0.04	0.73	0.16	16.00	23.95	6.27
+ Cycloheximid (CY)	0	0.32	0.74	0.12	0.39	0.15	14.00	36.23	19.56
	4	0.00	4.80	0.49	0.42	0.11	26.00	206.01	76.08
	7	0.00	2.56	0.28	0.29	0.08	36.00	79.31	28.62
	16	0.00	1.19	0.16	0.30	0.07	30.00	31.69	10.50
Sterilfiltriert (ST)	0	0.84	0.88	0.15	0.56	0.17	18.00	39.51	16.64
	4	NV	0.44	0.03	NV	NV	NV	NV	NV
	7	NV	0.30	0.02	NV	NV	NV	NV	NV
	16	0.14	0.56	0.09	0.48	0.13	18.00	26.60	10.01
Frisch (FF)	0	1.37	1.40	0.20	0.43	0.15	10.00	50.44	20.58
	4	0.68	0.66	0.14	0.35	0.12	24.00	27.52	12.94
	7	1.23	1.03	0.16	0.57	0.17	20.00	60.02	21.41
	16	0.68	0.45	0.07	0.81	0.23	26.00	35.68	16.37
10°C (10°)	0	0.89	1.13	0.19	0.31	0.09	24.00	32.22	10.91
	8	0.14	0.38	0.07	0.78	0.30	10.00	24.53	12.38
	16	0.96	0.51	0.07	0.50	0.20	16.00	25.27	14.62

Tage		FZ [10 ³ /ml]	Tage		FZ [10 ³ /ml]
3 Tage	0	3.82	3 Tage	0	3.82
vorinkubiert	4	5.48	vorinkubiert	4	NV
Mit 4-NP	8	1.47	Ohne 4-NP	8	3.69
(3D)	13	3.31	Nullwert	13	20.86
	32	0.62		32	1.21

Im Ansatz, der bei 10°C inkubiert wurde, verringerte sich die Gesamtbakterienzahl auf ca ein Drittel und stieg bis zum Versuchsende nicht mehr signifikant an, es waren die ganze Zeit Flagellaten vorhanden, eine zweite Blüte entwickelte sich nach 16 Tagen. Diese zweite Blüte war besonders deutlich bei dem Ansatz zu beobachten, der 3 Tage vorinkubiert worden war. Hier wurden die Flagellaten nach einer besonderen Methode fixiert und gezählt (vgl. 2.4), daher konnten keine Bakterienzahlen ermittelt werden. Zur Überprüfung der Zählgenauigkeit der Methode wurden parallel Nullproben ohne Zusatz von 8 µg/l 4-NP inkubiert und für Flagellatenzählungen präpariert. Diese Proben ergaben einen ähnlichen Verlauf aber immer höhere Flagellatenzahlen als die "3D"-Ansätze mit 4-NP (Tab.6).

Eine genauere Analyse der Verteilung der Bakterien in verschiedenen Volumenklassen verdeutlicht eine Folge des Grazing durch Protozoen, die über das mittlere Zellvolumen oder die bakterielle Biomasse nur abgeschätzt werden kann. So zeigten sich deutliche Unterschiede in der Entwicklung der Bakterien bei Gegenwart oder Abwesenheit von Protozoen, wenn die Verteilung der GBZ in Volumenklassen bei verschiedenen Ansätzen gegen die Versuchsdauer aufgetragen wird (Abb.13 und 14). Nach Zusatz von Cycloheximid fand eine Vergrößerung der Zellen in 4 Tagen (Volumenklasse 0.512) mit anschließender Teilung statt (Vol.klassen 0.128 und 0.256); ein Zeichen für Wachstum heterotropher, meist stäbchenförmiger Bakterien (vgl.3.1.1). Große Formen, die in der Anfangsprobe zu beobachten waren (Vol.klasse 2.048), vermehrten sich nicht (Abb.13).

Im Ansatz mit frischem Fördewasser zeigte sich dagegen ein Rückgang der mittleren Volumenklassen (0.128 und 0.256) zugunsten vor allem sehr großer Zellen (Vol.klassen 0.512 - 2.048).

Im Brackwasser und im sterilfiltrierten Wasser waren die Zellen von Anfang an etwas größer, weil hier überwiegend die akklimatisierte Kultur enthalten war (Tab.6 und 7). Im Versuchsverlauf ergab sich nur noch eine geringe Verschiebung zur nächstgrößeren Volumenklasse, sehr große Zellen wurden zwar zeitweilig festgestellt, dominierten aber nicht.

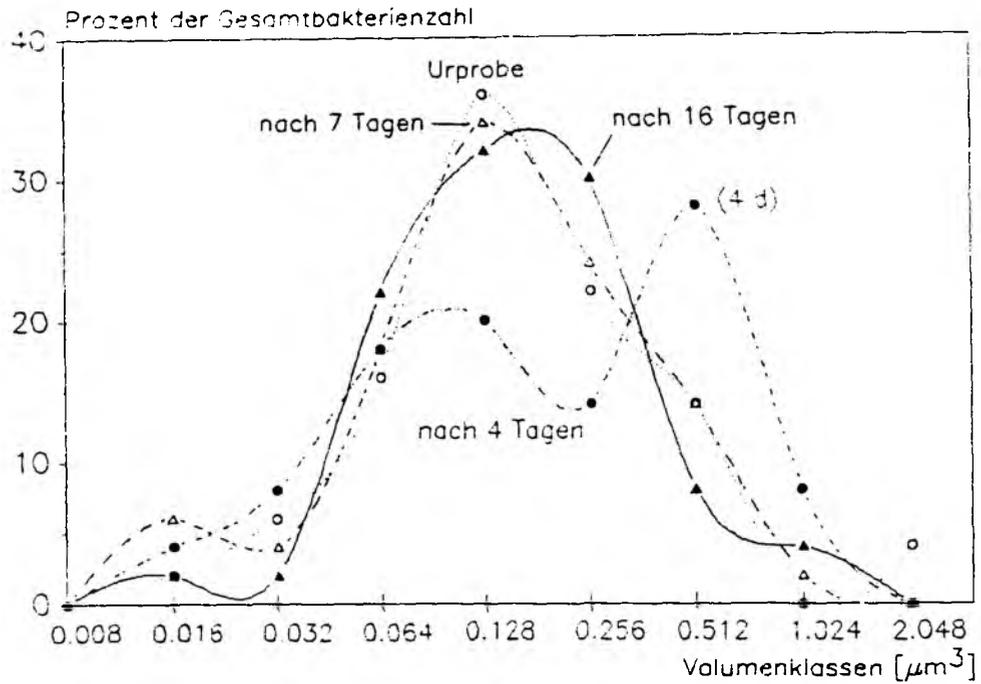


Abb.13: Verteilung der Gesamtbakterienzahl zu ausgewählten Zeitpunkten in verschiedene Volumenklassen im Ansatz mit Cycloheximid (CY).

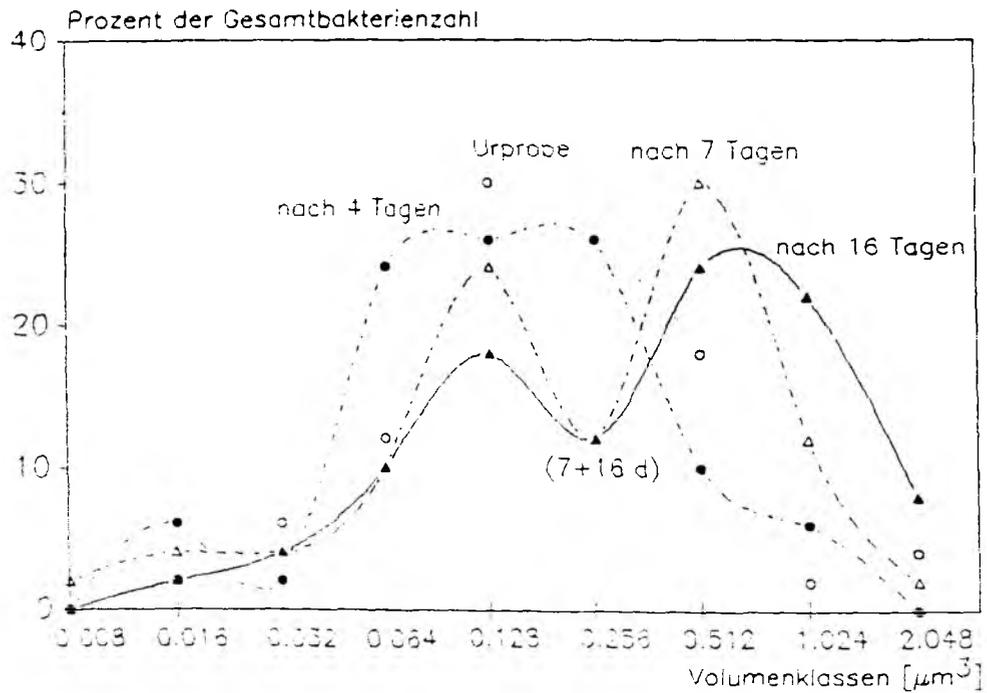


Abb.14: Verteilung der Gesamtbakterienzahl zu ausgewählten Zeitpunkten in verschiedene Volumenklassen im Ansatz mit unbehandeltem Fördewasser (FF).

Beim 10°C-Ansatz, der ebenfalls Flagellaten enthielt (Tab.6), konnte tendenziell das gleiche Phänomen festgestellt werden wie beim frischen Fördewasser (Tab. 7). Nach 16 Tagen waren sowohl sehr kleine (0.064) wie auch größere Zellen vorhanden (0.512 - 2.048), die mittleren Klassen mit 0.128 und 0.256 μm^3 waren kaum vertreten (Tab.7).

Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der Gesamtbakterienzahl (GBZ) der verschiedenen Ansätze aus dem Simulationsversuch in Volumenklassen

Probe	Ink.- Volumenklassen [μm^3]:										
	dauer	0.008	0.016	0.032	0.064	0.128	0.256	0.512	1.024	2.048	4.096
	[d]	[Prozent der GBZ]									
BW	0	0	8	6	12	22	24	16	12	0	0
	4	0	2	2	4	18	16	32	20	6	0
	16	0	4	2	6	6	22	36	22	2	0
CY	0	0	2	6	16	36	22	14	0	4	0
	4	0	4	8	18	20	14	28	8	0	0
	7	0	6	4	18	34	24	12	2	0	0
	16	0	2	2	22	32	30	8	4	0	0
ST	0	0	6	2	4	28	28	14	12	6	0
	16	0	6	0	8	32	26	14	14	0	0
FF	0	0	2	6	12	30	26	18	2	4	0
	4	0	6	2	24	26	26	10	6	0	0
	7	2	4	4	10	24	12	30	12	2	0
	16	0	2	4	10	18	12	24	22	8	0
10°C	0	0	6	6	12	46	14	8	8	0	0
	8	2	2	6	6	14	26	26	10	4	4
	16	2	4	6	26	16	12	20	10	4	0

3.2.5 VERSUCHE ZUR VERKÜRZUNG DER AKKLIMATIONSPHASE

Es konnten mehrere Versuche durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob der 4-NP Abbau durch nicht akklimatisierte mikrobielle Biozönosen früher einsetzt, wenn einige abiotischen Parameter verändert werden. Es wurden anorganische Nährstoffe zugesetzt und zwar 3 μmol Phosphat und/oder 50 μmol Ammoniumnitrat. Außerdem wurden 50 ml Probenwasser mit 50 ml POC-frei filtriertem Wasser vermischt, um den DOC-Gehalt zu erhöhen, oder es wurde Cycloheximid zugesetzt (vgl.2.8). In der Regel wurden 50 oder 100 ml Probenwasser mit 250 $\mu\text{g/l}$ 4-NP bei Zimmertemperatur unter Schütteln inkubiert.

3.2.5.1 EINFLUSS DES ZUSATZES VON NÄHRISALZEN ODER DOC

In den meisten Versuchen konnte keine eindeutige Förderung durch Nährsalz-Zugabe festgestellt werden, weil nur in einer der drei Parallelen überhaupt ein Abbau festzustellen war. So zeigte sich in einem Versuch ein Abbau nach 14 Tagen bei Zusatz einer Stickstoffquelle, nach 24 Tagen ohne jeglichen Zusatz und nach 48 Tagen nach Zusatz von DOC, aber immer nur bei einer Parallele.

Bei weiteren Versuchen mit Nährsalzzugabe, konnte ein Abbau nach 4 - 8 Wochen beim Oberflächenwasser der küstennahen Station A nur nach Zugabe von N+P-Salzen festgestellt werden, die Proben ohne Zusatz bauten 500 $\mu\text{g/l}$ 4-NP nicht ab, bei Zugabe von 50 oder 5000 $\mu\text{g/l}$ konnte nur in je einem Fall nach 31 Tagen ein Abbau festgestellt werden (vgl. Tab.12). Evtl. war das Probenvolumen von 100 - 250 ml zu gering. Andere ebenfalls im Spätsommer genommenen Proben zeigten entweder keinen Unterschied mit und ohne Zusatz z.B. bei einer Station vor Bülk. Oder es fand ein z.T. schneller aber unvollständiger Abbau nach Nährsalzzugabe statt, wie es bei Proben der Monitoring Routine Station Kieler Bucht Mitte (KBM) geschah. Hier war durch die Nährsalzzugabe wahrscheinlich ein vollständigerer Abbau der organischen Substanz möglich. Dadurch wurden anaerobe Verhältnisse geschaffen, und in zwei Proben, die erst nach 6 - 7 Wochen geöffnet wurden, hatte sich Schwefelwasserstoff gebildet. Es konnte nicht geklärt werden, ob der Abbau aerob, während einer Denitrifikationsphase oder während der Desulfurikation stattfand. Eine erneute Zugabe von 4-NP zu der Flasche, in der schon nach 8 Tagen eine teilweise Entfärbung festgestellt worden war, wurde nicht mehr abgebaut.

Eine Quantifizierung der Abbauer über MPN resultierte in einer vollständigen Entfärbung aller Verdünnungsstufen, die aber allein durch Säurebildung zustande kam. Nach Zugabe von Puffer (pH 10) zeigte sich daß das 4-NP noch vorhanden war. Es konnten also keine aeroben Abbauer nachgewiesen werden. In Proben ohne Zusatz von Nährsalzen von der gleichen Station ließ sich weder bei 50 noch bei 500 $\mu\text{g/l}$ einen Abbau von 4-NP in 3.5 Monaten nachweisen (Tab.12).

3.2.5.2 ABBAU NACH ZUSATZ VON CYCLOHEXIMID

In einem Vorversuch konnte eine Verkürzung der Akklimationsperiode durch Cycloheximid-Zusatz von 23 auf 12 Tage beobachtet werden, aber wieder nur bei einer von 3 Parallelen. Bei der zweiten wurde 4-NP nur zu ca 40 % abgebaut, bei der dritten in 3 Monaten gar nicht, während das 4-NP in den Proben ohne Cycloheximid nach 23, 38 und 68 Tagen vollständig abgebaut war.

Bei einigen Proben von den Stationen A und Bülk im August 1989 konnte ein Abbau nach Cycloheximid-Zugabe in allen Parallelen festgestellt werden, der aber langsam und unvollständig ablief. In den entsprechenden Proben ohne Zusätze konnte oft kein oder nur ein Abbau in einer von 3 Parallelen gefunden werden.

3.3 VORVERSUCHE ZUM ABBAU VERSCHIEDENER SUBSTANZEN

Im Folgenden sollen die Ergebnisse zur Mineralisierung verschiedener radioaktiv markierter Verbindungen besprochen werden. Für eine erste Abschätzung von Dauer und Kinetik des Abbaus bisher noch nicht untersuchter Substanzen wurden Wasser- und Sedimentproben aus der Kieler Förde genommen.

3.3.1 EDTA UND DIETHYLENGLYCOL

EDTA wurde bei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/l}$ nur zu 10 % zu CO_2 abgebaut (Abb.15), die Aufnahme war zu vernachlässigen. Der Abbau setzte sofort ein und war nach 7 - 10 Tagen schon abgeschlossen. Der Abbauverlauf entspricht einer chemischen Reaktion erster Ordnung, d.h. daß er unabhängig von der Konzentration der Reaktanden i.e. der Bakterien ist. Für einen Abbauverlauf nach diesem Modell ist kein Wachstum nötig. Zwischen 10 und 50 Tagen konnte keine weitere Erhöhung der Mineralisierung festgestellt werden.

Die Aufnahme durch Bakterienzellen betrug am Anfang 2.2 - 2.3 % und sank dann kontinuierlich auf 0.23 - 0.06 % nach 52 Tagen ab. Weitere Versuche zum EDTA Abbau durch natürliche Wasserproben und Sedimentsuspensionen sind im Abschnitt 3.4.2 besprochen.

Ein erster Versuch mit 50 $\mu\text{g/l}$ Diethylenglycol ergab nach ca 10 Tagen Akklimationsphase einen schnellen und fast vollständigen Abbau zu 80 % CO_2 (Abb.16). In der Phase des steilen Kurvenanstiegs war eine deutliche Aufnahme von 5.5 - 15 % der Aktivität in die Zellen festzustellen. Am Ende waren noch 1.5 % in den Zellen, dies ist deutlich mehr als die 0.1 - 0.5 % am Anfang. Es schien Wachstum eines Teils der Biozönose eingetreten zu sein. dafür spricht auch, daß die Kurve mit einem Modell für logistisches Wachstum gut angepaßt werden konnte.

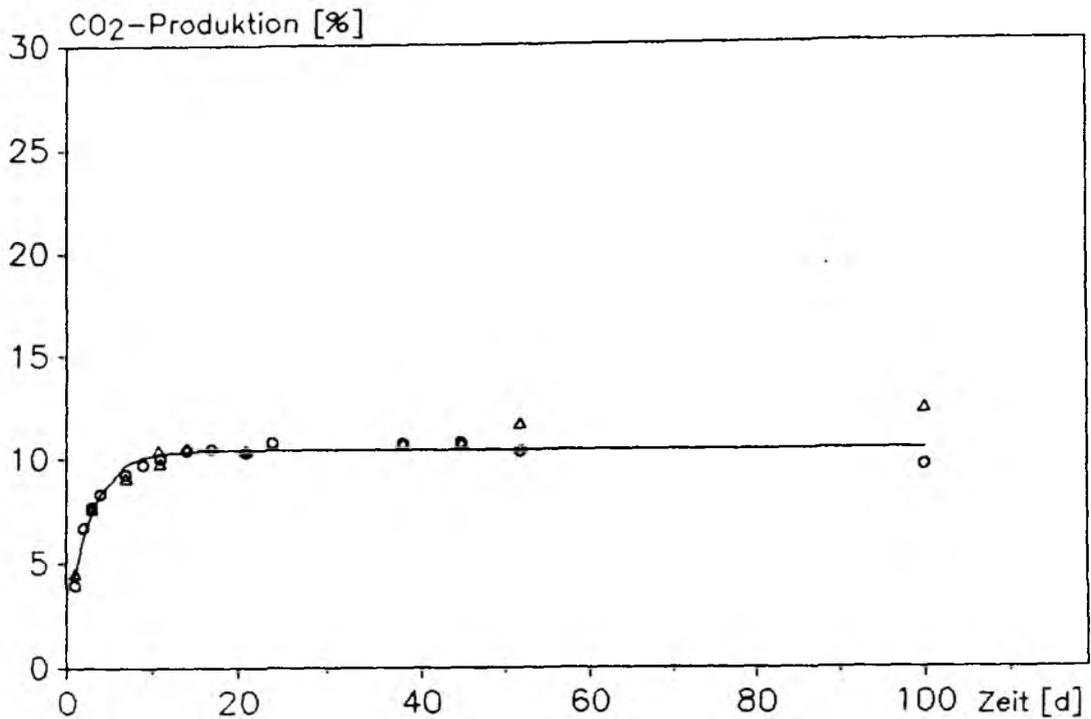


Abb.15: Abbau von 40 µg/l EDTA in Wasserproben aus der Kieler Förde. Die Kurve wurde mit einem Kurvenanpassungsprogramm berechnet (First-Order-Modell, Nr.3), die Symbole stellen die Meßwerte dar.

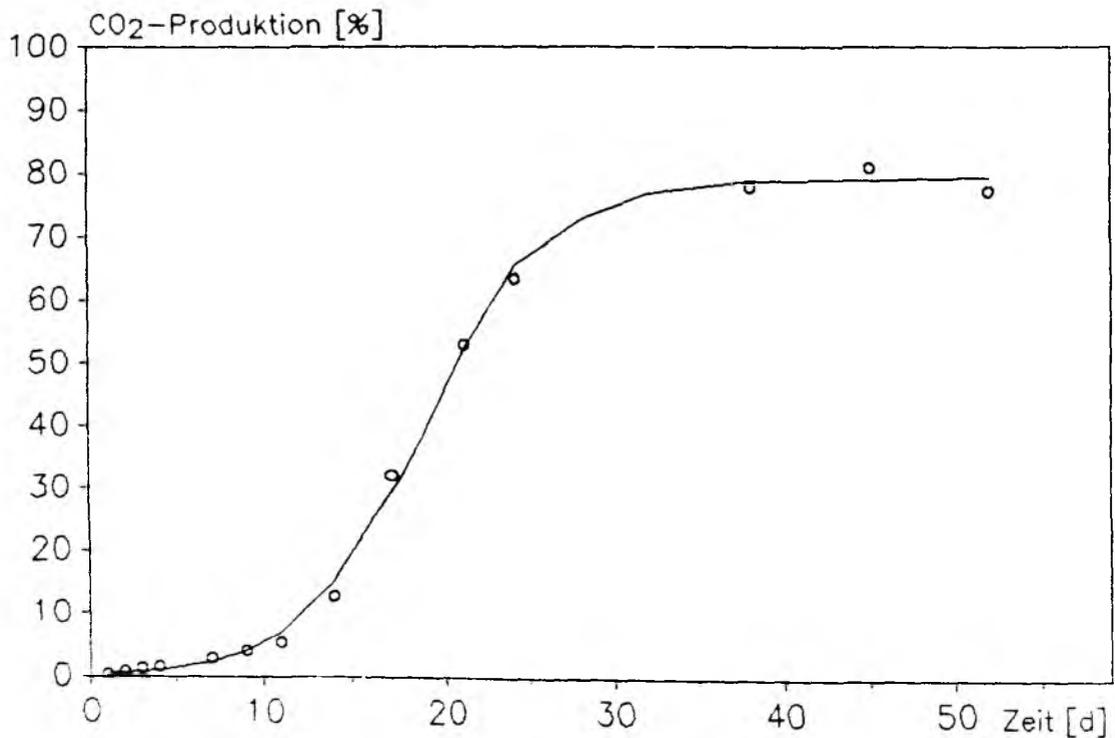


Abb.16: Abbau von 50 µg/l Diethylenglycol in Wasserproben aus der Kieler Förde. Die Kurve wurde mit einem Kurvenanpassungsprogramm berechnet (Modell für logistisches Wachstum, Nr.4), die Symbole stellen die Meßwerte dar.

Ein weiteres Experiment mit niedrigeren Konzentrationen zeigte keinen Unterschied im Abbau von 1 und 10 $\mu\text{g/l}$ (keine Abb.). Der Abbau setzte im Gegensatz zum vorherigen Versuch sofort ein, und kam nach 29 - 33 Tagen mit einer Veratmung zu 58 - 63 % zum Erliegen. In den Zellen befanden sich maximal 6 - 7 % und am Ende 1 - 2 % der Aktivität.

3.3.2 PHENOL UND NAPHTHALIN

- Phenol wurde in küstennahen Wasserproben schon nach 24 h bei 20°C zu 50 % mineralisiert, nach 14 Tagen waren 85 % in CO_2 überführt (Abb.17).

Naphthalin wurde ebenfalls relativ schnell zu 38 % (24 h) abgebaut, nach 3 Tagen waren 61.2 % erreicht und der Abbau stagnierte (Abb.17). Es schien also bei diesen Substanzen möglich zu sein, natürliche Abbauraten durch Kurzzeit-Inkubationen bei *in situ* Temperatur zu ermitteln.

In einem Vorversuch mit einer 1:100 Suspension mit Sandsediment vom Strand in der Nähe des Nord-Ostseekanals wurde Naphthalin nach einer mindestens eintägigen Lag-Phase weitgehend vollständig mineralisiert (Abb.17). Es wurden jeweils mehrere Parallelansätze mit 20 - 50 ml Volumen angesetzt und zu jedem Zeitpunkt 3 Proben sowie eine formolfixierte oder autoklavierte Kontrolle wenn nötig fixiert oder sofort vollständig angesäuert. Diese Methodik wurde daraufhin während der Forschungsfahrt eingesetzt. Zusätzlich wurden die Proben mit Phenol und Naphthalin bei *in situ* Temperatur inkubiert, um auch bei Sedimentproben ein natürliches Abbaupotential ermitteln zu können.

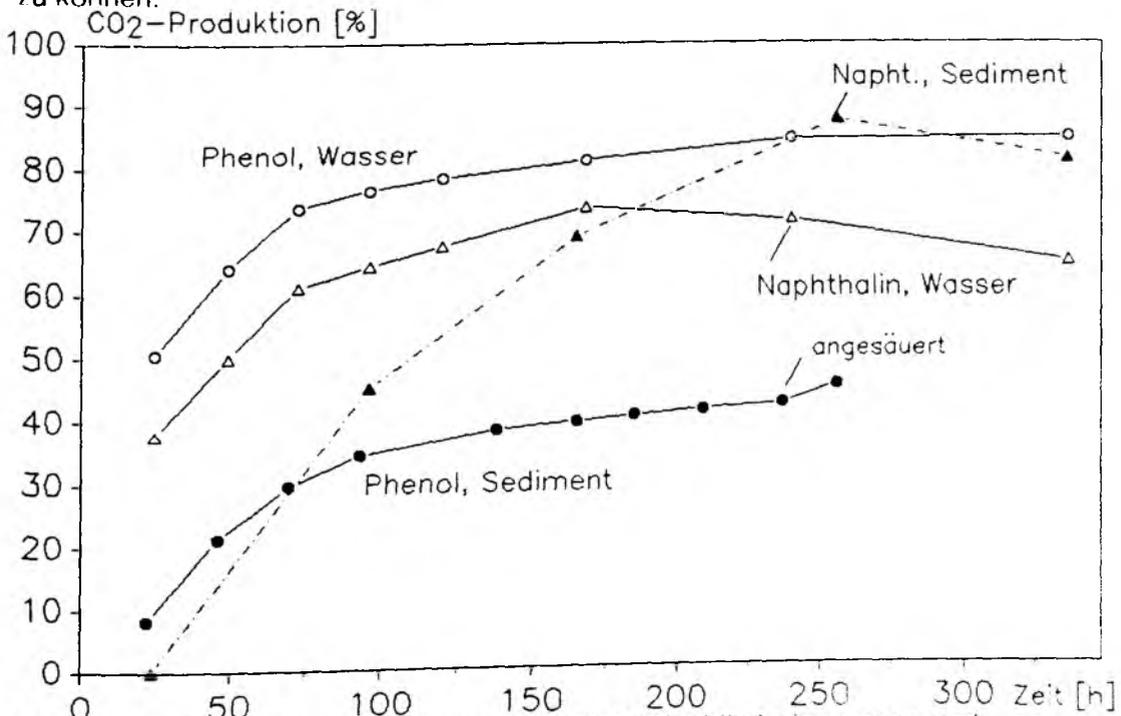


Abb.17: Vorversuche zum Abbau von Phenol und Naphthalin in wasser- und Sedimentproben aus der Kieler Förde.

3.3.3 VORVERSUCHE IN BIOMETERFLASCHEN MIT HOHEM SEDIMENTANTEIL

Folgende Substanzen wurden zunächst bearbeitet: 4-NP, Thiourea, EDTA, Phenol und Naphthalin. Es wurden jeweils 8 ng auf 4 cm³ Sandsediment (Station Möltenort vom 11.7.89) gegeben, das entsprach 7.34 ± 0.3 g Trockengewicht (Tab.1, 2.2). Also betrug die eingesetzte Konzentration ca 1 µg/kg TG. Bei EDTA und NAP wurden wegen der geringen spezifischen Aktivität 80 ng, also ca 10 µg/kg genommen. Zu allen Ansätzen wurden parallel Kontrollen inkubiert, die mit Formol fixiert worden waren. Der Versuch wurde in Biometerflaschen durchgeführt (vgl. 2.17).

Eine Aufnahme in die Zellen konnte nicht ermittelt werden. Dafür wurde die Radioaktivität gemessen, die in 1 ml überstehendem Wasser am Ende des Versuches vorhanden war. Sie wurde auf das gesamte Wasser inklusive Porenwasser hochgerechnet und in Prozent der eingesetzten Menge ausgedrückt. In den Kontrollen zeigte sich nur der Einfluß von Adsorption und abiotischem Abbau.

Bei Phenol waren schon nach einem Tag 10 % mineralisiert, nach 10 Tagen stagnierte der Abbau bei 42 % und durch zweimaliges Ansäuern ergaben sich weitere 3 %, sodaß insgesamt 45 % zu CO₂ abgebaut werden konnten (Abb.17). In der Probe waren nur noch 7 % im Wasser. In der Kontrolle konnten noch 62 % des Phenols im Wasser gemessen werden. Es waren dort also 48 und 38 % in der Probe an das Sediment adsorbiert.

Bei Naphthalin konnte kein Abbau in 12 Tagen festgestellt werden. Es zeigte sich nach Messen des Überstandes, daß weder in der Kontrolle noch in der Probe Naphthalin vorhanden war. Ein Teil war wahrscheinlich an das Sediment sorbiert, aber ein Großteil war von den Silikonstopfen aufgenommen worden. Bei folgenden Versuchen (Abb.17) wurden gut verschließbare Flaschen mit Teflondichtungen und/oder Polycarbonatdeckeln benutzt, die Naphthalin nicht adsorbierten. Es zeigte sich eine sehr schnelle und vollständige Mineralisierung in 2 weiteren Vorversuchen mit Wasser aus der Kieler Förde und Sediment von Falckenstein (Abb.17).

Bei 4-NP setzte der Abbau sofort ein, verlief aber langsam, sodaß erst nach 9 Tagen 10 % abgebaut waren, und am Ende des Versuchs nach 30 Tagen nur 22 % zu CO₂ abgebaut waren. Im Wasser der Kontrolle waren noch 62 % der eingesetzten Radioaktivität und 3.4 % waren abiotisch abgebaut worden. Also waren ca 35 % adsorbiert. In der Probe waren noch 23 % im Wasser gelöst, also ca 55 % adsorbiert.

Bei Thiourea mußte der Versuch nach 3 Tagen abgebrochen werden, da bei der Biometerflaschen mit der Probe der Seitenarm undicht wurde, und so kein CO₂ mehr quantifiziert werden konnte. Es war nach 3 Tagen schon ein deutlicher Unterschied zwischen Probe und Kontrolle zu bemerken. Die Adsorption an Sediment betrug bei der Kontrolle 55 %, denn weniger als 1 % waren abiotisch abgebaut worden und nur noch 45 % befanden sich nach 3 Tagen im Wasser. In der Probe waren dort nur 24 %, also müßten 66 % abgebaut und/oder adsorbiert gewesen sein.

EDTA zeigte die geringste Adsorption und den geringsten Abbau. Nach 9 Tagen waren 10 % mineralisiert, am Ende 15 %. In der Kontrolle wurden nur 1.6 % abiotisch abgebaut, 90 % waren noch in Lösung, in der Probe waren es 65 %. Also waren 8.4 bzw. 25 % adsorbiert.

Der Abbau aller Substanzen schien nach 30 Tagen so gut wie beendet zu sein, denn es wurden immer geringer werdende Mengen an DPM in der Natronlauge aufgefangen. Auch das Ansäuern brachte, außer beim Phenol, kaum noch einen Zuwachs an CO₂. Das heißt, daß in diesem System mit hohem Sedimentanteil, geringem Wasservolumen und sehr großem Luftraum der CO₂-Austausch günstig verlief. Allerdings schienen die eingesetzten Substanzen (außer EDTA) stark an das Sediment zu adsorbieren. Die Sorption kann z.B. bei 4-NP durch die Ansäuerung am Ende des Versuchs verstärkt worden sein, da undissoziiertes 4-NP lipophiler ist als geladenes 4-NP. Ein Versuch, die sorbierten Substanzen durch Aufschwemmen der Proben mit Wasser oder Ethanol zu desorbieren und durch Zentrifugieren das Sediment abzutrennen, schlug fehl. Daher konnte keine Bilanz aufgestellt werden. Unabhängig davon war die Adsorption in allen Proben mit biologischer Aktivität höher als in den formolfixierten Kontrollen.

3.4 VERGLEICH DES ABBAUS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN IN WASSER- UND SEDIMENTPROBEN AUS DER WESTLICHEN OSTSEE

Bei einer Forschungsfahrt in die Lübecker Bucht und das Arkona Becken vom 19.-27.8.1989 konnte der Abbau von DEG, EDTA, 4-NP, Phenol, Naphthalin und Thiourea in Wasser- und Sedimentproben verschiedener Herkunft untersucht werden. Die Substanzen wurden in der Regel in einer Konzentration von 1 µg/l zugesetzt. Nur bei 2- und 4-NP konnten mehrere Konzentrationen eingesetzt werden. Wegen der gleichen Methodik und der z. T. gleichen Stationen werden die Resultate zum Nitrophenol-Abbau in diesem Kapitel angeführt.

Es konnten in der Lübecker Bucht oberflächen- und sedimentnahe Wasserproben nahe der Travemündung aus 1 m Tiefe (Station A,1m) und 30 cm über dem Sediment (Station A,sW) entnommen werden. Desweiteren wurden das Wasser und Sediment aus der Mitte der Lübecker Bucht (Station B,1m und Sediment, sowie C, nur Sediment) und von einer Station auf der Oderbank (Station D,1m und Sediment) untersucht (Abb.1, 2.2).

Bei dieser Forschungsfahrt und einem darauffolgenden Versuch mit 2-NP sollte überprüft werden, welchen Beitrag das Sediment, das als Auffanglager für viele gelöste und an Partikel gebundene Stoffe gelten kann, zur Mineralisierung von organischen Fremdstoffen unter optimalen Bedingungen leisten kann. Da erste Vorversuche mit hohem Sedimentanteil eine starke, z.T. irreversible Adsorption bei den geringen Konzentrationen an eingesetzten Substanzen zeigten (3.3.3), wurde das Sediment in weiteren Versuchen 1 : 100 verdünnt. Auf diese Weise konnte das maximale aerobe Abbaupotential verschiedener Sedimente abgeschätzt und die gleiche Methodik wie

für die Wasserproben benutzt werden. Außerdem wurde so die Gesamtbakterienzahl in einen Bereich gebracht, der kaum noch höher als im überstehenden Wasser lag (vgl.Tab.1, 2.2). Die Gesamtbakterienzahl pro 0.01 cm³ entsprach 1 ml der Suspension und lag nur etwas über der Zahl in 1 ml der Wasserprobe. So wurde ein besserer Vergleich möglich.

3.4.1 ABBAURATEN VON PHENOL UND NAPHTHALIN

Für Phenol und Naphthalin wurde versucht, natürliche Abbauraten zu ermitteln, weil sich in Vorversuchen ein schneller Abbau ergeben hatte. Es ergab sich bei den 3 Wasserproben der Stationen A sowie B (jeweils Oberflächenwasser, bei A auch sedimentnahes Wasser) eine Lag-Phase in den ersten 12 h des Phenol-Abbaus, nur maximal 1.3 % wurden in dieser Zeit mineralisiert.

Tabelle 8: Natürliche Abbauraten von Phenol nach 12 h Inkubation beim Oberflächenwasser der Stationen A und B,(1m), beim sedimentnahen Wasser der Station A,(sW) sowie bei einer Sedimentsuspension der Station C,(Sed.)

Station	Rate [%/h]	Stdabw. [%/h]	Temperatur [°C]
A,1m	0.10	0.02	18
A,sW	0.06	0.02	15
B,1m	0.00	0.00	18
C,Sed.	0.26	0.00	15

Die natürlichen Abbauraten waren sehr niedrig und Unterschiede zwischen den 4 Stationen statistisch unsicher. Erwartungsgemäß zeigte die Sedimentsuspension die höchste Rate (vgl. 3.4.7). Das benutzte Phenol war nach Angaben des Herstellers zu >98 % rein (vgl.2.1), ein Abbau zu weniger als 2 % konnte sich also auch auf Verunreinigungen beziehen. Nach 12 h ließ sich eine Veränderung der Biozönose z.B. durch Wachstum oder Enzyminduktion nicht ausschließen.

Im weiteren Zeitverlauf erhöhte sich die Abbauraten und es wurden deutliche Unterschiede zwischen den 4 Proben sichtbar (Abb.18 und 19). Beim sedimentnahen Wasser der Station A setzte ein verstärkter Abbau nach 24 h ein und überschritt in 4 Tagen 50 %, maximal wurden 76.2 % mineralisiert (Abb.18). Das oberflächennahe Wasser der gleichen Station zeigte ungefähr das gleiche Bild, die maximale Abbauraten war etwas geringer als beim sedimentnahen Wasser. Die starke Streuung lag wahrscheinlich an der inhomogenen Verteilung der phenolabbauenden Bakterien (vgl. 3.4.7).

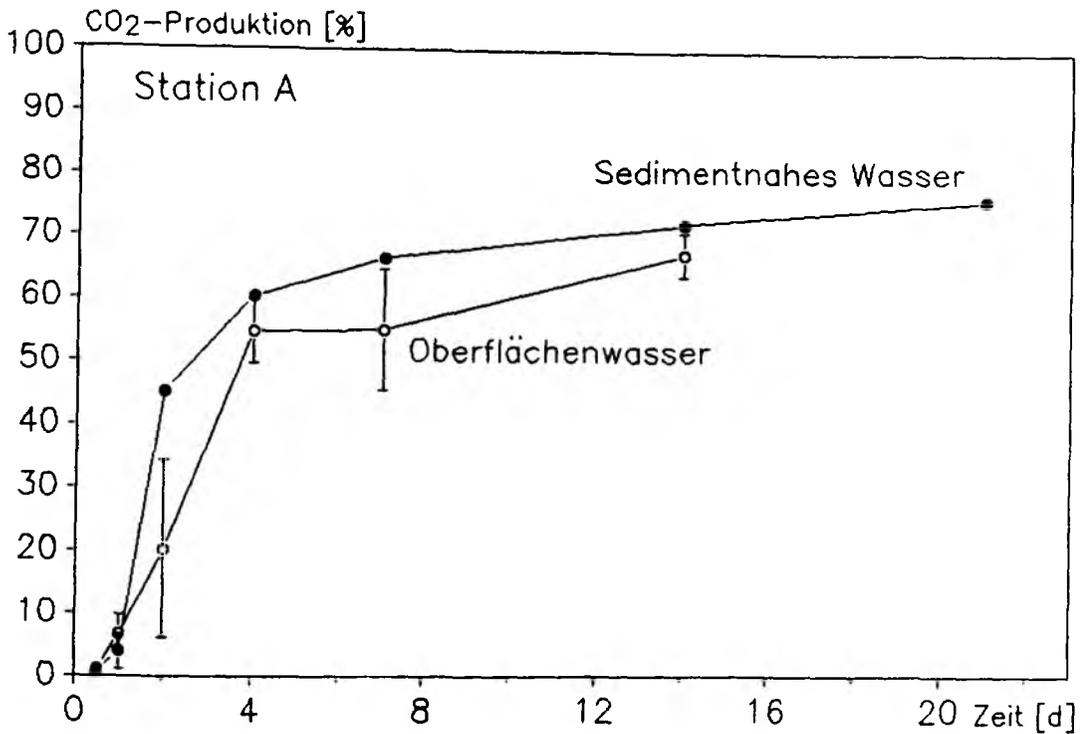


Abb.18: Mineralisierung von 1 $\mu\text{g/l}$ Phenol in Wasserproben von der Travemündung (Station A)

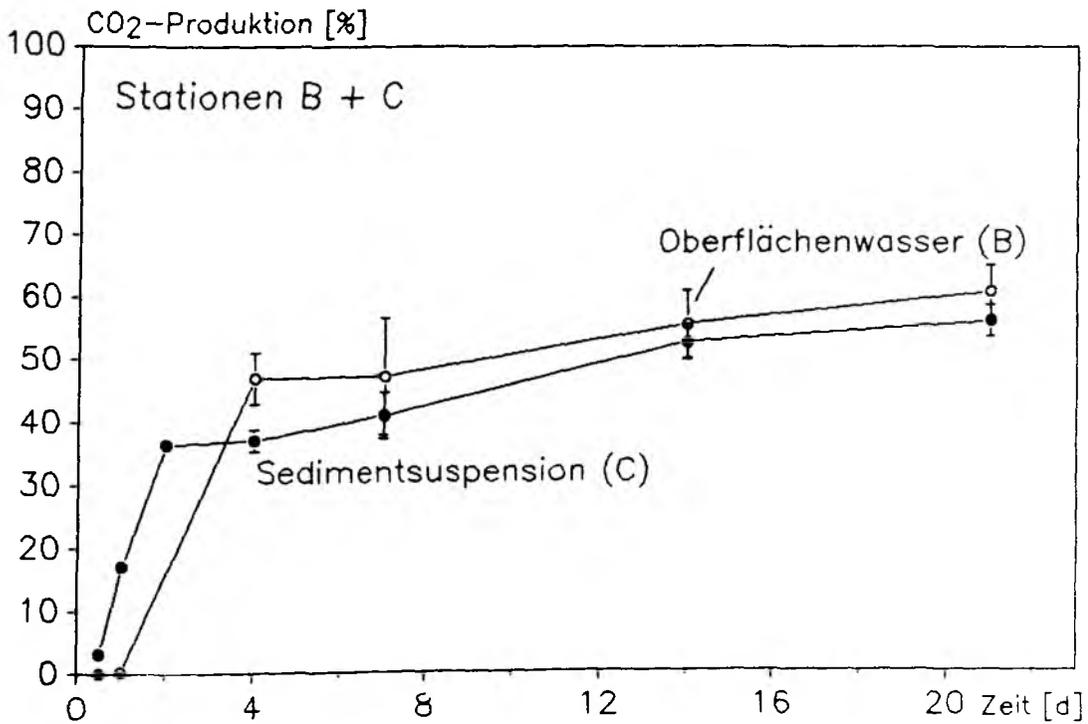


Abb.19: Mineralisierung von Phenol in Wasser- und Sedimentproben aus der Lübecker Bucht (Stationen B und C).

In der Sedimentsuspension setzte der Abbau am schnellsten ein, schon nach 12 h waren 3.14 % mineralisiert. Nach 2 Tagen flachte der Abbau bei 36.6 % stark ab. Erst nach insgesamt 14 - 21 Tagen waren 55.9 % zu CO₂ abgebaut (Abb.19). Bei der küstenfernsten Station (B) zeigte sich eine mindestens 24 h währende lag-Phase, dann wurde Phenol schnell zu 47 % umgesetzt. Der weitere Abbau zu maximal 60.5 % zog sich über 21 Tage hin, die Standardabweichung zwischen den 3 Parallelen war groß (Abb.19).

Es konnten also deutliche Unterschiede im Einsetzen und Ausmaß der Mineralisierung von Phenol in einer Konzentration von 1 µg/l bei den verschiedenen Stationen festgestellt werden.

Bei Naphthalin lief der Abbau in Proben mit küstennahem Wasser ebenfalls schnell ab. Allerdings zeigte hier das Sediment eine ausgeprägte Lag-Phase von mehr als 4 Tagen (vgl. Tab.9 und 10).

Die Inkubationstemperaturen waren wie bei Phenol angegeben 15 und 18°C. Es zeigte sich kein Unterschied im Abbau nach 1 - 2 und 3 - 4 Tagen, nur im Oberflächenwasser der Station B setzte der Abbau erst nach 3 - 4 Tagen langsam ein und nach 28 Tagen waren nur 31 % mineralisiert (Tab.9). Die beiden Stationen vor der Travemündung zeigten die höchsten Abbauraten, sie lagen höher als beim Phenolabbau in den ersten 12 h. Am Ende des Versuches waren 49 - 71 % mineralisiert. Das sedimentnahe Wasser zeigte den höchsten Abbau in der kürzesten Zeit (Tab.9).

Leider bestand der Verdacht, daß nicht nur gebildetes CO₂, sondern auch flüchtige Abbauprodukte gemessen wurden. Gerade im Sediment sank das gebildete "CO₂" von 51 % nach 14 Tagen wieder auf 19 % nach 28 Tagen. Dies war schon bei den Vorversuchen beobachtet worden (vgl. Abb.17). Bei der Station B war ein ähnliches Absinken zu beobachten, hier stieg das gebildete CO₂ aber zwischen 14 und 38 Tagen wieder auf 31 % an. Es konnte keine signifikante Aufnahme durch die Zellen festgestellt werden.

Nach der Literatur wird Naphthalin überwiegend mineralisiert und in Biomasse überführt; alle Abbauprodukte sollten durch ihre polaren Gruppen (BRUNS 1986) besser wasserlöslich sein als Naphthalin.

Tabelle 9: Mineralisierung von fünf Fremdstoffen in einer Konzentration von 1 µg/l bei verschiedenen Stationen der Forschungsfahrt. Zusätzlich sind die Aufnahme in die Zellen und die restliche Radioaktivität im überstehenden Wasser am Ende der Inkubation aufgeführt. (Stationen siehe 2.2)

Abbau zu Kohlendioxid:

Substrat	Probe	Abbau zu 10 % [d]	Abbau zu 50 % [d]	Maximales CO2 [%]	Stdabw. [%]	Reaktion
Phenol	A,1m	1 - 2	4	67.3	3.5	Lag-Phase
	A,sW	1 - 2	4	76.2	0.9	Lag-Phase
	B,1m	2	14	60.5	4.3	Lag-Phase
	C,Sed.	1	14	55.9	2.6	1.Ordnung
Naphthalin	A,1m	1 - 2	28	49.1	10.1	1.Ordnung
	A,sW	1 - 2	4	70.7	5.5	1.Ordnung
	B,1m	4 - 7	NA	30.6	12.8	Lag-Phase
	C,Sed.	4 - 7	14	50.7	5.5	Lag-Phase
EDTA	A,1m	4	NA	16.8	7.9	1.Ordnung
	A,sW	4	NA	19.1	0.3	1.Ordnung
	B,1m	7	NA	17.8	1.8	1.Ordnung
	C,Sed.	4	NA	16.3	NV	1.Ordnung
	D,1m	7	NA	12.6	3.0	1.Ordnung
	D,Sed.	4	NA	22.7	0.0	1.Ordnung
	Bülk	4	NA	18.9	0.3	1.Ordnung
DEG	A,1m	28 - 35	56	59.1	1.8	Akp
	A,sW	7 - 14	21 - 28	78.5	11.3	logistisch
	B,1m	NA	NA	3.5	2.9	NA
	B,Sed.	1 - 4	14	58.8	NV	1.Ordnung
	C,Sed.	1 - 4	7	78.4	NV	1.Ordnung
	D,Sed.	1 - 4	7	75.8	NV	1.Ordnung
Thiourea	A,1m	1 - 7	7 - 14	87.3	1.3	1.Ordnung
	A,sW	28	70	48.5	6.9	Akp
	B,1m	7	42	43.8	8.3	linear
	B,Sed.	1 - 4	NA	24.3	NV	1.Ordnung
	C,Sed.	1 - 4	26	52.0	NV	1.Ordnung
	D,Sed.	1 - 4	7 - 14	72.0	NV	1.Ordnung

Fortsetzung Tabelle 9:

Bilanzierung: Aufnahme in die Zellen und restliche Radioaktivität im überstehenden Wasser

Substrat	Probe	Aufnahme [%]	Stdabw. [%]	Überstand [%]	Stdabw. [%]	Volumen [l oder cm3]
EDTA	A,1m	0.7	0.6	65.3	7.9	0.25 - 0.5
	A,sW	0.3	0.0	79.1	2.6	0.25 - 1.0
	B,1m	0.0	0.1	81.3	1.4	0.25 - 1.0
	C,Sed.	ND	ND	75.3	NA	1.0
	D,1m	0.8	0.2	ND	ND	0.1
	Bülk	1.7	0.3	ND	ND	0.1
DEG	A,1m	2.4	1.0	18.2	0.9	0.5
	A,sW	3.6	0.8	ND	ND	0.25 - 0.5
	B,1m	0.0	0.0	113.0	20.1	0.50 - 1.0
Thiourea	A,1m	< 1	NA	ND	ND	0.25 - 0.5
	A,sW	3.7	2.1	40.9	3.7	0.10 - 0.5
	B,1m	< 1	NA	37.5	6.9	0.10 - 0.5
	B,Sed.	ND	ND	41.0	NA	5.0
	C,Sed.	ND	ND	35.0	NA	10.0

Tabelle 10: Natürliche Abbauraten von Naphthalin nach 24 - 96 h (Stationen siehe Tabelle 8)

Station	Rate nach 24/48 h [%/h]	Stdabw. nach 24/48 h [%/h]	Rate nach 72/96 h [%/h]	Stdabw. nach 72/96 h [%/h]
A,1m	0.53	0.07	0.50	0.05
A,sW	0.59	0.18	0.55	0.08
B,1m	0.00	0.00	0.07	0.05
C.Sed.	0.00	0.00	0.00	0.00

3.4.2 EDTA

Der EDTA Abbau verlief zunächst ähnlich wie vorher beschrieben (3.3.1), ca 10 % wurden in 4 - 7 Tagen mineralisiert. In den folgenden 28 - 56 Tagen stieg die Mineralisierung teilweise langsam weiter an, sodaß bei den küstennahen Stationen 16.8 - 19.1 %, bei den küstenfernen Stationen 12.6 - 17.1 % und bei den Sedimenten sogar 16.3 - 22.7 % abgebaut werden konnten.

Die Aufnahme in Bakterienzellen betrug in der anfänglichen Abbauphase 3.4 - 7.4 % und fiel danach auf Werte unter 1 %. Nur bei der Station bei Bülk, waren nach 21 und 28 Tagen noch 1.7 % in den Zellen. Wahrscheinlich war hier der Abbau noch nicht ganz abgeschlossen (Tab.9).

Wenn angenommen wird, das die zweite Phase den eigentlichen, wahrscheinlich cometabolischen Abbau bedeutet und vorher nur Verunreinigungen abgebaut werden (TIEDJE 1977), können folgende Abbauraten berechnet werden.

Tabelle 11: Abbauraten von EDTA bei 20°C (Stationen siehe 2.2)

Station	Abbauraten [%/Tag]	Standard- abweichung [%]	Regressions- koeffizient
A,1m	0.14	0.03	0.85
A,sW	0.11	0.02	0.87
B,1m	0.09	0.05	<u>0.49</u>
B,Sed.	0.07	0.01	0.82
C,Sed.	0.23	0.01	0.99
D,1m	0.06	0.03	<u>0.70</u>
Bülk,1m	0.31	0.05	0.94

Es konnte keine signifikante Zunahme der CO₂-Produktion mit der Zeit bei den beiden küstenferneren Stationen B und D festgestellt werden, beim schlickigen Sediment von B war nur eine geringe kaum signifikante Steigung von 0.07 %/Tag zu beobachten. Aber auch bei den anderen Stationen waren die Abbauraten von 0.11 - 0.31 %/Tag bei einer Inkubationstemperatur von 20°C sehr gering.

3.4.3 DIETHYLENGLYCOL

In allen Wasserproben konnte Diethylenglycol (DEG) erst nach einer Akklimationsphase von 7 bis 35 Tagen abgebaut werden. In der Mitte der Lübecker Bucht (Station B) setzte auch nach 12 Wochen Versuchsdauer kein Abbau ein (Tab.9 und Abb.20). Beim sedimentnahen Wasser der Station A setzte der Abbau viel früher ein als beim Oberflächenwasser und am Ende waren 78.5+11.3 % mineralisiert, also deutlich mehr als bei A,1m. Die Aufnahme durch die Bakterien blieb bei allen untersuchten Zeitpunkten unter 5 % und betrug am Ende maximal 3.6 % (Tab.9).

In den Sedimentsuspensionen dagegen setzte der Abbau bei allen drei Proben sehr schnell ein und war nach 14 Tagen weitgehend abgeschlossen (Abb.21). Es fällt auf, daß der Abbau bei der Probe von Station B schon bei 60 % CO₂ stagnierte. Vermutlich lag der Grund in einer sehr viel stärkeren Adsorption dieser und anderer Substanzen (siehe auch 3.4.1 und 3.4.4) an das schlickige Sediment der Station B. Beim DEG Abbau in Sedimentproben konnten keine 3 Parallelen angefertigt werden. Es zeigte sich aber, daß sich die beiden sandigen Sedimente sehr ähnlich verhielten und DEG zu ca 80 % mineralisieren konnten.

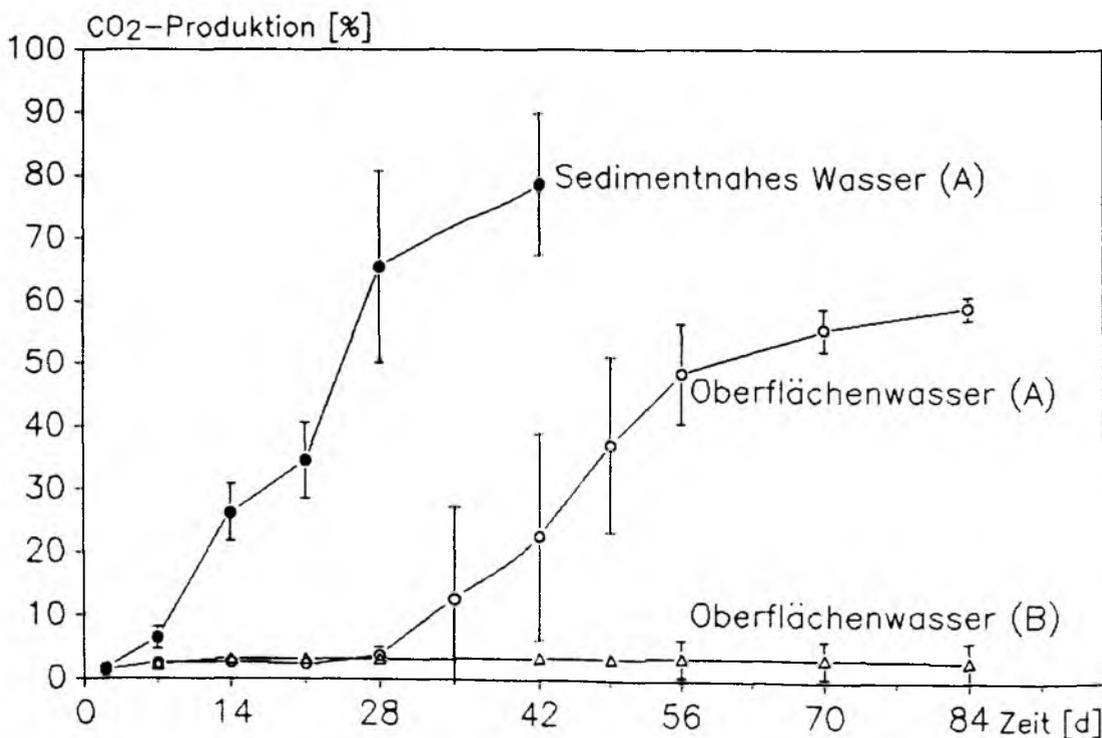


Abb.20: Mineralisierung von 1 µg/l Diethylenglycol in Wasserproben aus der Lübecker Bucht.

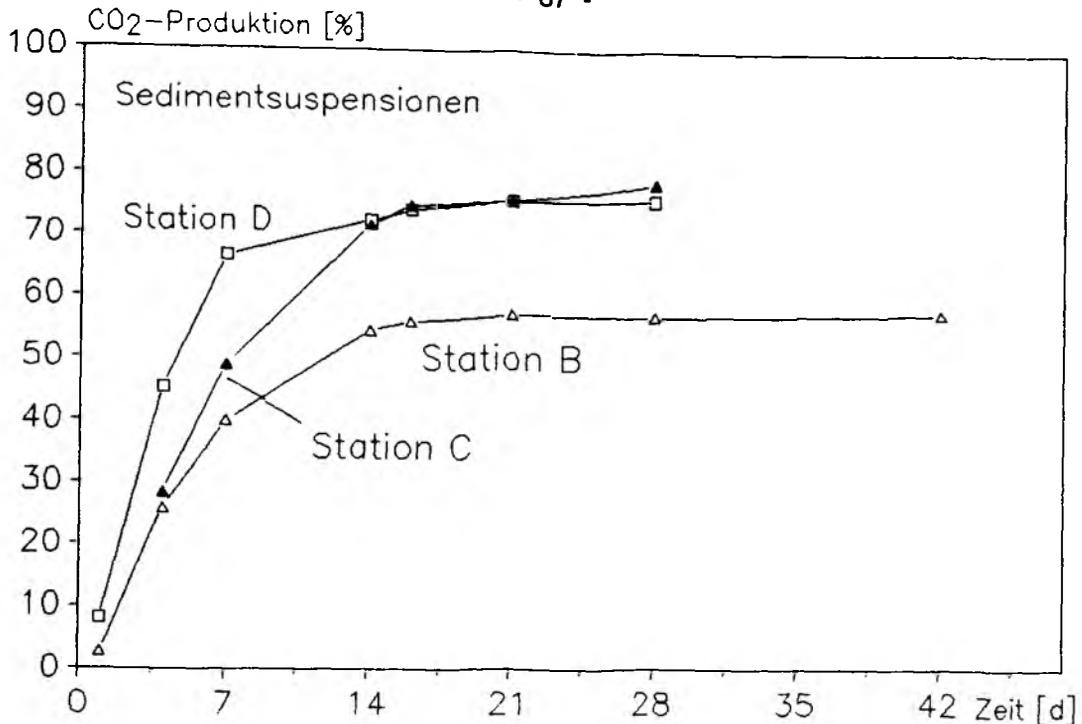


Abb.21: Mineralisierung von Diethylenglycol in Sedimentproben aus der westlichen Ostsee

3.4.4 THIOUREA

Beim Thioharnstoff zeigte sich ein sehr unterschiedlicher Verlauf des Abbaus in allen Proben. Im Wasser setzte der Abbau mit Ausnahme des Oberflächenwassers der Station A sehr langsam ein. In dieser Probe aus 1 m Tiefe nahe der Travemündung schienen sehr gut akklimatisierte Abbauer gewesen zu sein, die schon nach 14 Tagen 87.3+ \pm 1.3 % zu CO₂ veratmet hatten (Abb.22). Beim sedimentnahen Wasser von A erreichte der Abbau erst am Ende der Inkubation knapp 50 %, beim Oberflächenwasser der Station B wurden 43.8+ \pm 8.3 % CO₂ nach 42 Tagen nicht mehr überschritten (Abb.22). Während bei B der Abbau annähernd linear zunahm, zeigte sich beim sedimentnahen Wasser von A ein Akklimationsperiode mit erhöhter Abbaurrate nach 31 - 42 Tagen. Eine Aufnahme von Thiourea durch Bakterien betrug bei den beiden Proben aus 1 m Tiefe nie mehr als 1 %, beim sedimentnahen Wasser von A (A,sW) waren am Ende noch 3.7+ \pm 2.1 % der Radioaktivität in den Zellen (Tab.9).

Ähnlich wie bei der Probe mit Oberflächenwasser der Station A verlief der Abbau in einer Sedimentsuspensionen mit Oderbank-Sediment, hier erreichte die CO₂-Produktion ca 75 % nach 21 Tagen (Abb.23). Die beiden Sedimentproben aus der Mitte der Lübecker Bucht zeigten nach einem schnellen Abbau in der Anfangsphase einen langsamen, fast kontinuierlichen Abbau, der in Proben mit Schllicksediment (B) mit 24.3 % CO₂ bei ca der Hälfte der in Proben mit Sandsediment (C) erreichten Werte (52 % CO₂) stagnierte (Abb.23 und Tab.9). Eine Bilanzierung ergab in der Regel über 80 - 90 % Wiederfund. Beim Sediment von B waren noch 41 % im überstehenden Wasser, obwohl nur 24.3 % abgebaut wurden (Tab.9). Es waren also ca 35 % adsorbiert.

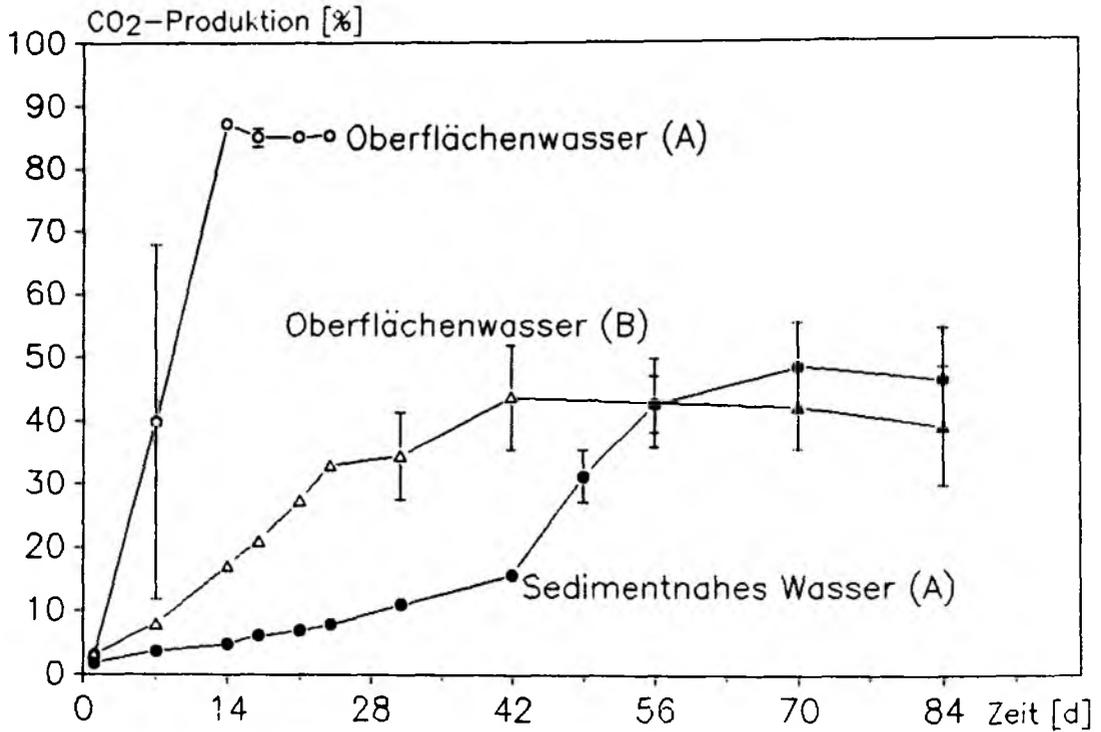


Abb.22: Mineralisierung von 1 µg/l Thiourea in Wasserproben aus der Lübecker Bucht.

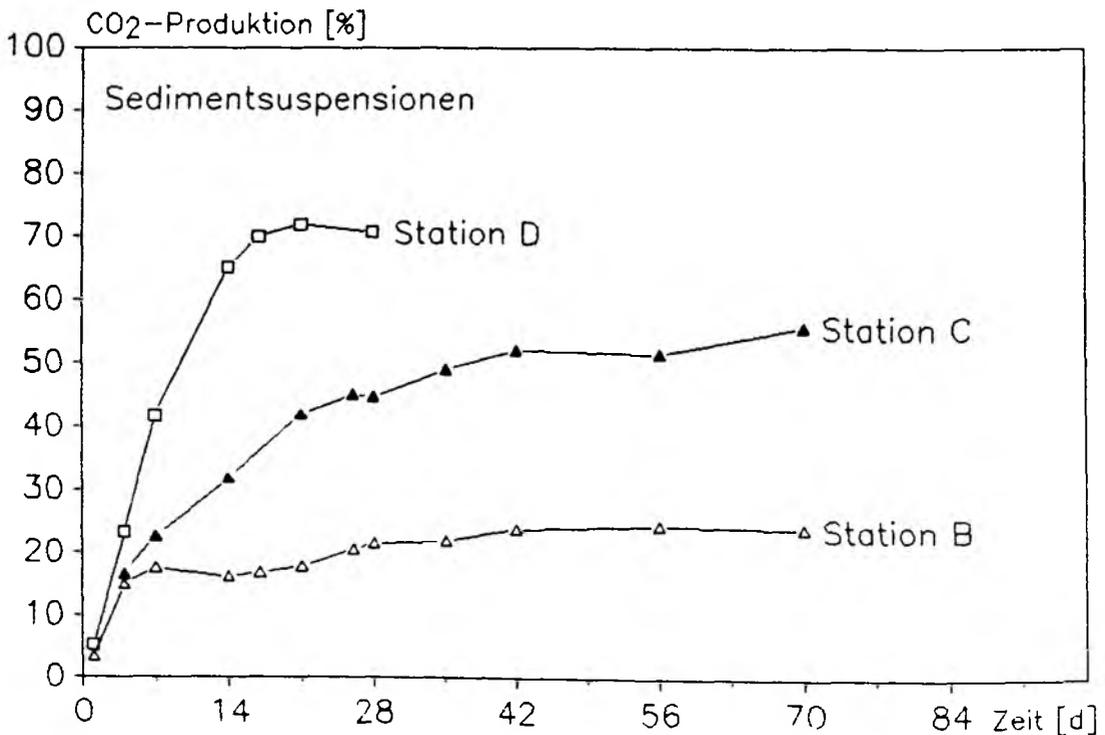


Abb.23: Mineralisierung von 1 µg/l Thiourea in Sedimentproben aus der westlichen Ostsee

3.4.5 ABBAU VERSCHIEDENER KONZENTRATIONEN AN 4-NITROPHENOL

Beim 4-NP wurde mit Konzentrationen von 0.5 bis 5000 $\mu\text{g/l}$ gearbeitet und es zeigte sich ein sehr unterschiedlicher Verlauf des Abbaus. In den Wasserproben fing er erst nach 14 - 70 Tagen an, nur das sedimentnahe Wasser von Station A, zeigte schon zwischen 7 und 14 Tagen eine starke Mineralisierung von 1 $\mu\text{g/l}$. Hier wurden 500 $\mu\text{g/l}$ nicht abgebaut (Abb.24 und Tab.12).

Bei den Proben aus 1 m Tiefe der Station A wurde die niedrigste Konzentration von 0.5 $\mu\text{g/l}$ nur zu 17.3+8.8 % abgebaut. Es war ein fast linearer Anstieg zu beobachten (Abb.24). Bei den höheren Konzentrationen zeigte sich ein schnellerer Abbau mit typischer Akklamationsphase (14 bzw. 31 Tage), allerdings jeweils nur bei einer von 3 Parallelen, 500 $\mu\text{g/l}$ konnten gar nicht abgebaut werden (Abb.25 und Tab.12).

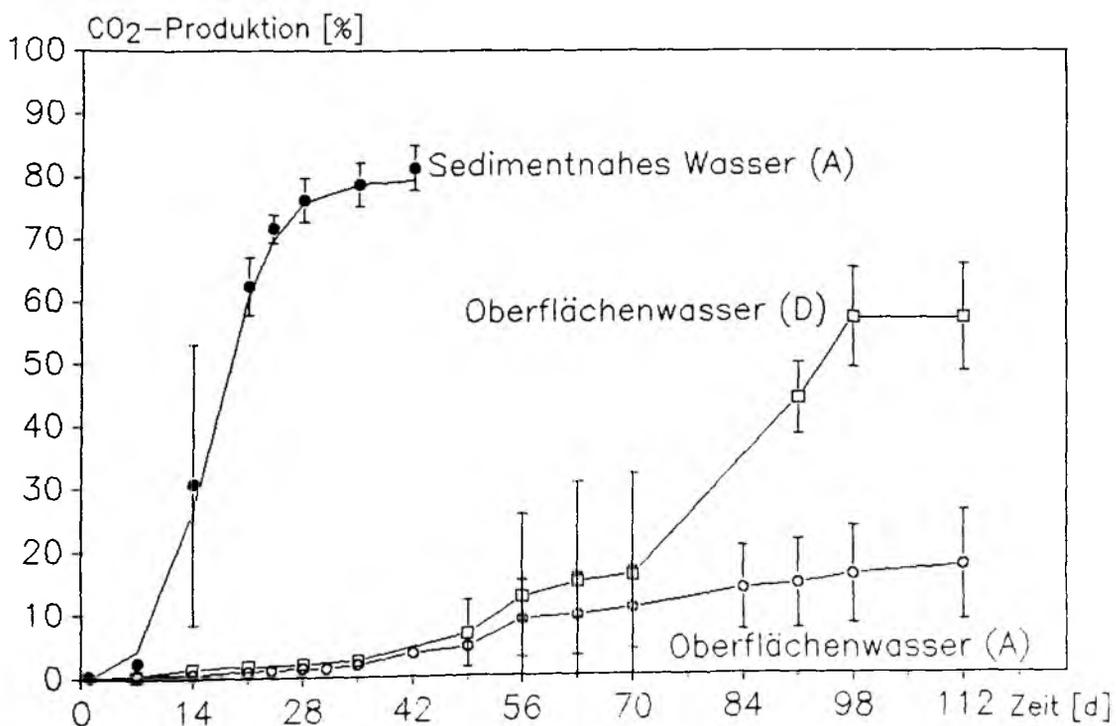


Abb.24: Mineralisierung von 0.5 oder 1 $\mu\text{g/l}$ 4-Nitrophenol in Wasserproben aus der westlichen Ostsee. Die Kurve für A,sW wurde mit einem Kurvenanpassungsprogramm berechnet (Modell 4, vgl. Abb.16), die Symbole stellen die Meßwerte dar.

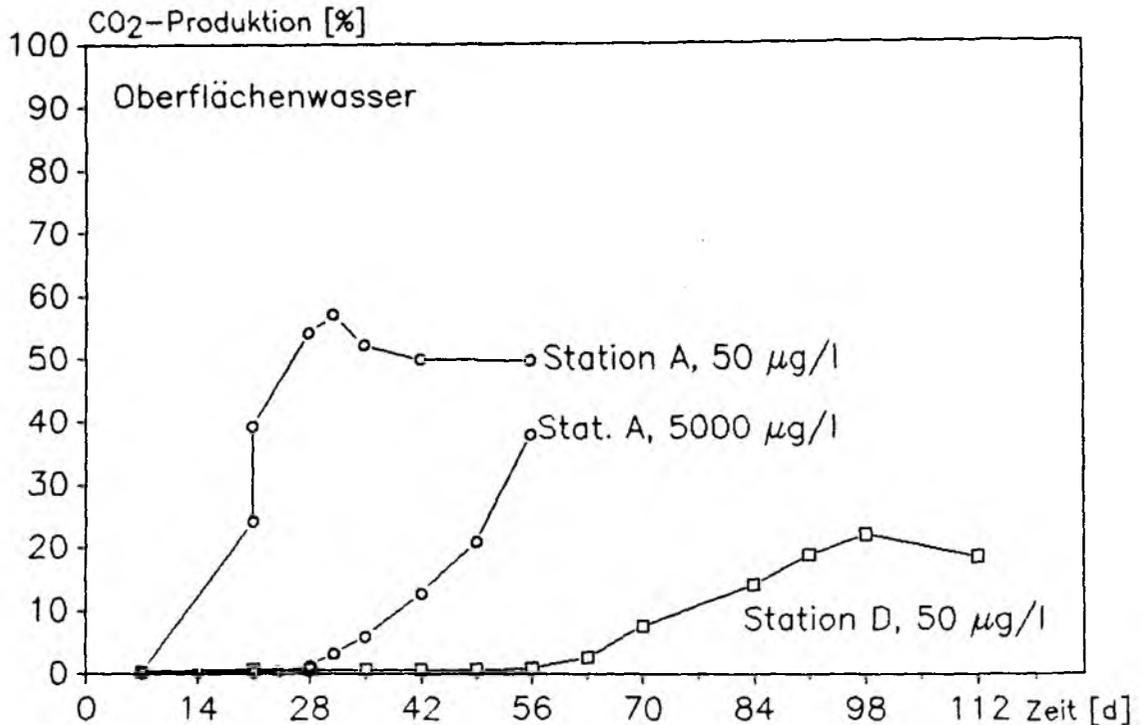


Abb.25: Mineralisierung höherer Konzentrationen an 4-NP in je einer Wasserprobe aus der westlichen Ostsee.

Beim Oberflächenwasser von B überschritt der Abbau nur knapp 10 % in 112 Tagen (Tab.12).

Bei Station D setzte der Abbau in Wasser bei der niedrigsten Konzentration nach 49 Tagen ein (Abb.24). 50 µg/l wurden erst nach 70 Tagen und nur zu maximal 22.1 % mineralisiert (Abb.25). Bei zwei weiteren, nur mit nicht radioaktiv markiertem 4-NP versehenen Proben konnte nach der gleichen Zeit eine Entfärbung gemessen werden (Tab.12). 5 mg/l 4-NP wurden nur in einer Parallele nach 70 Tagen bis auf einen kleinen Rest abgebaut (Tab.12).

Auch Sedimentsuspensionen wurden Konzentrationen von 1 bis z.T. 5000 µg/l 4-NP ausgesetzt. Es zeigte sich die schon bei DEG (3.4.3) und Thiourea (3.4.4) beobachtete Tendenz zum weniger vollständigen Abbau bei Sedimentproben der Station B (Abb.26). Dort wurden 42.1 ± 2.5 % mineralisiert und es trat eine Akklimationsphase von mindestens 7 Tagen Dauer auf (Abb.26).

Bei Proben der Station D erreichte die Mineralisierung 72.3 - 75.4 % (Abb.26 und Tab.12). Während der Abbau bei 1 $\mu\text{g/l}$ sehr schnell einsetzte, war bei 50 $\mu\text{g/l}$ eine Akklimationsperiode von 35 Tagen festzustellen (Abb.26). Zu 2 der Proben mit 1 $\mu\text{g/l}$ sowie allen 3 Parallelen mit 50 und 5000 $\mu\text{g/l}$ war irrtümlicherweise die doppelte Menge Sediment zugegeben worden (Tab.13). Es zeigte sich aber kein sehr großer Unterschied zwischen den 3 Parallelen bei 1 $\mu\text{g/l}$, der Abbau hatte nach 7 Tagen überall 10 % überschritten (13 \pm 3%) und es war eine maximale Standardabweichung von 10 % bei 56 % Abbau zu verzeichnen (Abb.26). 5 mg/l waren in 3 Parallelen nach 24, 41 und 59 Tagen vollständig abgebaut worden, wie sich über photometrische Messungen zeigen ließ (Tab.12).

Beim Sediment von C konnte eine Probenserie mit 500 $\mu\text{g/l}$ unmarkiertem 4-NP angesetzt werden. Außerdem wurde eine Suspensionsprobe mit 1 $\mu\text{g/l}$ in einer Biometerflasche inkubiert (vgl.3.4.6). Es zeigte sich ein Abbau in 3 Parallelen nach einer Akklimationsperiode von 14 bzw. 33 Tagen, der jeweils 7 - 14 Tage dauerte (Tab.12).

Eine Bilanzierung ergab nur noch 4.4 % der Radioaktivität im überstehenden Wasser der Sedimentproben von Station B und 7.0 bzw. 7.3 % bei D, während in den Wasserproben i.d. Regel der nicht mineralisierte Anteil noch gelöst vorhanden war (Tab.12). Die Restbeträge von 53 % bei Station B und 18 - 20 % bei D waren wahrscheinlich an das Sediment adsorbiert (vgl. Tab.13). Bei der Station B war es sehr schlickig und hatte einen hohen Anteil organischer Substanz von 44 mg C/g Trockengewicht. Die Sedimente der Stationen C und D enthielten nur 2.3 bzw. 0.5 mg C/g TG (Tab.1). Eine Adsorption ist um so höher, je mehr organische Substanz im Sediment enthalten und je geringer die Korngröße ist (ERNST et al.1986).

Tabelle 12: Abbau von 4-Nitrophenol in unterschiedlichen Konzentrationen bei verschiedenen Stationen der Forschungsfahrt. Abbau bedeutet Mineralisierung bei Einsatz von radioaktiv markiertem 4-NP bzw. Entfärbung (photometrischer Nachweis) bei höheren Konzentrationen. Zusätzlich sind die Aufnahme in die Zellen und die restliche Radioaktivität im überstehenden Wasser am Ende der Inkubation aufgeführt.

Konzentration [ug/l]	Probe	Abbau zu 10 % [d]	Abbau zu 50 % [d]	Max. CO2 [%]	Stdabw [%]	Aufnahme [%]	Stdabw [%]	Überstand [%]	Stdabw [%]	Volumen [l] bzw. [cm3 Sed]	Reaktion
0.5	A,1m	63 - 70	NA	17.3	8.8	1.5	0.6	74.4	10.7	0.5 - 1	Akklimationsphase
1.0	A,sW	7 - 14	21.0	81.3	3.6	2.1	0.1	ND	ND	0.25 - 0.5	logistisch
	B,1m	91 - 98	NA	11.1	4.9	0.1	0.1	78.7	6.5	0.25 - 0.5	NA
	B,Sed.	7 - 14	NA	42.1	2.5	ND	ND	4.4	NV	5 - 10	logistisch
	D,1m	49 - 56	98.0	56.9	8.6	2.5	NA	65.2	17.4	0.5 - 1	Akp
	D,Sed.	4 - 7	21.0	72.3	5.5	ND	ND	7.3	2.9	5 - 10	1.Ordnung
Biometerflaschen	A,1m	81	NA	41.0	NA	ND	NA	31.0	NA	0.1	Akp
	B,Sed.	24	NA	48.0	NA	ND	NA	4.0	NA	1.0	logistisch
1.0	C,Sed.	21	85.0	62.0	NA	ND	NA	16.0	NA	1.0	NA
	D,Sed.	39	NA	44.0	NA	ND	NA	35.0	NA	1.0	linear
50.0	A,1m	14 - 21	28.0	49.8 - 57	NA	5.3	NA	ND	ND	0.5	logistisch
	D,1m	70 - 84	NA	22.1	NA	2.1	NA	70.6	NA	0.5	Akp
	D,Sed.	35 - 43	56.0	75.4	1.7	ND	ND	7.0	2.0	5 - 10	logistisch
5000.0	A,1m	35 - 42	NA	>38	NA	2.5	NA	ND	ND	0.5	Akp

Fortsetzung Tabelle 12:

Entfärbung bei unmarkierten Proben

Konz. [ug/l]	Probe	Entfärbg. [d]	Paral- lelen	Volumen [l oder cm ³]
50.0	A,1m	> 100	2	0.25
	D,1m	70 - 84	2	0.50
	KBM	> 100	3	0.10
500.0	A,1m	> 100	3	0.10
	A,sW	> 100	3	0.10
	C,Sed.	14 - 28	1	1.00
		14 - 28	1	1.00
		33 - 40	1	1.00
	KBM	> 100	3	0.10
5000.0	A,1m	31	1	0.50
		> 100	2	0.25
	D,1m	70	1	1.00
		> 100	2	0.50
	D,Sed.	18 - 24	1	5.00
		38 - 41	1	5.00
		56 - 59	1	2.50



Reaktion**Besonderheit**

Akklimationsphase	NA
	NA
Akklimationsphase	NA
	NA
Akklimationsphase	Huminstoffbildung
Akklimationsphase	Huminstoffbildung
Akklimationsphase	Huminstoffbildung
	NA
Akklimationsphase	Huminstoffbildung
	NA
Akklimationsphase	Huminstoffbildung
Akklimationsphase	Huminstoffbildung
Akklimationsphase	Huminstoffbildung

Tabelle 13: Direkte Messungen eines Teils der Sedimente zur Bestimmung des fest adsorbierten 4-NP-Anteils

Probe	Sorption DPM/g TG	Einwaage [g/l]	Sorption [%]	Sorption [$\mu\text{g/l}$]
D, 1 μg	8060	15.27	10.13	0.10
D, 1 μg	4910	31.66	12.79	0.13
D, 1 μg	4860	30.16	12.07	0.12
D, 50 μg	2740	30.72	1.31	0.66
D, 50 μg	3160	30.28	1.52	0.76
D, 50 μg	4190	31.04	2.06	1.03
Biometerflaschen:				
D, 1 $\mu\text{g/l}$	5080	12.90	5.45	0.05
C, 1 $\mu\text{g/l}$	5350	12.00	5.34	0.05
B, 1 $\mu\text{g/l}$	79790	3.30	21.88	0.22

Es zeigte sich eine deutlich höhere prozentuale Adsorption von 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP, obwohl die absolut sorbierte Menge bei 50 $\mu\text{g/l}$ höher war. Die wechselnden Sediment : Wasser Verhältnisse hatten bei 1 $\mu\text{g/l}$ einen geringen Einfluß. Nur in der Biometerflasche von D, die ebenfalls 1 $\mu\text{g/l}$ enthielt, war der adsorbierte Prozentsatz deutlich niedriger.

Eine Bestimmung des adsorbierten Anteils beim Sediment der Station B wurde nur bei der Biometerflasche durchgeführt und es waren circa 22 % adsorbiert. Es ist zu vermuten, daß in den geschüttelten Flaschen mit Sedimentsuspensionen mehr adsorbiert war, weil durch die homogene Verteilung des Sediments eine größere Adsorptions-Oberfläche zur Verfügung stand. Die Biometerflaschen wurden stehend inkubiert

Bei den Sedimentproben von Station C mit 500 $\mu\text{g/l}$ und Station D mit 5 mg/l konnte eine Bildung huminstoffähnlicher Verbindungen beobachtet werden. Diese bräunliche Aggregate hatten ein atomares C:N-Verhältnis von 9.2 - 10.6 beim Sediment von C. Beim nicht inkubierten Sediment betrug es 7.15 (Tab.1). Eine parallel inkubierte Nullprobe mit Sediment von C ohne 4-NP Zusatz hatte allerdings auch ein Verhältnis von 9.6.

Die absoluten Mengen an Kohlen- und Stickstoff waren unterschiedlich: beim Nullwert waren sie mit 2.0 - 2.8 mg C/g TG und 0.24 - 0.35 mg N/g TG ähnlich wie in der Urprobe, die 2.26 und 0.37 enthielt (Tab.1). Die Proben mit 0.5 mg/l 4-NP enthielten 3.2 - 3.9 mg Kohlenstoff und 0.33 - 0.42 mg Stickstoff/g TG. Da hier das gesamte Sediment geerntet wurde, kann von einer geringen aber signifikanten Erhöhung des C-Gehalts um 0.4 - 1.6 mg C aber nur 0.00 - 0.05 mg N/g TG ausgegangen werden.

Beim grobsandigen Sediment von D, dem 5 mg/l 4-NP zugesetzt worden war, war das C:N Verhältnis der Huminstoffen mit 6.7 - 8.4 deutlich höher als im Sediment der Urprobe mit 5.74 (Tab.1). D. h. die organische Substanz der gebildeten Huminstoffe hatte eine andere Zusammensetzung als die der ursprünglichen Sedimentprobe. Es waren 10.1 - 13.7 mg C/g TG und 1.4 - 1.9 mg N/g TG enthalten, in der Urprobe waren es nur 0.48 und 0.10 pro g TG gewesen (Tab.1). Die Gesamtmenge an geernteten Huminstoffen betrug ca 55 mg TG dies entspricht nur 0.55 - 0.75 mg C absolut, während die entsprechenden Sediment-Einwaagen ca 15 g betragen.

Auch bei einer Wasserprobe der Station A wurde beim Abbau von 5 mg/l 4-NP eine Bildung von Huminstoffen beobachtet. Da diese Probe radioaktives 4-NP enthielt, konnten der Anteil an 4-NP oder dessen Abbauprodukten in den Huminstoffen quantifiziert werden, nachdem diese abgesaugt, zentrifugiert und gewaschen waren. 1 ml der auf 4 ml konzentrierten Huminstoffe enthielt 27957 DPM, 1 ml einer Vergleichsprobe mit nur 50 µg/l 4-NP, von denen ebenfalls 5 µg radioaktiv waren, enthielt nur 2305 DPM. In Prozent von der Gesamtaktivität im gesamten eingesetzten Volumen von 0.5 l waren bei 5 mg/l ca 3.6 % und bei 50 µg/l 0.3 % der Radioaktivität in der Huminstofffraktion enthalten. Es konnten aber keine gelösten oder kolloidal vorliegenden Stoffe erfaßt und vor allem nicht das ganze Volumen zentrifugiert werden, sodaß wahrscheinlich ein noch größerer Anteil in Huminstoffe überführt wurde. Im Mikrogramm ausgedrückt waren mindestens 180 von 5000 µg/l in den gebildeten Partikeln enthalten, bei 50 µg/l waren es nur 0.15 g.

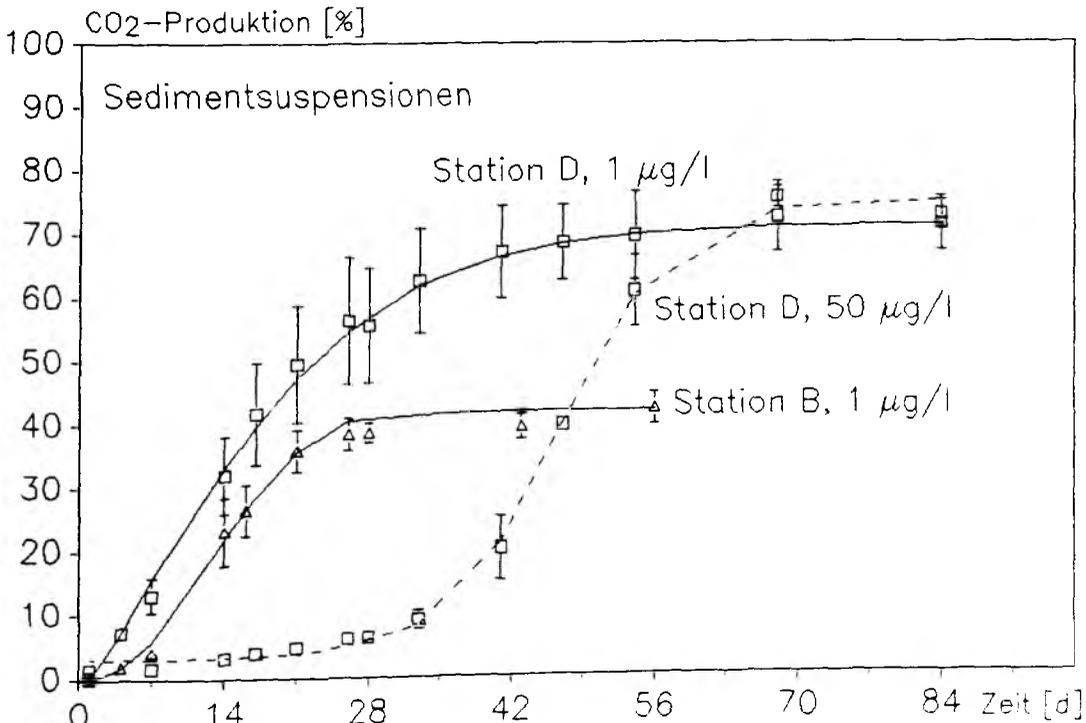


Abb.26: Mineralisierung von 4-NP in Sedimentproben aus der westlichen Ostsee. Alle Kurven wurden mit einem Kurvenanpassungsprogramm berechnet (Modelle 3 + 4, s. Abb.15 und 16), die Symbole stellen die Meßwerte dar.

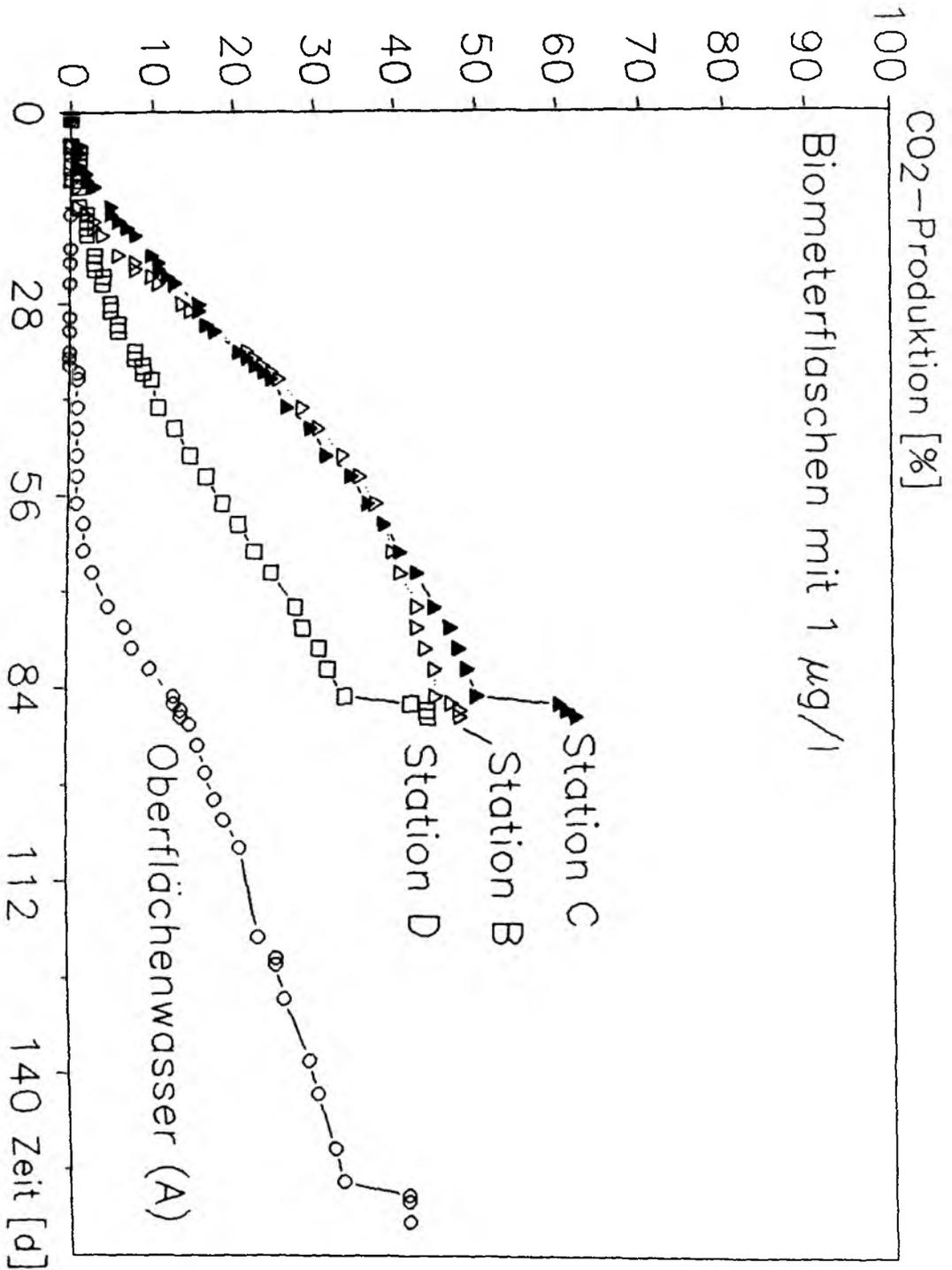


Abb.27: Mineralisierung von 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP in Biometerflaschen mit einer Wasserprobe und 3 Sedimentproben aus der westlichen Ostsee. Nach 85 bzw. 156 Tagen wurden die Sedimentproben angesäuert.

3.4.6 VERGLEICH DES ABBAUS IN BIOMETERFLASCHEN UND SUSPENSIONEN

Bei 4-NP konnte ein Vergleich des Abbaus nach der unter 2.12.1 beschriebenen Methode und der Mineralisierung in Biometerflaschen (vgl.2.17) durchgeführt werden. In einer Oberflächen-Wasserprobe der Station A setzte der Abbau im Wasser in der Biometerflasche nach 63 Tagen ein und war erst nach 156 Tagen beendet. 41 % waren zu CO₂ abgebaut worden (Abb.27). Dies deckte sich gut mit der für 0.5 µg/l ermittelten Akklimationsperiode von 63 - 70 Tagen (Tab.12).

Alle weiteren Wasserproben sowie eine Formol fixierte Kontrolle enthielten nach 85 Tagen noch 89 - 97 % der Radioaktivität im Wasser gelöst, nur 0 - 5 % wurden zu CO₂ abgebaut. Dies deckte sich nicht mit den Ergebnissen beim sedimentnahen Wasser von A. In den anderen 3 Parallelen mit 1 µg/l lag ein sehr schneller Abbau vor (Abb.24). Bei der Probe aus 1 m Tiefe der Station D hatte ein Abbau bei 3 Parallelen mit 1 µg/l nach 49 - 56 Tagen eingesetzt, in der Biometerflasche fand sich jedoch nach 85 Tagen noch kein Abbau. Evtl. war das eingesetzte Volumen von 100 ml zu klein, um die selten vorkommenden Abbauer zu enthalten (vgl. 3.4.7).

Bei den Sedimentsuspensionen zeigte sich ein durchaus ähnlicher Verlauf des 4-NP Abbaus in den Parallelproben und der Biometerflasche mit 1 µg/l der Station B (Abb.26 und 27). Am Ende der Inkubation waren nur noch 4 % des 4-NP im überstehenden Wasser, 22 % waren adsorbiert (Tab.12 und 13). Dies deckt sich in etwa mit der Bilanz der Suspensionen (Tab.12). Es wurden 48 % statt zuvor 42.1+/-2.4 % zu CO₂ mineralisiert, was daran liegen kann, daß das Verhältnis von Wasser zu Sediment in den Biometerflaschen zugunsten einer Desorption konstant blieb, während aus den Suspensionen mehrfach Wasser entnommen werden mußte.

Es konnte auch eine Probe mit Sandsediment der Station C untersucht werden. In dieser Biometerflasche setzte der Abbau schneller ein, und am Ende waren ca 15 % mehr mineralisiert als bei der Probe von Station B. Der starke Anstieg nach 85 Tagen war durch das Ansäuern der Proben am Ende des Versuchs bedingt (Abb.27). Am Ende waren insgesamt 62 % mineralisiert, 16 % befanden sich im Überstand und 5 % waren adsorbiert.

Bei der Station D setzte der Abbau in der Biometerflasche deutlich verzögert gegenüber den Suspensionsproben mit 1 µg/l ein. Hier war die Sedimenteinwaage gering, sodaß nur wenig Abbauer mit dem Sediment eingebracht wurden (vgl. Tab.7 und Tab.14). Wahrscheinlich war der Abbau diffusionslimitiert, da die Biometerflaschen nicht geschüttelt werden konnten. Der Abbau war nach 85 Tagen mit 44 % CO₂ wahrscheinlich noch nicht abgeschlossen, denn die CO₂-Produktion stieg immer noch langsam an. Es waren noch 35 % der Radioaktivität im Überstand. Im Versuch mit Suspensionen waren dort am Ende 7.3 % enthalten (Tab.12). Nur ca 5 % der Radioaktivität gegenüber 10 - 13 % im zuvor beschriebenen Versuch waren adsorbiert (Tab.13).

Bei allen Biometerproben wurde in den ersten 10 Tage kaum ein prozentualer Abbau deutlich. Es konnte aber in den drei Biometerflaschen mit Sediment deutlich mehr entstandenes CO₂ als in der Base aufgefangene Radioaktivität gemessen werden, als in der Kontrolle. Durch die große Pufferkapazität des Seewassers mußte die Freisetzung des gesamten Kohlendioxids etwas verzögert sein, denn der 100 % Wert der Berechnung bezieht sich auf das im gesamten Volumen enthaltene 4-NP. Ein zweifaches Ansäuern der Proben nach 85 Tagen ergab bei der Probe mit Schlicksediment (B) eine ca dreiprozentige Steigerung der CO₂-Ausbeute, bei den Sandsedimenten stieg sie um weitere 10 %.

3.4.7 QUANTIFIZIERUNG DER ABBAUER MIT EINER MPN-METHODE

Für einige Substanzen konnte die Anzahl der Abbauer in natürlichen und akklimatisierten Wasser- oder Sedimentproben mit einer MPN-Methode ermittelt werden, bei der die zu untersuchende Verbindung als einzige Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Bei Phenol wurde 1 µg/l und bei 4-NP wurden 1 und 500 µg/l eingesetzt. Bei 4-NP konnten die Abbauerzahlen vor und nach Einsetzen einer Akklimation ermittelt werden. Die Durchführung erfolgte nach der von Alexander (1982) beschriebenen Methode.

Tabelle 14: Anzahl der Abbauer von Phenol und 4-Nitrophenol in natürlichen Wasser- und Sedimentproben aus der westlichen Ostsee (Stationen siehe 3.4)

Probe	eingesetzte Substanz:		
	1 µg/l Phenol [Abbauer pro ml Wasser oder cm ³ Sediment]	1 µg/l 4-NP	500 µg/l 4-NP
A,1m	2	0.02	<0.01
A,sW	45-210	0.22	<0.01
B,1m	3-17	0.02	NV
B,Sed.	NV	1.30x10 ²	NV
C,Sed.	3x10 ⁴	NV	NV
D,1m	NV	<0.01	<0.01
D,Sed.	NV	<10	<10
Bülk	NV	NV	0.11-1.10
KBM	NV	NV	<0.01

(Zur Ermittlung des 95 % Vertrauensbereichs müssen die Werte mit 3.3 multipliziert bzw. durch 3.3. dividiert werden)

Bei den 4 untersuchten Stationen (vgl. 3.4.1) konnten Bakterien nachgewiesen werden, die Phenol in der Konzentration von 1 µg/l abbauten. Die großen zahlenmäßigen Unterschiede von 10⁰ - 10⁴ spiegeln sich in den natürlichen Abbauraten wieder, nur beim Oberflächenwasser der Station A schienen zwar wenige, aber sehr

aktive Phenolabbauer gewesen zu sein, denn der Abbau zeigte nur eine sehr kurze lag-Phase (Tab.8 und 14 sowie Abb.18).

4-NP Abbauer konnten nur in wenigen Proben in Volumina von 10 - 100 ml nachgewiesen werden. Beim sedimentnahen Wasser der Station A waren es um eine Zehnerpotenz mehr als im Oberflächenwasser (Tab.14). Hier setzte der Abbau von 1 $\mu\text{g/l}$ am schnellsten ein (Abb.24). In einer Sedimentprobe der Station B war mit $130/\text{cm}^3$ die höchste Anzahl an 4-NP Abbauern nachweisbar (Tab.14).

Tabelle 15: Anzahl der Abbauer während und nach der Akklimation an 4-NP in unterschiedlichen Konzentrationen (Stationen siehe 3.4)

Probe	Inkubation:		Anzahl der Abbauer bei	
	Dauer [d]	Konzentration [$\mu\text{g/l}$]	1 $\mu\text{g/l}$ [Abbauer/ml]	500 $\mu\text{g/l}$ [Abbauer/ml]
A,sW	17	1	<1	<0.01
A,1m	31	50	10-17	<1
A,1m	31	5000	$4.7-28 \times 10^3$	NV
B,Sed.	15	1	140-930	70
D,Sed.*	14	1	<10	<10
D,Sed.	29	1	61	<10
D,Sed.	29	5000/1	2×10^3	1600×10^3
D,Sed.**	29	5000/2	NV	<10
D,Sed.	42	5000/2	NV	17×10^3
D,1m	120	1	<1	<0.1

* = während des Abbaus, nach 29 Tagen waren 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP

** = vor dem Abbau von 5000 $\mu\text{g/l}$ 4-NP nach 42 Tagen war auch in dieser Parallele 4-NP abgebaut.

Es zeigte sich deutlich eine Abhängigkeit der Zunahme der Abbauer von der Konzentration, mit der die Probe inkubiert wurde. Bei Inkubation mit 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP konnte beim sedimentnahen Wasser von Station A kein Wachstum der 4-NP Abbauer festgestellt werden (Tab.15). Auch bei Sedimentproben von B waren nach 15 Tagen annähernd gleichviele Abbauer vorhanden wie in der Urprobe. Bei Sedimentsuspensionen von Station D waren nach 14 Tagen, als der Abbau schon 30 % überschritten hatte (Abb.26), ebenso wie in der Urprobe keine Abbauer nachweisbar. Nach 29 Tagen waren 61 Abbauer/ml vorhanden (Tab.15).

Bei Inkubation mit 50 $\mu\text{g/l}$ zeigte sich bei den Proben mit Oberflächenwasser der Station A eine geringe Zunahme der Abbauer. Eine Inkubation mit 5 mg/l führte zum Anstieg der Abbauerzahl auf 10^3 - $10^4/\text{ml}$.

Bei 5 mg/l war bei Sedimentproben von Station D eine starke Zunahme der 4-NP-Abbauer zu beobachten, die bei der ersten Parallele, in der ein Abbau stattgefunden hatte, am größten war. Hier zeigte sich das einzige Mal eine Zunahme um drei Größenordnungen bei den Bakterien, die 500 $\mu\text{g/l}$ abbauen konnten, gegenüber denen, die 1 $\mu\text{g/l}$ mineralisierten. Die 2. Parallele mit 5 mg/l 4-NP wurde vor und nach dem Abbau untersucht. Während vor dem Abbau noch keine Abbauer in 0.1 ml nachweisbar waren, stieg ihre Anzahl nach dem Abbau auf $17 \times 10^3/\text{ml}$ (Tab.15). Es ließ sich also zeigen, daß die Zunahme der Abbauer erst nach Abbau des 4-NP erfolgte.

Es waren also mindestens 50 $\mu\text{g/l}$ für ein Wachstum der Abbauer nötig. In der Regel waren mehr Abbauer mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/l}$ erfaßbar. Eine Ausnahme bot das Sediment, das mit 5000 $\mu\text{g/l}$ vorinkubiert worden war.

3.4.8 2-NITROPHENOL

Es wurden zwei Konzentrationsreihen von 0.5 - 5000 $\mu\text{g/l}$ durchgeführt, wobei nur bis 50 $\mu\text{g/l}$ markiertes 2-NP genommen wurde, ab 500 $\mu\text{g/l}$ konnte der Abbau photometrisch gemessen werden. Eine Wasserprobe aus der Kieler Förde vom 25.10.89 und eine Sedimentprobe vom Falckensteiner Strand vom 7.11.89 wurden untersucht.

In den Wasserproben zeigte sich ein schneller Abbau mit einer Lag-Phase von nur 1 - 2 Tagen bei 0.5 $\mu\text{g/l}$ (Abb.28). Bei 5 $\mu\text{g/l}$ setzte ein schneller Abbau erst nach 10 Tagen ein und bei 50 $\mu\text{g/l}$ dauerte es 11 Tage bis der Abbau in der ersten Parallele einsetzte, die zweite folgte nach 15 Tagen, in der 3. Parallele wurden 50 $\mu\text{g/l}$ bis zum Ende des Versuchs nach 42 Tagen nicht abgebaut. Bei dieser Konzentration zeigte sich also ein deutlicher Akklimationseffekt mit steiler Abbaurate nach erfolgter Akklimation, der nicht in allen Parallelen erfolgte. 5 $\mu\text{g/l}$ 4-NP, die als Vergleich dazugenommen worden waren, wurden erst nach einer Akklimationsperiode von 28 Tagen mineralisiert (Abb.28).

Die niedrigste Konzentration (0.5 $\mu\text{g/l}$) wurde im Sediment anders als im Wasser abgebaut (Abb.29). Die Kurve folgte einer linearen Abbaukinetik mit nur 33.5+ -5.6 % Abbau zu CO_2 in 35 Tagen. 5 $\mu\text{g/l}$ wurden nach einer 8 Tage langen Akklimationsperiode zu 55.4+ -2.3 % mineralisiert, während bei 50 $\mu\text{g/l}$ der Abbau erst nach ca 14 Tagen einsetzte, mit 58.3+ -2.4 % ein Maximum erreichte, aber dann wieder auf 44.9+ -4.3 % fiel. Die Proben mit 4-NP zeigten einen fast linearen Anstieg ohne deutliche Lag-Phase auf nur 36.9+ -5.7 % CO_2 nach 35 Tagen.

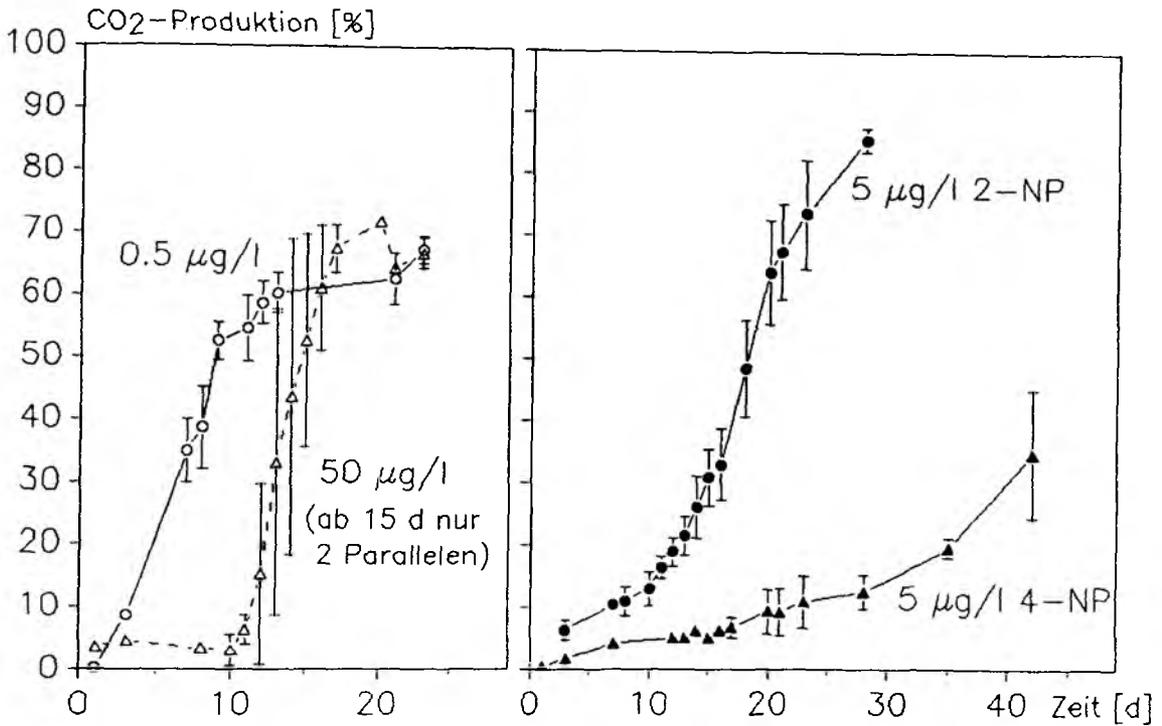


Abb.28: Mineralisierung von 2-Nitrophenol in einer Konzentrationsreihe von 0.5 bis 50 μg/l in Wasserproben aus der Kieler Förde. Als Vergleich dienten 5 μg/l 4-NP.

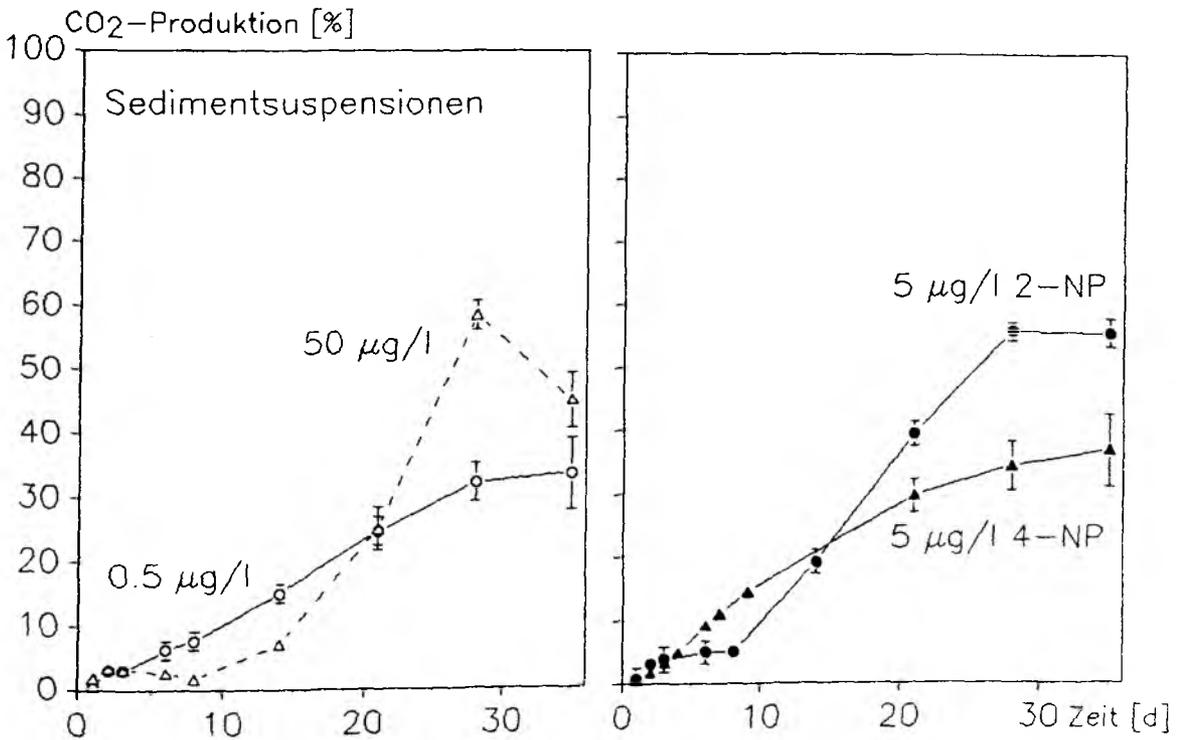


Abb.29: Mineralisierung von 2-Nitrophenol in einer Konzentrationsreihe von 0.5 bis 50 μg/l in Sedimentproben aus der Kieler Förde. Als Vergleich dienten 5 μg/l 4-NP.

Tabelle 16: Abbau der Nitrophenole in Konzentrationen von 500 und 5000 $\mu\text{g/l}$ in Wasser- und Sedimentproben

Probe	2-NP:	500 [d]	5000 [d]	4-NP:	500 [d]	5000 [d]
Wasserproben:						
1.Parallele		5	31		12	NV
2.Parallele		47	34		27	NV
3.Parallele		>55	>55		55	NV
Sedimentproben:						
1.Parallele		21	30		12	12
2.Parallele		27	>35		17	17
3.Parallele		29	>35		23	22

Es zeigte sich deutlich eine hohe Variabilität im Einsetzen des Abbaus höherer Konzentrationen in den Wasserproben (Tab.16). In zwei Proben mit 2-NP erfolgte kein Abbau im Versuchszeitraum.

Im Sediment verlief der Abbau nicht deutlich schneller, aber die drei Parallelen lagen dichter zusammen. Zwischen 500 und 5000 $\mu\text{g/l}$ 4-NP bestand kein Unterschied, während 5000 $\mu\text{g/l}$ 2-NP nur in einem Fall abgebaut wurden. 4-NP wurde bei beiden Konzentrationen etwas schneller abgebaut als 2-NP (Tab.16).

Zum weiteren Vergleich des Abbaus von 2- und 4-Nitrophenol sind im Folgenden die Anzahlen der Nitrophenol-Abbauer der Original-Wasserprobe aus der Kieler Förde vom 25.10.89 und der Sedimentprobe vom Falckensteiner Strand vom 7.11.89 und ihre Entwicklung während der Inkubation dargestellt.

3.4.9 ENTWICKLUNG DER ZAHL DER ABBAUER IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION AN ZUGESETZTEM SUBSTRAT

Beim 2-Nitrophenol wurden zu verschiedenen Zeiten während der Inkubation MPN-Reihen durchgeführt, wobei der Einfluß einer Inkubation mit Konzentrationen unter 50 $\mu\text{g/l}$ auf die Abbauerzahl untersucht werden sollte. Da 2-NP eine sehr niedrige spezifische Aktivität sowie eine geringere Gelbfärbung als 4-NP aufwies, wurde mit 5 $\mu\text{g/l}$ und 1 mg/l gearbeitet. Durch die verschiedenen Konzentrationen konnten die Anteile der Biozönose quantifiziert werden, die zum Abbau hoher und/oder geringer Mengen an Nitrophenol befähigt waren.

In den Sedimentproben waren um mehrere Zehnerpotenzen höhere Abbauerzahlen festzustellen als in Wasserproben. Zwischen den zwei Nitrophenolen zeigte sich bei Wasser- und bei Sedimentproben kaum ein Unterschied. Die MPN-Konzentration von 1 mg/l erwies sich als ungünstig, denn es konnten nur bei der Wasserprobe mit 2-NP überhaupt Abbauer in der Originalprobe nachgewiesen werden, ihre Anzahl lag also um mindestens eine Größenordnung niedriger als die Anzahl der Bakterien, die Nitrophenole im Mikrogramm-Bereich abbauen (Tab.17).

Tabelle 17: Veränderung der Anzahl der Bakterien, die 2-NP abbauen können, nach Abbau von 0.5 - 50 µg/l 2-NP. Die Zahl wurde durch MPN-Reihen mit 5 bzw. 1000 µg/l 2-NP und 1 bzw. 1000 µg/l 4-NP als einziger C-Quelle ermittelt.

Probe	Inkubation:		Anzahl der Abbauer bei	
	Dauer [d]	Konzentr. [µg/l]	1 µg/l [Abbauer/ml]	500 µg/l [Abbauer/ml]
Sedimentproben:				
Urprobe 4-NP			2300	< 180
Urprobe 2-NP			2200	NA
Wasserproben:				
Urprobe 4-NP			0.1-1.3	< 0.02
Urprobe 2-NP			0.12-2.1	0.13
Inkubationen:				
Nr.1	13	0.5	0.09-2.4	0.23
Nr.2	13	0.5	0.09-0.14	0.23
Nr.3	13	0.5	0.04-0.11	0.23
Nr.1*	17	50	0.04-0.09	0.23
Nr.2**	17	50	0.9-20	NA
Nr.3	17	50	1.7-17	0.23
Nr.1	23	5	3.9-7	0.23
Nr.2	23	5	1.2-10	0.23
Nr.3	23	5	1.2-8	0.23

NA = nicht auswertbar

* = kein Abbau im Versuchszeitraum

** = nach 17 Tagen war der Abbau bei dieser Parallele noch nicht abgeschlossen

Es wurde deutlich, daß Konzentrationen im Mikrogramm-Bereich nur zu einem geringfügigem Wachstum der 2-NP-Abbauer führten. Beim Abbau von 5 und 50 μg konnten sich ca 7 - 10 fach mehr Abbauer entwickeln als in der Urprobe. In der Parallele mit 50 $\mu\text{g/l}$, die keinen Abbau in 42 Tagen gezeigt hatte, waren weniger Abbauer vorhanden als in der Urprobe.

Bei 1 mg/l konnten bei allen Ansätzen Abbauer in 3 Parallelen mit 10 ml Probenwasser festgestellt werden, in höheren Verdünnungen waren in keinem Fall Abbauer nachweisbar, z.T. waren die MPN-Ansätze nicht auswertbar (vgl.2.15). Es wurde ein weiteres Phänomen beobachtet, daß sich nicht tabellarisch darstellen ließ. Und zwar konnten Proben, die aus Anreicherungen mit 50 $\mu\text{g/l}$ stammten, in denen der Abbau bereits erfolgt war, eine zweite Dosis von 1 mg/l 2-NP in den MPN-Röhrchen sehr schnell abbauen. Bei Anreicherungen mit 0.5 oder 5 $\mu\text{g/l}$ sowie der 3.Parallele von 50 $\mu\text{g/l}$, die nach 42 Tagen noch keinen Abbau zeigte, war der Abbau von 1 mg/l jedoch erst nach 2 - 3 Monaten erfolgt.

3.5 ABBAU VON 4-NITROPHENOL IN SITU DURCH EINE REINKULTUR

Um Abbau und Akklimation in der Natur zu untersuchen, konnten 2 Versuche mit Diffusionskammern durchgeführt werden, die *in situ* inkubiert wurden und durch Polycarbonat-Filter mit 0.2 μm Porenweite mit dem Umgebungswasser in Verbindung standen. Ein Problem war die Zugabe des gut wasserlöslichen 4-NP, das nur in 1 - 2 Schüben in Dialysesäcken in einem Agargel zugesetzt werden konnte. Auf diese Weise war die Diffusion etwas verzögert, so daß in den Kammern ca 8 -24 h lang 4-NP mit einer maximalen Anfangskonzentration von 1.3 mg/l zur Verfügung stand.

Im ersten Versuch wurde eine Reinkultur zu natürlichem Fördewasser gegeben, die kurz zuvor 4-NP im Labor bei 10°C abgebaut hatte. Parallel wurde eine Kammer nur mit Fördewasser inkubiert, um das Auftreten einer Akklimation an den 4-NP Abbau unter *in situ* Bedingungen zu verfolgen. Die Entwicklung von Bakterien, die 4-NP abbauen konnten, wurde über die MPN-Methode verfolgt. Beide Kammern erhielten zweimal eine Dosis 4-NP (vgl. 2.18).

Die erste Dosis wurde in der Kammer mit der Reinkultur abgebaut, denn nach 6.5 h bei 12.6 - 12.8°C waren nur noch 80 $\mu\text{g/l}$ während in der anderen Kammer noch 280 $\mu\text{g/l}$ vorhanden waren. Nach 24 h waren nur noch dort ca 60 $\mu\text{g/l}$ meßbar. Der zweite Zusatz von 4-NP nach 3 Tagen wurde in 6 h nicht mehr abgebaut.

Wird die Entwicklung der Abbauerzahl betrachtet (Abb.30), so zeigte sich eine konstante Anzahl bei der Reinkultur bis nach 3 Tagen, dann ging sie um mehr als 2 Zehnerpotenzen zurück. Die Kammer mit der natürlichen Mischkultur enthielt zu Beginn weniger als 0.018 Abbauer/ml und nach einem Tag 0.2/ml. Bis zum Ende trat keine weitere Vermehrung auf sondern die Anzahl fiel wieder unter 0.18/ml (keine Abbildung). Es konnten mikroskopisch heterotrophe Nanoflagellaten in den Ausgangsproben festgestellt werden.

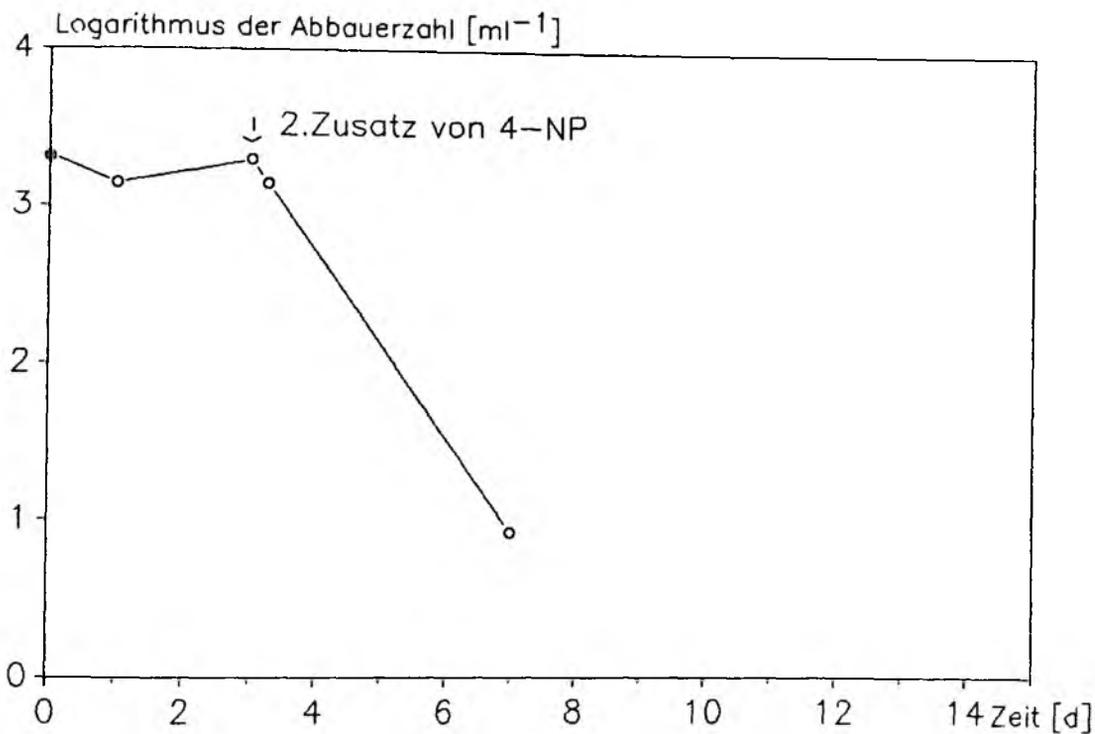


Abb.30: Entwicklung einer Reinkultur, die 4-NP bei 10°C abbauen konnte, während einer *in situ* Inkubation mit zweimaligem Zusatz von 1 mg/l 4-NP.

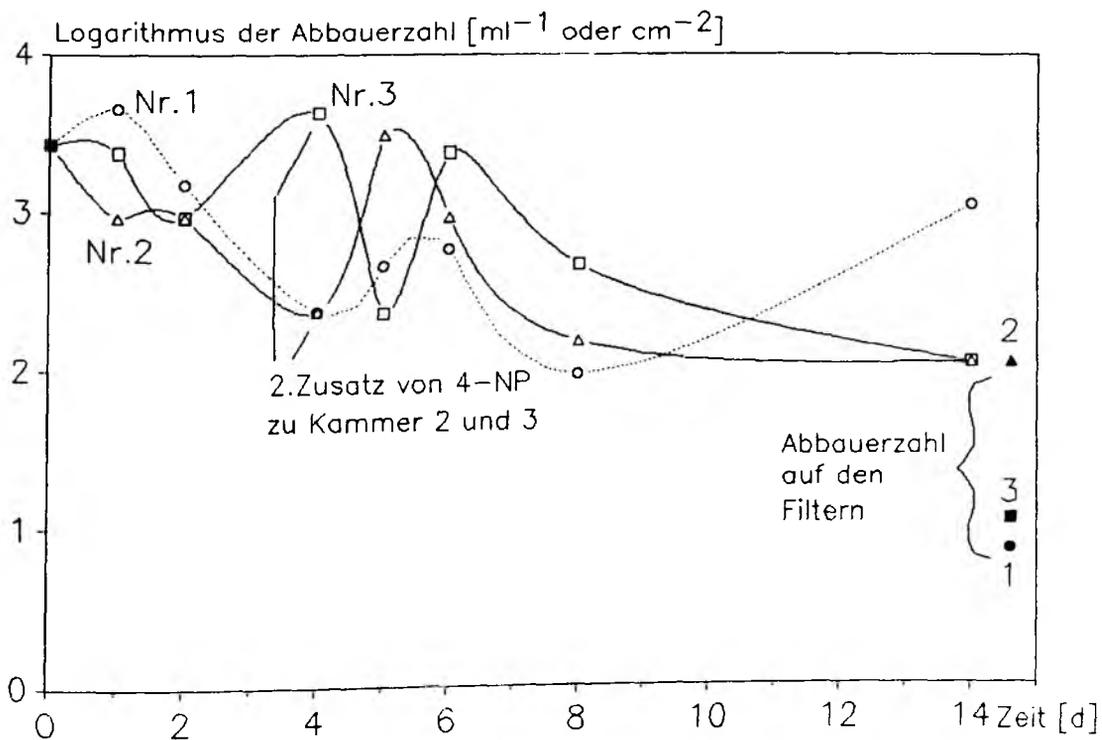


Abb.31: Entwicklung einer an den 4-NP Abbau akklimatisierten Mischkultur während einer *in situ* Inkubation. Nach 4 Tagen wurde zu 2 Kammern erneut 4-NP zugesetzt.

Am Ende des Versuchs wurden die Filter mikroskopisch untersucht, die die Seitenwände der Diffusionskammern bildeten. Sie waren mit einem dichten Biofilm aus Bakterien bewachsen, der auch Flagellaten enthielt.

3.6 ÜBERLEBEN UND WACHSTUM EINER AN DEN ABBAU VON 4-NP ANGEPAßTEN UND DANN IN SITU GEHÄLTERTEN MISCHKULTUR

In einem weiteren Versuch wurde mit 5 Kammern gearbeitet, die alle eine natürliche Wasserprobe enthielten. Zu 3 Kammern wurden zusätzlich 11 ml einer Mischkultur zugesetzt, die kurz zuvor 500 µg/l 4-NP abgebaut hatte. Am Anfang enthielten alle Kammern 4-NP, am 4.Tag wurde 4-NP ein zweites Mal nur zu einer Kammer ohne und zu 2 Kammern mit Abbauer-mischkultur zugesetzt. Während dieses Zeitraums sank die Wassertemperatur von 8.8 auf 6.1°C (vgl.2.18).

Es konnte kein Abbau des 4-NP in den ersten 3 h der Freiland-Inkubation gemessen werden, nach einem Tag war in allen Kammern kein 4-NP mehr nachzuweisen. Nach dem 2.Zusatz von 4-NP konnte erst nach einem Tag die nächste Probe genommen werden, und es war kein 4-NP mehr vorhanden.

Die Abbauerzahlen in den Ansätzen mit akklimatisierten Zellen verhielten sich im Wesentlichen in den 3 Parallelen ähnlich. Sie nahmen bis zum Versuchsende nach 14 Tagen nur um eine Zehnerpotenz ab (Abb.31). Der Zusatz von neuem 4-NP am 4.Tag zu nur 2 Kammern bewirkte allenfalls eine stärkere Oszillation in diesen beiden Kammern. Ein Teil der Abnahme der Zellzahl im Wasser konnte durch Bestimmung der Anzahl pro Quadratzentimeter Filterfläche erklärt werden. Die Zahlen pro ml oder cm² können ungefähr miteinander verglichen werden, weil die innere Oberfläche der Kammer und das Volumen ungefähr gleich sind (vgl. 2.18). Am Ende waren in der Kammer Nr.1 ohne erneuten Zusatz am meisten Abbauer im Wasser. Bei einer Kammer mit zweitem Zusatz von 4-NP (Nr.2) waren ca gleichviele Abbauer im Wasser und an den Filtern (10² Abbauer/ml oder cm²). Die dritte Kammer enthielt 10² Abbauer/ml im Wasser und nur 10¹ Abbauer/cm² an den Filtern.

In den Ansätzen, die nur die natürliche Biozönose enthielten, waren am Anfang 0.08 Abbauer/ml. Nach 4 Tagen konnten in der Probe, die den neuen 4-NP Zusatz bekommen sollte, 0.4 Abbauer/ml nachgewiesen werden, danach blieb die Zahl zwischen 0.09 und <0.3/ml. Bei den Filtern waren auf 4.5 cm² keine Abbauer nachweisbar (keine Abbildung).

Unter dem Raster-Elektronenmikroskop zeigte sich bei diesem Versuch nur eine geringe Besiedelung der Filter, aber es wurden häufig Choanoflagellaten gesehen.

4. DISKUSSION

Die Frage, ob organische, grundsätzlich abbaubare Fremdstoffe, die in niedrigen Konzentrationen in der Natur vorkommen, dort mineralisiert werden können, ist von großer Bedeutung. Es ist immer wieder beobachtet worden, daß im Auslauf von Klärwerken Substanzen vorhanden sind, bei denen ein Abbau in biologischen Tests festgestellt werden konnte. Im Klärwerk kann es vorkommen, daß die Verweildauer zu kurz ist oder daß die Bakterienbiozönose nicht optimal an den jeweiligen Fremdstoff angepaßt ist. Somit ist dort ein unvollständiger oder gar kein Abbau möglich und Chemikalien können in die Umwelt gelangen. Um den Abbau in der Umwelt zu untersuchen, müssen die Konzentration des Fremdstoffes und die Anzahl der Abbauer als wesentliche Faktoren behandelt werden.

4.1 ABBAU VON 4-NITROPHENOL

Im ersten Teil der Diskussion soll am Beispiel des Abbaus von 4-NP aufgezeigt werden, welchen Einfluß Parameter wie Temperatur, Konzentration des eingesetzten Fremdstoffs und die Zusammensetzung der Biozönose auf die Geschwindigkeit und Vollständigkeit des Abbaus von Fremdstoffen in der Natur haben können. Auch die Veränderungen in der Biozönose nach einer Akklimation werden im ersten Teil eingehend im Zusammenhang mit dem Simulationsversuch besprochen.

4.1.1 VORVERSUCHE

Es zeigte sich nur ein geringer, statistisch schwer abzusichernder Anstieg von Gesamtbakterienzahl, mittlerem Zellvolumen und bakterieller Biomasse beim Einsatz von 250 µg/l 4-Nitrophenol. Dies ist bei der geringen Nitrophenolmenge kaum verwunderlich. Sogar nach Zusatz der doppelten Menge verschiedener leichter abbaubarer Substanzen konnte Höfle (1984) keine stärkere Zunahme der Gesamtbakterienzahl als in einer Nullprobe ohne Zusatz feststellen. Außerdem liegt der schon vorhandene Gehalt an gelöster organischer Substanz in Meerwasser in der Größenordnung von ca 0.6 - 8 mg/l Kohlenstoff (KENNISH 1989). Mit der Zugabe von 0.25 mg/l Nitrophenol wurden den untersuchten Proben nur noch 0.13 mg/l an Kohlenstoff hinzugefügt.

Weil es ein Ziel dieser Arbeit war, den Abbau von Fremdstoffen in möglichst niedrigen umweltrelevanten Konzentrationen und die Reaktion der mikrobiellen Biozönose darauf zu erfassen, wurden die Gesamtbakterienzahl und davon abgeleitete Parameter nur noch in Einzelfällen ermittelt. Mehr Aufschluß über Populationsverschiebungen ergab die Untersuchung der qualitativen Zusammensetzung der Biozönose. Die Bakterien konnten dabei nach Volumenklassen aufgeschlüsselt werden (Abb.2 und 3), oder der Anteil der Abbauer wurde mit einer MPN-Methode erfaßt (3.2.2.1). Es zeigte sich ein typisches Wachstumsereignis heterotropher Stäbchen, nachdem 2-NP abgebaut worden war. Außerdem nahm der Anteil fädiger Bakterien zu (Abb.3). Dies kann eine Reaktion der Biozönose auf Wegfraß durch Protozoen sein, wenn genügend Kohlenstoff-Quellen vorhanden sind, um diese Strategie zuzulassen (GÜDE 1979).

Die Untersuchung von Reinkulturen, die 2- und 4-NP abbauen konnten, ergab in allen Fällen einen Nitrophenol-Abbau mit einhergehender Freisetzung von Nitrit, wie er bei Germanier & Wuhrmann (1963), Raymond & Alexander (1971) und Siddaramappa (1973) beschrieben ist. Die Abbauewege werden also wahrscheinlich oxidativ über Catechol bzw. Hydrochinon ablaufen, wie es Zeyer (1988) für 2-NP und Spain et al. (1979) für 4-NP beschrieben haben. Da viele der isolierten Abbauer Pseudomonaden waren, die Nitrophenol auch in Süßwasser abbauten, schien es sich überwiegend um copiotrophe, salztolerante Formen zu handeln, die wahrscheinlich über allochthone Einträge ins Meer gelangt sind. Obwohl sie schon aus Anreicherungskulturen mit nur 250 µg/l stammten, konnten in einem untersuchten Fall 8 µg/l nicht mineralisiert werden. Anreicherungen aus den MPN-Reihen mit 1 µg/l waren nicht erfolgreich. Ein Abbau bei 10°C war möglich, dauerte aber meist sehr lange. Es zeigte sich also wie schwer es ist, die Bakterien zu isolieren, die den Abbau geringer Konzentrationen an Fremdstoffen in der Natur durchführen.

4.1.2 EINFLUSS DER KONZENTRATION AUF DEN ABBAU

Der Einfluß der Konzentration des zugesetzten Stoffes wird in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert. Einerseits wurde oft beobachtet, daß der Abbau um so länger dauert, je höher die Konzentration ist, und von einer Lag-Phase eingeleitet wird (MUNNEKE & HSIEH 1974, NYHOLM et al. 1984). Andererseits konnte besonders in aquatischen Biotopen ein schnelleres Einsetzen des Abbaus mit höheren Abbauraten bei höheren Konzentrationen festgestellt werden (BOETHLING & ALEXANDER 1979, HOOVER et al. 1986). Diese beide Phänomene sind gar nicht unvereinbar miteinander, wenn die Zahl der Abbauer in der anfänglichen Probe, das Vorkommen einer Akklimationsphase und eine mögliche Toxizität des Fremdstoffs in die Untersuchung einbezogen werden.

Wenn bereits in der Urprobe die zum Abbau befähigten Bakterien einen deutlichen Anteil der Gesamtbiozönose ausmachen, dann setzt der Abbau in dem Fall ohne Verzögerung ein, in dem die zugesetzte Konzentration ungefähr der Konzentration entspricht, an die die Abbauer und ihre Enzyme angepaßt sind. Diese kann in Klärwerken oder nur mäßig belasteten Gewässern um Größenordnungen (mg oder g) unterschiedlich sein. Wenn zu dieser als akklimatisiert zu bezeichnenden Biozönose eine höhere Konzentration zugesetzt wird, als sie für die vorhandenen Enzyme und Bakterien optimal ist, müssen sich die Abbauer vermehren und evtl. andere Enzyme bilden (LEWIS 1981, 1988). So kommt es zu einer Lag-Phase, in der der Fremdstoff zwar abgebaut wird, aber durch das ungünstige Verhältnis der Abbauerzahl zur Konzentration kann der Abbau noch nicht quantitativ sein, d.h. er wird mit weniger empfindlichen Methoden nicht erfaßt. Dieser Fall trat vor allem beim 4-NP Abbau in Sedimentproben und in akklimatisierten Mischkulturen auf und wird später behandelt.

Problematisch wird es bei toxischen Konzentrationen, oder bei Substanzen, die keine guten Wachstumssubstrate sind. Bei ihnen kann die Mineralisierung ganz zum Erliegen kommen, Detoxifizierungsmechanismen können den Abbau überlagern oder Abbauprodukte akkumulieren. In Mischkulturen können diese Prozesse alle gleichzeitig ablaufen, Abbauprodukte werden oft von anderen Mikroorganismen weiterverwendet und der Abbau verläuft effektiver, wie z.B. bei Parathion (SLATER & LOVATT 1984). In eigenen Untersuchungen wurde beim 4-NP Abbau freigesetztes Nitrit durch die abbauenden Bakterien oder durch Kommensalen wieder aufgenommen.

Weitere Versuche mit 2- und 4-Nitrophenol zeigten eine einsetzende Toxizität ab ca 5 mg/l bei Wasserproben aus der Ostsee. Bei dieser Konzentration erfolgte der Abbau seltener und meist später als in Proben mit niedrigeren Konzentrationen (Tab.16). Nyholm et al. (1984) konnten zeigen, daß im Konzentrationsbereich von 5 - 160 mg/l eine um 50 % verminderte Respiration sowohl in Aktivschlamm als auch in einer Bakterien-Reinkultur auftraten. Ähnliche Ergebnisse fanden Pagga et al.(1982). Sie konnten einen Zusammenhang zwischen Atmungshemmung (50 % ab 110 mg/l) und Abbauehemmung in Klärschlamm feststellen, auch die Mineralisierung anderer Verbindungen war vermindert. Die Toxizität von 4-NP war bei pH-Werten unter 7 stark erhöht.

Im zweiten Fall, wenn in der Urprobe nur sehr wenige oder gar keine aktiven Abbauer enthalten sind, ist die Konzentration an zugesetztem Fremdstoff immer für einen schnellen Abbau zu hoch. Es muß eine Lag-Phase auftreten, in der die Abbauer ihre Fähigkeit zur schnellen Mineralisierung entwickeln. Sie wird Adaptations- oder Akklimationsperiode (Akp) genannt und hat oft eine Dauer von mehreren Tagen (vgl.1.3). Mögliche Gründe für das Auftreten von Akklimationsperioden werden später diskutiert (4.1.5, 4.3 und 4.5). Zunächst soll insbesondere die Rolle der Konzentration für ein Wachstum der Bakterien an eigenen Ergebnissen zum Abbau von 4-NP vorgestellt werden.

Bei Konzentrationen unter ca 10 µg/l waren die Abbauraten gering, weil die Bakterien sich nicht mehr vermehren konnten. Wachstum der anfänglich sehr kleinen Abbauer-Population zeigte sich erst bei 80 und 250 µg/l 4-NP sowohl an der steil ansteigenden CO₂-Produktion, als auch an der erhöhten Aufnahme in die Biomasse und der Zunahme der Abbauerzahl um mehr als 3 Zehnerpotenzen (vgl.3.2.2). Der Abbau von 80 - 500 µg/l 4-NP setzte in Wasserproben aus der Kieler Förde nach 7 - 13 Tagen ein und die Entfärbung war schon nach 1 - 2 Tagen abgeschlossen, während die genauer erfaßbare CO₂-Produktion anstieg, bis 30 Tage vergangen waren. Das Ausmaß der Mineralisierung war unter diesen für die Abbauer günstigen Bedingungen hoch. Bei niedrigeren Konzentrationen unter 10 µg/l setzte ein Abbau zu CO₂ erst nach ca 17 Tagen ein und erreichte erst nach 34 Tagen 50 %.

Bei Konzentrationen im Milligramm-Bereich, wie sie in bei der Forschungsfahrt genommenen Proben und bei Versuchen mit 2-NP eingesetzt wurden, kann eine toxische Wirkung einsetzen. Bei 5 mg/l schien der Bereich für ein optimales Wachstum der Bakterien schon überschritten zu sein. Nur bei einzelnen Proben zeigte sich überhaupt ein Abbau und er setzte nach der Mineralisierung von 1 oder 50 $\mu\text{g/l}$ ein (Tab.12). Es konnten bei der Station A mindestens 13 % der eingesetzten Radioaktivität in der partikulären Fraktion gemessen werden (3.4.5). Dies deutet auf eine Detoxifizierungsreaktion hin, wie sie für Aniline beschrieben worden ist (ZEYER 1987). Neuere Untersuchungen zum Abbau von Nitrophenolen ergaben die Bildung von Aminophenolen, die zu Partikeln polymerisieren können (SCHACKMANN et al. 1990).

Bei der Station D vor der Odermündung wurden mit 5 mg/l im Meer selten vorkommende normalerweise bodenbewohnende Actinomyceten angereichert. In dieser Probe wurde das 4-NP nicht vollständig abgebaut und auch bei 50 $\mu\text{g/l}$ wurden nur 22 % mineralisiert. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Affinität der 4-NP abbauenden Enzyme nicht sehr hoch war. Bei 1 $\mu\text{g/l}$ setzte der Abbau etwas früher ein und war vollständiger als bei 50 $\mu\text{g/l}$ (Tab.12), es waren also andere Enzyme beteiligt und evtl. auch andere Bakterien, wie es auch Lewis und Mitarbeiter fanden (1985,1988). Abbauer waren weder am Anfang noch nach Abbau von 1 $\mu\text{g/l}$ nachweisbar (3.4.7).

Sehr niedrige Konzentrationen wurden oft mit extrem langsamen Raten umgesetzt, so waren bei Station D von 1 $\mu\text{g/l}$ erst nach 98 Tagen 50 % mineralisiert. Bei anderen Stationen stagnierte der Abbau bei 11 - 17 % (Tab.12), sodaß von keinem quantitativen Umsatz gesprochen werden konnte, zumal der Anteil an Verunreinigungen des radioaktiven 4-NP bei ca 10 % lag. Wahrscheinlich sind unterschiedliche Gründe für den unvollständigen Abbau relevant gewesen. Bei der Station nahe der Travemündung (A) wurde 4-NP bei Konzentrationen von 50 - 5000 $\mu\text{g/l}$ in meistens nur einer der Parallelen schnell und vollständig abgebaut (Tab.12). Es waren also dort Abbauer vorhanden, wenn auch unregelmäßig verteilt. 0.5 $\mu\text{g/l}$ waren wahrscheinlich zu wenig für einen quantitativen Abbau, da diese Menge für ein Wachstum nicht ausreicht. Bei der Station B in der Mitte der Lübecker Bucht dagegen waren wahrscheinlich keine Abbauer vorhanden, da in keiner Probe ein quantitativer Abbau in 3 Monate einsetzte (3.4.5).

Es zeigte sich also, daß auch eine sehr niedrige Konzentration den Abbau negativ beeinflussen kann. Außerdem erwies es sich als schwierig, den Abbau von Schadstoffen bei niedrigen Konzentrationen aus Versuchen mit höheren, leichter chemisch erfaßbaren Konzentrationen zu extrapolieren. Von den Abbauraten bei 80 und 250 $\mu\text{g/l}$ kann nicht auf die Abbauraten bei 0.8 und 0.08 $\mu\text{g/l}$ geschlossen werden (Tab.4). Es ist möglich, daß unterschiedliche Bakterien für die Mineralisierung niedriger und höherer Konzentrationen verantwortlich waren. Letztere konnten leicht mit der MPN-Methode oder auf Nitrophenol-Agar erfaßt, angereichert und isoliert werden (vgl.3.1.2 und 3.2.2). Sie bauen aber wahrscheinlich sehr niedrige Konzentrationen nicht ab, wie es bei einer Reinkultur gezeigt werden konnte (3.1.3). Dieses Phänomen ist auch bei Zaidi et al. (1988) bei mehreren Reinkulturen beobachtet worden.

Im Gegensatz dazu konnte bei Bakterien-Biozönosen kein Schwellenwert festgestellt werden, oberhalb dessen erst eine Mineralisierung von 4-NP zu verzeichnen war, wie es bei Zehnder & Schraa (1988) beschrieben ist. Der Abbau bei Konzentrationen im unteren Mikrogramm-Bereich war deutlich verlangsamt, wie es auch Hoover et al. (1986) feststellten.

4.1.3 EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN ABBAU

Es zeigte sich bei dem Versuch, natürliche Abbauraten unter *in situ* Bedingungen zu messen, daß die sich ergebenden Raten sehr niedrig waren. Erstens konnte nicht sichergestellt werden, daß 4-NP anstelle von Verunreinigungen mineralisiert wurde. Zweitens benötigt der Abbau von 4-NP unter Winterbedingungen länger als ein halbes Jahr (3.2.1). Daher schien es von Bedeutung zu überprüfen, ob eine Akklimation bei niedrigen Temperaturen auftritt (vgl.4.5). Es wurden einige Versuche mit akklimatisierten Mischkulturen durchgeführt, bei denen sich der Abbau bei 10°C nur geringfügig von 3 Tagen (bei 20°C) auf 5 - 7 Tage verlangsamte. Auch Reinkulturen konnten 4-NP bei 10°C abbauen, es dauerte z.T. aber erheblich länger als bei 20°C.

4.1.4 ROLLE DER BIOZÖNOSE

Wie schon aus dem bisher diskutierten Ergebnissen deutlich wurde, spielt die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose eine wesentliche Rolle für den Fremdstoff-Abbau. Je nach Größe des vorhandenen Anteils an aktiven Abbauern und nach der abzubauenen Konzentration muß eine mehr oder weniger große Verschiebung stattfinden, bis ein Fremdstoff quantitativ mineralisiert werden kann. Eine starke Anreicherung einzelner Arten, wie sie durch größere Mengen organischer Verbindungen entstehen kann, führt zur Verarmung der Vielfalt der Biozönose. Artenarme Biozönosen sind weniger stabil und können auf erneute Störungen, z.B. durch Einleitung weiterer, evtl. toxischer Verbindungen, leichter aus dem Gleichgewicht geraten und völlig zusammenbrechen. Außerdem kann es auch bei geringen Konzentrationen durch Bioakkumulation in höheren Gliedern der Nahrungskette, die auf Fremdstoffe empfindlicher reagieren können, zu unvorhersehbaren Folgen kommen (vgl.Tab.18). Bei einer ausgedehnten Untersuchung zur Bioakkumulation, die eine Anreicherung von Chemikalien durch direkt Aufnahme aus dem umgebenden Medium und über die Nahrung beinhaltet, konnte Folgendes festgestellt werden. Die direkte Aufnahme über das Wasser (Biokonzentration) spielte in limnischen Systemen eine größere Rolle, als eine Biomagnifikation über die Nahrungskette (LILLELUND et al.1987, KORTE 1987). Die individuellen Sorptionskapazitäten reichten für die in der Natur beobachteten hohen Schadstoffakkumulationen aus. Schon bei Konzentrationen von 0.1 - 1 µg/l des Herbizids Atrazin zeigten sich tiefgreifende Folgen im Versuchs-Ökosystem (LILLELUND et al.1987).

Daher ist die Untersuchung des Abbaus von Fremdstoffen in der Natur von großer Bedeutung. Nur durch eine möglichst schnelle und vollständige Mineralisierung von Fremdstoffen können toxische Wirkungen vermieden werden.

Tabelle 18: aquatische Toxizität von 4-Nitrophenol

Art	Parameter	4-NP EC ₁₀ * [mg/l]	4-NP EC ₅₀ * [mg/l]
Scenedesmus subspicatus	Biomasse	2.1	26
	Wachstum	10.0	50
Scenedesmus quadricauda	Wachstum	7.4	NV
Entosiphon sulcatum	Wachstum	0.8	NV
Brachidanio rerio	Tod	14.0	NV
Lepomis macrochirus	Tod	8.3	NV
Daphnia magna	Schwimmfähigkeit	9.0	12
	Reproduktion	1.3	NV
Ciona intestinalis	Filtrierrate	0.5	1.5
	Entwicklung	NV	0.5
Barentsia matsushimana	Koloniewachstum	0.03	0.32
Pseudomonas putida	Wachstum	4.0	NV
Photobacterium	Leuchtintensität	0.6-1.3	2.5-6.3

* EC = Effective Concentration: Konzentration, bei der eine Wirkung bei 10 % (EC₁₀) oder 50 % (EC₅₀) der Versuchsorganismen auftritt.

Nach BRINGMANN & KÜHN 1980, BRINGMANN & KÜHN 1982, KÜHN & PATTARD 1990, KAUFMANN & SCHOLZ 1986, RIPPEN 1984, LANGENFELD 1990, eigene Ergebnisse)

4.1.4.1 POPULATIONSVERSCHIEBUNGEN

Das Auftreten von Populationsverschiebungen nach Zusatz von Nitrophenolen wurde mehrfach untersucht (3.2.2.1, 3.2.4 und 3.4.7). Da die meisten Versuche im Labor in geschlossenen Systemen durchgeführt wurden, kann nicht mit Sicherheit geklärt werden, ob Artefakte der Inkubation oder natürliche Selektionsmechanismen beobachtet wurden. Die Diffusionskammer-Versuche sind besonders interessant, weil in ihnen das Überleben einer Abbauer-Reinkultur sowie einer Abbauer-Mischkultur in der Umwelt untersucht werden konnte (4.7). Da die zugegebenen Konzentrationen an 4-NP in fast allen Versuchen sehr niedrig waren, konnte mit Methoden, die die Reaktion der gesamten Bakterienbiozönose erfassen, wie der Gesamtbakterienzahl, nur ein geringer Effekt des Fremdstoff-Zusatzes festgestellt werden (vgl. 4.1.1). Es

waren genug natürliche C-Quellen vorhanden, die bereits ein Wachstum der Bakterien ermöglichten. Weitere ökologische Faktoren, wie z. B. Grazing durch heterotrophe Flagellaten hatten einen deutlicheren Einfluß auf die Zusammensetzung der Biozönose als das 4-NP. Allerdings ließ sich ein wichtiger, wenn auch indirekter Zusammenhang feststellen. Bei einem hohen Anteil der Abbauer an der Biozönose oder wenn die Abbauer auf dem zugesetzten Fremdstoff wachsen können, sind gerade die entstehenden großen Zellen durch ein Grazing besonders gefährdet (vgl. 3.2.4.2). Obwohl Wachstum für einen schnellen und quantitativen Abbau von höheren Konzentrationen an Fremdstoffen unbedingt nötig ist, kann also in der Natur gerade das Wachstum einen Nachteil für das Überleben der Abbauer bedeuten, wenn ihre Wachstumsrate gering ist. Niedrige Raten können durch geringe Temperaturen, die Art und Konzentration des Fremdstoffes bedingt sein.

4.1.4.2 WACHSTUM DER ABBAUER

Bei den Laborversuchen konnte mehrfach eine Zunahme 4-NP abbauender Bakterien festgestellt werden, nachdem dieses in Konzentrationen ab ca 50 $\mu\text{g/l}$ abgebaut worden war. In den ursprünglichen Wasserproben waren nur selten Abbauer nach langen Inkubationszeiten und in relativ großen Proben-Volumina nachweisbar (Tab.14 und 15).

Bei Durchführung von MPN-Reihen mit 500 und 1 $\mu\text{g/l}$ ergaben sich fast immer höhere Zahlen mit der niedrigeren Konzentration. Die Bakterien, die 0.08 und 8 $\mu\text{g/l}$ abbauten, ließen sich mit 250 $\mu\text{g/l}$ nicht erfassen (3.2.2.1). Oft bestanden große Unterschiede im Einsetzen des Abbaus von niedrigen und höheren Konzentrationen (vgl. 3.2.2 und 3.4.5). Diese Ergebnisse zeigen, daß nicht vom Abbau höherer auf den Abbau niedriger Konzentrationen geschlossen werden kann. Vermutlich werden unterschiedliche Teile der Biozönose selektiert: oligotrophe Bakterien mit Enzymen, die hohe Substrataffinität aber nur geringe -spezifität haben, mineralisieren geringe Konzentrationen, ohne zu wachsen. Copiotrophe, z. T. aus Einleitungen stammende Bakterien, wie die bereits erwähnten Actinomyceten oder die hauptsächlich isolierten Pseudomonaden (3.1.3), bauen höhere Konzentrationen über unterschiedliche Mechanismen ab. Dies geschieht z.T. weniger effektiv und langsam, wenn ein Teil des 4-NP in Huminstoffe überführt wird. Z.T. setzt der Abbau auch schnell ein und ist sehr vollständig, weil Wachstum durch das 4-NP möglich ist. Starkes Wachstum ergab sich bei den Proben, die 5 mg/l abgebaut hatten (Tab.15). Bei 50 $\mu\text{g/l}$ 4-NP konnte nur in einem Fall eine geringe Zunahme der Abbauer festgestellt werden. Um die genaue Konzentration zu ermitteln, bei der ein Wachstum einsetzen kann, wurde der Bereich zwischen 0.5 und 50 $\mu\text{g/l}$ bei einer Konzentrationsreihe mit 2-NP intensiv auf die Entwicklung der Abbauer untersucht (vgl.3.4.9). Es ergab sich ab 5 $\mu\text{g/l}$ ein geringes Wachstum der 2-NP-Abbauer.

Für den 4-NP Abbau sind nach allen bisher veröffentlichten Daten induzierbare Enzyme nötig, mit Ausnahme der Enzyme für die Umwandlung in Aminophenole, die konstitutiv sind (SCHACKMANN et al.1990). Außerdem können Nitrophenole als Stickstoff-Quellen genutzt werden, da beim Abbau Nitrit gebildet und auch Stickstoff inkorporiert werden kann (JENSEN 1967). Diese Besonderheiten können zur Erklärung der großen Unterschiede im 4-NP Abbau in unterschiedlichen Biotopen beitragen. Das Vorhandensein anderer Kohlenstoff-Quellen oder Stickstoffverbindungen kann den 4-NP Abbau in der Natur unterdrücken, während bei einer quantitativen Erfassung der Abbauer im Labor das eingesetzte Medium entscheidend dazu beiträgt, welche Abbauer angereichert werden. Z.B. konnten DNP abbauende Bakterien nur in stickstofffreien Kulturen angereichert werden (BRUHN et al. 1988)

Es kann indirekt aus dem Anteil der bakteriellen Biozönose, der einen Fremdstoff abbauen kann, sowie aus der Geschwindigkeit des Abbaus auf das Vorkommen der entsprechenden Verbindung in dem untersuchten Gewässer geschlossen werden. Mikroorganismen können auf diese Weise als Bioindikatoren benutzt werden, um z. B. ein relativ wenig kostenintensives Monitoring durchzuführen. Es muß aber berücksichtigt werden, daß z.B. durch MPN-Reihen, vor allem wenn sie mit hohen Konzentrationen und unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden, nur das Potential für einen Abbau in der Natur abgeschätzt werden kann. So waren in Proben, die bei 20°C inkubiert worden häufiger Abbauer enthalten als in Proben, die bei 10°C inkubiert wurden (3.2.1).

4.1.5 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN KONZENTRATION, AKKLIMATION UND WACHSTUM

Für eine Abschätzung der Verweildauer von Fremdstoffen in der Natur kommt dem mikrobiellen Abbau die Hauptrolle in der Verminderung der Konzentration zu (LINKFIELD et al.1989). Für die Modellierung des Verhaltens von Chemikalien in der Umwelt werden Ratenkonstanten für deren Abbau benötigt, um diesen Parameter quantitativ einbringen zu können. Wenn Akklimationsphasen das Einsetzen des Abbaus verzögern, können keine natürlichen Abbauraten gemessen werden. Diese Periode erschwert die modellhafte Erfassung und stellt einen Abbau in der Natur in Frage.

Weil beim 4-NP Abbau fast immer eine Akklimationsperiode vor dem schnellen Abbau auftrat, schien es von Interesse zu sein, dieses Phänomen genauer zu untersuchen.

Im Meer spielt besonders der Abbau von Fremdstoffen in Konzentrationen im Mikrogramm-Bereich eine bedeutende Rolle. Es liegen durch die starke Verdünnung aller Einträge nur selten Einzelstoffe in höheren Konzentrationen vor und oligotrophe Bakterien bilden einen beträchtlichen Anteil der Biozönose. So konnte für ein marines Isolat normales Wachstum bei 110 µg/l gemischten organischen Substrats ermittelt werden, sogar 1 µg/l Glucose wurden in Gegenwart einer Aminosäuremischung noch genutzt (LAW & BUTTON 1977). Beim Abbau unterschiedlicher Konzentrationen

an 4-NP in Wasserproben aus der westlichen Ostsee konnte gezeigt werden, daß Konzentrationen bis $0.08 \mu\text{g/l}$ abgebaut wurden. Allerdings dauerte die Akklimation bei Konzentrationen unter ca $10 \mu\text{g/l}$ deutlich länger als bei Konzentrationen im höheren Mikrogramm-Bereich. In einigen Fällen wurde versucht, durch erneute Zugabe von 4-NP den Akklimationsgrad der jeweiligen Proben festzustellen. Nur wenn die erste Dosis mindestens $50 \mu\text{g/l}$ betrug, ergab ein schneller Abbau des zweiten Zusatzes, daß eine gut akklimatisierte Biozönose vorlag.

In diesem Zusammenhang ist besonders darauf hinzuweisen, daß andere Autoren eine Schwellenkonzentration gefunden haben, unterhalb derer keine Akklimation erfolgt. So fanden Spain & Van Veld (1983) in Flußsedimenten bei Konzentrationen unterhalb von $10 \mu\text{g/l}$ 4-Nitrophenol einen langsamen Abbau, aber keinen schnelleren Abbau, wenn das Substrat ein zweites Mal zugegeben wurde. Ab $60 \mu\text{g/l}$ wurde eine zweite Dosis sehr viel schneller abgebaut. Für diese Autoren war eine Akklimation also an einen schnelleren Abbau nach erneutem Zusatz geknüpft.

Aelion et al. (1987) fanden keine Akklimation und keinen Abbau bei 14 ng 4-NP pro g Boden, während in der gleichen Aquifer-Sedimentprobe 530 ng/g nach 35 - 42 d abgebaut wurden. Sie fanden also eine Schwelle, unter der kein Abbau stattfand. Ob Abbau einer zweiten Dosis möglich war, wurde nicht untersucht, allerdings waren MPN-Bestimmungen erst nach erfolgtem Abbau möglich.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis konnte in allen Proben mit Meerwasser oder Sediment ein Abbau von 2- und 4-NP festgestellt werden. Die geringsten untersuchten Konzentrationen betragen 0.5 bzw. $0.08 \mu\text{g/l}$. Es wäre sinnvoll zu unterscheiden, ob Akklimation den Abbau nach einer Akklimationsperiode bedeuten soll, oder ob zu einer erfolgreichen Akklimation die Entwicklung einer Biozönose gehört, die die gleiche Substanz bei einer zweiten Zugabe schneller abbauen kann.

Bei verschiedenen Versuchen, den Akklimationsgrad von Proben mit Mischkulturen zu ermitteln, ergab sich ein schneller Zweitabbau, wenn die ursprüngliche Probe eine größere Menge 4-NP erhalten hatte. Der Abbau erfolgte schnell und unabhängig davon, ob beim 2. Mal eine kleine, gleichgroße oder größere Menge 4-NP zugegeben wurde (vgl. z.B. Abb.7). Der Grund war wahrscheinlich, daß die höhere Anfangskonzentration zu einer Vermehrung der Abbauer geführt hatte, wie sie mehrfach durch MPN-Zählungen erfaßt werden konnte (3.2.2.1, 3.4.7 und 3.4.9). Die entstandene Population konnte einen Zweitabbau ohne oder nur mit geringem Wachstum und auf jeden Fall ohne eine erneute Akklimationsperiode durchführen. Der Abbauverlauf entspricht einer chemischen Reaktion erster Ordnung, d.h. daß er unabhängig von der Konzentration des Reaktanden i.e. der Bakterien ist. Sie dienen in diesem Fall als Katalysator. Die Abbaurate wird erst geringer, wenn das Substrat zur Neige geht (ANDERSON et al. 1990). Für einen Abbauverlauf nach diesem Modell ist kein Wachstum nötig.

Wenn aber in der ursprünglichen Probe nur eine geringe Konzentration eingesetzt wurde (1 - 5 $\mu\text{g/l}$), dauerte der Zweitabbau bei großen Konzentration ungefähr genauso lange, wie er in der ursprünglichen Wasserprobe gedauert hatte, zu der gleich die höhere Konzentration gegeben worden war. Es waren also nach längerer Inkubation mit geringen Mengen an 4-NP noch Bakterien vorhanden, die auch größere Mengen umsetzen konnten, sie waren aber an diese Konzentration aber nicht akklimatisiert.

Wenn zu einer Probe, die für die gleiche Zeit ohne 4-NP inkubiert wurde, eine geringe Menge 4-NP gegeben wurde, setzte kein Abbau mehr ein (vgl. Abb. 7). Das heißt, daß wahrscheinlich durch die geringe Menge an 4-NP die Abbauer während der Inkubation erhalten blieben, wenn sie sich auch nicht vermehren oder physiologisch auf den Abbau der höheren Konzentration einstellen konnten.

Wenn beim zweiten Mal erneut eine geringe Konzentration zugesetzt wurde, erfolgte kein Abbau (3.2.3 und Abb.8). Warum die zweite geringere Konzentration nicht abgebaut wurde, ist schwer zu erklären. Leider wurde diese Untersuchung nur mit dem Probenwasser der Station D auf der Oderbank gemacht, es wurden allerdings 5 Parallelen angesetzt. Diese Station ergab in mehrfacher Hinsicht eigenartige Ergebnisse, der Landeinfluß könnte hier trotz der erhebliche Entfernung groß gewesen sein. Die Salinität war gering, der Nährsalzgehalt hoch (vgl. Abb.1 und Tab.1). Die Oder ist mit $16.6 \text{ km}^3/\text{Jahr}$ der wasserreichste Fluß der Arkona- und Bornholmsee, die insgesamt $30.7 \text{ km}^3/\text{Jahr}$ an Flusswasser erhalten (MAGAARD & RHEINHEIMER 1974).

Evtl. führten Süßwasserbakterien wie die erwähnten Actinomyceten den 4-NP Abbau durch. Die geringe Menge könnte cometabolisch abgebaut worden sein, sodaß für einen Zweitabbau nicht mehr genügend zusätzliche C-Quellen vorhanden waren. Der Zusatz von frischem Ostsee- oder Brackwasser förderte den Abbau jedoch nicht signifikant. Evtl. war auch das Probenvolumen von 100 ml, das für den Folgeversuch benutzt wurde, zu klein, um genügend Abbauer zu enthalten. Mit der MPN-Methode waren keine Abbauer in 1 - 10 ml nachzuweisen (Tab.15, 3.4.7).

4.1.6 EINFLUSS BIOTISCHER UND ABIOTISCHER FAKTOREN AUF DEN 4-NP ABBAU DURCH AKKLIMATISIERTE BIOZÖNOSEN

Diverse Umweltfaktoren haben einen entscheidenden Einfluß darauf, ob ein Abbau induziert werden kann und ob die mineralisierenden Bakterien überleben oder sogar wachsen können. Auf einige dieser Faktoren soll im Folgenden besonders eingegangen werden. Die Tabelle 19 bietet einen Überblick über die Komplexität des Fremdstoffabbaus in der Natur. Viele Faktoren wirken sich auf akklimatisierte Biozönosen anders aus als auf natürliche. Einige Faktoren wie Konzentration und Temperatur sind in ihrer Bedeutung für den Abbau, schon im vorhergehenden Text besprochen worden (4.1.2 und 4.1.3).

Tabelle 19: Umweltfaktoren, die den Abbau von Fremdstoffen in der Natur beeinflussen

Faktor	Definition	Möglicher Effekt
Konzentration	hoch niedrig	Toxizität Kein Wachstum, langsamer Abbau
Zahl der Abbauer	hoch niedrig	Kein Wachstum, schneller Abbau Wachstum, verzögerter Abbau
Eigenschaften des Substrats:		
Löslichkeit	hoch gering	Mobilität Verfügbarkeit eingeschränkt Toxizität
Flüchtigkeit	hoch	Verfügbarkeit eingeschränkt
Adsorption	hoch gering	Verfügbarkeit eingeschränkt Mobilität, Toxizität
Wechselwirkung zwischen Substrat und abbauendem Organismus:		
Substratnutzung	gut mäßig schlecht	Mineralisierung Akkumulation von Metaboliten Cometabolismus, Akkumulation von Metaboliten
Enzym-Induktion		Verzögerung des Abbaus
Substrat Affinität	hoch niedrig	Vollständiger Abbau, Toxizität Unvollständiger Abbau
Substrat Spezifität	hoch niedrig	Selektiver Abbau, "Dead-End-Metabolite" Abbau mehrerer Substrate
Abiotische Faktoren:		
Temperatur	niedrig	Wachstum und Abbau verlangsamt
Salinität	hoch zunehmend	Hemmung des Abbaus Umstellung der Biozönose
pH-Wert		Einfluß auf chemische Eigenschaften, z.B. erhöhte Toxizität
Sauerstoff	niedrig	Mineralisierung oft nur aerob
Nährstoffe	niedrig	Unvollständiger Abbau Nutzung der Fremdstoffe als Stickstoff, Phosphor oder Schwefel-Quelle

Fortsetzung Tabelle 19:

Faktor	Möglicher Effekt
Andere C-Quellen	Konkurrenz oder Cosubstrat
Fremdstoffgemische	Addition oder Synergismus in der Toxizität Konkurrenz oder Cosubstrat Verringerte Verfügbarkeit
Biotische Faktoren:	
a)Eigenschaften des Abbauers	
Gen-Stabilität	Plasmidverlust, -transfer
Überlebensrate	Verdrängung der Abbauer
Wachstumsrate	Uneffektiver Abbau
Anheftung/Mobilität/Aggregation	Je nach Biotop günstig oder ungünstig
b)Einfluß der Biozönose	
Konkurrenz um Nährstoffe	Verdrängung der Abbauer
Detoxifizierung	Unerwünschte Metabolite
Nutzung von Metaboliten	Vollständigerer Abbau
Symbiotischer Abbau	Mineralisierung nur in Mischkultur
Wegfraß durch Protozoen	Verzögerung des Abbaus
Regeneration von Nährsalzen durch Protozoen	Vollständigerer Abbau

Um herauszufinden, welche Veränderungen in einer mikrobiellen Biozönose nach einer Akklimation erfolgt sind, wurde der sogenannte Simulationsversuch durchgeführt. Er sollte zeigen, ob Bakterien, die an den Abbau von 250 µg/l 4-NP akklimatisiert sind, diese Verbindung auch unter ungünstigen Bedingungen mineralisieren können, wie sie in der Natur häufig anzutreffen sind.

Bei allen Ansätzen setzte der Abbau ohne deutliche Akklimationsperiode ein. Es konnte also vor allem ein Einfluß auf die Abbaurate und die Vollständigkeit des Abbaus durch den Einfluß unterschiedlicher Faktoren ermittelt werden.

4.1.6.1 ABBAURATEN, -KINETIK UND AUSMASS DER MINERALISIERUNG

Die höchste Abbaurrate zeigte sich bei den Proben, die mit gealtertem Brackwasser verdünnt wurden (Abb.9). Die Abbaukinetik sieht fast wie eine Reaktion erster Ordnung aus, obwohl Wachstum aufgetreten sein muß. Es konnte eine Kurvenanpassung mit dem Modell (3) für einen Abbau, der unabhängig von der Zahl der Abbauer ist, durchgeführt werden (Abb.9). Die Kurve geht aber nicht durch den Nullpunkt. Einen sigmoiden Kurvenverlauf, der bei einem Wachstum der Abbauer zu erwarten wäre, kann nur aus dem fast fehlenden Abbau in den ersten 24 h annehmen, beim ersten Akklimationsexperiment (Abb.7), dessen Abbauverlauf mit dem gleichen Modell angepaßt wurde, konnte schon nach einigen Stunden ein deutlicher Abbau festgestellt werden. Hier wurden die Bakterien nicht auf 5 % verdünnt.

In den ersten 100 h verhielten sich die anderen 3 Ansätze gleich. Der Grund lag wohl in der Verfügbarkeit anderer C-Quellen. Danach näherte sich der Ansatz mit Cycloheximid dem mit gealtertem Brackwasser. Der Verlauf der CO₂-Produktionskurve ähnelt dem einer typischen logistischen Wachstumskurve (SCHMIDT et al. 1985). Die Abbaurrate nimmt zuerst zu, da die Abbauer wachsen. Dann wurde ein Wendepunkt erreicht und die Rate nimmt wieder ab, da das Substrat zur Neige geht (ANDERSON et al.1990). Eine Anpassung mit dem Modell (4) für logistisches Wachstum ergab eine gute Übereinstimmung mit den Meßwerten (Abb.9). Durch Unterdrückung der Protozoen konnten die Bakterien in diesem Ansatz wachsen (Tab.6).

Beim sterilfiltrierten Wasser verlief der Abbau wesentlich langsamer. Der Kurvenverlauf zeigte eine sehr geringe Abbaurrate, da er während der ersten 150 h fast linear war und danach abflachte. Eine Anpassung mit Modell (4) ergab eine sehr niedrige Rate und gab den Kurvenverlauf bis auf die letzten beiden Wertepaare relativ gut wieder (Abb.10). Der Einfluß des größeren DOC Angebots für die geringere Bakterienzahl machte sich also nicht bemerkbar. Es wurde mehrfach in anderen Versuchen beobachtet, daß der Abbau höherer Konzentrationen in partikelfreiem Wasser langsamer ablief als in partikelhaltigem Wasser.

Am langsamsten verlief der Abbau in dem Ansatz, dem frisches unbehandeltes Fördewasser zugesetzt worden war. Es zeigten sich zwei kurze Stagnationsphasen, die wahrscheinlich auf den Einfluß eines Grazing durch heterotrophe Flagellaten zurückzuführen waren (vgl. 3.2.4.3). Diese Kurve ist keinem kinetischen Modell zum Wachstum vergleichbar, da Plateaus erst bei Substraterschöpfung zu erwarten sind. Bei einer Anpassung an Modell 4 wird bei drei Wertepaaren die Abbaurrate deutlich unterschätzt (Abb.10). Vermutlich muß die Kurve als aus mehreren Wachstums- und Abbauschüben zusammengesetzt betrachtet werden. Es könnte sein, daß nach 16 Tagen der Abbau noch nicht vollständig war, sondern nur ein zweites, durch Grazing bedingtes Plateau vorlag.

Ungefähr das Gleiche gilt für die beiden Ansätze, die bei 10°C inkubiert wurden. Die Plateaus waren noch besser ausgeprägt als bei 20°C. Der Abbau setzte zwar sofort ein, verlief aber mit geringer Rate. Die erste Protozoen-Blüte zwischen 0 - 8 Tagen hatte nur einen deutlichen Einfluß auf den Abbau beim 10°C-Ansatz (Abb.12 und Tab.6). Die zweite Blüte nach ca 13 Tagen dagegen bewirkte eine sehr deutliche Stagnation der Mineralisierung bei ca 27 % CO₂ beim Ansatz 3D. Die Inkubationen bei 10°C wurden evtl. zu früh beendet. Nach 32 Tagen stagnierte der Abbau erneut beim Ansatz "3D", evtl. nur vorübergehend, bei einer Mineralisierung von nur knapp 50 %.

Die Aufnahme von Radioaktivität in die bakterielle Biomasse bestätigte den schnellen Umsatz des 4-NP in den Proben mit gealtertem Brackwasser (Abb.11). Die Probe mit Cycloheximid zeigte über die ganze Zeit eine relativ hohe Aufnahme mit einem Peak, nachdem über 50 % mineralisiert waren. In diesem Ansatz war also die größte Anzahl an Abbauern vorhanden. Beim frischen Wasser und beim sterilfiltrierten, frischen Wasser schwankte die Aufnahme meist nur zwischen 1 und 2 % und spiegelte in etwa das stark oszillierende Wachstum der Population wieder. Der physiologische Zustand der Zellen schien also in den verschiedenen Ansätzen unterschiedlich zu sein.

Die in Lösung verbleibenden Radioaktivität bestätigte einen sehr vollständigen Abbau bei den Ansätzen mit Brackwasser und mit Cycloheximid (vgl. 3.2.4). Das bedeutet, daß z.T. andere C-Quellen und vor allem Grazing einen negativen Einfluß auf die Abbaurate und die Vollständigkeit des 4-NP Abbaus hatten.

4.1.6.2 EINFLUSS AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG DER BIOZÖNOSE

Beim Brackwasser-Ansatz war die Zunahme der bakteriellen Biomasse kaum signifikant. Nach 4 Tagen war die Zahl nicht angestiegen, nach 7 Tagen hatte sie sich nur verdoppelt. Da 5 % die aus 12.5 µg/l 4-NP entstandenen Zellen enthielten, reichte die neuzugegebene Menge an 4-NP von weiteren 8 µg/l wahrscheinlich für ca eine Teilung der Abbauer aus. Die Zusammensetzung der Biozönose dieser Probe, die nur aus der Abbauermischkultur bestand, war am Anfang ähnlich heterogen wie bei den Proben mit frischem Wasser, und enthielt z.B. 20 % Kokken. Durch die Vorinkubation war also keine einheitliche Kultur entstanden. Die Bakterienzahl war überwiegend in 5 Volumenklassen verteilt (Tab.6 und 7). Während der Inkubation mit 8 µg/l 4-NP vereinheitlichte sich die Zusammensetzung etwas, sodaß am Ende 3 Volumenklassen (0.256 - 1.024) 80 % der Bakterien beinhalteten. Als Folge des geringen Wachstums waren die Bakterien also hauptsächlich größer geworden. Ihre Anzahl hatte sich nur geringfügig erhöht (Tab.6).

Vor allem die mittleren Volumenklassen, die die vermutlich stäbchenförmigen Abbauer enthielten (vgl.3.1.3), konnten sich im Ansatz mit Cycloheximid entwickeln (Abb.13). An der Verteilung der Zahl und der Biomasse in Volumenklassen wurde deutlich, daß die Zellen nach 4 Tagen sehr groß waren (0.512 und 1.024 µm³) und sich danach teilten (0.128 - 0.512) (Abb.13). Wahrscheinlich trat Wachstum auf anderen C-Quellen auf, die im frischen Ostseewasser oder als Verunreinigungen im Cycloheximid

vorhanden waren, denn der Biomassezuwachs von 36 auf 206 $\mu\text{g C/l}$ kann nicht durch den Zusatz von 8 $\mu\text{g/l}$ 4-NP erklärt werden.

Das relativ große mittlere Zellvolumen und die große bakterielle Biomasse am Anfang beim Ansatz mit sterilfiltriertem Wasser sind auf 3 große Zellen zurückzuführen, die 29 % der Biomasse ausmachten (Tab.6 und 7). Die Berechnung war daher stark fehlerbehaftet. Die beabsichtigte Kontrolle des Ansatzes mit Cycloheximid auf Artefakte ließ sich daher nicht durchführen. Erstaunlich war, daß die Gesamtbakterienzahl und das mittlere Zellvolumen während der Inkubation nicht größer wurden. Der Einfluß anderer C-Quellen machte sich also nicht bemerkbar. Dies spricht indirekt dafür, daß beim Ansatz mit Cycloheximid Verunreinigungen oder partikuläres Material genutzt wurden, denn der natürlich vorkommende gelöste Kohlenstoff hätte auch im sterilfiltrierten Wasser enthalten sein müssen.

Obwohl einzelne Flagellaten in den Ansätzen mit Brackwasser und sterilfiltriertem Wasser festgestellt wurden, scheinen sie kein effektives Grazing durchgeführt zu haben, was bei der geringen Gesamtbakterienzahl auch kaum zu erwarten war (Tab.6). Erst ab Gesamtbakterienzahlen oberhalb von $10^6/\text{ml}$ können Flagellaten sich vermehren und 5 - 250 % der Bakterien aus der Wassersäule entfernen (ANDERSEN & FENCHEL 1985). Wachstum und Abbau von 4-NP waren nicht immer gekoppelt, denn im Brackwasser-Ansatz, in dem der Abbau schon nach 4 Tagen bei über 50 % CO_2 lag, war bis zu diesem Zeitpunkt kein Wachstum der bakteriellen Biozönose aufgetreten (Tab.6). In diesem Ansatz waren am wenigsten C-Quellen enthalten.

In den Ansätzen mit frischem Fördewasser zeigte sich ein Rückgang der mittleren Volumenklassen zugunsten vor allem sehr großer und z.T. auch sehr kleiner Zellen (Abb.14 und Tab.7).

Es ist bekannt, daß Protozoen selektiv größere Bakterien fressen (TURLEY et al.1986, AMMERMANN et al.1984, KRAMBECK 1988), wie z.B. heterotrophe Stäbchen, zu denen alle bisher isolierten Abbauer gehören. Wenn die Abbauer nicht unter Fraßdruck eine andere Morphologie annehmen konnten (GÜDE 1979, vgl. 4.1.1), war es zu erwarten, daß ihre evtl. aktiv wachsende Population weggefressen wurde, auch wenn ihr Anteil an der Gesamtpopulation gering war. Die Abbildung 14 zeigt besonders nach 7 und 16 Tagen ein Räuber-Beute-System, das sich nicht im Gleichgewicht befindet. Während der Wegfraß durch heterotrophe Nanoflagellaten die mittelgroßen Zellen stark dezimiert hat, können größere Zellen dem Fraßdruck z.T. entgehen. Mögliche Gründe können die höheren Wachstumsraten größerer Zellen sein (KRAMBECK 1988), so daß sie den Protozoen "davonwachsen", oder eine bevorzugte Nutzung bestimmter, mittelgroßer Morphotypen durch die sehr kleinen Nanoflagellaten (TURLEY et al.1986). Weil die Protozoen nicht in allen Ansätzen und über die gesamte Inkubationszeit gleichmäßig verteilt vorkamen, sondern sogenannte Blüten bildeten, erklärt sich die Ausprägung von Plateaus in der CO_2 -Produktion.

Der Einfluß einer hohen Protozoenzahl auf den 4-NP Abbau war besonders deutlich bei dem Ansatz zu beobachten, der 3 Tage zur Entwicklung der Protozoen vorinkubiert worden war (Abb.12). Bei diesem Ansatz konnten keine Gesamtbakterienzahl ermittelt werden, aber im anderen Ansatz, der bei 10°C inkubiert worden war, zeigte sich wieder eine Verschiebung der Biozönose und die Gesamtbakterienzahl nahm stark ab (Tab.6 und 7). Vor allem wenn die Wachstumsrate einer bestimmten Bakteriengruppe gering ist, wie es z.B. bei 10°C und bei niedrigen Konzentrationen an Fremdstoff der Fall sein kann, kann ein Wegfraß durch Protozoen zu einer starken Dezimierung dieser Gruppe führen, wenn die Gesamtbakterienzahl für ein Grazing ausreicht (MALLORY et al.1983, GOLDSTEIN et al. 1985).

Es ist interessant, die Standardabweichung bei den CO₂-Messungen zu betrachten. Sie war in allen Ansätzen mit vermutlich aktiven Protozoen sehr groß (FF, 10°C, 3D). Für die Zählung der Protozoen ließ sich keine Standardabweichung berechnen, da immer nur eine der 3 Parallelproben dafür herangezogen werden konnte. Ein Anhaltspunkt für die Variabilität bot die Bestimmung in gleichbehandelten Proben ohne 4-NP-Zusatz (3D, Nullwert, Tab.6), in denen die absoluten Flagellatenzahlen deutlich höher, aber tendenziell die gleichen Blüten erkennbar waren.

Es ließ sich kein Einfluß einer Nährsalz-Zugabe auf den Abbau von 4-NP durch akklimatisierte Biozönosen aufzeigen. Wenn 5 % der akklimatisierten Biozönose mit frischem Wasser versetzt wurde, das 250 µg/l 4-NP enthielt, war schon in 4 Tagen eine vollständige Entfärbung erfolgt, unabhängig davon, ob Nährsalze zugesetzt wurden oder nicht. Auch wenn eine zweite Dosis 4-NP zur unverdünnten "alten" Probe gegeben wurde, konnte 4-NP schnell abgebaut werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in dem beschriebenen Simulationsversuch ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Zahl der Abbauer, der Zahl der Protozoen und der zugesetzten Konzentration an 4-NP zu beobachten war. Ohne Grazing-Druck konnten 8 µg/l 4-NP schnell mit und ohne Wachstum der Gesamtpopulation mineralisiert werden. Eine Entwicklung von Flagellaten verlangsamte den Abbau stark, wenn die zugesetzte Konzentration und die Temperatur gering waren. Bei 250 µg/l war der Abbau schon vor der voraussichtlichen Entwicklung der Flagellaten nach 4 Tagen abgeschlossen. Hier könnte die höhere Wachstumsrate der Bakterien durch die günstige Konzentration und Temperatur für den schnellen Abbau ausschlaggebend gewesen sein.

4.1.7 EINFLUSS BIOTISCHER UND ABIOTISCHER FAKTOREN AUF DIE AKKLIMATION VON NATÜRLICHEN BIOZÖNOSEN

Um herauszufinden, ob die Faktoren, die einen Einfluß auf die Abbaurate zeigten (vgl.4.1.6), auch die Akklimation natürlicher Wasserproben beeinflussen konnten, wurden einige Versuche zur Verkürzung der Akklamationsperiode mit 4-NP als Beispiels-Substanz durchgeführt.

In einem ungestörten System sollte exponentielles Wachstum von mineralisierenden Bakterien bis zur Substraterschöpfung möglich sein. Als Folge wäre eine kurze Lag-Phase mit geringerem Umsatz am Anfang festzustellen, da die kleine Population das Substrat noch nicht quantitativ umsetzen kann. Die Wachstumskurve hätte einen logistischen Verlauf (vgl. 4.1.6.1), wie er z.B. bei der Abb.15 zu sehen ist. Wenn der Abbau eine stark verlängerte Lag- oder Akklimationsphase zeigt, wie es bei 2- und 4-NP häufig der Fall war, muß die Entwicklung der Bakterien durch äußere Faktoren verlangsamt sein. Da andere Autoren bei Untersuchung des Abbaus von 4-NP deutliche Verkürzungen der Akklimationsperioden nach Zusatz von Nährsalzen und Hemmung des Grazing feststellten, wurden einige ähnliche Versuche durchgeführt (SWINDOLL et al. 1988, WIGGINS et al. 1987).

4.1.7.1 EINFLUSS VON NÄHRGEBIRGEN

Es ist eine Verlangsamung des Wachstums und damit eine längere Akklimationsperiode vor dem Abbau durch fehlende anorganische Nährstoffe denkbar (JONES & ALEXANDER 1988). So vermuteten Kuiper & Hanstveit (1984), daß die niedrigen Konzentrationen an Phosphat und Nitrat in Meerwasser ($<0.1 \mu\text{M}$) das Wachstum von Bakterien limitieren können, die Chlorphenole abbauen. Eigene Versuche zeigten keine deutliche Verkürzung der Akklimationsperiode durch den Zusatz von N- und P-Salzen. Teilweise setzte ein Abbau aber nur nach Zusatz von Nährstoffen ein. In einem besonderen Fall wurden durch den Zusatz anaerobe Verhältnisse erzeugt und 4-NP wahrscheinlich von Denitrifizierern abgebaut (3.2.5.1). Es wird deutlich, wie sehr durch die Anreicherungsbedingungen verschiedene Abbauer selektiert werden können. Da Nitrophenole auch als Stickstoffquelle dienen können, ist ein Abbau unter N-limitierten Bedingungen wahrscheinlicher (BRUHN et al.1987). Es konnte mehrfach beobachtet werden, daß beim Abbau gebildetes Nitrit wieder aufgenommen wurde.

4.1.7.2 TEMPERATUR-ABHÄNGIGKEIT UND KONZENTRATIONS-EINFLUSS

Es muß zwischen einem Temperatureinfluß auf die Abbaurate und auf die Länge der Akklimationsperiode unterschieden werden. 4-NP wurde bei 10°C mit ca der Hälfte der Rate bei 20°C abgebaut, wenn akklimatisierte Bakterien eingesetzt wurden (4.1.3). Viel gravierender war der Einfluß auf die Akklimationsperiode, denn es zeigte sich nur in einem Fall ein Abbau von $500 \mu\text{g/l}$ 4-NP nach 8 Wochen bei 10°C (3.2.1). Bei 20°C wurde in allen 5 Parallelen 4-NP abgebaut, es waren also Abbauer vorhanden, die sich aber bei der niedrigeren Temperatur nicht durchsetzen konnten. Bei noch geringeren Temperaturen vor allem in Verbindung mit niedrigen Konzentrationen konnte auch nach monatelanger Inkubation kein Einsetzen des Abbaus festgestellt werden (3.2.1).

Die letztgenannten Bedingungen reflektieren eher die natürliche Situation im Meer: in der Ostsee zeigt die Temperatur einen ausgesprochenen jahreszeitlichen Gang und schwankt z.B. zwischen weniger als 0 und 17°C beim Feuerschiff Fehmarn-Belt (MAGAARD & RHEINHEIMER 1974). In größeren Tiefen sind die Temperaturen noch geringer. Im Meer sind niedrige Konzentrationen an Einzelsubstanzen anzutreffen. Z.B. wurden bei 2 Stationen in der Nordsee 0.03 - 0.35 µg/l Äthyl-Parathion gemessen, das zu 4-NP hydrolysieren kann (Daten zur Umwelt 1989).

4.1.7.3 FÖRDERUNG DURCH HEMMUNG DES GRAZING

Als gerade in Ökosystemen relevanter Faktor soll noch der Wegfraß von Bakterien durch Protozoen angeführt werden, der zu verlängerten Akklimationsperioden führen kann (WIGGINS et al. 1987). Im Simulationsversuch konnte gezeigt werden, daß Protozoen durch Wegfraß den Abbau zur Stagnation bringen (3.2.4). Wenn von einer geringeren anfänglichen Abbauerzahl ausgegangen wird, wie sie in den ursprünglichen Wasserproben mit der MPN-Methode nachgewiesen wurde, könnten die beobachteten Plateaus bei sehr viel niedrigeren Werten liegen, und so die beobachteten Akklimationsperioden zumindest teilweise erklären. Während im Simulationsversuch der Zusatz von Cycloheximid zur Hemmung der Protozoen die Abbaurate deutlich förderte (Abb.9), konnte der gleiche Zusatz zu nicht akklimatisierten Proben nur in einigen Fällen die Akklimationsperiode verkürzen (3.2.5.2). Meist wurde 4-NP in höheren Konzentrationen nach Cycloheximid-Zusatz nur unvollständig abgebaut. In Proben ohne Hemmung der Protozoen konnte z.T. kein Abbau von 4-NP festgestellt werden. Wahrscheinlich war die Grazing-Rate höher als die Wachstumsrate der Abbauer, sodaß sich die Abbauer nicht durchsetzen konnten (SINCLAIR & ALEXANDER 1989). Die Wachstumsrate kann durch eine niedrige Konzentration an zuge-setztem Fremdstoff und durch geringe Nährsalzkonzentrationen vermindert werden, vor allem, wenn noch andere Bakterien um die begrenzt zur Verfügung stehenden Nährsalze konkurrieren (RAMADAN et al 1990). In einem Versuch mit Abwasser (WIGGINS & ALEXANDER 1988b) wurde die Akklimationsperiode beim 4-NP Abbau durch Hemmung des Grazing verkürzt oder aufgehoben, und die Zahl der Abbauer nahm zu. Der Abbau war aber weniger vollständig, nachdem die Protozoenaktivität in Abwasser inhibiert wurde. Der Grund kann die fehlende Regeneration von Nährsalzen gewesen sein, bei der Protozoen eine wesentliche Rolle spielen (GÜDE 1985).

Bei niedriger Konzentration an 4-NP, wie sie im Simulationsversuch eingesetzt wurden, schien die fehlende Regeneration keine Rolle zu spielen, denn der Abbau war nach Zusatz von Cycloheximid sehr vollständig (Abb.9).

4.2 VERGLEICH DES ABBAUS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN IN NIEDRIGEN KONZENTRATIONEN

Im Folgenden soll der Abbau mehrerer Substanzen besprochen werden, die alle in einer Konzentration von 1 µg/l zu Wasser- und Sedimentproben aus der westlichen Ostsee zuge-setzt und überwiegend für 3 Monate bei 20°C inkubiert wurden.

4.2.1 PHENOL

Phenol ist eine Verbindung die auch natürlich vorkommt. Allerdings liegt selten freies Phenol vor, sondern es werden Polyphenole in Huminstoffen gefunden. Daher ist es nicht verwunderlich, daß bei einem Vorversuch mit Wasser aus der Kieler Förde schon nach 24 h die Hälfte des zugesetzten Phenols mineralisiert war (vgl.3.3.2). Auch in Sedimentproben setzte ein Phenol-Abbau schnell ein. Durch den hohen Anteil an Sediment und die niedrige Phenolkonzentration wurden in 10 Tagen nur 45 % mineralisiert (3.3.3). Der Rest war wahrscheinlich adsorbiert, denn nur noch 7 % der Radioaktivität befanden sich im Wasser.

Bei der Forschungsfahrt in die westliche Ostsee wurde versucht, *in situ* Abbauraten für Phenol in Wasser- und Sedimentproben von verschiedenen Stationen zu messen (vgl. 3.4.1). Sogar bei fast optimalen Temperaturen von 15 - 18°C wurden nur maximal 1.3 % in den ersten 12 h mineralisiert. Das heißt, daß die natürlichen Abbauraten in der westlichen Ostsee sehr gering sind. Nur im Sediment waren nach der gleichen Zeit schon über 3 % abgebaut; hier wurden aber die natürlichen Umweltbedingungen durch die Benutzung einer Suspension gestört (vgl.4.2.2).

Nach 24 - 48 h zeigte sich ein induktiver Effekt, denn die Abbauraten stiegen steil an (Abb.18 und 19). Besonders bei den Stationen A (sedimentnahes Wasser) und B (Oberflächenwasser) war eine extreme Steigerung der Phenol-Mineralisierung zu verzeichnen. Es konnten bei beiden Stationen in den Ausgangsproben mit der MPN-Methode Bakterien erfaßt werden, die 1 µg/l Phenol abbauten (vgl.3.4.7), sodaß eine Enzyminduktion mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache für die beobachtete Lag-Phase war. Andere C-Quellen dürften bei der geringen zugesetzten Menge an Phenol den Abbau nicht unterdrückt haben, wie es bei 50 µg/l 4-NP beobachtet wurde (4.3.1). Sie könnten allerdings ein Wachstum der Phenol abbauenden Bakterien ermöglicht haben.

Bei Proben des Oberflächenwasser von Station A (A,1m) und B (B,1m) war die Standardabweichung besonders groß. Hier waren nur wenige Phenol-abbauende Bakterien in den Urproben (vgl.3.4.7). Dies kann eine große Streuung der Parallelen erklären. Bei Proben von Station B war eine deutliche Lag-Phase vor Einsetzen der Mineralisierung zu verzeichnen, sowie ein unvollständiger Abbau, obwohl mit der MPN-Methode Abbauer nachweisbar waren. Sie waren also nicht optimal an den Phenol-Abbau angepaßt. Vielleicht fehlten im Probenwasser Nährsalze für die quantitative Mineralisierung (Tab.1, 2.2).

Die sehr hohen Abbauer-Zahlen bei Station A im sedimentnahen Wasser (A,sw) und in den Sedimentproben von C (C,Sed.) spiegeln sich in der geringen Standardabweichung der 3 Parallelen wieder (Abb.18 und 19). Vielleicht saßen die Bakterien, die Phenole abbauen können, bevorzugt auf Partikeln, die im bodennahen Wasser vermehrt vorkommen (KATO 1989). In Sandsediment wie bei Station C können 49 bis über 90 % der Bakterien angeheftet sein (RHEINHEIMER 1979, WEISE & RHEINHEIMER 1979). Bei der Sedimentsuspension von Station C fällt auf, daß der zunächst

schnelle Abbau nach 2 Tagen bei 37 % CO₂ stagnierte. Danach wurden erst sehr langsam bis zu 56 % des Phenols mineralisiert. Es lag sicher wieder der Einfluß einer Adsorption vor (vgl.3.3.3). Da Phenol sowohl ionische wie auch lipophile Wechselwirkungen eingehen kann, ist es durchaus denkbar, daß die weniger starken van der Waals-Bindungen gelöst werden können, während andere Bindungen Phenol irreversibel festhalten können (ISAACSON & FRINK 1984). Wenn durch Abbau das Phenol in der Wasserphase erschöpft ist, wird ein Teil des gebundenen Phenols desorbiert und kann abgebaut werden. Die Abbaurate wird dann durch die Geschwindigkeit der Desorption limitiert, wie es auch Wszolek & Alexander (1979) bei Alkylaminen fanden. Eine Nutzung adsorbierten Phenols wird in der Literatur diskutiert, ist aber noch nicht eindeutig bewiesen (LI & DIGIANO 1983, EHRHARDT & REHM 1989). Eine unvollständige Nutzung kann auch daraus entstehen, das Stoffwechselprodukte fest adsorbieren, wie es Schulz & Keinath (1985) bei Aktivkohle fanden.

4.2.2 NAPHTHALIN

Bei der Forschungsfahrt lief der Abbau von Naphthalin in Wasserproben ähnlich wie der Phenol-Abbau ab. Nur das Sediment zeigte eine ausgeprägte Lag-Phase von mehr als 4 Tagen (vgl. Tab.9). Evtl. wurde das zugesetzte radioaktive Naphthalin dort durch eine sehr viel größere Menge an schon vorhandenem Naphthalin verdünnt. In Sedimenten wurden Konzentrationen von Naphthalin von 0.3 - 18 µg/g Sed. gefunden (KERR & CAPONE 1988), sodaß ein Verdünnungseffekt möglich ist. Im Wasser war eine Konzentration im Mikrogramm-Bereich unwahrscheinlich, Gschwend et al. (1982) fanden in einer küstennahen Station 0.5 - 35 ng/l mit dem Maximalwerten im Winter. Die gleichen Autoren fanden ebenfalls Lag-Phasen vor dem Abbau im Sediment von bis zu 6 Tagen Dauer. Sie stellten fest, daß durch Anfertigung einer Suspension die natürliche Abbaurate um ca das Dreifache überschätzt wird, allerdings nahm die Variabilität zwischen Parallelen durch Verwendung einer Suspension ab.

Daten über den Gehalt an polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in der Ostsee (BALZER, unveröffentlicht) ergaben 0.2 - 200 µg/g PAK, je nach Standort und verwendeter Methode, aber nur 3 - 9 ng/g davon waren Naphthalin. In der Atmosphäre konnten 5 - 50 ng/m³ gemessen werden. Der Jahreseintrag an Mineralöl in die Ostsee wird auf 50 - 100.000 t geschätzt, die Ölkonzentrationen im Oberflächenwasser betragen 1 - 2.7 µg/l (EHRHARDT 1981).

Dies deutet auf einen ständigen Eintrag von PAK z.B. über die Atmosphäre hin (HALKIEWICZ et al. 1987). Je nach Standort können sie angereichert und evtl. nach einer Akklimationsperiode, wie sie auch Wilson et al. (1985) beim Naphthalin-Abbau in Grundwasser feststellten, abgebaut werden. Es zeigte sich, daß der Abbau niedriger Konzentrationen in Wasserproben schneller einsetzte als in Sedimentproben. Es ist durchaus denkbar, daß in der Ostsee geringe Naphthalin Konzentrationen in der Wassersäule vorhanden sind und somit eine akklimatisierte Bakterienflora erhalten bleibt, die zumindest im Sommer Naphthalin abbaut. Denn obwohl lipophile Substanzen an Partikeloberflächen adsorbieren und absinken können, hängt es nicht

nur von den Eigenschaften der Chemikalie sondern auch von der Dynamik des Wasserkörpers und der Partikel ab, welche Menge eines Fremdstoffs tatsächlich ins Sediment gelangt (HINGA 1988). Da Naphthalin leicht flüchtig ist, kann es über den atmosphärischen Kreislauf von Verdunstung und Niederschlag besonders ins Oberflächenwasser gelangen.

Es scheint eine spezifische Flora für den Naphthalin-Abbau zuständig zu sein, denn Shiaris (1989) fand keine gute Korrelation der saisonalen Variabilität von heterotropher Aktivität mit Acetat und Glutamat und der Mineralisierung von Naphthalin, Phenanthren und Benzo[a]pyren. Arvin und Mitarbeiter (1989) stellten fest, daß Mischkulturen, die Naphthalin abgebaut hatten, nicht Benzol abbauen konnten.

4.2.3 EDTA

Bei der Untersuchung des Abbaus von EDTA konnte bei Einsatz von 40 $\mu\text{g/l}$ ein schneller Abbau von 10 % der zugesetzten Menge festgestellt werden, dann stagnierte der Abbau (Abb.15). Bei Einsatz von 1 $\mu\text{g/l}$ wurde zunächst das gleiche Phänomen beobachtet, der Abbau ergab schnell 10 % CO_2 und stagnierte dann oder verlief nur sehr langsam (Tab.9 und 11). Wahrscheinlich wurde zuerst nur eine Verunreinigung abgebaut, wie es auch Tiedje (1977) aus seinen ähnlichen Ergebnissen schloß, der den EDTA-Abbau in Böden untersuchte. Es wäre sehr ungewöhnlich, daß die Bakterien nur einen derart kleinen Anteil des Substrats nutzen, welches sowieso nur in den geringen Konzentrationen von 1 - 40 $\mu\text{g/l}$ zugesetzt wurde. Eine Verdünnung des radioaktiven durch schon in der Wasserprobe vorkommendes EDTA ist bei 1 $\mu\text{g/l}$ denkbar, bei 40 $\mu\text{g/l}$ sehr unwahrscheinlich. In Trinkwasser und Oberflächenwasser in der BRD konnten Werte zwischen 10 und 45 $\mu\text{g/l}$ gemessen werden (DIETZ 1987). Die mögliche Verdünnung sollte eine Mineralisierung des zugesetzten Anteils aber nur verlangsamen (vgl. 4.2.2) und nicht verhindern. Genau das Umgekehrte war in allen untersuchten Proben der Fall.

In einem Review-Artikel von Egli (1988) wird angeführt, daß noch keine Reinkulturen isoliert werden konnten, die EDTA als C- und/oder N-Quelle nutzen. Wahrscheinlich wird EDTA über einen Cometabolismus abgebaut. Die Ethylen- und die Acetat-Gruppe können zu CO_2 mineralisiert werden. Als Zwischenprodukte treten Iminodiacetat, ED3A, Nitriltriacetat (NTA) und Glycin auf. Die gleichen Produkte entstehen beim photochemischen Abbau. Über den Abbau von NTA ist bekannt, daß er in unbelastetem Flußwasser erst nach einer Akklimationsperiode abläuft (LARSSON & DAVIDSON 1982). In Salzwasser konnte NTA oft gar nicht oder nur nach sehr langen Akklimationsperioden abgebaut werden, wenn nicht durch eine chronische Belastung mit höheren Mengen an NTA eine spezifische Abbauerflora vorhanden war (PFAENDER et al. 1985, HUNTER et al. 1986).

Die Toxizität von EDTA erwies sich in Standardtests als relativ gering, nur die untersuchte Grünalge *Scenedesmus* wurde ab 11 mg/l in ihrem Wachstum gehemmt (SCHÖBERL & HUBER 1988). Es wurden aber auch nur 0 - <10 % in verschiedenen Screening-Tests abgebaut (ebd.). Als ökologisch relevante Eigenschaften nennen die Autoren die starke Komplexbildung von EDTA mit Metallen, die die Verfügbarkeit von Spurenstoffen beeinflussen und somit zur Primärproduktion beitragen kann. Durch die Komplexbildung ist eine Remobilisierung von Schwermetallen aus z.B. Sedimenten möglich.

Diese konnte durch Dehnad & Förstner (1988) experimentell bestätigt werden: die Gegenwart von EDTA und NTA behinderte die Entgiftung von Schwermetallen in Gewässern, welche normalerweise durch Sorption an Feststoffe erfolgt. Da EDTA gerade die Sorption von Cadmium stark verminderte, kommen die Autoren zu dem Schluß, daß der vielfältige Einsatz von EDTA in der Industrie problematisch ist.

Der oft erwähnte photochemische Abbau von EDTA (LOCKHART & BLAKELEY 1975a und b) kann im Meer kaum eine Rolle spielen, da EDTA im alkalischen Milieu als Ca-Chelat vorliegt (TIEDJE 1977). Nur bei Fe(III)EDTA förderte eine Behandlung mit Sonnenlicht den Abbau (ebd.). Madsen & Alexander (1985) fanden keinen EDTA-Abbau durch Mikroorganismen aus einem Klärwerk, unabhängig von der chemischen Speziation (Komplexbildung mit H, Ca, Mg, Fe oder Al), die bei Citrat und NTA einen deutlichen Einfluß auf die Abbaubarkeit hatte.

Auch Means et al. (1980) untersuchten den Abbau mehrerer Komplexbildner im Boden, da EDTA bei einer Konzentration von nur 0.3 µm zur Verbreitung von radioaktiven Metallen geführt hatte. Sie stellten fest, daß der Abbau zu langsam für eine quantitative Entfernung in absehbarer Zeit vor sich ging.

Diese Aussage kann für den EDTA-Abbau in der westlichen Ostsee bestätigt werden. Hier betrug die höchste Abbaurrate 0.31 %/Tag bei einer Inkubationstemperatur von 20°C und einer eingesetzten Konzentration von nur 1 µg/l (Tab.11). Das würde bedeuten, daß 1 µg/l unter optimalen Bedingungen in ca einem Jahr mineralisiert wäre. Bei 40 µg/l konnte kein linearer Anstieg in der zweiten Phase nach Mineralisierung von Verunreinigungen festgestellt werden (Abb.15). Ein Abbau unter natürlichen Bedingungen ist daher sehr unwahrscheinlich.

4.2.4 DIETHYLENGLYCOL

Weitere Stoffe, die eine Akklimationsperiode vor dem Abbau zeigten, waren Diethylenglycol, 2-NP und in einem Fall Thiourea. Im sedimentnahen Wasser zeigte sich nur eine kurze Verzögerung des Abbaus. Wahrscheinlich mußten erst DEG abbauende Enzyme induziert werden, denn für ein Wachstum war die zugesetzte Konzentration zu gering.

Im Oberflächenwasser sorgten wahrscheinlich beide Faktoren für die ausgedehnte Akklimationsperiode. Bei der Station in der Mitte der Lübecker Bucht setzte in 3 Monaten kein Abbau ein (3.4.3). Dort könnten die DEG-Abbauer so selten gewesen sein, daß im größten inkubierten Volumen von 1 l Wasser keine vorhanden waren (Tab.9).

Nach der Literatur wird DEG nur von wenigen spezialisierten Bakterien abgebaut, wobei es sogar als Zwischenprodukt beim Polyethylenglycol-Abbau akkumulieren kann (HAINES & ALEXANDER 1975, SCHÖBERL 1985). Polyethylenglycole (PEG) werden viel als Polymere, u.a. in Tensiden, benutzt (ebd.). Nicht alle mit PEG isolierten Stämme konnten DEG abbauen, für Monoethylenglycol schien wiederum ein anderer Abbauweg vorzuliegen, und die Enzyme mußten in allen Fällen induziert werden (WATSON & JONES 1977, SCHÖBERL 1985).

Watson & Jones (1977) fanden einen besseren Abbau in Gegenwart anderer C-Quellen. Dies könnte den sehr viel besseren Abbau von DEG in Sedimentproben z.T. erklären (Abb.21). Außerdem reichern sich in Sedimenten sowohl Bakterien als auch Fremdstoffe an, die bei den untersuchten Stationen aus allochthonen Einträgen von Trave und Oder stammen können. Anderson und Mitarbeiter (1990) stellten fest, daß in epilithischen Bakteriengemeinschaften aus einem verschmutzten Fluß die Fähigkeit zum Abbau von Natrium Dodecyl Sulfat sehr viel beständiger war, als in planktischen Biozönosen. Außerdem wurde das Überleben von Abwasserbakterien durch die Anwesenheit von Sediment gefördert, wie es Bauerfeind et al. (1981) für coliforme Bakterien zeigen konnten. Aus dem Kurvenverlauf des DEG Abbaus im Sediment kann geschlossen werden, daß in den 3 untersuchten Sedimenten genug Abbauer vorkamen, um DEG ohne Enzyminduktion und Wachstum zu mineralisieren. Das heißt, daß im Sediment wahrscheinlich eine akklimatisierte Biozönose vorhanden war.

4.2.5 THIOUREA

Thiourea wurde in einer Untersuchung des Umweltbundesamtes (KLEIN et al. 1988) eine hohe Priorität als kritischer Fremdstoff in Luft, Boden und Wasser zugesprochen. Über die Abbaubarkeit von Thiourea ist bisher nur sehr wenig bekannt. Beim Studium von Patentschriften wird deutlich, daß diese Substanz z.B. im Abwasser von Atomkraftwerken, Chemiewerken und thermo-elektrischen Fabriken auftritt (DENKA-ENG., MITSUBISHI HEAVY IND.). Die Toxizität wird sehr unterschiedlich eingeschätzt, da diese Substanz als potentiell carcinogen und teratogen gilt. Thiourea kann durch voradaptierte Reinkulturen auch in hohen Konzentrationen von 50 mg bis 1 g/l in ein bis zwei Tagen als N-Quelle vollständig abgebaut werden, wenn andere C-Quellen zugesetzt werden (Patentschrift AJINOMOTO, KREIKENBOHM 1990). Die Testchemikalie ist ein Inhibitor für die Nitrifikation und Denitrifikation, schon ab 0.67 mg/l wird die Nitrifikation 100 %ig gehemmt (KREIKENBOHM 1990).

In Vorversuchen wurden 250 µg/l Thiourea nicht abgebaut (3.1). Da ein weiterer Versuch mit 1 µg/l einen Abbau zeigte (3.3.3), wurde die Mineralisierung dieser Substanz bei der Forschungsfahrt in die westliche Ostsee bei Proben von 6 Stationen untersucht.

In den Wasserproben verlief der Abbau sehr unterschiedlich: im Oberflächenwasser vor der Travemündung wurde Thiourea sehr schnell und vollständig mineralisiert (Abb.22). Wahrscheinlich wurde es von Bakterien verwendet, die sonst Harnstoff abbauen. Sie kommen bevorzugt in Abwässern vor, und gelten als Indikatoren für eine Gewässerverschmutzung, da Harnstoff überwiegend anthropogenen Ursprungs ist (STEINMANN 1974). Da Thiourea die Harnstoff-Aufnahme kompetitiv hemmt, kann zumindest der gleiche Transportmechanismus genutzt werden. Von der untersuchten Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* wurde Thiourea nicht weiter metabolisiert (PAUL 1983).

Schon im sedimentnahen Wasser der Station A verlief der Abbau von Thiourea deutlich langsamer. Hier waren wahrscheinlich weniger Bakterien vorhanden, die Thiourea sofort nutzen konnten. Nach 40 Tagen erhöhte sich die Abbaurrate. Es kann sein, daß der höhere Gehalt an alternativen Stickstoffquellen, der im sedimentnahen Wasser zu vermuten ist, die Enzyme für eine Mineralisierung des Thioureas unterdrückte. Die Enzyme des Amidolyase-Wegs beim Harnstoff-Abbau werden z.B. durch Ammonium reprimiert (WHEELER 1983). Die Enzyme des Urease-Wegs dagegen sind konstitutiv, aber bei Stickstoff-Limitierung wurden bei Algen höhere Assimilationsraten gemessen. Bei Inkubation im Dunkeln wurde hauptsächlich $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt, bei Inkubation im Licht wurde Harnstoff hauptsächlich inkorporiert (PAUL 1983). Meist werden die vorhandenen Nährsalze im Laufe einer längeren Inkubation aufgezehrt (LANGENFELD 1990).

Bei der Station B in der Mitte der Lübecker Bucht wurde Thiourea in der Wasserprobe fast genauso schnell und sehr viel vollständiger genutzt als im darunterliegenden Sediment (Abb.22 und 23). Da im Wasser nur sehr geringe Mengen an Stickstoff vorhanden waren (vgl. Tab.1, 2.2), könnte Thiourea in der geringen zugesetzten Menge als N-Quelle gedient haben, evtl. waren auch Algen an der Umsetzung beteiligt. Die Inkubation erfolgte allerdings im Dunkeln und es wurde mehr mineralisiert als inkorporiert (Tab.9).

In Sedimentprobe der Station B wurden 24 % mineralisiert, aber nur 41 % waren nach 70 Tagen im überstehenden Wasser. Dies deutet auf eine sehr starke Adsorption von ca 35 % durch das schlickige Sediment hin, wie sie auch schon in einem Vorversuch mit hohem Sedimentanteil festgestellt worden war (3.3.3). Der Nährsalzgehalt im sedimentnahen Wasser der Station B war nur etwas höher als im Oberflächenwasser (Tab.1). Eine Unterdrückung des Abbaus von Thiourea für mehr als 70 Tage durch andere N-Quellen war daher unwahrscheinlich.

In den Sedimentsuspensionen der Station C dagegen wurden 52 % mineralisiert und nur maximal 13 % konnten adsorbiert gewesen sein, da 35 % der Radioaktivität im Überstand meßbar waren. Bei der Station D, die im Einflußbereich der Oder lag, wurden im Sediment schnell 72 % mineralisiert. Die Sedimentsuspension verhielt sich fast wie das Oberflächenwasser von Station A. Dieses enthielt nur gering erhöhte, das Wasser über der Oderbank dagegen stark erhöhte Nährstoffmengen (Tab.1). Es lag also ein starker Landeinfluß vor; die Werte über der Oderbank sind höher als Meßwerte aus der Kieler Förde zu einer vergleichbaren Jahreszeit (Tab.1, z.B. 10.7.89). Der hohe Ammonium-Gehalt führte in diesem Fall nicht zu einer Unterdrückung der Mineralisierung von Thiourea.

4.2.6 2-NITROPHENOL

Im Folgenden soll der Abbau von 2-Nitrophenol in verschiedenen Konzentration in Wasser- und Sedimentproben miteinander und mit dem Abbau von 4-NP, das ein Isomer von 2-NP ist, verglichen werden. Wie schon aus den Vorversuchen mit 250 $\mu\text{g/l}$ deutlich wurde (vgl.3.1), wurde auch 2-NP in Ostseewasser erst nach einer Akklimationsperiode abgebaut, sie war aber i.d.R. kürzer als beim 4-NP.

Bei einem Versuch mit Wasser und Sediment aus der Kieler Förde, bei dem Konzentrationen bis herunter zu 0.5 $\mu\text{g/l}$ eingesetzt wurden, konnte in den Wasserproben die niedrigste Konzentration nach einer eintägigen Lag-Phase schnell und vollständig mineralisiert werden (Abb.28). Erst nach 11 Tagen folgten 5 und 50 $\mu\text{g/l}$, mit einem etwas steileren Anstieg bei 50 $\mu\text{g/l}$. Bei noch höheren Konzentrationen konnte nur das Einsetzen einer Entfärbung gemessen werden, die aber nach den Erfahrungen mit 5 mg/l 4-NP (vgl.25 und Tab.12) vor einer signifikanten Erhöhung der CO_2 -Produktion stattfindet. Nach 5 Tagen war bereits eine Parallele mit 500 $\mu\text{g/l}$ entfärbt, die anderen Proben mit 500 oder 5000 $\mu\text{g/l}$ folgten aber erst viel später nach bzw. waren nach 55 Tagen noch nicht entfärbt (Tab.16).

Es war also keine deutliche Konzentrationabhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit festzustellen. Vor dem Abbau der höheren Konzentrationen war eine Akklimationsperiode von mindestens 5 Tagen zu beobachten. Zur Erklärung der Ergebnisse müssen die MPN-Reihen herangezogen werden, die Aussagen über ein Wachstum der 2-NP Abbauer bei den niedrigen Konzentration von 0.5 - 50 $\mu\text{g/l}$ ermöglichen (Tab.17). Am Anfang waren Bakterien, die 2-NP abbauen können, in 1 ml nachweisbar. Nach dem Abbau von 0.5 $\mu\text{g/l}$ war ihre Zahl nicht signifikant angestiegen, die vorhandene Menge schien also für eine Abbau auszureichen. Es war kein Wachstum auf anderen C-Quellen aufgetreten.

Bei den beiden höheren Konzentrationen war wahrscheinlich Wachstum notwendig, denn während und nach dem Abbau stiegen die Zahlen um ca eine Größenordnung an. Es bestand eine gute Übereinstimmung mit der sehr geringen Abbauerzahl in einer Parallele mit 50 $\mu\text{g/l}$ (Nr.1, 50 $\mu\text{g/l}$, Tab.17) und dem fehlenden Abbau in dieser Flasche bis zum Versuchsende. Alle besprochenen MPN-Ergebnisse beziehen sich auf

die eingesetzte MPN-Konzentration von 5 $\mu\text{g/l}$. Die Resultate mit 1 mg/l waren z.gr.T. nur bei der ersten Verdünnungsstufe auswertbar (vgl. 2.15). Deshalb ergab sich in allen Ansätzen ca die gleiche Anzahl. Es war ein deutlicher Beweis für die höhere Zahl und/oder die andersartigen Enzyme des Teils der Biozönose, der 50 $\mu\text{g/l}$ 2-NP abgebaut hatte, daß nur Proben aus diesen beiden Parallelen 1 mg/l schnell umsetzen konnten. Alle anderen, incl. der 3. Parallele ohne Abbau von 50 $\mu\text{g/l}$, brauchten mehrere Monate, um 1 mg/l 2-NP umzusetzen.

Bei Zusatz von 4-NP zu Parallelproben konnten zwar Abbauer über MPN (1 $\mu\text{g/l}$) festgestellt werden (Tab.17), eine Mineralisierung von 5 $\mu\text{g/l}$ setzte aber erst nach ca 25 Tagen ein. 500 $\mu\text{g/l}$ wurden nach 12 - 55 Tagen abgebaut (Abb.28 und Tab.16).

Im Sediment zeigte sich eine völlig andere, überraschende Entwicklung. Es konnte keine Mineralisierung von 2-NP während der ersten 7 - 9 Tage gemessen werden. Als erstes setzte dann der Abbau von 0.5 $\mu\text{g/l}$ ein, er blieb aber sehr unvollständig (Abb.29). Wahrscheinlich war ein beträchtlicher Teil adsorbiert. 5 und 50 $\mu\text{g/l}$ verhielten sich fast gleich, bei 50 $\mu\text{g/l}$ dauerte die Akklimationsperiode etwas länger und die Abbaurrate war steiler. Dies deutet auf Wachstum hin. Noch höhere Konzentrationen wurden nach 21 - 30 Tagen abgebaut (Entfärbung, vgl. Tab.16). Bei 2 Parallelen konnten 5 mg/l 2-NP nicht abgebaut werden, während die gleiche Konzentration an 4-NP in nur 12 - 22 Tagen entfernt wurde. Dieses kann an einer toxischen Wirkung des 2-NP liegen. Es ist in der Literatur als toxischer beschrieben als 4-NP, bei 0.9 mg/l wurde eine beginnende Beeinträchtigung des Wachstums von *Pseudomonas putida* beschrieben, bei 4-NP erst ab 4 mg/l (BRINGMANN & KÜHN 1980). Es kann sein, daß das leicht flüchtige 2-NP sich i.d.R. nicht in Sedimenten anreichert, sodaß die dort vorkommende Biozönose nicht an diesen Fremdstoff akklimatisiert ist.

Auch 5 $\mu\text{g/l}$ 4-NP wurden in diesem grobsandigen Sediment nur langsam und unvollständig mineralisiert. Er wird aus der Graphik nicht deutlich, ob eine Akklimationsperiode aufgetreten ist (Abb.29). Siragusa & DeLaune (1986) stellten eine erhebliche Adsorption und nur sehr geringe Wiederfreisetzung von 4-NP in marinem Sediment fest. Die Adsorption kann also bei der geringen eingesetzten Menge von 5 $\mu\text{g/l}$ einen Großteil irreversibel festgehalten haben (vgl.3.3.3). VanVeld & Spain (1983) beschrieben eine durch biologische Prozesse verstärkte Sorption von 4-NP an Sedimente von 39 - 65 % im Vergleich zu 23 % in abiotischen Kontrollen.

Es zeigte sich also ein sehr unterschiedlicher Abbau des 2-NP bei den verschiedenen Konzentrationen. Die niedrigste eingesetzte Konzentration von 0.5 $\mu\text{g/l}$ wurde am schnellsten, aber im Sediment nur sehr unvollständig mineralisiert. Bei den Konzentrationen, für deren Abbau mit Sicherheit ein beträchtliches Wachstum der Abbauer nötig ist, konnten sie sich nur in einigen Fällen durchsetzen. Ein ähnliches Ergebnis fanden auch Haltrich et al. (1980) bei einem Ringtest mit 2-NP. 0 - 100 % wurden im OECD-Screening- und Zahn-Wellens-Test abgebaut. Diese Tests sollen Modellcharakter für den Abbau in Gewässern und Klärwerken haben. Eine Eliminierung durch Wasserdampflichkeit wird ebenfalls erwähnt.

Auch in Klärwerken mit Wiesenfiltration konnten niedrige Abbauraten von 2-NP festgestellt werden (ZARTH et al 1984). Es wurden nur 67 % entfernt und es war unklar, ob Adsorption, Verflüchtigung oder biologischer Abbau aufgetreten waren. Eine vermutete Adsorption war so fest, daß 2-NP nach Beenden der Anwendung nicht ausgewaschen werden konnte (ebd.).

Da Nitroaromaten in ubiquitär verwendeten Haushaltsartikeln, wie Seifen, Polituren und Kosmetika verwendet werden (ZARTH et al. 1984), ist ihr Auftreten in mäßig belasteten Gewässern wie der Kieler Förde durchaus möglich.

Wenn ein Vergleich des Abbaus der 3 untersuchten Phenole gemacht wird, ergibt sich der beste und vollständigste Abbau bei Phenol in Wasserproben in der Nähe der Küste. Im Sediment setzt der Abbau zwar schnell ein, bleibt aber unvollständig. Mögliche Gründe sind unter 4.3 zusammengefaßt. Bei 2- und 4-NP sind in fast allen untersuchten Wasserproben zuwenig Abbauer vorhanden, um einen schnellen Abbau auch geringer Konzentrationen durchzuführen. Es wird meistens eine Akklimationsphase festgestellt, in der die Enzyme zum Abbau induziert werden, die Abbauer ihren Stoffwechsel umstellen und evtl. wachsen, bis die Nitrophenole quantitativ umgesetzt werden. In dieser Zeit gehen komplexe Veränderungen in der chemischen und bakteriellen Zusammensetzung der Wasser- oder Sedimentproben vor sich, die als Flascheneffekt bezeichnet werden (vgl.4.4). Das Ausmaß des Abbaus ist sehr unterschiedlich. Es zeigt sich ein negativer Einfluß einer Adsorption ans Sediment. Nach sehr langen Akklimationsperioden und bei sehr geringen Konzentrationen war der Abbau meist ebenfalls weniger vollständig. Es sind sicherlich unterschiedliche Teile der bakteriellen Biozönose am Abbau der verschiedenen Phenole beteiligt. Wahrscheinlich stammt ein Großteil der Abbauer aus Süßwasser und reichert sich in Sedimenten an. Daher soll noch einmal auf die Besonderheiten von Sedimenten eingegangen werden.

4.3 ABBAU IM SEDIMENT

Als Folge eines verzögerten Abbaus im Wasser erhält das Sediment eine wichtige Funktion beim Abbau auch gut wasserlöslicher Verbindungen. Viele Fremdstoffe reagieren auf verschiedenste Art und Weise, wie z. B. Flocculation, Komplexbildung oder hydrophobe Wechselwirkungen, mit vor allem feinkörnigen Partikeln, wenn sie in küstennahe, marine Gewässer gelangen (OLSEN et al.1982). Die weitere Verbreitung dieser Fremdstoffe wird also hauptsächlich durch die Dynamik des Partikeltransports bestimmt. Ein Großteil der Partikel sedimentiert, gerade in der westlichen Ostsee, in oft saisonalen Zyklen (OSTERROHT & SMETACEK 1980). Daher können Sedimente als Indikatoren für eine Belastung herangezogen werden, und es kann zur Einschleusung von Fremdstoffen in die benthische Nahrungskette kommen (ERNST et al.1986).

Mehrere Autoren konnten zeigen, daß der Abbau diverser Schadstoffe in Systemen mit Wasser und Sediment im Vergleich zu solchen ohne Sediment besser oder überhaupt erst erfolgte (LEE & RYAN 1979, SPAIN et al.1980,1984). Die letztgenannten Autoren

stellten fest, daß die Akklimationsperiode für 4-NP im System ohne Sediment dreimal solange dauerte. Sedimente enthalten ein großes Potential an verschiedenen Stoffwechselformen, da sich mit Bakterien besetzte Partikel dort anreichern. Pritchard et al. (1987) fanden 100-fach mehr 4-Chlorphenol abbauende Bakterien in Sediment- als in Wasserproben. In belasteten Sedimenten, wie sie im größeren Teil der Ostsee vorliegen (GRANBY 1987), ist es daher nicht verwunderlich, daß bei vielen der zugesetzten Fremdstoffe die Mineralisierung von $1 \mu\text{g/l}$ sofort einsetzte (Abb.19, 21 und 23). Bei 4-NP konnte dies nur bei niedrigen Konzentrationen festgestellt werden (Abb.26). Bei Konzentrationen ab $50 \mu\text{g/l}$ sowie bei allen eingesetzten Konzentrationen an 2-NP konnte immer eine Akklimationsperiode oder Lag-Phase gemessen werden, die aus der bevorzugten Nutzung anderer C-Quellen resultieren kann (vgl. 4.3.1).

Bei der Sedimentprobe von Station B war sogar bei $1 \mu\text{g/l}$ eine Akklimationsperiode vor Einsetzen des schnellen Abbaus zu beobachten, wie sie auch Spain & VanVeld (1983) fanden (Abb.26). Durch die Suspension des Sedimentes in Wasser veränderten sich vor allem bei dem schlammigen Sediment von Station B die Umweltbedingungen erheblich: die Sauerstoffversorgung wurde besser, innere Oberflächen wurden frei und organische Verbindungen konnten adsorbieren und desorbieren, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Wasser und Sediment eingestellt hatte. Diese Artefakte erschweren die Interpretation und machen eine Übertragung auf den Abbau unter natürlichen Bedingungen fast unmöglich. Kerr & Capone (1988) fanden höhere Abbauraten bei Benutzung von Suspensionen, während bei VanVeld & Spain (1983) der Abbau in intakten Sedimentkernen schneller ablief. Besonders bei feinen und geschichteten Sedimenten müßte mit ungestörten Sedimentkernen gearbeitet werden, um genauere Aussagen über den Abbau in der Natur treffen zu können (PRITCHARD et al. 1979).

Der große Einfluß einer Adsorption auf den Abbau zeigte sich vor allem bei Verwendung eines hohen Sedimentanteils (3.3.3), sowie beim schlammigen Sediment aus der Mitte der Lübecker Bucht. Es hatte einen hohen Anteil organischer Substanz (Tab.1, 2.2), die bei Sorptionsprozessen eine dominante Rolle spielt (GRANBY 1987, ISAACSON & FRINK 1984). Eine Adsorption verläuft schnell und kann einen erheblichen Prozentsatz von z.B. 40 % binden, wie Figge et al. (1986) für 4-NP in einem terrestrischen Mikrokosmos zeigen konnten. Sorbierte Substrate sind in der Regel nicht mikrobiell abbaubar (LOOSDRECHT et al.1990). Beim 4-Nitrophenol Abbau wurden im Vergleich zu Sandsedimenten ca 30 % weniger mineralisiert. Schlamm-sediment kann außerdem Tonminerale enthalten, die einige Stoffe sehr fest adsorbieren und damit das Ausmaß des Abbaus herabsetzen können, wie es auch Subba-Rao und Alexander (1982) nach Zugabe von Tonmineralen zu geringen Konzentra-

tionen an Benzylamin fanden. Im überstehenden Wasser der Sedimentsuspensionen von Station B war kaum noch 4-NP nachzuweisen, ein Teil des restlichen Substrats war sehr fest adsorbiert (Tab.12 und 13). Besonders bei niedrigen Konzentrationen kann durch Sorption nur ein sehr geringer Teil des Substrats verfügbar sein. Es konnte sogar bei 1:100 oder 1:50 verdünntem Sandsediment eine prozentual stärkere Adsorption bei 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP als bei 50 $\mu\text{g/l}$ festgestellt werden (Tab.13). Eine durch Adsorption verringerte Konzentration kann die Akklimation verhindern (ARAUJO, pers. Mitteilung).

4.3.1 ANDERE C-QUELLEN

Das Vorhandensein anderer C-Quellen ist ein wichtiger Begleitfaktor beim Abbau von Fremdstoffen in natürlichen Gewässern. Besonders wenn der Fremdstoff ein schlechtes Wachstumssubstrat ist oder nur als Stickstoffquelle genutzt werden kann wie z.B. EDTA und Thiourea, sind andere organische Verbindungen für seinen Abbau notwendig. Ihre Konzentration kann entscheiden, welche Menge an Fremdstoff cometabolisch abgebaut werden kann. Lewis et al. (1984) konnten sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte von Kultur-Filtraten und Exsudaten auf die Transformationsraten von Fremdstoffen durch Reinkulturen feststellen.

Im Sediment liegen mehr Nährstoffe organischer und anorganischer Natur vor als im Wasser, die einen Abbau z.B. durch Cometalismus fördern können. Bei niedrigen Konzentrationen können mehrere Substrate gleichzeitig genutzt werden, wie es Schmidt et al. (1987) beim Abbau von 4-NP und Glukose durch eine Reinkultur zeigen konnten. Partikel können als Kohlenstoffquelle dienen aber auch toxische Wirkungen hoher Konzentration an Fremdstoffen abmildern (LOOSDRECHT et al.1990), so konnte z.B. 5 mg/l 4-NP in allen Sedimentproben abgebaut werden, während die gleiche Konzentration in Wasserproben nur in 2 von 6 Proben abgebaut wurde (Tab.12). In partikelfreiem Wasser konnte z. T. ein verlangsamer und in einigen Fällen auch gar kein Abbau höherer Konzentrationen von 4-NP festgestellt werden, Jones & Alexander beobachteten eine Verzögerung des Phenol-Abbaus in partikelfreiem Wasser. Pritchard et al. (1987) fanden eine bessere Mineralisierung von 4-Chlorphenol nach Zugabe von sterilem Sediment.

Natürlich vorkommende, organische Verbindungen treten aber auch als potentiell konkurrierende C-Quellen auf und können den Abbau verzögern. Dieses Phänomen konnte beim 4-NP Abbau in Sedimenten bei Konzentrationen ab 50 $\mu\text{g/l}$ beobachtet werden (Abb.26).

Es soll noch kurz eine weiterer Faktor erwähnt werden, der für den Abbau von Fremdstoffen im Sediment eine wesentliche Rolle spielen kann. Gerade in küstennahen Sedimentations-Zonen, wo der Fremdstoff-Eintrag ins Sediment hoch ist, herrschen häufig anaerobe Verhältnisse vor, die das Abbaupotential wieder einschränken (HAMBRICK et al.1980, BAUER & CAPONE 1985). Ein Abbau von z.B. 4-NP unter anaeroben Bedingungen in marinen Sedimenten verläuft äußerst langsam, sodaß

diese Chemikalie in solchen Sedimenten für Jahre persistieren kann (SIRAGUSA & DELAUNE 1986). Durch Bioturbation können Fremdstoffe schnell in tiefere Sedimentschichten gelangen, die sehr oft anaerob sind (PRITCHARD et al. 1987).

Die Sedimentproben in dieser Arbeit wurden überwiegend aus sandigen Oberflächensedimenten gewonnen, 1:100 verdünnt und unter Schütteln inkubiert, um aerobe Verhältnisse zu gewährleisten. Mit dieser Methode kann nur ein Abbaupotential der aeroben Zonen des Sediments ermittelt werden, zur Bestimmung natürlicher Abbauraten ist sie nicht geeignet. Es wurde meistens bei 20°C inkubiert, ergänzende Versuche bei *in situ* Temperatur dienten der Abschätzung des Temperatureinflusses auf natürliche Abbauprozesse (3.4.1).

Die in einigen Versuchen eingesetzten Biometerflaschen eignen sich insofern für die Untersuchung eines Fremdstoffabbaus in Sedimenten, als das Verhältnis von Wasser zu Sediment in den Biometerflaschen während der gesamten Versuchsdauer konstant bleibt, während aus den Suspensionen mehrfach Wasser entnommen werden muß. Allerdings können sie eher einen qualitativen Eindruck vermitteln, da das gebildete CO₂ ohne Ansäuern nicht quantitativ ausgetrieben werden kann. Je größer das Verhältnis von Sediment zu Wasser ist, desto besser ist es für den Gasaustausch aber desto mehr spielen Adsorption und eine evtl. mangelhafte Sauerstoffversorgung eine Rolle, wie z.T. aus den Vorversuchen deutlich wurde (3.3.3). Außerdem entspricht ein solches Verhältnis eher natürlichen Bedingungen.

4.3.2 EINFLUSS DER MIKROBIELLEN BIOZÖNOSE IN SEDIMENTEN AUF DEN ABBAU

Obwohl der Einfluß abiotischer Umweltfaktoren in Sedimenten besonders wichtig ist, soll noch kurz auf die Rolle der Sediment-Biozönose für einen Fremdstoff-Abbau eingegangen werden. Wie bereits erwähnt, ist die Gesamtbakterienzahl in Sedimenten deutlich höher als in Wasserproben (Tab.1). Aber auch zwischen verschiedenen Sedimenten zeigen sich Unterschiede, wie in Tabelle 1 deutlich zu sehen ist. Wenn die Gesamtbakterienzahl zum besseren Vergleich auf Gramm Trockengewicht bezogen wird, hat das schlickige Sediment der Station B eine Gesamtbakterienzahl, die um ca eine Größenordnung höher war als bei Station C und D. Am geringsten war sie beim grobsandigen Sediment von Falckenstein, das für die Vorversuche und die Konzentrationsreihe mit 2-NP benutzt wurde.

Nur im Sediment von B waren mit der MPN-Methode 4-NP Abbauer nachweisbar (Tab 14). Es könnte also eine Korrelation zwischen Gesamtbakterienzahl und Abbauer-Zahl bestehen. In einem späteren Versuch mit Sediment von Falckenstein ergaben sich aber trotz der geringen Gesamtbakterienzahl sogar mehr Abbauer (2300/ml, siehe Tab.17) als bei Station B (130/ml). In den meisten Urproben konnten nur mit 1 oder 5 µg/l Abbauer nachgewiesen werden, nicht mit 500 oder 1000 µg/l (Tab.14 und 17). In Sandsedimenten ist ein hoher Prozentsatz der Bakterien angeheftet (WEISE & RHEINHEIMER 1979). So läßt es sich erklären, warum in Sedimentproben der Station

D eine schnelle Mineralisierung von 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP erfolgte, aber keine Abbauer mit der MPN-Methode nachweisbar waren (Tab.15 und Abb.26).

Es wird deutlich, daß wahrscheinlich die Belastungsvorgeschichte einen größeren Einfluß auf die Zusammensetzung der Biozönose und den Anteil an Fremdstoffabbauern hat als die Gesamtbakterienzahl. Dies kann auch am Verlauf der Abbaukurven (Abb.26) für Station B und D festgestellt werden. Obwohl nur bei Station B Abbauer nachweisbar waren, setzte hier der Abbau von 1 $\mu\text{g/l}$ langsamer ein als bei Station D. Wahrscheinlich waren andere C-Quellen einer der Gründe, sowie die Veränderung des Milieus und vor allem eine geförderte Adsorption, die besonders in der schlickigen Probe zum Tragen kam.

Bei einem Teil der Proben wurde untersucht, ob sich im Verlauf der Inkubation mit 4-NP die Abbauerzahl erhöhte (3.4.7, Tab.14 und 15). Es zeigte sich keine Zunahme der Abbauerzahl in 14 Tagen bei Proben von der Station D, obwohl der Abbau von 1 $\mu\text{g/l}$ 4-NP schon eingesetzt hatte. Nach 29 Tagen, als 1 $\mu\text{g/l}$ abgebaut worden war, konnten Abbauer nachgewiesen werden. Sie müßten sich auf anderen C-Quellen vermehrt haben, da 1 $\mu\text{g/l}$ nicht zum Wachstum ausreicht. Evtl. konnten die Abbauer auch jetzt erst erfaßt werden, da sie sich durch das ständige Schütteln vom Sediment abgelöst hatten. Dagegen spricht aber, daß nach 14 Tagen noch keine Abbauer nachweisbar waren. Beim schlickigen Sediment von B war eine repräsentative Unterprobenentnahme einfacher. Es war keine signifikante Zunahme im Ansatz mit 1 $\mu\text{g/l}$ feststellbar.

Sehr deutlich ließ sich eine Zunahme der Abbauerzahl in den Sediment-Proben zeigen, die 5 mg/l abgebaut hatten. Während vor dem Abbau keine Bakterien mit der MPN-Methode bei Station D erfaßbar waren, konnten nach erfolgtem Abbau 10^3 - 10^6 Abbauer/ml gezählt werden (Tab.14 und 15). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil der Population, der mit 1 $\mu\text{g/l}$ erfaßt wurde und dem mit 500 $\mu\text{g/l}$ erfaßten um 3 Zehnerpotenzen. Dieses Phänomen kann als weiterer Beweis dafür dienen, daß für den Abbau unterschiedlich hoher Konzentrationen verschiedene Bakterien zuständig sein können. Für den Abbau sehr niedriger Konzentrationen sind die Enzyme, die bei Induktion durch hohe Konzentrationen gebildet werden, nur bedingt geeignet und vice versa (JONES & ALEXANDER 1986, LEWIS et al.1988).

4.4 AKKLIMATION UND ABBAU IN DER NATUR

Ein großer Nachteil der Durchführung von Versuchen unter Laborbedingungen in geschlossenen Systemen ist die unsichere Übertragbarkeit auf natürliche Bedingungen. Einige Faktoren wie Temperatur oder Grazing Druck können zwar vereinzelt oder sogar in Kombination erfaßt werden, aber es wirkt nie die gesamte Komplexität natürlicher Umweltbedingungen, wie sie in Tabelle 19 dargestellt sind, gleichzeitig ein. Außerdem können leicht Artefakte durch z.B. Erschöpfung von Nährsalzen oder Spurenelementen oder auch durch deren vermehrte Freisetzung aus lysierenden

Zellen geschaffen werden, die in der Natur nie in der Form auftreten, wie in einem geschlossenen System. Dieser sogenannte "Flascheneffekt" schließt auch Wachstum der Bakterien auf den Flaschenwänden ein und ist schon seit 1936 bekannt (ZOBELL & ANDERSON 1936, AMMERMANN et al.1984)

Um Abbau und Akklimation in der Natur zu untersuchen, konnten 2 Versuche mit Diffusionskammern durchgeführt werden. Einer wurde mit einer Reinkultur, die 4-NP abbauen konnte, durchgeführt; ein zweiter Versuch mit einer akklimatisierten Mischkultur (vgl. 3.5 und 3.6). Die Reinkultur konnte sich unter natürlichen Bedingungen nicht durchsetzen, es war kein Wachstum festzustellen und schon nach 7 Tagen war die Zahl von 3.5×10^3 /ml auf 8.3 Zellen/ml zurückgegangen (Abb.30). Wahrscheinlich war Grazing durch heterotrophe Nanoflagellaten ein wichtiger Grund für den Rückgang. Sie konnten mikroskopisch in der Ausgangsprobe festgestellt werden und vermehren sich i.d.Regel bei Temperaturen ab 10°C in den Diffusionskammern in ca 4 Tagen erheblich (GALVAO 1990). Es bestand die Möglichkeit, daß sich einige Zellen der Reinkultur an den Filtern festsetzten, um so dem Wegfraß durch Protozoen zumindest teilweise zu entgehen. Im freien Wasser kann diese Funktion von Partikeln übernommen werden (LOOSDRECHT et al.1990). Diese Partikel sedimentieren aber im Laufe der Zeit, und so reichern sich diese Bakterien im Sediment an (CHO & AZAM 1988). Sie stehen also für einen Abbau in der Wassersäule nur eine begrenzte Zeit zur Verfügung.

Die natürliche Mischkultur zeigte eine geringe Reaktion auf das zugesetzte 4-NP. Nur nach einem Tag konnte in einer der fünf Parallelen der geringsten MPN-Verdünnung mit 1 ml Probenwasser Abbauer nachgewiesen werden, so daß sich die Zahl von 0.2 Abbauer/ml ergibt. Bis zum Ende des Versuchs trat keine weitere Vermehrung trotz des zweiten 4-NP-Zusatzes auf, sondern es konnten gar keine Abbauer mehr nachgewiesen werden (3.5). Wahrscheinlich war die Temperatur zu gering und die Kontaktzeit mit dem 4-NP zu kurz. Die Bedingungen, die während des Versuchs vorlagen, entsprechen aber durchaus einer Situation, wie sie in der meisten Zeit des Jahres in der Ostsee vorliegt.

Die akklimatisierte Mischkultur zeigte nur eine geringe Abnahme der Bakterien, die 4-NP abbauen konnten (Abb.31). Ein Teil der Abnahme konnte durch Anheftung an die Innenwände der Kammer erklärt werden. Ein Abbau von 4-NP unter *in situ* Bedingungen konnte weder über photometrische Messungen noch über ein Wachstum der Abauer nachgewiesen werden (3.7). Inwieweit Flagellaten bei der geringen Temperatur aktiv waren, und ob die bevorzugt an Oberflächen vorkommenden Choanoflagellaten die Filter abweiden können, muß dahingestellt bleiben. Auf jeden Fall zeigte sich ein sehr viel besseres Überleben der an den Abbau von 4-NP akklimatisierten Mischkultur als bei der Reinkultur (Abb.30 und 31). Es konnte kein Abbau *in situ* festgestellt werden, was sicherlich mit den niedrigen Temperaturen zusammenhing, die evtl. für das Überleben günstig waren. Auch die Anheftung an die Filter schien für einen Teil der Bakterien eine gute Überlebensstrategie zu sein.

Obwohl Abbauer auch in der natürlichen Probe vorhanden waren (ca 16 pro Kammer), fand eine Akklimation unter *in situ* Bedingungen nicht statt, denn es konnte keine Zunahme der Abbauerzahl nach zweifachem Zusatz von 4-NP festgestellt werden, sondern die Anzahlen schwankten im Bereich der Fehlergrenzen der MPN-Methode (2.15). Wahrscheinlich war ein Wachstum durch die geringe Temperatur und geringe Kontaktzeit mit dem 4-NP nicht möglich. Erst nach einer Inkubation von mehreren Wochen im Labor bei 20°C konnte die maximal erreichte Zahl von 0.4 Abbauern/ml ermittelt werden. Diese Bakterien sind nicht unbedingt bei 10°C aktiv (vgl.4.3.2).

Ist nur eine kleine Abbauerpopulation im Wasserkörper vorhanden, die für einen effektiven Abbau wachsen muß, können bei ungünstigen Umweltbedingungen die eingeleiteten Fremdstoffen weit in die Meere und deren Sedimente verbreitet und damit verdünnt werden. Durch die resultierenden, niedrigen Konzentrationen werden die Bedingungen für einen Abbau noch ungünstiger. Außerdem müssen die geringen Temperaturen berücksichtigt werden, wie sie in größeren Wassertiefen und die meiste Zeit des Jahres in der ganzen Ostsee herrschen. Deshalb muß ein quantitativer Abbau der untersuchten Fremdstoffe, der die Nachlieferung kompensieren kann, in der Ostsee fraglich bleiben.

5. FAZIT

In den hier dargestellten Untersuchungen hat sich gezeigt, daß Fremdstoffe in niedrigen Konzentrationen, die in küstennahen Gewässern noch durch Bakterien abgebaut werden können, in küstenerferen Biotopen häufig nur unvollständig oder gar nicht mehr umgesetzt werden. Hier ist die Fähigkeit zum Abbau von Fremdstoffen in den mikrobiellen Lebensgemeinschaften nur noch selten vorhanden, oder sie kann unter natürlichen Bedingungen nicht zum Ausdruck kommen. Außerdem werden durch die Verdünnung der Chemikalien Schwellenkonzentrationen unterschritten, unterhalb derer sich die Neubildung von Enzymen zur Umsetzung der geringen Substanzmengen für die Mikroorganismen aus energetischen Gründen nicht mehr lohnt.

Dies gilt ebenfalls für Proben aus dem Elbeästuar und der Nordsee (RHEINHEIMER et al. 1990). Als Besonderheit der Ostsee zeigte sich schon in geringer Entfernung von der Küste ein deutlicher Rückgang des Fremdstoffabbaus in Wasserproben im Gegensatz zu Sedimentproben. Im Sediment der Ostsee reichern sich Fremdstoffe und Bakterien allochthonen Ursprungs an, sodaß prinzipiell die Bedingungen für eine Mineralisierung von Fremdstoffen gegeben sind. Im natürlichen Milieu haben jedoch abiotische Faktoren wie niedrige Temperaturen und Sauerstoffgehalte, eine Vielzahl leichter abbaubarer Substrate und die oft irreversible Adsorption von Fremdstoffen einen negativen Einfluß auf Rate und Ausmaß der Mineralisierung.

Es zeigt sich also, daß die Abbauprozesse bei den untersuchten Fremdstoffen in Proben aus der westlichen Ostsee fast ausnahmslos zu langsam oder unvollständig ablaufen, um einen kontinuierlichen anthropogenen Eintrag zu beseitigen.

Eine Hauptquelle für Einträge sind geklärte und ungeklärte Abwässer. Gaudy & Blachly (1985) konnten zeigen, daß sogar Glukose in Klärwerken nicht vollständig abgebaut wurde, weil die Verweilzeit zu kurz war. Für einen vollständigeren Abbau bei längerer Verweilzeit wären Bakterien mit niedrigen spezifischen Wachstumsraten notwendig.

Diese Bakterien, die Enzyme mit hohen Affinitäten und geringen Spezifitäten haben sollten, könnten über Anreicherungskulturen und Isolierungen von Reinkulturen aus dem unerschöpflichen Potential z.B. der Meere und besonders ihrer Sedimente erhalten werden. Mit ihrer Hilfe können Fremdstoffe z.B. in Schönungsteichen oder auch Spezial-Fermentern dort beseitigt werden, wo sie noch relativ unvermischt vorliegen, d. h. vor ihrer Einleitung in natürliche Gewässer. Durch optimale Parameter-Einstellung könnte das natürliche Abbaupotential voll ausgeschöpft werden.

Auf diese Weise werden die Gewässer geschont, in denen oft ungünstige Umweltfaktoren den Fremdstoffabbau behindern, und eine vielfältige Biozönose bleibt erhalten oder kann sich entwickeln. Die mikrobielle Lebensgemeinschaft kann dann wieder ihre Funktion wahrnehmen. Diese ist die langsame Remineralisierung natürlicher Einträge sowie der unvermeidbaren anthropogenen Restmengen, die auch bei Anwendung der bestmöglichen Klär- und Filter-Technologie noch in Gewässer wie die Ostsee gelangen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die biologische Abbaubarkeit von organischen Chemikalien im umwelt-relevanten Konzentrationsbereich untersucht. Der Hauptteil der Experimente konnte mit natürlichen Mischpopulationen aus der Ostsee durchgeführt werden. Zum Teil wurden an den Fremdstoffabbau akklimatisierte Mischkulturen eingesetzt. Beginn, Rate und Ausmaß der Mineralisierung konnten nach Zusatz geringer Mengen radio-aktiv markierter Verbindungen zu Wasser- und Sedimentproben über das entstehende Kohlendioxid quantifiziert werden. Folgende Fremdstoffe wurden eingesetzt: Diethylenglycol, EDTA, 2- und 4-Nitrophenol, Naphthalin, Phenol und Thiourea.

Bei ausgewählten Versuchen wurde die Entwicklung der mikrobiellen Biozönose während der Inkubation erfaßt. Es erfolgten mikroskopische Zählungen und Klassifizierungen, sowie die selektive Erfassung von Bakterien, die einen Fremdstoff in hoher oder niedriger Konzentration abbauen.

Zur Erfassung eines Fremdstoffabbaus bei niedrigen Konzentrationen mußten spezifische Methoden, wie die MPN-Methode verwendet werden, um die Entwicklung der Abbauerpopulation zu verfolgen.

Naturnahe Abbauraten konnten nur bei fast ubiquitär vorkommenden Verbindungen wie Phenol und Naphthalin gemessen werden. Sie waren selbst bei annähernd optimalen Bedingungen meist gering.

Die eingesetzte Konzentration des Fremdstoffes kann zwei entgegengesetzte Effekte auf die Geschwindigkeit des Abbaus haben:

1) Wenn eine Abbauerpopulation vorhanden ist, dauert der Abbau bei höheren Konzentrationen länger, weil für eine quantitative Umsetzung Wachstum nötig ist; (Beispiele sind der DEG- und 2-NP-Abbau in Wasser und der 2- und 4-NP-Abbau in Sedimenten.)

2) Wenn nur sehr wenige Abbauer vorhanden sind, und/oder die Abbauenzyme erst induziert werden müssen, setzt der Abbau auf jeden Fall erst nach einer Akklimationsphase ein, die bei höheren Konzentrationen kürzer ist. (Beispiel ist der 4-NP-Abbau in Wasser)

Eine Akklimation an höhere Konzentrationen läßt den schnellen Abbau auch niedriger Konzentrationen zu, während eine Akklimation an niedrige Konzentrationen keinen schnellen Abbau höherer Konzentrationen zuläßt.

Die Ursache für eine Akklimationsphase ist eine zu kleine, inaktive Abbauerpopulation; ihr Wachstums wird i. d. Regel durch niedrige Temperaturen, geringe Substratkonzentrationen und Wegfraß durch Protozoen verlangsamt werden.

Die Abbauaktivität kann durch Repression der Enzyminduktion bei nicht konstitutiven Enzymen durch andere Substrate verhindert werden. (Beispiel ist der Abbau von 50 µg/l 4-NP im Sediment).

In Sedimentsuspensionen und in sedimentnahe Wasser konnte ein sehr viel schnellerer Abbau von DEG und 4-NP festgestellt werden als in Oberflächenwasser, der z.T. mit einer höheren Abbauerzahl im Sediment einherging.

Thiourea wurde nur in Proben mit direktem Süßwassereinfluß und nur in geringer Konzentration relativ schnell und vollständig umgesetzt.

Die Umsetzung zu CO₂ war in Sedimentproben bei fast allen genannten Substanzen weniger vollständig als in Wasserproben, während sie in sedimentnahe Wasser gleiche Ausmaße erreichte. Eine Ursache hierfür war die zum Teil starke Adsorption der Fremdstoffe an feine und organische Bestandteile des Sediments.

EDTA wurde auch unter optimalen Bedingungen nicht quantitativ abgebaut.

Untersuchungen der mikrobiellen Biozösen natürlicher Wasser- und z. T. Sedimentproben ergaben sehr niedrige Zahlen an Bakterien, die verschiedene Phenole abbauen konnten. Es schienen zwei unterschiedliche Populationen am Abbau hoher und niedriger Konzentrationen von Nitrophenolen beteiligt zu sein.

Nach der Mineralisierung von Fremdstoff-Mengen von mindestens 5 µg/l konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils der Abbauer an der Gesamtbiozöse festgestellt werden.

Eine Akklimation einer natürlichen mikrobiellen Biozöse an den 4-NP Abbau unter ungünstigen natürlichen Bedingungen konnte nicht festgestellt werden. Unter den gleichen Bedingungen wurde 4-NP nicht durch bereits akklimatisierte Bakterien abgebaut.

Grundsätzlich ließ sich feststellen, daß die Fähigkeit zur Mineralisierung von Fremdstoffen in Wasserproben aus der westlichen Ostsee schon bei Proben aus nur geringer Entfernung von der Küste stark eingeschränkt ist. In Sedimentproben zeigte sich ein höheres Abbaupotential, aber durch verstärkte Einwirkung ungünstiger abiotischer Faktoren im natürlichen Milieu konnten Fremdstoffe hier oft nur unvollständig mineralisiert werden.

7.LITERATUR

- Aelion, C.M., C.M. Swindoll & F.K. Pfaender: Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (9), S.2212-2217 (1987)
- Ajinomoto K. K.: Biological removal of thiourea from waste liquor by activated sludge process using *Pseudomonas* Gp bacteria as decomposition agent. Patent No.: JP 58008592/A, Patent Date: 830118, WPI Accession No: 83-19068K/08 (1983)
- Alexander, M.: Most probable number method for microbial populations. In: *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties - Agronomy Monograph No.9* (2nd edition), Madison, USA, S.815-820 (1982)
- Ammermann, J.W., J.A. Fuhrman, A. Hagström & F. Azam: Bacterioplankton growth in seawater: I. growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Marine Ecology - Progress Series* 18, S.31-39 (1984)
- Andersen, P. & T. Fenchel: Bacterivory by microheterotrophic flagellates in seawater samples. *Limnol. Oceanogr.* 30 (1), S. 198-202 (1984)
- Anderson. D.J., M.J. Day, N.J. Russell & G.F. White: Die-away kinetic analysis of the capacity of epilithic and planctonic bacteria from clean and polluted river water to biodegrade sodium dodecyl sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (3), S. 758-763 (1990)
- Arvin, E., B.K. Jensen & A.T. Gundersen: Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (12), S. 3221-3225 (1989)
- Bauer, J. E. & D. G. Capone: Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene und naphthalene in intertidal marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (1), S. 81-90 (1985)
- Bauer, J. E. & D. G. Capone: Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (7), S.1649-1655 (1988)

- Bauerfeind, S., G.G. Gerhardt & G. Rheinheimer: Unter-
suchungen zur Überlebensdauer von Fäkalbakterien mit
und ohne Sediment.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 174. S. 364-374
(1981)
- Beilsteins Handbuch der organischen Chemie. 1/2, S. 520, 3/6
S. 291 und 1005, 4/6 S. 342, 722 und 1245, 4/11, 4/E
und 6/2 S. 116, diverse Jahrgänge
- Boethling, R. S. & M. Alexander: effect of concentration of
organic chemicals on their biodegradation by natural
microbial communities.
Appl. Environ. Microbiol., 37 (6), S. 1211-1216 (1979)
- BMB-Symposium: 11th Symposium of the Baltic Marine
Biologists. Szczecin, Poland, September 11-16 (1989)
- Bringmann, G. & R. Kühn: Comparison of the toxicity
thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and
protozoa in the cell multiplication inhibition test.
Water Research 14, S.231-241 (1980)
- Bringmann, G. & R. Kühn: Ergebnisse der Schadwirkung
wassergefährdender Stoffe gegen *Daphnia magna* in einem
weiterentwickelten standardisierten Testverfahren.
Z. Wasser Abwasser Forsch. 15 (1), S.1-6 (1982)
- Bruhn, C., H. Lenke & H.-J. Knackmuss: Nitrosubstituted
aromatic compounds as nitrogen source for bacteria.
Appl. Environ. Microbiol., 53 (1), S. 208-210 (1987)
- Bruns, K.: Einflüsse von Naphthalin auf marine Bakterien.
Diplomarbeit, Universität Giessen (1986)
- Button, D.K. & B.R. Robertson: Effect of toluene exposure
time and concentration on induction of high affinity
values for toluene oxidation by bacteria of estuarine
seawater samples.
Marine Ecology - Progress Series 26, S.187-193 (1985)
- Cho, B.C. & F Azam: Major role of bacteria in
biogeochemical fluxes in the ocean's interior.
Nature 332 (6163), S. 441-443 (1988)
- Cossa, D.: Cadmium in *Mytilus* spp.: worldwide survey and
relationship between seawater and mussel content.
Marine Environmental Research 26, S.265-284 (1988)
- Curds, C.R.: The ecology and role of protozoa in aerobic
sewage treatment processes.
Ann. Rev. Microbiol. 36, S.27-46 (1982)
- Daten zur Umwelt: Umweltjahresbericht.
Hrsgb.: Umweltbundesamt, Redaktion: Fachgebiet I 1.2
Umweltforschung und -statistik. E. Schmidt Verlag
GmbH & Co., Berlin, S. 407 (1989)

- Dehnad, F & U. Förstner: Einfluß ausgewählter organischer Komplexbildner auf die Sorption von Schwermetallen auf Gewässersedimente.
Z. Wasser- Abwasser-Forsch.21, S. 46-50 (1988)
- Denka-Eng.: Method for removal of hardly decomposable COD from waste-water - oxidation using ozone of waste-water from thermosetting resin factory.
Patent No.: JP 59189996, Patent Date: 841027
WPI Accession No: 84-304145 (8449) (1984)
- Dietz, F.: Neue Meßergebnisse über die Belastung von Trinkwasser mit EDTA.
GWf, Wasser, Abwasser 128, S. 286-288 (1987)
- EAWAG: Untersuchungen über das Umweltverhalten des Phosphatersatzstoffes NTA und des Komplexbildners EDTA
EAWAG Jahresbericht, CH-8600 Dübendorf,
Überlandstrasse 133, Kap.3.2, S. 3-5 - 3-17 (1987)
- Egli, T.: (An)aerobic breakdown of chelating agents used in household detergents.
Microbiological Sciences 5 (2), S. 36-41 (1988)
- Ehrhardt, M.: Organic substances in the Baltic Sea.
Marine Pollution Bulletin 12 (6), S.210-213 (1981)
- Ehrhardt, H.M. & H.-J. Rehm: Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Pseudomonas putida* P8 adsorbed on activated carbon.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, S.312-317 (1989)
- Ernst, W., G. Edler, H. Goerke, K. Weber, S. Weigelt & U. Weigelt: Berichte der Abteilungen: Chemie.
Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven 21, S. 139-155 (1986)
- Figge, K., J. Klahn & J. Koch: Kinetic distribution model for chemicals based on results from a standard environmental system.
Ecotoxicology and Environmental Safety 11, S.320-338 (1986)
- Fletcher, M. & K. C. Marshall: Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria?
In Advances in Microbial Ecology, Vol.6, Herausgeber K. C. Marshall, Plenum Press, New York - London, S. 199-236 (1982)
- Galvao, H.: Die Rolle der Nanoflagellaten im Nahrungsnetz eines Brackwassergebietes (westliche Ostsee).
Dissertation, Universität Kiel (1990)
- Gardiner, J.: Complexation of trace metals by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in natural waters.
Water Research 10, S.507-514 (1976)

- Gaudy Jr., A.F. & T.R. Blachly: A study of the biodegradability of residual COD.
Journal WPCF 57 (4), S. 332-338 (1985)
- Gerike, P. & W. K. Fischer: A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests.
Ecotoxicology And Environmental Safety 3, S. 159-173 (1979)
- Germanier, B. & K. Wuhrmann: Über den aeroben mikrobiellen Abbau aromatischer Nitroverbindungen.
22. Jahresvers. Schweiz. Mikrobiol. Ges., Basel 1963, Path. Microbiol. 26, S. 569-578 (1963)
- Granby, K.: Levels of hydrocarbons and chlorinated compounds in the Danish sea areas.
Report of the Marine Pollution Laboratory 12, December (1987)
- Grasshoff, K., M. Ehrhardt & K. Kremling: Methods of seawater analysis.
Verlag Chemie, Weinheim (1983)
- Goldstein, R.M., L.M. Mallory & M. Alexander: Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation.
Appl. Environ. Microbiol. 50 (4), S. 977-983 (1985)
- Gonzalez, J.M., E.B. Sherr, B.F. Sherr: Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates.
Appl. Environ. Microbiol. 56 (3), S.583-589 (1990)
- Gschwend, P.M., O.C. Zafiriou, R.F.C. Mantoura, R.P. Schwarzenbach & R.B. Gagosian: Volatile organic compounds at a coastal site.
Environ. Sci. Technol. 16 (1), S.31-38 (1982)
- Güde, H.: Grazing by protozoa as selection factor for activated sludge bacteria.
Microbial Ecology 5, S. 225-237 (1979)
- Güde, H.: Influence of phagotrophic processes on the regeneration of nutrients in two-stage continuous culture systems.
Microbial Ecology 11, S. 193-204 (1985)
- Haas, L.W.: Improved epifluorescence microscopy for observing planctonic micro-organisms:
Annales de l'Institut Oceanographique, Nouvelle Serie 58 (5), S.261-266 (1982)
- Haines, J.R. & M. Alexander: Microbial degradation of polyethylene glycols.
Appl. Environ. Microbiol. 29 (5), S. 621-625 (1975)

- Halkiewicz, J., H. Lamparczyk, J. Grzybowski & A. Radecki:
On the aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbon
levels in the southern Baltic Sea atmosphere.
Atmospheric Environment 21 (9), S.2057-2063 (1987)
- Haltrich, W. G., U. Pagga & H. Wellens: Die Prüfung der
biologischen Abbaubarkeit von wasserlöslichen Stoffen.
Vom Wasser 54, S. 51-62 (1980)
- Hambrick III, G. A., R. D. DeLaune & W.H. Patrick, Jr.:
effect of estuarine sediment pH and oxidation-
reduction potential on microbial hydrocarbon
degradation.
Appl. Environ. Microbiol. 40 (2), S. 365-369 (1980)
- Heitkamp, M. A., J. P. Freeman & C. E. Cerniglia:
Naphthalene biodegradation in environmental
microcosms: estimates of degradation rates and
characterization of metabolites.
Appl. Environ. Microbiol. 53 (1), S.129-136 (1987)
- Herbes, S. E. & L. R. Schwall: Microbial transformation
of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and
petroleum-contaminated sediments.
Appl. Environ. Microbiol., 35 (2), S.306-316 (1978)
- Hinga, K.R.: Seasonal predictions for pollutant scavenging
in two coastal environments using a model calibration
based upon thorium scavenging.
Marine Environmental Research 26, S. 97-112 (1988)
- Höfle, M.G.: Can mixed cultures help the understanding of
natural heterotrophic processes?
Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 19, S.53-58
(1984)
- Hollibaugh, J.T.: Metabolic adaptation in natural bacterial
populations supplemented with selected amino acids.
Estuarine and Coastal Marine Science 9, S.215-230
(1979)
- Hoover, D. G., G. E. Borgonovi, S. H. Jones & M.
Alexander: anomalies in mineralization of low
concentrations of organic compounds in lake water and
sewage.
Appl. Environ. Microbiol., 51 (2), S.226-232 (1986)
- Horowitz, A., J. M. Suflita & J. M. Tiedje: Reductive
dehalogenations of halobenzoates by anaerobic lake
sediment microorganisms.
Appl. Environ. Microbiol. 45 (5), S.1459-1465 (1983)
- Huang, T.-C., M.-C. Chang & M. Alexander: Effect of
protozoa on bacterial degradation of an aromatic
compound.
Appl. Environ. Microbiol. 41 (1), S. 229-232 (1981)

- Hunter, M., T. Stephenson, P.W.W. Kirk, R. Perry & J.N. Lester: Effect of salinity gradients and heterotrophic microbial activity on biodegradation of nitrotriacetic acid in laboratory simulations of the estuarine environment.
Appl. Environ. Microbiol. 51 (5), S.919-925 (1986)
- 4.Immissionsschutzbericht der Bundesregierung vom 28.7. 1988.
Drucksache 11/2714 (1988)
- Van Iperen, J. & W. Helder: A method for the determination of organic carbon in calcareous marine sediments.
Marine Geology 64, S.179-187 (1985)
- Isaacson, P.J. & C.R. Frink: Nonreversible sorption of phenolic compounds by sediment fractions: the role of sediment organic matter.
Environ. Sci. Technol. 18, S.43-48 (1984)
- Jensen, H.L. & G. Lautrup-Larsen: Microorganisms that decompose nitro-aromatic compounds, with special reference to dinitro-ortho-cresol.
Acta Agriculturae Scandinavica 17, S. 115-125 (1967)
- Johannes, R.E.: Influence of marine protozoa on nutrient regeneration.
Limnol. Oceanogr. 10, S. 434-442 (1965)
- Jones, S.H. & M. Alexander: Kinetics of mineralization of phenols in lake water.
Appl. Environ. Microbiol. 51 (5), S.891-897 (1986)
- Jones, S.H. & M. Alexander: Effect of inorganic nutrients on the acclimation period preceding mineralization of organic chemicals in lake water.
Appl. Environ. Microbiol. 54 (12), S.3177-3179 (1988)
- Kaplan D.L., J.T. Walsh & A.M. Kaplan: Gas chromatographic analysis of glycols to determine biodegradability
Environ. Sci. Technol. 16, S. 723-725 (1982)
- Kato, K.: Planctonic bacterial strategy in aquatic ecosystems: free-living vs. attached.
In Recent Advances in Microbial Ecology, Editors T.Hattori, Y.Ishida, Y. Maruyama, R.Y.Morita & A. Uchida, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, S. 373-377 (1989)
- Kaufmann, T.& N. Scholz: Entwicklung von Testverfahren an Kemptozoen und Ascidien für ökotoxikologische Untersuchungen nach dem Chemikalien-Gesetz.
Jahresbericht der biologischen Anstalt Helgoland, S. 86-88 (1986)

- Keith, L. H. & W. A. Telliard: Priority Pollutants 1: A perspective view.
Environ. Sci. Technol. 13, S. 416-423 (1979)
- Kennish, M.J.: CRC Practical Handbook of Marine Science.
Editor M.J. Kennish, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1989)
- Kerr, R.P. & D.G. Capone: The effect of salinity on the microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments.
Marine Environmental Research 26, S.181-198 (1988)
- Klein, A.W., W. Klein, W. Kördel & M. Weiss: Structure-activity relationships for selecting and setting priorities for existing chemicals - a computer-assisted approach.
Environmental Toxicology and Chemistry 7, S. 455-467, (1988)
- Korte, F.: Lehrbuch der ökologischen Chemie.
Thieme Verlag Stuttgart, 2. Auflage, Kapitel 3.2.1, S.46 (1987)
- Kosfeld, C.: Mikrobieller Abbau von Faeces der Miesmuschel (*Mytilus edulis* L.)
Dissertation, Christian Albrechts Universität, Kiel (1989)
- Krambeck, C.: Control of bacterioplankton structures by grazing and nutrient supply during the decline of an algal bloom.
Verh. Internat. Verein. Limnol. 23, S. 496-502 (1988)
- Kreikenbohm, R.: Anreicherung von aeroben Bakterien für die Dekontamination Thioharnstoff-haltiger Abwässer.
7. Dechema-Fachgespräch Umweltschutz, 12./13.3. 1990
Poster Nr.24 (1990)
- Kuiper, J. & A.O. Hanstveit: Fate and effects of 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol in marine plankton communities in experimental enclosures.
Ecotoxicology and Environmental Safety 8, S. 15-33 (1984)
- Kühn, R. & M. Pattard: Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test.
Water Research 24 (1), S.31-38 (1990)
- Langenfeld, M.: Abbau und Toxizität von Dinitrophenol bei Gewässerbakterien und Laborstämmen.
Diplomarbeit, Universität Kiel (1990)

- Larson, R.J. & D.H. Davidson: Acclimation to and biodegradation of nitrilotriacetate (NTA) at trace concentrations in natural waters. *Water Research* 16, S.1597-1604 (1982)
- Law, A. T. & D. K. Button: Multiple-carbon-source-limited growth kinetics of a marine coryneform bacterium. *Journal of Bacteriology* 129 (1), S. 115-123 (1977)
- Lee, R. F. & C. Ryan: Microbial degradation of organo chlorine compounds in estuarine waters and sediments. In EPA workshop: Degradation of Pollutants in Marine Environments. April 1979, EPA 600/9-79-1012, S. 443-450 (1979)
- Leuenberger, C., J. Czuczwa, J. Tremp & W. Giger: Nitrated phenols in rain: atmospheric occurrence of phytotoxic pollutants. *Chemosphere* 17, S. 511-515 (1988)
- Lewis, D.L. & H.W. Holm: Rates of transformation of methyl parathion and diethyl phthalate by aufwuchs microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (4), S. 698-703 (1981)
- Lewis, D.L., R.E. Hodson & L.F. Freeman III: Effects of microbial community interactions on transformation rates of xenobiotic chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (3), S. 561-565 (1984)
- Lewis, D.L., R.E. Hodson & L.F. Freeman III: Multiphasic kinetics for transformation of methyl parathion by *Flavobacterium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (3), S. 553-557 (1985)
- Lewis, D.L., R.E. Hodson & H.-M. Hwang: Kinetics of mixed microbial assemblages enhance removal of highly dilute organic substances. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (8), S. 2054-2057 (1988)
- Leymann, G.: Diskussionsbeitrag zur Eutrophierung der Küstengewässer. *Wasser + Boden* 11, S.644-646 (1988)
- Li, A.Y.L. & F.A. DiGiano: Availability of sorbed substrate for microbial degradation on granular activated carbon. *J. Water Pollut. Control Fed.* 55, S. 392-399 (1983)
- Lillelund, K., U. de Haar, H-J. Elster, L. Karbe, I. Schwoerbel & W. Simonis: Bioakkumulation in Nahrungsketten. Zur Problematik der Akkumulation von Umweltchemikalien in aquatischen Systemen. Ergebnisse aus dem Schwerpunktprogramm "Nahrungskettenprobleme". Forschungsbericht der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Verlag Chemie, Weinheim, S. 299-304 (1987)

- Linkfield, T. G., J. M. Suflita & J. T. Tiedje:
Characterization of the acclimation period before
anaerobic dehalogenation of halobenzoates.
Appl. Environ. Microbiol. 55 (11), S. 2773-2778 (1989)
- Lockhart, H.B. & R.V. Blakeley: Aerobic photodegradation of
X(N)chelates of (ethylenedinitrilo)tetraacetic acid
[EDTA]: implications for natural waters.
Environmental Letters 9 (1), S. 19-31 (1975a)
- Lockhart, H.B. & R.V. Blakeley: Aerobic photodegradation of
Fe (III)-(ethylenedinitrilo)tetraacetate (Ferric EDTA)
Implications for natural waters.
Environmental Science & Technology 9 (12), S.1035-
1038 (1975b)
- Loosdrecht, VAN, M.C.M., J. Lyklema, W. Norde & A.J.B.
Zehnder: Influence of interfaces on microbial
activity.
Microbiological Reviews 54 (1),S. 75-87 (1990)
- Madsen, E. L. & M. Alexander: Effects of chemical
speciation on the mineralization of organic compounds
by microorganisms.
Appl. Environ. Microbiol. 50 (2), S. 342-349 (1985)
- Madsen, P.P. & B. Larsen: Accumulation of mud sediments and
trace metals in the Kattegat and the Belt Sea.
Report of the Marine Pollution Laboratory 10, December
(1986)
- Magaard, L. & G. Rheinheimer: Meereskunde der Ostsee.
Springer Verlag, Berlin (1974)
- Mallory, L.M., C.-S. Yuk, L.-N. Liang & M. Alexander:
Alternative prey: a mechanism for elimination of
bacterial species by protozoa.
Appl. Environ. Microbiol. 46 (5), S. 1073-1079 (1983)
- Martinetz, D.: Top 50 list of chemical products.
UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 3, S. 11 (1989)
- Means, J. L., T. Kucak & D.A. Crerar: Relative degradation
rates of NTA, EDTA and DTPA and environmental
implications.
Environmental Pollution (Series B) 1, S. 45-60 (1980)
- Meuter, G.: Vergleichende Untersuchungen von Bakterien-
stämmen aus dem Elbe-Ästuar und der westlichen Ostsee,
die aromatische Verbindungen abbauen.
Diplom-Arbeit, Universität Kiel (1989)
- Meyer-Reil, L.-A.: Seasonal variations in bacterial biomass
and decomposition of particulate organic material in
marine sediments.
Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 19, S. 201-206
(1984)

- McFeters, G.A. & D.G. Stuart: Survival of coliform bacteria in natural waters: field and laboratory studies with membrane-filter chambers.
Applied Microbiology 24, S.804-811 (1972)
- Mitsubishi Heavy Ind. KK: Thiourea, citric acid containing wastewater purification - treated with copper and calcium compounds.
Patent No.: JP 50072451/A, Patent Date: 750616, WPI
Access No.: 76-08129X/05 (1975)
- Munneke, D.M. & D.P.H. Hsieh: Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in aqueous media.
Appl. Environ. Microbiol. 28 (2), S. 212-217 (1974)
- Muschenheimer, D.K., P.E. Kepkay & K. Kranck: Microbial growth in turbulent suspension and its relation to marine aggregate formation. Netherlands Journal of Sea Research 23 (3), S. 283-292 (1989)
- Nyholm, N., P. Lindgaard-Joergensen & N. Hansen: Biodegradation of 4-nitrophenol in standardized aquatic degradation tests.
Ecotoxicology and Environmental Safety 8, S. 451-470 (1984)
- Oppenheimer, C. H. & C. E. ZoBell: The growth and viability of sixty-three species of bacteria as influenced by hydrostatic pressure.
J. Mar. Res. 11, S. 10-18 (1952)
- Olsen, C.R., N.H. Cutshall & I.L. Larsen: Pollutant-particle associations and dynamics in coastal marine environments: a review.
Marine Chemistry 11, S. 501-533 (1982)
- Olsson, M. & L. Reutergardh: DDT and PCB pollution trends in the Swedish aquatic environment.
Ambio 15 (2), S.103-109 (1986)
- Osterroht, C. & V. Smetacek: Vertical transport of chlorinated hydrocarbons by sedimentation of particulate matter in Kiel Bight.
Marine Ecology - Progress Series 2, S. 27-34 (1980)
- Pagga, U., W.G. Haltrich & W. Günthner: Untersuchungen über die Wirkung von 4-Nitrophenol.
Von Wasser 59, S.51-65 (1982)
- Paul, J.H.: Uptake of organic nitrogen.
In Carpenter, E.J & D.C. Capone: Nitrogen in the marine environment. Academic Press, S.288 und 291 (1983)

- Pfaender, F.K., R.J. Shimp & R.J. Larson: Adaptation of estuarine ecosystems to the biodegradation of nitrilotriacetic acid: effects of preexposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4, S.587-595 (1985)
- Pritchard, P. H., W. Bourquin, H. L. Frederickson & T. Maziarz: System design factors affecting environmental fate studies in microcosms. In EPA workshop: Degradation of Pollutants in Marine Environments. April 1979 EPA-600/9-79-012, S. 251-271 (1979)
- Pritchard, P. H., E.J. O'Neill, C.M. Spain & D.G. Ahearn: Physical and biological parameters that determine the fate of p-chlorophenol in laboratory test systems: *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (8), S. 1833-1838 (1987)
- Ramadan, M.A., O.M. El-Tayeb & M. Alexander: Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (5), S. 1392-1396 (1990)
- Rassoulzadegan, F. & R.W. Sheldon: Predator-prey interactions of nanozooplankton and bacteria in an oligotrophic marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 31, S. 1010-1021 (1986)
- Raymond, D.G.M. & M. Alexander: Microbial metabolism and cometabolism of nitrophenols. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 1, S. 123-130 (1971)
- Rheinheimer, G.: Sandstrände - Eine ökologische Nische für einige interessante heterotrophe Bakterien. *Forum Mikrobiologie* 6, S. 318-322 (1979)
- Rheinheimer, G.: *Mikrobiologie der Gewässer*. Gustav Fischer Verlag, 3. Auflage, Stuttgart (1981)
- Rheinheimer, G., H. Gericke & J.B. Wesnigk: Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Chemikalien im umweltrelevanten Konzentrationsbereich. *Umweltforschungplan des Ministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Umweltchemikalien, Forschungsbericht 106 02 051* (1990)
- Rippen, G.: *Handbuch der Umweltchemikalien: physikalisch-chemische und ökotoxikologische Daten ausgewählter chemischer Stoffe*. Verfasser G.Rippen, Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, S. 7-17 (1984)
- Rippen, G., E. Zietz, R. Frank, T. Knacker & W. Klöpffer: Do airborne nitrophenols contribute to forest decline? *Environmental Technology letters* 8, S. 475-483 (1987)

- Ritzrau, W.: Die bodennahe Trübezone der Kieler Bucht.
Diplomarbeit, Universität Kiel 1990
- Robinson, J.A.: Determining microbial kinetic parameters using nonlinear regression analysis: advantages and limitations in microbial ecology.
In: Advances in Microbial Ecology, Editor K.C. Marshall, Plenum Press, New York, London, Vol.8, Ch.2 (1985)
- Römpps Chemielexikon: 7.Auflage, Herausgeber Dr.O.-A. Neumüller, Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart, diverse Bände (1972 - 1977)
- Schackmann, A., R. Müller & F. Lingens: Reductive conversion of nitroaromatic compounds by *Pseudomonas* sp.CBS 3.
Poster Nr.155 der DGHM/VAAM Tagung 1990, TU Berlin (1990)
- Schmidt, E., M. Hellwig & H.-J. Knackmuss: Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community.
Appl. Environ. Microbiol. 46 (5), S. 1038-1044 (1983)
- Schmidt, S. K. & M. Alexander: Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations.
Appl. Environ. Microbiol. 49 (4), S.822-827 (1985)
- Schmidt, S. K., S. Simkins & M. Alexander: Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth.
Appl. Environ. Microbiol. 50 (2), S.232-331 (1985)
- Schmidt, S.K.: Kinetics of mineralization of organic compounds at concentrations too low to support growth.
Ph. D. Thesis, Cornell University, N. Y. (1986)
- Schmidt, S. K., K.M. Scow & M. Alexander: Kinetics of p-Nitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: effects of second substrates.
Appl. Environ. Microbiol. 53 (11), S.2617-2623 (1987)
- Schöberl P.: Der Metabolismus von Monoethylen- bzw. Diethylenglykol durch *Corynebacterium* spec., Stamm E bzw. *Pseudomonas fluorescens*, Stamm P 201⁺.
Tenside Detergents 22 (2), S. 70-77 (1985)
- Schöberl P. & L. Huber: Ökologisch relevante Daten von nichttensidischen Inhaltsstoffen in Wasch- und Reinigungsmitteln.
Berichte des HA-Detergentien, Carl Hanser Verlag, München (1988)

- Schulz, J.R. & T.M. Keinath: Mechanismen der Entfernung organischer Stoffe bei bio-physikalischen Behandlungsverfahren.
Siedlungswasserwirtschaftliche Fachexkursion zur 12.IAWPRC-Konferenz 1894, Amsterdam, Mittelungen der Oswald-Schulze-Stiftung, München, S.737-738 (1985)
- Scow, K. M., S. Simkins & M. Alexander: Kinetics of mineralization of organic compounds at low concentrations in soil.
Appl. Environ. Microbiol. 51 (5), S. 1028-1035 (1986)
- Shiaris, M.P.: Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo[a]pyrene in surficial estuarine sediments.
Appl. Environ. Microbiol. 55 (6), S. 1391-1399 (1989)
- Shimp, R. J. & R. L. Young: Availability of organic chemicals for biodegradation in settled bottom sediments.
Ecotoxicology and Environmental Safety 15, S. 31-45 (1988)
- Siddaramappa, R., K.P. Rajaram & N. Sethunathan: Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil.
Appl. Microbiol. 26 (4), S. 846-849 (1973)
- Simkins, S. & M. Alexander: Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density.
Appl. Environ. Microbiol. 47 (6), S. 1299-1306 (1984)
- Sinclair, J.L. & M. Alexander: Effect of protozoan predation on relative abundance of fast- and slow-growing bacteria.
Can. J. Microbiol. 35, S.578-582 (1989)
- Siragusa, G.R. & R.D. DeLaune: Mineralization and sorption of p-nitrophenol in estuarine sediment.
Environ. Toxicol. and Chem.5, S. 175-178 (1986)
- Slater, J.H. & D. Lovatt; Biodegradation and the significance of microbial communities.
In: Microbial degradation of organic compounds.
Editor D.T. Gibson, Marcel Dekker, Inc., Microbiology Series Vol.13, S. 439-485 (1984)
- Spain, J.C., O. Wyss & D.T. Gibson: Enzymatic oxidation of p-nitrophenol.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, S. 634-641 (1979)
- Spain, J.C., P.H. Pritchard & A.W. Bourquin: Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment water cores from estuarine and freshwater environments.
Appl. Environ. Microbiol. 40 (4), S. 726-734 (1980)

- Spain, J. C. & P. A. Van Veld: Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure.
Appl. Environ. Microbiol. 45 (2), S. 428-435 (1983)
- Spain, J.C., P.A. Van Veld, C.A. Monti, P.H. Pritchard & C.R. Cripe: Comparison of p-Nitrophenol Biodegradation in Field and Laboratory Test Systems.
Appl. Environ. Microbiol. 48 (11), S. 944-950 (1984)
- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg & J. Ingraham: The microbial world.
Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. Y. (1976)
- Steen, W.C., D.F. Paris & G.L. Baughman: Effects of sediment sorption on microbial degradation of toxic substances.
In: Contaminants and Sediments. Editor R. A. Baker, Science Publishers, Inc., Ann Arbor, MI, Vol. 1, Ch. 23 (1980)
- Steinmann, J.: Ökologische Untersuchungen zum bakteriellen Abbau von Harnstoff und Harnsäure in Gewässern.
Dissertation, Universität, Kiel (1974)
- Studt, P., W. Kerner & T. Win: Mikrobieller Abbau wichtiger Bestandteile wassergemischter Kühlschmierstoffe.
Tribologie + Schmierungstechnik 35 (6), S. 312-314 (1988)
- Subba-Rao, R.V. & M. Alexander: Effect of sorption on mineralization of low concentrations of aromatic compounds in lake water samples.
Appl. Environ. Microbiol. 44 (3), S. 659-668 (1982)
- Subba-Rao, R.V., H.E. Rubin & M. Alexander: Kinetics and extent of mineralization of organic chemicals at trace levels in freshwater and sewage.
Appl. Environ. Microbiol. 43 (5), S. 1139-1150 (1982)
- Swindoll, C.M., C.M. Aelion & F.K. Pfaender: Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities.
Appl. Environ. Microbiol. 54 (1), S. 212-217 (1988)
- Tiedje, J.M.: Influence of environmental parameters on EDTA biodegradation in soils and sediments.
Journal Environmental Quality 6 (1), S. 21-26 (1977)
- Trautner, F., A. Reischl & O. Hutzinger: Nitrierte Phenole in Nebelwasser.
UWSF-Z. Umweltchemie Ökotoxikologie 3, S. 10-11 (1989)

- Turley, C.M., R.C. Newell & D.B. Robins: Survival strategies of two small marine ciliates and their role in regulating bacterial community structure under experimental conditions.
Marine Ecology - Progress Series 33, S.59-70 (1986)
- Ursin, C. & P. Pheiffer Madsen: Degradation rates of ¹⁴C-Benzoate and ¹⁴C-p-Nitrophenol in natural seawater *in situ* at the ppb level by means of a sensitive tracer method.
Proc. Symp. "Chemicals in the Environment", Copenhagen Oct. 1982, Editor K. Christiansen, Lyngby, S. 152-164 (1983)
- Ursin, C. & P. Pheiffer Madsen: Degradation of organic chemicals. Initial degradation rates contra prolonged exposure tests.
In: Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, Editors G. Persoone, E. Jaspers & C. Claus, State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium, Vol.2, S. 547-554 (1984)
- Vasconcelos, G.J., R.G. Swartz: Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus *in situ*.
Appl. Environ. Microbiol. 31 (6), S.913-920 (1976)
- Van Veld, P.A. & J.C. Spain: Degradation of selected xenobiotic compounds in three types of aquatic test systems.
Chemosphere 12 (9/10), S. 1291-1305 (1983)
- Wang, Y.-S., R.V. Rubin & M. Alexander: Effect of substrate concentration and organic and inorganic compounds on the occurrence and rate of mineralization and cometabolism.
Appl. Environ. Microbiol. 47 (6), S. 1195-1200 (1984)
- Wang, Y.-T., M.T. Suidan, J.T. Pfeffer & I. Najm: Effects of some alkyl phenols on methanogenic degradation of phenol.
Appl. Environ. Microbiol. 54 (5), S. 1277-1279 (1988)
- Watson, G. K. & N. Jones: The biodegradation of polyethylene glycols by sewage bacteria.
Water Research 11, S. 95-100 (1977)
- Weise, W. & G. Rheinheimer: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Bakterienbesiedlung von marinen Sandsedimenten.
Botanica Marina 22, S. 9-106 (1979)
- Wheeler, P.A.: Phytoplankton nitrogen metabolism:
In Carpenter, E.J & D.C. Capone: Nitrogen in the marine environment, Academic Press, S. 329, (1983)

- Wiggins, B. A.: Explanation for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in sewage.
Ph. D. thesis, Cornell University, N.Y. (1987)
- Wiggins, B. A., S. H. Jones & M. Alexander: Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments.
Appl. Environ. Microbiol. 53 (4), S. 791-796 (1987)
- Wiggins, B. A. & M. Alexander: Role of chemical concentration and second carbon sources in acclimation of microbial communities for biodegradation.
Appl. Environ. Microbiol. 54 (11), S. 2803-2807 (1988a)
- Wiggins, B. A. & M. Alexander: Role of protozoa in microbial acclimation for mineralization of organic chemicals in sewage.
Can. J. Microbiol. 34, S. 661-666 (1988b)
- Wilson, J.T., J.F. McNabb, J.W. Cochran, T.H. Wang, M.B. Tomson & P.B. Bedient: Symposium: Biodegradation of chemicals in the subsurface environment. Influence of microbial adaptation on the fate of organic pollutants in ground water.
Environmental Toxicology and Chemistry 4, S.721-726 (1985)
- Wszolek, P. C. & M. Alexander: Effect of desorption rate on the biodegradation of n-alkylamines bound to clay.
J. Agric. Food Chem. 27 (2), S. 410-414 (1979)
- Wyndham, R.C.: Evolved aniline catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus* during continuous culture of river water.
Appl. Environ. Microbiol. 51 (4), S.781-789 (1986)
- Zaidi, B.R., G. Stucki & M. Alexander: Low chemical concentration and pH as factors limiting the success of inoculation to enhance biodegradation.
Environmental Toxicology and Chemistry 7, S.143-151 (1988)
- Zarth, M. O.F., R.G. Smith, E.D. Schroeder & M.W. Ostrowski: Removal of toxic organics by overland flow.
Vom Wasser 63, S. 281-297 (1984)
- Zehnder, A.J.B. & G. Schraa: Biologischer Abbau xenobiotischer Verbindungen bei niedrigen Konzentrationen und das Problem der Restkonzentration.
GWF Wasser, Abwasser 129 (5), S. 369-373 (1988)
- Zeyer J. & P.C. Kearney: Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by a *Pseudomonas putida*.
J. Agric. Food Chem. 32, S. 238-242 (1984)

- Zeyer, J., H. P. Kocher & K. N. Timmis: Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. Appl. Environ. Microbiol. 52 (8), S. 334-339 (1986)
- Zeyer, J.: Abbau aromatischer Nitroverbindungen. 5. Dechema-Fachgespräch Umweltschutz, Biologischer Abbau "persistenter" Substanzen?, 29./30.4. 1987 Vortrag 5 (1987)
- Zeyer, J.: Abbau aromatischer Nitroverbindungen. GWF - Wasser/Abwasser (Biotechnologie), S. 25 -27 (1988)
- Zimmermann, R.: Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy. In "Microbial ecology of a brackish water environment", Editor G.Rheinheimer, Springer Verlag, Heidelberg, Ecological Studies 25, S.103-120 (1977)
- Zimmermann, R. & Meyer-Reil, L.-A.: A new method of fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. Kiel. Meeresforsch. 30, S. 24-27 (1974)
- ZoBell, C.E. & D.Q. Anderson: Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored seawater and the influence of oxygen tension and solid surfaces. Biol. Bull. mar. biol. Lab.71, S. 324-342 (1936)