



1. Einleitung und Aufgabenstellung

Polyaminopolycarbonsäuren (PAPC) wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Diethyltri-aminpentaacetat (DTPA) und Propylendiamintetraacetat (PDTA) können mit vielen verschiedenen Metallionen stabile wasserlösliche Komplexe bilden. Diese Komplexbildnerfähigkeit wird für viele technische Prozesse genutzt. Da EDTA, der mengenmäßig bedeutendste dieser Komplexbildner, als ökotoxikologisch kritisch eingestuft wurde und aufgrund einer Selbstverpflichtung der Industrie (Bundesministerium für Umwelt, 1991) die entsprechenden Einträge in die aquatische Umwelt reduziert werden sollten, werden häufig als Ersatz andere PAPC mit stark komplexierenden Eigenschaften eingesetzt, beispielsweise PDTA und DTPA (Schmidt et al., 2004).

Den Hauptanwendungsbereich von PDTA stellen Bleichprozesse in der Photoindustrie dar, wobei das auf dem belichteten Film enthaltene metallische Silber durch Eisen(III)-PDTA bzw. -EDTA zu Silber(I)-Ionen oxidiert wird. Die entsprechenden Abwässer aus dem Einsatz von PDTA stellen in ökotoxikologischer Hinsicht ein Problem dar, da es sich bei diesen Komplexbildnern um schwer abbaubare Verbindungen handelt, die weder durch konventionelle biologische noch durch physikalisch-chemische Methoden der Abwasserreinigung hinreichend eliminiert werden können (Nörtemann, 1999; Schmidt et al., 2003). PDTA ist in der aquatischen Umwelt bereits in Konzentrationen im $\mu\text{g/L}$ -Bereich nachweisbar (Knepper, 2002; Soßdorf et al., 2001, Schmidt et al. 2004). Da es mittlerweile verstärkt als Ersatzstoff für EDTA eingesetzt wird, ist somit in Zukunft eine stärkere Belastung der Gewässer mit diesem Komplexbildner zu erwarten.

Um die Belastung der aquatischen Umwelt durch diese Chelatbildner zu minimieren, gibt es die Möglichkeit der Substitution von PDTA durch biologisch leicht abbaubare Ersatzstoffe oder einer gezielten Behandlung der belasteten Abwasserteilströme. Mögliche Substituenten wären Komplexbildner wie zum Beispiel Ethylendiamindisuccinat (S,S-EDDS), Alanindiacetat (β -ADA) oder Methylglycindiacetat (MGDA). Für viele industrielle Anwendungsgebiete ist jedoch ein Ersatz der herkömmlichen Polyaminopolycarbonsäuren aus ökonomischen oder technischen Gründen nicht möglich (Giles, 2007; Knepper, 2001).

Da PDTA ebenso wie EDTA punktuell in definierten industriellen Bereichen eingesetzt wird, stellt die biologische Reinigung der entsprechenden Abwasserteilströme eine effiziente und kostengünstige Möglichkeit zur Reduzierung der Gewässerbelastung dar (Otto, 2003). Eine physikalisch-chemische Behandlung der Abwässer ist beispielsweise mit UV-Strahlung, Ozon oder Wasserstoffperoxid, bzw. mit einer Kombination der drei Verfahren möglich. Allerdings



kann es aufgrund der geringen Selektivität dieser Methoden zu einem hohen Verbrauch an Agentien durch die Nebenreaktionen mit anderen Abwasserinhaltsstoffen kommen, wodurch sich die Kosten für diese Verfahren merklich erhöhen. Eine wesentlich selektivere und kostengünstigere Methode ist die biologische Reinigung belasteter Abwasserteilströme mit speziell angereicherten und adaptierten Mikroorganismen, die PDTA bzw. EDTA auch unter den gegebenen Praxisbedingungen vollständig abbauen können.

Aus einer von Nörtemann et al. 1991 angereicherten Mischkultur konnte mit dem Stamm BNC1 (DSM 6780) erstmals ein Organismus isoliert werden, der die Fähigkeit zur vollständigen Mineralisierung von EDTA besitzt. Eine erneute Populationsanalyse der in den Jahren von 1992 - 1996 weiter an den Abbau von EDTA adaptierten Mischkultur MKA durch Noll (1996) führte zur Beschreibung von mehreren phänotypisch und morphologisch ähnlichen Bakterienstämmen, die alle derselben Art anzugehören schienen. Das Isolat ANP11 wurde mit 70-90 % Populationsanteil als dominanter EDTA-Primärverwerter identifiziert.

Von Baaß (2004) konnten die Reinkultur ANP11 und auch die über Jahre an den Abbau von EDTA adaptierte Mischkultur MKA erfolgreich für den Abbau von PDTA als alleiniger Kohlenstoffquelle eingesetzt werden. Auch ein Umsatz von EDTA und PDTA als Mischsubstrat in einer industriell relevanten Konzentration durch die Rein- und die Mischkultur war möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Bedingungen für den Abbau von PDTA durch den Stamm ANP11 und die Mischkultur MKA optimiert, reaktionstechnisch wichtige Parameter ermittelt und der Einfluss begleitender Abwasserinhaltsstoffe sowie das Verhalten der Mikroorganismen bei möglichen Störungen im praktischen Einsatz untersucht werden. Abschließend sollte der von Baaß (2004) postulierte Abbauweg von PDTA durch den Stamm ANP11 durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit waren taxonomische Untersuchungen der am Institut für Verfahrenstechnik der TU-Braunschweig isolierten PAPC-abbauenden Mikroorganismen, insbesondere des inzwischen von zahlreichen Arbeitsgruppen untersuchten und in der internationalen Literatur vielfach beschriebenen bzw. zitierten Stammes BNC1. Da das Interesse an diesem Stamm u.a. als potentieller Pflanzensymbiont sowie als biotechnologisch interessantes Isolat international sehr hoch ist und sein Genom inzwischen auch vom DOE (Department of Energy) Joint Genome Institute vollständig sequenziert wurde (Taxon Object ID 400550000), war es sinnvoll, primär diesen Stamm umfassend taxonomisch zu untersuchen und ihn mit bereits beschriebenen und genetisch ähnlichen Arten zu vergleichen.



1. Einleitung und Aufgabenstellung

Unter dem Aspekt der praktischen Anwendung wurde dagegen der an den Abbau von PDTA besser adaptierte Stamm ANP11 bzw. die diesen Stamm enthaltende Mischkultur MKA verwendet.



2. Theoretische Grundlagen

2.1 Polyaminopolycarbonsäuren

Polyaminopolycarbonsäuren (PAPC, s. Abb. 2.1) wie zum Beispiel Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Diethylentriaminpentaacetat (DTPA), 1,3-Propylendiamintetraacetat (PDTA) oder Nitrilotriacetat (NTA) bilden mit den meisten zwei- und dreiwertigen Metallionen stabile, wasserlösliche Komplexe. Sie werden auch als Komplex- oder Chelatbildner (von griech. Chele = Krebschere) bezeichnet, da sie das Zentralatom mit einer oder mehreren Seitenketten scherenartig umschließen.

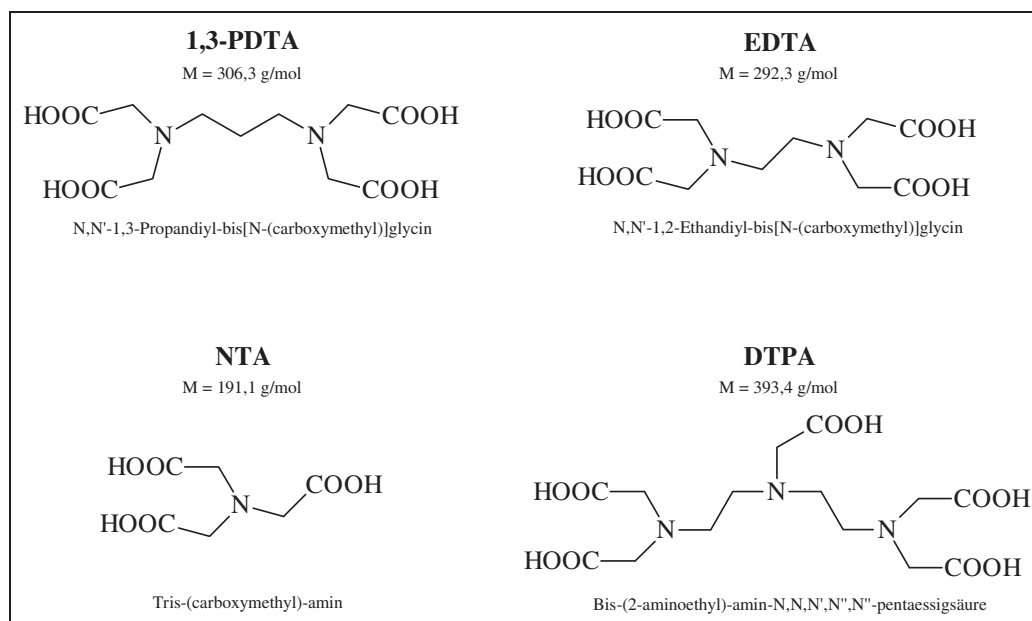


Abb. 2.1: Strukturen der bekanntesten Polyaminopolycarbonsäuren

Durch die Komplexierung werden die Eigenschaften des Zentralatoms maskiert, wodurch beispielsweise unlösliche Metallsalze in Lösung gehalten oder gelöste Metallionen daran gehindert werden, als Katalysator für unerwünschte Reaktionen zu fungieren. Diese Eigenschaft macht man sich in weiten Bereichen der Industrie zu Nutze, wie zum Beispiel in der Anwendung von Waschmitteln, bei der Metallgewinnung sowie in der Papier-, Textil- und Photoindustrie (Nörtemann, 2005). Die Stabilität der Chelate ist unter anderem abhängig vom gebundenen Metallion und steigt mit der Anzahl der Bindungen zwischen Metallion und Ligand, der so genannten Zähigkeit (Demuth und Kober, 1992). Dabei wird die Stabilitätskonstante K eines Komplexes wie folgt definiert:

$$K = \frac{c_{MeL}}{c_{Me} \cdot c_L}$$

Me: Metall; L: Ligand; MeL: Komplex; c: Konzentration



Da Komplexbildungsreaktionen im Allgemeinen in wässriger Phase ablaufen, wird das dynamische Gleichgewicht nicht nur durch Temperatur, Druck und die Konzentration der Komponenten, sondern auch durch die Ionenstärke der Lösung beeinflusst. Um eine Vergleichbarkeit der Komplexbildungskonstanten zu gewährleisten, sind standardisierte Bedingungen unbedingt erforderlich (Schwarzenbach und Flaschka, 1965; West, 1969).

Die logarithmischen Komplexbildungskonstanten von einigen relevanten Metall-PAPC-Komplexen sind in Tab. 2.1 zusammengestellt. Bei den PAPC-Komplexen mit hohen Werten für $\log K_{MePAPC}$ handelt es sich um sehr stabile Komplexe mit starken, exergonischen Komplexbildungsreaktionen. Für viele industrielle Anwendungen, wie zum Beispiel in der Papier- und Zellstoffindustrie (DTPA) oder der Photoindustrie (EDTA, PDTA) sind stabile Komplexverbindungen nötig (Völkel et al., 1995; Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, 2005).

Tabelle 2.1: Logarithmen der Komplexbildungskonstanten ($\log K_{MePAPC}$) verschiedener PAPC-Komplexe in wässriger Phase (20 °C, 0,1 M KCl) (Könen, 1997; Ullmann, 1987; Technische Information der BASF-AG, TI/EVD 1065d, 2006)

Metallion	EDTA	PDTA	DTPA	NTA
Mg^{2+}	8,8	6,0	9,3	5,5
Ca^{2+}	10,6	7,1	10,8	6,4
Fe^{3+}	25,1	21,4	28,0	15,9
Zn^{2+}	16,4	15,2	18,4	10,7
Mn^{2+}	13,8	10,0	15,6	7,5
Cu^{2+}	18,8	18,9	21,5	12,9

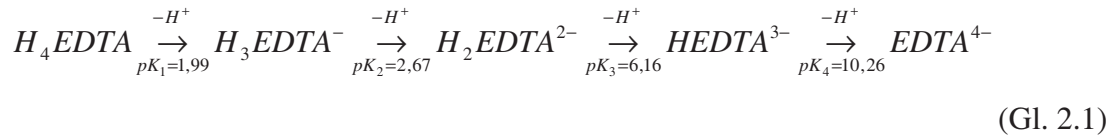
Während die einfach aufgebaute Aminopolycarbonsäure NTA Komplexe von vergleichsweise geringer Stabilität bildet, welche biologisch leicht abgebaut werden können, werden die wesentlich stabileren Metallkomplexe der Komplexbildner EDTA, PDTA und DTPA im Rahmen einer herkömmlichen biologischen oder physikalischen Abwasserbehandlung nicht mineralisiert (Lahl et al., 1988; Alder et al., 1990).

2.1.1 Eigenschaften von PDTA und EDTA

EDTA ist die bekannteste der Aminopolycarbonsäuren. Es wurde in den dreißiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts erstmals durch Munz (I.G. Farbenindustrie, DT-Pat. 718981 (1935)) in den Laboratorien der I.G. Farbenindustrie durch die Umsetzung von Ethylendiamin mit Monochloressigsäure in Gegenwart von Soda synthetisiert. EDTA ist ein mehrzähliger



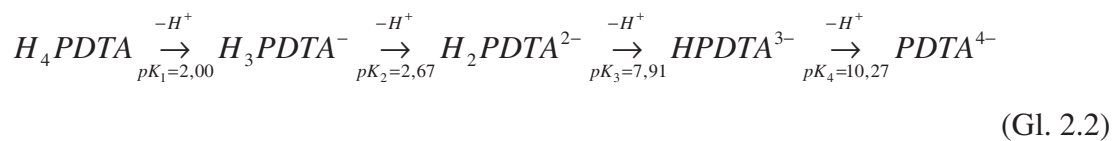
Ligand. Das zentrale Metallatom des Komplexes wird koordinativ über die Stickstoff- und Sauerstoffatome gebunden, wobei sich maximal fünf fünfgliedrige Ringe und somit thermodynamisch stabile Chelate ausbilden. EDTA ist als neutrale Säure vierprotonig und kann gemäß folgendem Schema in vier Stufen dissoziieren (Könen, I., 1997; West, T. S., 1969):



EDTA gilt für den Menschen als toxikologisch unbedenklich, da im Tierversuch weder chronisch toxische, noch karzinogene, mutagene oder allergische Effekte nachgewiesen werden konnten (Whittaker et al., 1993). Es ist nur in geringem Maße fischtoxisch, eine Bioakkumulation in aquatischen oder terrestrischen Tieren ist nicht bekannt. (Dietrich et al., 1999; Schmidt und Brauch, 2003).

Auch PDTA ist ein mehrzähliger Ligand, der sechs koordinative Bindungsstellen aufweist, eine pro Stickstoffatom und je eine an jeder Acetylgruppe. PDTA kann in einer Komplexverbindung vier Fünfringe und einen Sechsring ausbilden. Diese Kombination aus Fünfringen und Sechsring ist energetisch ungünstiger als beim EDTA und resultiert aus der im Vergleich zum EDTA zusätzlichen Methylengruppe. Das erklärt die im Vergleich geringeren Komplexbildungskonstanten von PDTA (s. Tab. 2.1).

PDTA ist als neutrale Säure vierprotonig und kann wie EDTA in vier Stufen dissoziieren (Könen, I., 1997; West, T. S., 1969):



2.1.2 Einsatz von EDTA und PDTA in der Photoindustrie

EDTA wird bereits seit langem in großen Mengen in der Photoindustrie eingesetzt. Nach dem Entwickeln der Farbnegativfilme folgt der Bleichschritt, in dem das reduzierte elementare Silber durch Oxidation in Silberhalogenid übergeführt wird. Beim anschließenden Fixieren werden die Silbersalze mit Hilfe von Natriumthiosulfat als wasserlöslicher Komplex entfernt, zurück bleibt das Farbnegativ. Wird nun das Negativ als Maske vor ein neues Photopapier gelegt und belichtet, erhält man nach einem Entwicklungsprozess das wirklichkeitsgetreue Farbpositiv. Als Oxidationskomponente des Bleichschritts wird häufig ein $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NH}_4\text{-EDTA}$ -



Komplex eingesetzt. Er ist dabei die wichtigste Bleichsubstanz und liegt in Bleichfixierbädern in Konzentrationen von 45 g/l vor. In Spülwässern befinden sich ca. 0,5 g/l EDTA. EDTA hat dabei die Aufgabe, das in relativ hoher Konzentration benötigte Oxidationsmittel Fe^{III} in Lösung zu halten und die Ausflockung von Fe^{III} -Hydroxid zu verhindern (Baumann, 1994; Anchell und Troop, 1998). Im Jahr 2003 wurden in der Photoindustrie in Europa 2966 t (gereinigte 100% Säure) EDTA eingesetzt (CEFIC, 2004).

Als Alternative zu EDTA wird in den Bleichfixierbädern 1,3-PDTA eingesetzt. PDTA wird nahezu ausschließlich in der Photoindustrie verwendet (Schmidt und Brauch, 2003). Dort wird es ebenso wie EDTA eingesetzt, um das für die Bleichung benötigte Oxidationsmittel Fe^{III} in Lösung zu halten, indem es eine Ausfällung von Fe^{III} -Hydroxid verhindert. PDTA- Fe^{III} -Komplexe haben eine größere Bleichwirkung als die entsprechenden EDTA-Komplexe. Aufgrund dessen konnte die benötigte Komplexbildnermenge auf 35 % des EDTA-Niveaus gesenkt werden (Könen, 1997; Bucheli-Witschel et al., 2001; Schmidt und Brauch, 2003).

2.1.3 Umweltrelevanz von EDTA und PDTA

Gemäß den standardisierten Abbautests nach OECD sind EDTA und PDTA weder als leicht noch als potentiell biologisch abbaubar einzustufen (OECD, 1981; Siegrist et al., 1988; Koch, 1993). Die durch geringe biologische Abbaubarkeit und die daraus resultierende unzureichende Elimination in konventionellen Kläranlagen bedingte Akkumulation in der Umwelt, speziell im Wasser und Trinkwasser, ist als ökotoxikologisch kritisch zu bewerten. Die ökologischen Folgen einer Anreicherung sind nicht abzuschätzen und daher als problematisch zu beurteilen (Bucheli-Witschel et al., 2001). Generell gilt der Grundsatz, das naturfremde Stoffe, insbesondere biologisch schwer abbaubare oder gesundheitlich bedenkliche, nicht in die Gewässer eingeleitet werden sollen. Aus Vorsorgegründen gilt dies für alle naturfremden Stoffe und nicht nur für Stoffe, deren toxikologische Relevanz bereits nachgewiesen wurde (Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, 2003).

Ein weiteres Problem ist die theoretische Möglichkeit, dass beim (Teil-)Abbau von EDTA oder PDTA Metabolite mit unbekannter Ökotoxizität entstehen können. Ebenso kritisch zu betrachten ist der Einfluss der Chelatbildner auf die Belastung der Gewässer und Gewässersedimente mit Schwermetallen. Zum einen werden Schwermetalle durch PAPC maskiert und gelangen so ungehindert in den Vorfluter. Weiterhin besteht die Gefahr von Gewässereutrophierungen, da durch die Chelatbildner für Algen wichtige Spurenelemente in Lösung gehalten werden und somit ständig zur Verfügung stehen. Von Lorenz (1997) wird