

**Aus dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde**

**Martin Wolter  
Frantisek Zadrazil  
Joachim Haselbach**

**Carsten in der Wiesche  
Sigrid Hey  
Ewald Schnug**

**Biologische Abbaubarkeit synthetischer  
superabsorbierender Bodenhilfsstoffe**

Manuskript, zu finden in [www.fal.de](http://www.fal.de)

Published in: Landbauforschung Völkenrode 52(2002)1,  
pp. 43-52

**Braunschweig  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)  
2002**

## Biologische Abbaubarkeit synthetischer superabsorbierender Bodenhilfsstoffe

Martin Wolter<sup>1</sup>, Carsten in der Wiesche<sup>1</sup>, Frantisek Zadrazil<sup>1</sup>, Sigrid Hey<sup>2</sup>, Joachim Haselbach<sup>2</sup>, Ewald Schnug<sup>1</sup>

### Zusammenfassung

Kreuzvernetzte Copolymerisate von Acrylamid und Acrylsäure können bis zum 250fachen ihres Gewichts an Wasser reversibel absorbieren. Dem Boden zugegeben können sie die Wasserversorgung der Pflanzen verbessern, indem sie die Wasserspeicherfähigkeit des Bodens erhöhen. Im Hinblick auf den möglichen Einsatz dieser Polymere als Bodenhilfsstoff in der Landwirtschaft muß sichergestellt sein, dass sie im Boden mittelfristig einem Abbau unterliegen, der eine Akkumulation in der Umwelt ausschließt. In der vorliegenden Studie wurde der biologische Abbau eines <sup>14</sup>C-markierten Acrylamid/Acrylsäure-Copolymers in einem Ackerboden durch zwei Weißfäulepilze (*Pleurotus ostreatus*, *Dichomitus squalens*), einen Braunfäulepilz (*Flammulina velutipes*) und einen saprophytisch im Boden wachsenden Pilz (*Agaricus bitorquis*) in Mikrokosmen untersucht. Die höchste Mineralisierung des <sup>14</sup>C-Copolymers zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wurde nach Inokulation des Bodens mit *P. ostreatus* gemessen (8,8 % der Ausgangsradioaktivität innerhalb von 22 Wochen). Als einziger der untersuchten Pilze produzierte *P. ostreatus* ligninolytische Exoenzyme, Laccasen und Manganperoxidasen, in der Mischung aus Boden und Acrylamid/Acrylsäure-Copolymer. Deutlich höher als im Boden war die Mineralisierung des <sup>14</sup>C-Copolymers in Reinkultur von *P. ostreatus* auf Weizenstroh (31 % innerhalb von 28 Wochen). Zudem wurde der Anteil löslicher Bestandteile an dem <sup>14</sup>C-Copolymer durch *P. ostreatus* signifikant gesteigert. Durch die originäre Bodenmikroflora allein, also ohne Zusatz von Pilzsubstrat, wurden innerhalb von 22 Wochen bis zu 2,2 % des <sup>14</sup>C-Copolymers mineralisiert. Unter Berücksichtigung der optimierten Inkubationsbedingungen dürfte die ermittelte Abbaurate jedoch höher sein, als unter natürlichen Bedingungen zu erwarten ist.

**Schlüsselwörter:** Acrylamid/Acrylsäure-Copolymere, Polyacrylamide, Superabsorber, Bodenhilfsstoffe, biologischer Abbau, Bodenmikroorganismen, Weißfäulepilze

### Abstract

#### Biological degradability of syntetic superabsorbent soil conditioners

Cross linked acrylamide and acrylic acid copolymers can reversibly absorb up to 250 times of their weight in water. When they are applied to soil, they can improve the water supply to plants by increasing the water storage capacity of the soil. In a consideration of the possible use of these polymers as soil conditioners in agriculture, it must first be established that, over the mid-term, they are degraded in the soil in order to prevent accumulation in the environment. In this work, the biological degradation of a <sup>14</sup>C-labeled acrylamide/acrylic acid copolymer in an agricultural soil by two white rot fungi (*Pleurotus ostreatus*, *Dichomitus squalens*), a brown rot fungus (*Flammulina velutipes*) and a saprophytic soil fungus (*Agaricus bitorquis*) was studied in microcosms. The highest mineralisation of the <sup>14</sup>C-copolymer to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was measured following the inoculation of the soil with *P. ostreatus* (8.8 % of the initial radioactivity within 22 weeks). *P. ostreatus* was the only fungus studied which produced ligninolytic exoenzymes, laccases and manganese peroxidases, in the mixture of soil and acrylamide/acrylic acid copolymer. The mineralisation of the <sup>14</sup>C-copolymer in a pure culture of *P. ostreatus* on wheat straw was significantly higher (31 % within 28 weeks) than in soil. Besides mineralisation, *P. ostreatus* significantly increased the portion of soluble components of the <sup>14</sup>C-copolymer. Without the addition of fungal substrate, up to 2.2 % of the <sup>14</sup>C-copolymer was mineralised within 22 weeks by only the indigenous soil microflora. Considering optimized incubation conditions in laboratory scale, the degradation rate is expected to be lower in natural conditions.

**Keywords:** acrylamide/acrylic acid copolymers, polyacrylamide, super absorber, soil conditioner, biodegradation, soil microorganisms, white rot fungi

<sup>1</sup> Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig

<sup>2</sup> Stockhausen GmbH & Co. KG, Bäckerpfad 25, 47805 Krefeld

## 1 Einleitung

Durch die Polymerisation von Acrylamid und Acrylsäure und die Verknüpfung der kettenförmigen Moleküle zu einem dreidimensionalen Netzwerk entstehen unlösliche, aber quellfähige Polymere (Buchholz und Graham 1998). Als Bodenhilfsstoffe können kreuzvernetzte Acrylamid/Acrylsäure-Copolymere (AAC) aufgrund ihres Wasserspeichervermögens die Wasserkapazität von Böden dauerhaft erhöhen. Der Einsatz solcher Bodenhilfsstoffe verbessert die Wachstumsbedingungen für Pflanzen insbesondere während trockener Perioden und verringert den Nährstoffaustrag ins Grundwasser (Hüttermann et al. 1999). Dabei bleibt das Wasseraufnahmevermögen auch nach wiederholter Austrocknung über mehrere Jahre erhalten. Mögliche Anwendungsgebiete sind z. B. der Landschaftsbau und die Forstwirtschaft, die Erstellung von Straßenbegleitgrün und Lärmschutzwänden sowie die Rekultivierung von Halden und Deponien (Wegener und Wegener 2000). Hierbei handelt es sich im wesentlichen um eine einmalige Ausbringung von AAC auf definierten und begrenzten Flächen. Bei wiederholter und großflächiger Einbringung dieser Bodenhilfsstoffe in den Boden, wie es bei dem Einsatz als Bodenhilfsstoff in der Landwirtschaft zu erwarten wäre, ist die Frage der biologischen Abbaubarkeit dieser synthetischen Polymere im Hinblick auf eine mögliche Akkumulation in der Umwelt von Bedeutung.

Polyacrylamide (PAM), die als Homo- oder Copolymer aus Acrylamid und anderen Comonomeren hergestellt werden, sind hinsichtlich ihres Aufbaus den Superabsorbentern verwandt, im Gegensatz zu diesen jedoch nicht vernetzt und somit wasserlöslich. Bezüglich des Einsatzes von PAM als Bodenhilfsstoff bestehen langjährige Erfahrungen. Insbesondere anionische PAM mit hohem Molekulargewicht werden in trockenen und mediterranen Klimaten auf bewässerten Flächen eingesetzt. Dabei wird das Polymer zumeist direkt dem Wasser zugesetzt (Barvenik 1994, Green et al. 2000). Im Boden tritt das PAM aufgrund seines anionischen Charakters in komplexe elektrostatische Wechselwirkungen mit den Bodenaggregaten (Kay-Shoemake et al. 1998a). Über Kationen-Brücken interagiert das Polymer insbesondere mit der Tonfraktion des Bodens (Green et al. 2000, Seybold 1994). Das führt zu einer Stabilisierung der Bodenstruktur, die der Bildung von Krusten an der Bodenoberfläche entgegenwirkt und die Infiltration erhöht (Barvenik 1994, Kay-Shoemake et al. 2000).

Der Einsatz von PAM als Bodenhilfsstoff wird als nicht umweltgefährdend angesehen, wenn der unvermeidliche Anteil des Monomers Acrylamid in dem Produkt gering ist (Seybold 1994). Bei der Synthese von PAM und AAC verbleibt ein Acrylamid-Restgehalt in dem Produkt, dessen Anteil typischerweise unter 0,1 % liegt (Weindel und Sontheimer 1971). Während PAM selber nicht toxisch ist

und biologische Membranen nicht überwindet, wirkt Acrylamid neurotoxisch und potentiell karzinogen auf Mensch und Tier (Barvenik 1994, Seybold 1994, Smith und Oehme 1991). Acrylamid ist biologisch abbaubar und akkumuliert nicht in Böden, kann wegen der hohen Wasserlöslichkeit jedoch ins Grundwasser gelangen (Seybold 1994). Im Boden wird Acrylamid bei Temperaturen über 20 °C innerhalb einiger Tage abgebaut (Barvenik 1994).

Über die mikrobielle Transformation von PAM und dessen Einfluss auf die mikrobielle Ökologie landwirtschaftlicher Böden ist bisher nur wenig bekannt (Kay-Shoemake et al. 1998b). Einmal dem Boden zugegeben bindet PAM irreversibel, so dass direkte Abbaustudien nur mit Hilfe von isotopenmarkiertem PAM möglich sind (Kay-Shoemake et al. 1998a).

Im Unterschied zu seinen monomeren Bestandteilen, Acrylamid und Acrylsäure, kann PAM bakteriellen Anreicherungskulturen zwar als Stickstoffquelle, nicht jedoch als alleinige Kohlenstoffquelle dienen (Kay-Shoemake et al. 1998a). Die C-N-Bindung der Amidgruppe wird durch Amidasen unter Freisetzung von NH<sub>3</sub> hydrolysiert (Kay-Shoemake et al. 1998b). In PAM-behandelten Böden wurde eine höhere PAM-spezifische Amidase-Aktivität gefunden (Kay-Shoemake et al. 1998b). Einige PAM-behandelte landwirtschaftliche Böden weisen höhere Keimzahlen und anorganische N-Konzentrationen auf als unbehandelte Böden, möglicherweise als Ergebnis der Freisetzung von N aus PAM (Kay-Shoemake et al. 1998a). Die Untersuchungen deuten daraufhin, dass PAM von Bodenmikroorganismen als Stickstoffquelle genutzt werden kann und den anorganischen Stickstoffpool des Bodens beeinflusst.

Durch die hydrolytische Desaminierung durch Mikroorganismen wird PAM in Polyacrylat umgewandelt (Chang et al. 2001, Kay-Shoemake et al. 1998a). Übertragen auf AAC lassen die an PAM erzielten Ergebnisse vermuten, dass das Kohlenstoffskelett im Anschluss an eine wahrscheinlich zunächst erfolgende Desaminierung weitgehend erhalten bleibt und möglicherweise später durch physikalische oder biologische Mechanismen weiter abgebaut und/oder in die organische Bodensubstanz eingebunden wird.

Im Hinblick auf den biologischen Abbau von AAC stellt sich zunächst die Frage nach Organismen, die derartige Polymere enzymatisch angreifen können. Als besonders potent hinsichtlich des Abbaus zahlreicher als persistent geltender Xenobiotika haben sich Weißfäulepilze erwiesen. Sie sind die einzigen Organismen, die in der Natur den polymeren Holzbestandteil Lignin innerhalb relativ kurzer Zeit weitgehend abbauen können (Zadrazil 1985, Haider 1986, Boyle et al. 1992). Dies geschieht mit Hilfe eines Systems von Exoenzymen, mit Peroxidasen oder Laccasen als wesentlichem Bestandteil (Buswell 1991, Evans et al. 1994, Leonowicz et al. 1999). Aufgrund ihrer geringen Selektivität transformieren diese Enzyme neben

Lignin eine Vielzahl von Xenobiotika (Bumpus et al. 1985, Wolter et al. 1997, Martens et al. 1996). Eine Reihe von Weißfäulepilzen ist in der Lage, außer auf ihrem eigentlichen Substrat (Holz, Stroh etc.) auch im Boden zu wachsen (Martens et al. 1999). Insofern kommen diese Organismen auch für den möglichen Abbau von AAC in Betracht, das als Bodenverbesserer in der Landwirtschaft eingesetzt wird.

Bisher bekannte Untersuchungen zum Abbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem AAC durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* zeigen, dass der Pilz in Flüssigkultur die dreidimensionale vernetzte Struktur des Copolymers depolymerisieren kann (Sutherland et al. 1997). Im Boden konnte innerhalb von ca. drei Monaten eine bis zu 8 %ige Mineralisierung des Copolymers mit *P. chrysosporium* erzielt werden (Stahl et al. 2000). Unseres Wissens nach ist *P. chrysosporium* bisher der einzige Organismus, dessen Fähigkeit zum Abbau von AAC beschrieben wurde. Die in dieser Studie vorgestellten Versuche sollten daher klären, in welchem Ausmaß ein AAC durch Pilze verschiedener physiologischer Gruppen unter optimierten Wachstumsbedingungen abgebaut werden kann. Gleichzeitig wurde in einem Ackerboden die Fähigkeit dieser Pilze und der natürlichen Bodenmikroflora zum Abbau des Copolymers unter praxisnahen Bedingungen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Charakterisierung des $^{14}\text{C}$ -Copolymers

Als Modellsubstanz wurde ein von der Firma Stockhausen (Krefeld) hergestelltes 2,3- $^{14}\text{C}$ -Acrylamid/Acrylsäure-Copolymer ( $^{14}\text{C}$ -AAC) (74 MBq/g) eingesetzt, das dem von der Firma Stockhausen unter dem Namen Stockosorb® vertriebenen AAC weitgehend entspricht.

Das kommerzielle Produkt ist weitgehend wasserunlöslich (wasserlöslicher Anteil: 6 %). Um den wasserlöslichen radioaktiven Anteil von  $^{14}\text{C}$ -AAC zu bestimmen, wurde ein 382 µg Aliquot mit 4 ml bidestilliertem Wasser versetzt. Der Überstand wurde zunächst nach 2 h und dann stündlich mit einer Spritzenkanüle mit stumpfer Spitze abgenommen und durch erneute Zugabe von 4 ml bidestilliertem Wasser ersetzt. Die im Überstand enthaltene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 14 ml Szintillator (Rotiszint eco Plus, Roth, Karlsruhe) im Flüssigszintillationszähler (Wallac 1409, Berthold, Bad Wildbad) bestimmt. Der Anteil der Moleküle mit einem Molekulargewicht von unter 3000 Dalton wurde nach Ultrafiltration mit einem Membranfilter entsprechender Ausschlussgrenze (Amicon, Beverly, MA, USA) bestimmt.

Um den in Natronlauge löslichen Anteil von  $^{14}\text{C}$ -AAC zu bestimmen, wurde ein 367 µg Aliquot mit 4 ml 0,1 M Natronlauge versetzt. Nach 2, 3 und 20 h wurde die Lauge ausgetauscht und auf  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität untersucht.

### 2.2 Versuchsboden

Der verwendete Boden wurde dem A-Horizont einer Parabraunerde auf dem Gelände der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig entnommen. Die Eigenschaften des Versuchsbodens sind in Tab.1 aufgeführt. Der Boden wurde auf 2 mm gesiebt und anschließend bei 4 °C gelagert. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurde bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 1  
Chemisch-physikalische Charakterisierung des Versuchsbodens

Parameter	Gehalt
Textur	Sand 45 %
	Schluff 47 %
	Ton 8 %
maximale Wasserhaltekapazität	26,7 %
pH	6,1
Gesamtstickstoff	1,4 mg g <sup>-1</sup>
Gesamtkohlenstoff	18,6 mg g <sup>-1</sup>
CAL-Phosphor	142 mg kg <sup>-1</sup>
CAL-Kalium	227 mg kg <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> -Magnesium	124 mg kg <sup>-1</sup>

### 2.3 Pilzstämme

Die Stämme *Pleurotus ostreatus* (DSMZ 11191), *Flammulina velutipes*, *Dichomitus squalens* (DSMZ 9615) und *Agaricus bitorquis* wurden auf ihre Fähigkeit zum Abbau von  $^{14}\text{C}$ -AAC in Reinkultur bzw. im Boden getestet. Zusätzlich wurden die Stämme *Agrocybe aegerita*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus sajor-caju* auf ihre Fähigkeit zum Wachstum in einer Boden-AAC-Mischung getestet. Alle Stämme stammten aus der Sammlung des Institutes für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL (Dr. Zadrazil).

Während es sich bei *P. ostreatus* und *D. squalens* um Weißfäulepilze handelt, gehört *F. velutipes* zu den Braunfäulepilzen, die ebenfalls Holz zersetzen, aber bevorzugt die Cellulosebestandteile abbauen. Im Unterschied zu diesen vorwiegend auf Holz vorkommenden Pilzen wächst *A. bitorquis* saprophytisch im Boden. In den Versuchen wurde er auf Champignonsubstrat kultiviert, wie es in der kommerziellen Champignon-Produktion verwendet wird. Zur Herstellung von Impfmateriale für die Versuche wurden die Pilze auf Malzextrakt-Agarplatten (14 g l<sup>-1</sup> Malzin, 15 g l<sup>-1</sup> Agar) bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Das in den Abbaustudien eingesetzte Substrat (Strohmehl bzw. Champignonsubstrat) wurde mit zwei Agarzylindern pro Reaktorgefäß inokuliert, die mit einem sterilen Korkbohrer aus den 7 bis 14 Tage alten Agarplatten ausgestochen wurden.

## 2.4 Aufbau der Modellversuche

Als Inkubationsgefäße dienten Röhrenreaktoren (Länge: 230 mm, Innendurchmesser: 27 mm) oder Flaschenreaktoren (250-ml-Gewindeflaschen). Die Reaktoren wurden an einen Belüftungsrechen angeschlossen und bei einer Durchflussrate von 3 bis 6 ml min<sup>-1</sup> mit CO<sub>2</sub>-freier Luft (vorgeschaltete CO<sub>2</sub>-Falle mit Natronkalk) durchspült. Aus den Reaktorgefäßen gelangte die Luft durch Teflonkapillaren zunächst in leere Reagenzgläser, die als Rücklauffalle dienten. Anschließend wurde die Luft durch Reagenzgläser mit 25 ml 2 N Natronlauge geleitet, wo das entstandene <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> absorbiert wurde. Die Durchflussraten wurden mit Spritzenkanülen unterschiedlichen Durchmessers reguliert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 25 °C.

## 2.5 Reinkulturversuche

Diese Versuche hatten zum Ziel, das maximale mikrobielle Abbaupotential von AAC zu erhalten. Unter dieser Zielsetzung war es erfolgversprechend, möglichst wenig AAC mit einer relativ großen Menge an Pilzsubstrat zu vermischen, um ein optimales Wachstum des Pilzes zu garantieren. Daher wurde das <sup>14</sup>C-markierte AAC nicht mit unmarkiertem AAC vermischt. Reinkulturversuche wurden mit dem bodenbewohnenden Pilz *A. bitorquis* und mit dem Weißfäulepilz *P. ostreatus* durchgeführt (s. Kapitel 3.2).

In die Flaschenreaktoren wurden je 5 g gemahlene Weizenstrohmehl (Partikeldurchmesser < 1 mm) eingewogen und 60 min autoklaviert. Danach wurde das Stroh in den Flaschen bei locker aufgeschraubter Verschlusskappe für 48 h bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurde den Ansätzen jeweils ca. 0,5 mg <sup>14</sup>C-AAC (auf 1 µg genau), entsprechend einer Radioaktivität von 37 kBq, auf einem Glas-Wägeschiffchen zugegeben. Durch Drehen des Flaschenreaktors wurde das AAC mit dem Strohmehl vermischt. Schließlich wurde das Gemisch mit 15 ml sterilem, bidestilliertem Wasser befeuchtet.

Acht Ansätze wurden mit dem Pilzstamm *P. ostreatus* beimpft. Vier der beimpften Flaschenreaktoren wurden in der 18. Inkubationswoche erneut mit angefeuchtetem Pilzsubstrat überschichtet, um zu prüfen, ob sich die AAC-Mineralisation auf die Weise steigern lässt. Weitere vier Flaschenreaktoren wurden nicht beimpft und dienten als abiotische Kontrolle.

Analog zu dem Versuch mit Flaschenreaktoren wurde ein Versuch in miniaturisierter Ausführung mit nur 0,5 g Stroh in Reagenzgläsern (Innendurchmesser: 20 mm) durchgeführt, um den Einfluss des Versuchsmaßstabs auf den AAC-Abbau zu prüfen. Das <sup>14</sup>C-AAC wurde mit einer sterilen Pasteurpipette in das Strohs substrat eingerührt (20 Umdrehungen). Die Spitze der Pasteurpipette blieb nach dem Mischen im Reagenzglas.

Für die Versuche mit *A. bitorquis* wurden 5 g Champignonssubstrat (Trockengewicht; 68,5 % Feuchte) auf eine Länge von 6,5 cm in Glasröhren gefüllt und autoklaviert. Bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C hatte *A. bitorquis* das Substrat 6 Wochen nach der Inokulation vollständig durchwachsen. Anschließend wurden weitere 5 g steriles Champignonssubstrat (Trockengewicht) darüber geschichtet und inkubiert. In die Grenzfläche zwischen dem beimpften und unbeimpften Substrat wurde <sup>14</sup>C-AAC gemischt.

## 2.6 Mischkulturversuche mit Boden-AAC-Mischungen

Für die Versuche mit Inkubation im Röhrenreaktor wurde Weizenstrohmehl (Partikeldurchmesser < 1 mm) mit der dreifachen Masse Wasser angefeuchtet und über Nacht bei 4 °C quellen gelassen. Am nächsten Tag wurden je 5 g (Trockengewicht) Strohmehl in einen Röhrenreaktor (Innendurchmesser: 27 mm, Länge der Strohsäule: 5 cm) gegeben und 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert. In den Ansätzen mit *A. bitorquis* wurde Champignonssubstrat anstelle von Strohmehl eingesetzt (s. o.).

Nachdem der Pilz das Substrat in den Röhrenreaktoren vollständig besiedelt hatte, wurde eine Mischung aus Boden und unmarkiertem AAC in den Reaktor auf das bewachsene Substrat gegeben und befeuchtet. In einem Vorversuch wurden 30 g Boden mit 0,07 g bzw. 0,15 g AAC gemischt und mit 7 ml bzw. 15 ml Wasser befeuchtet, um den Einfluss von AAC auf das Myzelwachstum im Boden zu testen.

Für den Versuch zum Abbau von <sup>14</sup>C-AAC wurden 0,02 g unmarkiertes AAC mit 10 g Boden vermischt und in den Reaktor auf das bewachsene Substrat gegeben. Zwischen dem Pilzsubstrat und der Boden-AAC-Mischung wurde zuvor ein Nylongewebe plziert (Maschenweite: 1 mm), um die Kompartimente nach Abschluss der Inkubation für die Analysen wieder trennen zu können. Ca. 0,5 mg radioaktives AAC (s. o.) wurden mit einer Pasteurpipette in den Boden eingerührt. Anschließend wurde das Boden-AAC-Gemisch mit 2,33 ml Wasser angefeuchtet und leicht angedrückt, so dass die Länge der Bodensäule 2,0 cm betrug.

Der Abbau von AAC mit *P. ostreatus* im Boden wurde zusätzlich in Flaschenreaktoren gemessen, um den Einfluss der Versuchsanordnung auf die Abbaurate zu untersuchen. Je 5 g Strohmehl wurden mit 15 ml Wasser befeuchtet und 30 Minuten autoklaviert. Nachdem der Pilz das Stroh bewachsen hatte (5 Tage) wurde eine Mischung aus Boden und unmarkiertem sowie markiertem AAC (s. o.) auf das bewachsene Stroh gegeben. Kontrollen ohne Strohmehl, mit unbeimpften Strohmehl und mit sterilem Boden (30 Minuten autoklaviert) ohne Zusätze wurden ebenfalls angesetzt.



## 2.7 Radiorespirometrie und Bilanzierung der $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität

Die Natronlauge in den Reagenzgläsern der Belüftungsapparatur wurde wöchentlich ausgetauscht. Aliquote von 5 ml Natronlauge wurden jeweils mit 14 ml Szintillator (Rotiszint, Roth, Karlsruhe) vermischt und im Flüssigszintillationszähler analysiert. Der gemessene Wert wurde um den Chemikalienblindwert korrigiert.

Um zu prüfen, ob die Radioaktivität der Natronlauge tatsächlich auf der Mineralisierung der radioaktiv markierten Kohlenstoffatome zu  $^{14}\text{CO}_2$  beruht und nicht durch flüchtige, niedermolekulare Bestandteile des AAC verursacht wurde, wurden je 500  $\mu\text{l}$  der 2 N Natronlauge mit 1,0 ml 0,3 M  $\text{BaCl}_2$  Lösung gemischt. Danach wurde diese Mischung bei 15000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend die in 1,0 ml Überstand enthaltene Radioaktivität gemessen. Die Radioaktivität des Überstands geht auf organische Metabolite zurück, da  $^{14}\text{CO}_2$  durch  $\text{BaCl}_2$  als  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  ausgefällt wird.

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Depolymerisation von  $^{14}\text{C}$ -AAC wurden die Proben nach Abbruch der Inkubation in Anlehnung an Tan (1977) mit Natronlauge extrahiert und der Anteil löslicher  $^{14}\text{C}$ -markierter Bestandteile bestimmt. Der Boden wurde mit 20 ml 0,1 N Natronlauge versetzt und bei 25 °C in einem Zentrifugenglas mit einem Magnetrührkern gerührt. Nach 20 h wurde 15 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, abpipetiert und 40  $\mu\text{l}$  des Extraktes im Flüssigszintillationszähler gemessen. Anschließend wurde noch einmal für 3 h und 2 h gerührt, jeweils anschließend zentrifugiert und die im Extrakt enthaltene Radioaktivität bestimmt.

Zur Bestimmung der Rückstandsradioaktivität in Boden- bzw. Substratproben wurde ein Verbrennungsgerät eingesetzt (Biological Oxidizer Ox 300, R. J. Harvey Corp., New Jersey, USA). Die Verbrennungszeit betrug 4 Minuten. Da eine gleichmäßige Verteilung der radioaktiven Polymerkörnchen im Boden bzw. Substrat nicht gewährleistet war, wurden die gemessenen Proben jeweils vollständig verbrannt. Die Absorptionslösung zum Auffangen des im Oxidizer freigesetzten  $^{14}\text{CO}_2$  wurde aus je 48,5 % Szintillator (Quickzint 212, Zinsser Analytik, Frankfurt/M.), 30,9 % Ethanolamin und 20,6 % Methanol hergestellt.

## 2.8 Enzymbestimmung

Analog zu den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -AAC wurden Untersuchungen mit nichtradioaktivem AAC in Röhrenreaktoren angesetzt, um die Aktivität ligninolytischer Exoenzyme in der Boden-AAC-Mischung mittels photometrischer Tests zu bestimmen. Nach 6, 12 und 18 Wochen Inkubation wurden je 4 Glasröhren pro Variante für die Enzymbestimmung eingefroren. Nach mindestens einer Woche

Lagerung bei -25 °C erfolgte die Extraktion von Exoenzymen aus dem Bodenkompartment der einzelnen Ansätze (in der Wiese 2000). Die Laccase-Aktivität wurde mit Hilfe des Redoxindikators ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure), Sigma, St. Louis, USA) gemessen (Lang et al. 1997). Die Bestimmung der Peroxidase-Aktivität erfolgte mit einem Gemisch aus MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonhydrochlorid, Sigma) und DMAB (3-Dimethylamino-benzoesäure, Sigma) (in der Wiese 2000). Die Enzymaktivitäten wurden auf die Boden-Trockenmasse bezogen und in Units (U) angegeben. Die Einheit Unit bezeichnet den enzymatischen Stoffumsatz pro Zeiteinheit (1 U = 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$ ).

## 2.9 Statistische Methoden

Der multiple Vergleich von Mittelwerten wurde mit dem Duncan-Test durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 5,0$  % werden Unterschiede zwischen verschiedenen Varianten als signifikant bezeichnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung des $^{14}\text{C}$ -markierten Copolymers

Das  $^{14}\text{C}$ -AAC enthält, neben dem hochmolekularen Anteil, 51 % an niedermolekularen wasserlöslichen Bestandteilen. Insgesamt 8 % der radioaktiven Kohlenstoffatome passierten einen Filter mit einer Ausschlussgrenze von 3000 Dalton. In 0,1 N Natronlauge waren 61 % der Radioaktivität löslich.

### 3.2 Reinkulturversuche

In den Reinkulturversuchen mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem AAC wurde unter Bedingungen, die für das Wachstum von *P. ostreatus* optimal sind, das maximale Abbaupotential des Pilzes ermittelt. *P. ostreatus* benötigte etwa vier Wochen, um das mit AAC vermengte Strohs substrat vollständig zu kolonisieren. Im Verlauf der Inkubation besiedelte der Pilz das Stroh so dicht, dass das Stroh vollständig von Hyphen überzogen und daher nicht mehr sichtbar war. Bei den unbeimpften Kontrollen wurde keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen des Substrates festgestellt.

In den Flaschenreaktoren wurde durch *P. ostreatus* innerhalb von 28 Wochen 31 % des  $^{14}\text{C}$  als  $^{14}\text{CO}_2$  freigesetzt (Tab. 2). In den Miniaturansätzen wurde dagegen nur 17 % des  $^{14}\text{C}$ -AAC mineralisiert. In den unbeimpften Reaktoren lag die Mineralisierung unter 0,3 % (Tab. 2). Die Mineralisierung des  $^{14}\text{C}$ -markierten AAC erfolgte während der gesamten Inkubationsperiode.

Wenn dem durch *P. ostreatus* besiedelten Substrat in der 18. Inkubationswoche erneut steriles Strohs substrat zuge-

Tab. 2

Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -AAC in Weizenstroh durch *Pleurotus ostreatus* und in den unbeimpften Kontrollen während 28wöchiger Inkubation bei 25 °C. Angabe in Prozent der applizierten Radioaktivität. Mittelwerte, die mit unterschiedlichen Buchstaben markiert sind, differieren signifikant ( $n=4$ ,  $p<0,05$ )

Variante	$^{14}\text{CO}_2$ (%)
<i>P. ostreatus</i> (Flaschenreaktor)	31 <sup>a</sup>
<i>P. ostreatus</i> (Flaschenreaktor) mit erneuter Strohzugabe	30 <sup>a</sup>
<i>P. ostreatus</i> (Miniaturansatz)	17 <sup>b</sup>
Abiotische Kontrolle	0,3 <sup>c</sup>

geben wurde, unterschieden sich die nach 28wöchiger Inkubation erhaltenen kumulativen Mineralisierungsraten der Ansätze mit und ohne erneute Strohzugabe nicht signifikant.

Mit dem ebenfalls unter Reinkulturbedingungen getesteten Stamm *A. bitorquis* wurde auf Champignonsubstrat nach 22wöchiger Inkubation eine deutlich geringere Mineralisierungsrate von 1,59 % erhalten.

### 3.3 Mischkulturversuche mit Boden-AAC-Mischungen

Um geeignete Pilzspezies für einen Abbauersuch mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem AAC im Boden zu finden, wurden zunächst mehrere Pilzstämme auf ihre Fähigkeit überprüft, die Boden-AAC-Mischung zu bewachsen. Die Stämme *Dichomitus squalens*, *Flammulina velutipes* und *Agrocybe aegerita* bewuchsen den Boden nicht. *Pleurotus eryngii* und *Lentinus edodes* bewuchsen den Boden nur schwach. Die Stämme *Peurotus sajor-caju* und *Pleurotus ostreatus* wuchsen dagegen rasch in die Boden-AAC-Mischung ein. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Myzels von *P. ostreatus* im Boden wurde durch die Verdopplung der AAC-Applikationsmenge (0,15 g AAC auf



Abb. 1  
Wachstumsverhalten von *Pleurotus ostreatus* nach 84 Tagen Inkubation in einem Röhrenreaktor (Substrat-Kompartiment links, Boden-AAC-Kompartiment rechts)

30 g Boden, mit entsprechend höherer Anfeuchtung) nicht signifikant beeinflusst.

Da *P. ostreatus* den Boden am schnellsten besiedelte und darüber hinaus in der Lage ist, eine Vielzahl hochmolekularer Stoffe zu depolymerisieren (Glenn et al. 1983, Hammel et al. 1986), wurde er als Modellorganismus für die Gruppe *Pleurotus* spp. in den Abbauersuchen ausgewählt. *Dichomitus squalens*, *Flammulina velutipes* und *Agaricus bitorquis* wurden zu Vergleichszwecken eingesetzt.

Während der Abbauersuche mit radioaktivem AAC wurde die in den Röhrenreaktoren befindliche Boden-AAC-Mischung (10g Boden, 0,02 g AAC) von *P. ostreatus* innerhalb von drei Wochen komplett durchwachsen. Jedoch blieben einige Stellen der Mischung unbesiedelt. *D. squalens* und *F. velutipes* besiedelten die Boden-AAC-Mischung nicht. In diesen Ansätzen färbten sich die Pilzsubstrate, wie auch das Stroh in den unbeimpften Kontrollen, im Verlauf der Inkubation dunkelbraun bis schwarz, was auf die Infektion durch Bodenmikroorganismen hindeutete. *A. bitorquis* war ebenfalls in der Lage den Boden zu durchwachsen, besiedelte ihn jedoch nicht so flächendeckend wie *P. ostreatus*. In den Flaschenreaktoren besiedelte *P. ostreatus* die Boden-AAC-Mischung innerhalb von drei Wochen vollständig. Im weiteren Verlauf der Inkubation verdichtete sich die Myzelschicht an der Bodenoberfläche so stark, dass der Boden nicht mehr zu sehen war. Das Stroh der unbeimpften Kontrollen färbte sich während der Inkubation dunkelbraun bis schwarz.

In der durch *P. ostreatus* besiedelten Boden-AAC-Mischung wurden im gesamten Inkubationsverlauf ligninolytische Enzymaktivitäten gemessen. Die Manganperoxidase-Aktivität betrug zwischen 90 und 340 U g<sup>-1</sup> und die Laccase-Aktivität zwischen 25 und 45 U g<sup>-1</sup>. Dagegen waren im Bodenkompartment der mit anderen Pilzen beimpften Ansätze und in den Kontrollen ohne Pilz keine ligninolytischen Exoenzyme nachweisbar.

In Abb. 2 sind typische Verlaufskurven für die Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden dargestellt. Nach einer

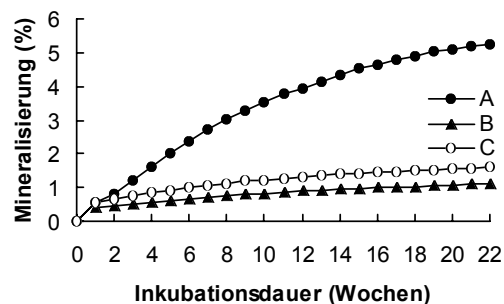


Abb. 2  
Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden nach Zugabe von *Pleurotus ostreatus*-Substrat (A), *Dichomitus squalens*-Substrat (B) oder unbeimpftem Stroh (C) während Inkubation bei 25 °C in Röhrenreaktoren. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier Wiederholungen

Tab. 3

Kumulative Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden von Röhren- und Flaschenreaktoren nach 11 und 22 Wochen Inkubation bei 25 °C in Abhängigkeit von der Zugabe verschiedener Pilzsubstrate bzw. unbeimpfter Substrate. Die Mittelwerte der Mineralisation zu den einzelnen Inkubationszeitpunkten, die mit unterschiedlichen Buchstaben markiert sind, differieren signifikant ( $n=4$ ,  $p<0,05$ )

	$^{14}\text{CO}_2$ (%)	
	nach 11 Wochen	nach 22 Wochen
<b>Flaschenreaktor</b>		
ohne Zusätze	1,93 <sup>cd</sup>	2,23 <sup>cd</sup>
Stroh	2,51 <sup>d</sup>	3,11 <sup>d</sup>
<i>P. ostreatus</i> (auf Stroh)	5,66 <sup>f</sup>	8,84 <sup>f</sup>
<b>Röhrenreaktor</b>		
ohne Zusätze (steril)	0,55 <sup>a</sup>	n.b.
ohne Zusätze (unsteril)	0,87 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>a</sup>
Stroh	1,28 <sup>abc</sup>	1,61 <sup>abc</sup>
Champignonsubstrat	1,77 <sup>cd</sup>	n.b.
<i>P. ostreatus</i> (auf Stroh)	3,77 <sup>e</sup>	5,25 <sup>e</sup>
<i>D. squalens</i> (auf Stroh)	0,86 <sup>ab</sup>	1,11 <sup>ab</sup>
<i>F. velutipes</i> (auf Stroh)	1,25 <sup>abc</sup>	1,59 <sup>ac</sup>
<i>A. bitorquis</i> (auf Champignonsubstrat)	1,40 <sup>bc</sup>	n.b.
n.b.: nicht bestimmt		

anfänglichen relativ hohen Mineralisierung von 0,5 bis 1 % in der ersten Woche verläuft die Mineralisierung während der Inkubation sehr gleichmäßig mit Raten von ca. 0,02 % je Woche.

Die kumulative Mineralisierung im Boden der Kontrollen ohne Zusatz betrug nach 22 Wochen 1,1 % (Tab. 3). Durch die Zugabe von Stroh wurde keine signifikante Steigerung der Mineralisierung im Vergleich zu den Kontrollen ohne Zusatz. Auch mit den Pilzstämmen *D. squalens* und *F. velutipes* wurden mit 1,1 bzw. 1,6 % ähnliche Werte wie in den Kontrollen erzielt (Tab. 3). Durch die Inokulation des Bodens mit *P. ostreatus* konnte die Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -AAC dagegen signifikant auf 5,3 % gesteigert werden (Tab. 3).

#### Flaschenreaktoren

Die Kinetik der Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -AAC in den Flaschenreaktoren entspricht der in den Röhrenreaktoren erhaltenen Kinetik (Abb. 2). Ohne Zugabe von Stroh oder Pilzsubstrat zum Boden wurde innerhalb von 22 Wochen 2,2 % der Radioaktivität aus  $^{14}\text{C}$ -AAC als  $^{14}\text{CO}_2$  freigesetzt (Tab. 3). Durch die Zugabe von Stroh wurde die Mineralisation nicht signifikant gesteigert (Tab. 3). Dage-

gen wurde nach Inokulation des Bodens mit *P. ostreatus* insgesamt 8,8 % des  $^{14}\text{C}$ -AAC mineralisiert, und damit signifikant mehr als in allen anderen Varianten (Tab. 3).

#### 3.4 Verteilung der $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität nach Abbruch der Inkubation des $^{14}\text{C}$ -AAC

Überprüfung der Abluft der Reaktoren auf  $^{14}\text{C}$ -radioaktive Metabolite:

Die Absorptionslösungen wurden stichprobenartig auf  $^{14}\text{C}$ -radioaktive Metabolite überprüft. Die Radioaktivität der überwiegenden Zahl der überprüften Proben war nicht signifikant vom Blindwert verschieden. Lediglich in neun von 180 Proben wurden signifikant höhere Werte gemessen. Der Maximalwert betrug 1,4 %, alle übrigen Werte lagen unter 0,1 % der eingesetzten Radioaktivität. Die von der Abluft der Reaktoren aufgefangene Radioaktivität ist somit auf  $^{14}\text{CO}_2$  zurückzuführen.

#### Bildung löslicher $^{14}\text{C}$ -radioaktiver Metabolite:

Durch Extraktion der Boden-AAC-Mischungen mit 0,1 N Natronlauge wurde untersucht, ob der in Natronlauge lösliche Anteil des  $^{14}\text{C}$ -AAC während der Inkubation gestiegen ist und somit eine Depolymerisierung des  $^{14}\text{C}$ -AAC stattfand. Die Proben der Kontrollen ohne Zuschlag wiesen mit 41,6 % der applizierten Radioaktivität den geringsten NaOH-extrahierbaren Anteil auf (Tab. 4). Durch die Zugabe von unbeimpftem Stroh wurde dieser Anteil nicht signifikant beeinflusst (Tab. 4). Die Zugabe von *D. squalens*- oder *F. velutipes*-Substrat erhöhte den Anteil der extrahierbaren Radioaktivität gegenüber den unbehandelten Kontrollen signifikant. Gegenüber den Kontrollen mit unbeimpftem Stroh war die Erhöhung jedoch nicht signifikant. Dagegen hatte sich nach Inokulation der Boden-AAC-Mischungen mit *P. ostreatus* der in Natronlauge lösliche Anteil des  $^{14}\text{C}$ -AAC innerhalb von

Tab. 4

Bildung löslicher Metabolite nach 22 Wochen Inkubation von  $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden mit *Dichomitus squalens*, *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus*. Die Mittelwerte der Radioaktivität in NaOH-Extrakten bzw. der Summen von Radioaktivität in NaOH-Extrakten und  $^{14}\text{CO}_2$ , die mit unterschiedlichen Buchstaben markiert sind, differieren signifikant ( $n=4$ ,  $p<0,05$ )

	NaOH-extrahierbare Bestandteile	NaOH-extrahierbare Bestandteile incl. $^{14}\text{CO}_2$
	Radioaktivität (%)	
ohne Zusätze	41,6 <sup>b</sup>	42,7 <sup>a</sup>
Stroh	49,1 <sup>ab</sup>	50,8 <sup>ab</sup>
<i>D. squalens</i>	55,8 <sup>a</sup>	56,9 <sup>b</sup>
<i>F. velutipes</i>	56,7 <sup>a</sup>	58,3 <sup>b</sup>
<i>P. ostreatus</i>	85,7 <sup>c</sup>	90,9 <sup>d</sup>



Tab. 5

Verteilung der Radioaktivität nach aerober Inkubation (25°C, 22 Wochen) von  $^{14}\text{C}$ -AAC in Weizenstroh bzw. in Parabraunerde mit *Pleurotus ostreatus* bzw. in der Kontrolle ohne Zugabe von Substrat und Pilz. Angabe in Prozent der applizierten Radioaktivität. Darstellung der Ergebnisse von einzelnen Reaktoren

Variante	$^{14}\text{CO}_2$	lösl. Stoffe	unlös. Rückstand	Summe
	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>P. ostreatus</i> Reinkultur	30	n. b.	n. b.	101
<i>P. ostreatus</i> Reinkultur (Miniaturansatz)	12	n. b.	n. b.	74
Boden ohne Zusätze	1	55	3	59
Boden + <i>P. ostreatus</i>	5	79	16	100
n. b.: nicht bestimmt				

22 Wochen im Vergleich zur Kontrolle mehr als verdoppelt (Tab. 4).

Bilanzierung der eingesetzten Radioaktivität:

Zur Absicherung der Mineralisierungsraten und der löslichen radioaktiven Anteile wurde der nicht extrahierbare Rückstand exemplarisch ausgewählter Ansätze im Oxidizer verbrannt, die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler quantifiziert und eine radioaktive Gesamtbilanz erstellt. In den mit *P. ostreatus* bewachsenen Proben wurden 100 % bis 101 % der Ausgangsradioaktivität wiedergefunden (Tab. 5). Allerdings betrug die Wiederfindung bei der Miniatur-Variante des Reinkulturversuchs lediglich 74 % (Tab. 5). Noch niedriger war die Wiederfindung in dem Kontrollboden ohne Zugabe von Stroh oder Pilzsubstrat (Tab. 5).

## 4 Diskussion

### 4.1 Eignung des $^{14}\text{C}$ -markierten Copolymers als Modellsubstanz für Stockosorb®

Das in den Versuchen eingesetzte  $^{14}\text{C}$ -markierte Acrylamid/Acrylsäure-Copolymer enthielt 51 % wasserlösliche Bestandteile und war daher nur bedingt repräsentativ für das entsprechende kommerziell erhältliche Produkt mit dem Handelsnamen Stockosorb® (wasserlöslicher Anteil: 6 %). Die in dieser Arbeit erzielten Werte für die Wasserlöslichkeit des radioaktiven Copolymers liegen auch über den von Raid (1998) und Stahl et al. (2000) angegebenen Daten, die mit dem gleichen Produkt erhalten wurden.

Vermutlich verursachte die  $\beta$ -Strahlung durch Radiolyse während der Lagerung eine teilweise Depolymerisation, was zu einer höheren Wasserlöslichkeit führte. Diese teilweise Depolymerisation macht das  $^{14}\text{C}$ -AAC einem biologischen Abbau im Vergleich zum unmarkierten Handelsprodukt möglicherweise leichter zugänglich. Allerdings sind 92 % der Radioaktivität in Molekülen mit einem Molekulargewicht von über 3000 Dalton gebunden. Moleküle dieser Größe werden nicht in Mikroorganismen aufgenommen und sind daher dem intrazellulären Abbau nicht zugänglich. Daher wurde das  $^{14}\text{C}$ -AAC trotz der vorhandenen Unterschiede als Modellverbindung für das Handelsprodukt Stockosorb® verwendet.

### 4.2 Mineralisierung von $^{14}\text{C}$ -AAC durch *Pleurotus ostreatus* unter optimalen Wachstumsbedingungen

Bei der Feststofffermentation einer Mischung von  $^{14}\text{C}$ -AAC und Weizenstroh mit dem Weißfäulepilz *P. ostreatus* wurden mit bis zu 31 % die höchsten Mineralisierungsraten der durchgeführten Versuche erhalten (Tab. 2). Dieser Pilz zeigte bereits in vorangegangenen Abbaustudien mit als persistent geltenden Stoffen hohe Mineralisierungsraten der  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen (Wolter 1998). Des Weiteren hat sich bei früheren Untersuchungen die Feststofffermentation gegenüber der Flüssigkultur als vorteilhaft zur Erzielung hoher Mineralisierungsraten erwiesen (Wolter et al. 1997, Sack et al. 1997). Die Fermentation lignozellulosehaltiger Festsubstrate ähnelt den natürlichen Wachstumsbedingungen der Weißfäulepilze, so daß die Produktion ligninolytischer Enzyme induziert wird. Diesen Exoenzymen wird eine entscheidende Rolle beim Xenobiotika-Abbau zugeschrieben (in der Wiesche 2000). Daher kann davon ausgegangen werden, dass *P. ostreatus* unter den im Reinkulturversuch vorliegenden Arbeit gegebenen Bedingungen das größtmögliche Abbaupotential aufweist.

Der Vergleich mit den sterilen Kontrollansätzen, die praktisch keine Mineralisierung aufwiesen, zeigt, dass tatsächlich der Pilz die Mineralisierung des AAC bewirkt und keine abiotische Zersetzung des vorliegt (Tab. 2). Jedoch geht aus diesen Ergebnissen alleine noch nicht hervor, wodurch die Mineralisierung limitiert wird. Möglicherweise können die pilzlichen Exoenzyme nur die an der Oberfläche des Polymers vorliegenden Kohlenstoffatome oxidieren, so dass die Mineralisierung durch die Struktur des  $^{14}\text{C}$ -AAC limitiert wird. Allerdings unterliegt auch der Abbau nicht-polymerer Xenobiotika durch *P. ostreatus* und andere Weißfäulepilze einer vergleichbaren Limitierung (Wolter 1998). Es erscheint wahrscheinlicher, dass das Oxidationsvermögen des Pilzes im Laufe der Inkubation nachlässt, weil der Großteil des Substrates durch den Pilz abgebaut wurde. Die erneute Zugabe von Strohs substrat bewirkte keine signifikante Erhöhung der Mineralisierung (Tab. 2). Allerdings ist eine Erhöhung der

Aktivität extrazellulärer oxidativer Enzyme in dem verbrauchten Substrat als Reaktion auf die Besiedelung des frischen Substrats auch nicht zu erwarten.

Weil selbst am Ende der Inkubationszeit noch relativ hohe wöchentliche Mineralisierungsraten auftraten, ist davon auszugehen, dass das  $^{14}\text{C}$ -AAC bei längerer Inkubation noch weiter mineralisiert worden wäre.

#### 4.3 Mineralisierung von $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden

Weißfäulepilze zeichnen sich durch ihre hochwirksamen extrazellulären Enzymsysteme aus, die sie zum Abbau von weitgehend persistenten Xenobiotika auch im Boden befähigen. Die Bedingungen zur Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden waren für Weißfäulepilze allerdings weniger günstig als im Strohs substrat, da der Boden selbst nur wenig für den Pilz verwertbare organische Substanz enthielt, ein relativ hoher Wassergehalt eingestellt wurde (entsprechend der Stockosorb-Anwendungsempfehlung der Firma Stockhausen) und die Pilze mit der originären Bodenmikroflora konkurrieren mußten. Daher wurde die Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -AAC im Boden zwar durch *P. ostreatus* gefördert, aber mit signifikant niedrigerer Mineralisierungsrate als im Strohs substrat (Tab. 2, 3).

*D. squalens* und *F. velutipes* hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Mineralisation (Tab. 3), was mit der mangelnden Durchsetzungsfähigkeit gegenüber der originären Bodenfauna zu begründen ist. In Gegenwart der originären Mikroflora wachsen diese Stämme nicht oder nur in geringem Ausmaß in Böden ein. Dennoch konnten sie in einer Studie von Martens und Zadrazil (1992) den Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Boden indirekt fördern. Es wurde vermutet, dass die Pilze beim Abbau des Strohs substrats Stoffe freisetzen, die in das Stroh diffundierten und dort zu einer Steigerung des mikrobiellen Abbaus der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen führen. Auf den cometabolischen Abbau von AAC haben diese Stoffe aber offenbar keinen Einfluss.

*P. ostreatus* war den anderen getesteten Stämmen im Hinblick auf die Fähigkeit zur Kolonisation von Boden-AAC-Mischungen überlegen. Auch wurde in dem mit *P. ostreatus* beimpften Boden mehr  $^{14}\text{C}$ -AAC mineralisiert als in den anderen Varianten (Tab. 3), was auf die Kolonisierung des Bodens und die Produktion von Manganperoxidasen und Laccasen durch diesen Pilz zurückzuführen ist.

Da die Mineralisierungsraten von *P. ostreatus* mit den Flaschenreaktoren signifikant höher waren als in den Röhrenreaktoren, bietet der Flaschenreaktor offenbar bessere Bedingungen für den pilzlichen Abbau (Tab. 3). In den Flaschenreaktoren war die Kontaktfläche des Boden-AAC-Gemisches zu dem bewachsenen Stroh größer und der Boden war etwas lockerer geschichtet, was die Kolonisation des Bodens durch den Pilz begünstigte. In den

Röhrenreaktoren war die Wachstumsdichte des Myzels dagegen an verdichteten Stellen der Bodensäule erkennbar vermindert. Dennoch erscheint die Durchführung mit dem Röhrenreaktor praxisnäher, da die Pilzhyphe im Freiland auf der Suche nach neuen Substraten größere Distanzen im Boden überwindet und dabei auch mit verdichteten Stellen konfrontiert ist.

Die Mineralisierung des  $^{14}\text{C}$ -AAC zu Kohlendioxid und Wasser stellt die Endstufe des mikrobiellen Abbaus dar. Ihr geht eine Zerstörung der dreidimensionalen vernetzten Struktur ("Depolymerisation") und damit eine Verflüssigung des Copolymers zu niedermolekularen Bestandteilen voraus (Stahl et al. 2000). Die Extrahierbarkeit der Radioaktivität in den unbeimpften Kontrollen (42 %) war niedriger als der durch Extraktion des reinen  $^{14}\text{C}$ -AAC mit Natronlauge ermittelte Wert (61 %). Dies ist auf die Sorption eines Teils der radioaktiven Moleküle an Huminstoffe zurückzuführen. Dennoch hatte die Inokulation des Bodens mit *P. ostreatus* eine starke Zunahme löslicher  $^{14}\text{C}$ -radioaktiver Substanzen zur Folge (Tab. 4). Die Summe der Radioaktivität löslicher Substanzen und von  $^{14}\text{CO}_2$  beläuft sich in diesen Ansätzen auf 91 % der applizierten Radioaktivität (Tab. 4). Demnach spaltet der Pilz das  $^{14}\text{C}$ -AAC nahezu vollständig in kleine Moleküle, die wiederum dem mikrobiellen Abbau leichter zugänglich sind als das hochmolekulare Copolymer.

Die Spaltung des Copolymers in kleinere Einheiten war möglicherweise auf die Aktivität von Manganperoxidasen und Laccasen zurückzuführen, die durch *P. ostreatus* in der Boden-AAC-Mischung freigesetzt wurden. In Abwesenheit des Pilzes waren diese ligninolytischen Exoenzyme nicht im Boden nachweisbar. Die Bedeutung dieser Enzyme für den Abbau von Xenobiotika wurde unter anderem von Sack et al. (1997) gezeigt.

Im Hinblick auf das langfristige Verhalten der AAC-Rückstände ist neben einer weiteren langsamen Mineralisierung zu  $\text{CO}_2$  ein Einbau in Humusbestandteile denkbar. Da mit der zur Extraktion  $^{14}\text{C}$ -radioaktiver Substanzen angewandten Methode auch Huminsäuren und Fulvosäuren gelöst werden, ist die Bindung der markierten Kohlenstoffatome an die Huminsäuren nicht auszuschließen. Die nicht extrahierbaren Bestandteile lagen entweder als unlösliches Copolymer vor oder waren an Humine gebunden. Dieser nicht extrahierbare Anteil beträgt nach 22 Wochen Inkubation mit *P. ostreatus* allerdings nur noch 9 % der applizierten Radioaktivität (Tab. 4). Die Bindung an Humine kann durch eine Adsorption oder als chemische Bindung in nicht extrahierbare Rückstände erfolgen.

Holzerstörende Organismen wie *P. ostreatus* sind in Böden nur sporadisch, bei ausreichender Verfügbarkeit lignozellulosehaltiger Substrate, aktiv. Durch die originäre Bodenmikroflora allein, also ohne Zusatz von Pilzsubstrat, wurden innerhalb von 22 Wochen bis zu 2,2 % des  $^{14}\text{C}$ -Copolymers mineralisiert (Tab. 3). Berücksichtigt man die im Vergleich zum Handelsprodukt höhere Was-

serlöslichkeit und damit biologische Zugänglichkeit des untersuchten <sup>14</sup>C-AAC sowie die bezüglich Temperatur, Wassergehalt und Sauerstoffversorgung optimierten Inkubationsbedingungen, sind für handelsübliche Superabsorber unter natürlichen Bedingungen deutlich geringere Abbauraten zu erwarten.

## Literatur

- Barvenik F-W (1994) Polyacrylamide characteristics related to soil applications. *Soil Sci* 58: 235-243
- Boyle C-D, Kropp B-R, Reid I-D (1992) Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 58: 3217-3224
- Buchholz F-L, Graham A-T (1998) Modern superabsorbent polymer technology. Wiley VCH
- Bumpus J-A, Tien M, Wright D, Aust S-D (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436
- Buswell J-A (1991) Fungal degradation of lignin. In: Arora K, Mukerij K G, Knudsen G R (eds) *Soil and Plants. Handbook of Applied Mycology*, New York Vol 1: Marcel Dekker, pp 425-480
- Chang L-L, Raudenbush D-L, Dentel S-K (2001) Aerobic and anaerobic biodegradability of a flocculant polymer. *Water Sci Technol* 44: 461-468
- Evans C-S, Dutton M-V, Guillen F, Veness R-G (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13: 235-240
- Glenn J-K, Morgan M-A, Mayfield M-B, Kuwahara M, Gold M-H (1983) An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in Lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 1077-1083
- Green V-S, Stott D-E, Norton L-D, Graveel J-G (2000) Polyacrylamide molecular weight and charge effects on infiltration under simulated rainfall. *Soil Sci Soc Am J* 64: 1786-1791
- Haider K (1986) Changes in substrate composition during the incubation of plant residues in soil. In: Jensen V, Kjölller A, Sørensen L-H (eds) *Microbial communities in soil*. London : Elsevier Applied Science Publishers, pp 133-147
- Hammel K-E, Kalyanaramen B, Kirk T-K (1986) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J Biol Chem* 261: 16948-16952
- Hüttermann A, Zommorodi M, Reise K (1999) Addition of hydrogels into soil for prolonging the survival of *Pinus halepensis* seedlings subjected to drought. *Soil and Tillage Research* 50: 295-304
- Kay-Shoemaker J-L, Watwood M-E, Lentz R-D, Sojka R-E (1998a) Polyacrylamide as an organic nitrogen source for soil microorganisms with potential effects on inorganic soil nitrogen in agricultural soil. *Soil Biol Biochem* 30: 1045-1052
- Kay-Shoemaker J-L, Watwood M-E, Sojka R-E, Lentz R-D (1998b) Polyacrylamide as a substrate for microbial amidase in culture and soil. *Soil Biol Biochem* 30: 1647-1654
- Kay-Shoemaker J-L, Watwood M-E, Sojka R-E, Lentz R-D (2000) Soil amidase activity in polyacrylamide-treated soils and potential activity toward common amide-containing pesticides. *Biol Fertil Soils* 31: 183-186
- Lang E, Eller G, Zadrzil F (1997) Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microb Ecol* 34: 1-10
- Leonowicz A, Matuszewska A, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Cho N-S, Hofrichter M, Rogalski J (1999) Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genet Biol* 27: 175-185
- Martens R, Zadrzil F (1992) Screening of white rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: *Soil decontamination using biological progresses*, Dechema-Congress, 6.-9. December 1992, Karlsruhe, pp 505-510
- Martens R, Wetzstein H-G, Zadrzil F, Capelari M, Hoffmann P, Schmeer N (1996) Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. *Appl Environ Microbiol* 62: 4206-4209
- Martens R, Wolter M, Bahadir M, Zadrzil F (1999) Mineralization of <sup>14</sup>C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by *Pleurotus* sp. Florida. *Soil Biol Biochem* 31: 1893-1899
- Raid P (1998) Aufnahme und Metabolismus von monomerem Acrylamid aus einem Acrylamid/Acrylsäure-Copolymer in verschiedenen pflanzlichen Systemen. *Landbauforsch Völkensrode SH* 187:98
- Sack U, Hofrichter M, Fritsche W (1997) Degradation of PAHs by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiol Lett* 152: 227-234
- Sack U, Heinze T-M, Deck J, Cerniglia C-E, Martens R, Zadrzil F, Fritsche W (1997) Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl Environ Microbiol* 63: 3919-3925
- Seybold C-A (1994) Polyacrylamide review : soil conditioning and environmental fate. *Commun Soil Sci Plant Anal* 25: 2171-2185
- Smith E-A, Oehme F-W (1991) Acrylamide and polyacrylamide : a review of production, use, environmental fate and neurotoxicity. *Rev Environ Health* 9: 215-228
- Stahl J-D, Cameron M-D, Haselbach J, Aust S-D (2000) Biodegradation of superabsorbent polymers in soil. *Environ Sci & Pollut Res* 7(2): 83-88
- Sutherland G-R-J, Haselbach J, Aust S-D (1997) Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. *Environ Sci & Pollut Res* 4: 16-20
- Tan K-H (1977) Infrared spectra of humic and fulvic acids, containing silica, metal ions, hygroscopic moisture. *Soil Sci* 123 (4): 235-240
- Wegener O, Wegener H-R (2000) Lysimeterversuche zum Einsatz von Hydroabsorbentien bei der Abdeckung und Begrünung von Deponien. In: Egloffstein T-G, Burkhardt G, Czurda K (eds) *Oberflächenabdichtung von Deponien und Altlasten 2000. Abfallwirtschaft in Forschung und Praxis*. Berlin : Erich Schmidt Verlag, pp 117-139
- Weindel W, Sontheimer H (1971) Flockungshilfsmittel in der Trinkwasseraufbereitung. *Gwf-wasser/abwasser* 112 (2): 76-80
- in der Wiesche C (2000) Untersuchungen zur Sanierung PAK-kontaminierter Böden mit Weißfäulepilzen. *Landbauforsch Völkensrode SH* 219: 236
- Wolter M, Zadrzil F, Martens R, Bahadir M (1997) Degradation of eight highly condensed EPA-PAHs by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 398-404
- Wolter M (1998) Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch den Weißfäulepilz *Pleurotus* sp. Florida. *Dissertation Technische Universität Braunschweig*
- Zadrzil F (1985) Screening of fungi for lignin decomposition and conversion of straw into feed. *Angewandte Botanik* 59: 433-452