



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: C 02 F

3/34

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



(12) PATENTSCHRIFT A5

(11)

638 470

(21) Gesuchsnummer: 6532/78

(73) Inhaber:
CIBA-GEIGY AG, Basel

(22) Anmeldungsdatum: 15.06.1978

(24) Patent erteilt: 30.09.1983

(45) Patentschrift
veröffentlicht: 30.09.1983

(72) Erfinder:
Josef Zeyer, Zürich
Prof. Dr. Ralf Hütter, Gockhausen
Dr. Peter Mayer, Basel

(54) Verfahren zum Abbau von Cyanursäure.

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein mikrobielles Verfahren zum Abbau von Cyanursäure in Cyanursäure enthaltenden Abwässern. Das wesentliche Merkmal des Verfahrens besteht darin, dass man für den Abbau der Cyanursäure einen Pilz der Gattung *Sporothrix*, insbesondere einen Pilz der Art *Sporothrix schenkii*, verwendet. Nach einer Variante des Verfahrens kann auch neben Cyanursäure vorliegendes Ammelin und Ammelid abgebaut werden, wenn man neben einem Pilz der Gattung *Sporothrix* einen zweiten Mikroorganismus verwendet, der mit dem Pilz verträglich ist und der den Abbau von Ammelin und Ammelid zu Cyanursäure bewirkt. Mit dem erfindungsgemässen Verfahren können Abwässer gereinigt werden, wie sie bei der technischen Herstellung von Triazin-Herbiziden anfallen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Mikrobielles Verfahren zum Abbau von Cyanursäure in Cyanursäure enthaltendem Abwasser, dadurch gekennzeichnet, dass das Abwasser mit abbauenden Enzymen aus dem Pilz der Gattung *Sporothrix* in Kontakt gebracht wird.

2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die abbauenden Enzyme in Form der Pilzkulturen eingesetzt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das Abwasser mit einem Pilz der Gattung *Sporothrix* animpft und den Abbau der Cyanursäure mit wachsenden Zellen des Pilzes der Gattung *Sporothrix* durchführt.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man das Abwasser mit einem Pilz der Gattung *Sporothrix* animpft und den Abbau der Cyanursäure mit ruhenden Zellen des Pilzes der Gattung *Sporothrix* durchführt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man den Abbau der im Abwasser enthaltenen Cyanursäure mit immobilisierten Zellen des Pilzes der Gattung *Sporothrix* durchführt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man bei Temperaturen von 5 bis 35 °C arbeitet.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man bei Temperaturen von 25 bis 35 °C arbeitet.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pilze der Gattung *Sporothrix* solche der Art *Sporothrix schenckii* verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pilze der Gattung *Sporothrix schenckii* die Stämme CBS 472.48, CBS 539.36 und NRRL Y-11 307 verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pilze der Gattung *Sporothrix* den Stamm *Sporothrix schenckii* NRRL Y-11 307 verwendet.

11. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man daneben zum gleichzeitigen Abbau von Ammelin und Ammelid zu Cyanursäure einen zweiten, mit dem Pilz verträglichen Mikroorganismus verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Mikroorganismus das Bakterium NRRL B-11308 ist.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Mischkultur des Pilz-Stammes *Sporothrix schenckii* NRRL Y-11 307 und des Bakteriums NRRL B-11308 verwendet.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein mikrobielles Verfahren zum Abbau von Cyanursäure in Cyanursäure enthaltenden Abwässern.

Bei der Herstellung von Triazinherbiziden, z. B. 2-Äthylamino-4-isopropylamino-6-chlor-s-triazin (Atrazin®), 2,4-Bis-Äthylamino-6-chlor-s-triazin (Simazin®) oder 2,4-Bis-isopropylamino-6-chlor-s-triazin (Propazin®) durch Umsetzung von Cyanurchlorid mit entsprechenden Alkylaminen fällt Abwasser an, das ausser dem gewünschten herbiziden Wirkstoff 2,4,6-Trisalkylamino-s-triazin, Hydroxyalkylamino-s-triazine und Cyanursäure enthält. Der Abbau dieser Verbindungen ist aus ökologischen Gründen notwendig.

Es ist bekannt, dass man Alkylamino-s-triazine oxidativ dealkylieren kann (J. Agr. Food Chem. 19 (3), 572–573 [1971]). Die hierbei gebildeten Amino-s-triazine können durch Hydrolyse in saurem Medium weiter zu Cyanursäure abgebaut werden, die hydrolytisch nicht weiter abbaubar ist.

Alkylamino-s-triazine der vorgenannten Art können auch direkt durch energische Hydrolyse in saurem Medium in Cyanursäure und Alkylamin gespalten werden (Journal of Chromatography, 100, 175–179 [1974]).

5 Ferner wurde bereits über den biologischen Abbau von 2,4-Bis-alkylamino-6-chlor-s-triazinen zu Ammelid berichtet (J. Agr. Food Chem. 13, 369 [1965]).

Der Abbau von Verunreinigungen, wie sie Abwasser von Anlagen zur Herstellung von Triazin-Herbiziden vorhanden
10 sind, führt also bei Anwendung der bisher bekannten, chemischen Methoden lediglich bis zur Cyanursäure. Nach dem vorgenannten biologischen Verfahren zum Abbau von 2,4-Bis-alkylamin-6-chlor-s-triazinen wird dagegen Ammelid als Endprodukt des Abbaus erhalten, was eine anschliessende
15 chemische Hydrolyse zur Cyanursäure notwendig macht.

Es ist ferner bekannt, dass Cyanursäure mikrobiologisch abgebaut werden kann. So ist beispielsweise in Arch. Microbiol. 67, 1–5 (1969) der Abbau von Cyanursäure durch Stämme der Pilzgattungen *Penicillium* und *Hormondendrum* beschrieben. Diese Pilze können Cyanursäure auf glucosehaltigem Mineralsalzmedium als einzige Stickstoffquelle
20 verwerten. Aus den experimentellen Angaben ergibt sich eine durchschnittliche Abbauleistung von etwa 0,7 bis 1,2 mg Cyanursäure pro g Trockengewicht und Stunde. In J. Environm. Qual. 4 (1), 134–319 (1975) ist der Abbau von Cyanursäure in sandigen Lehm Böden und in Kulturen be-
25 beschrieben. In Kulturen wurde innerhalb von 16 bis 32 Tagen ein 90 bis 96%iger Abbau der Cyanursäure durch *Stachybotrys chartarum* und *Hendersonula toruloides* beobachtet.

30 Nach den experimentellen Angaben beträgt die durchschnittliche Abbauleistung etwa 0,08 mg Cyanursäure pro g Trockengewicht und Stunde.

Es wurde auch bereits vorgeschlagen, Cyanursäure durch Bakterien abzubauen. So ist in der deutschen Offenlegungsschrift 2 521 842 ein anaerobes Verfahren zum Abbau von Cyanursäure beschrieben, das Bakterien aus Kläranlagenmaterial, aktivierten Schlamm aus Kläranlagen, natürlichen Wässern und Böden bei Temperaturen unter 50 °C verwendet. Aus den experimentellen Angaben ergibt sich eine
35 durchschnittliche Abbauleistung von etwa 0,24 bis 1,5 mg Cyanursäure pro g Trockengewicht und Stunde. Es sei in diesem Zusammenhang auch auf Appl. Microbiol. 28, 1004–1008 (1974) verwiesen, wo die gleichen Autoren ebenfalls über den anaeroben, bakteriellen Abbau von Cyanursäure berichten. Aus den hier gemachten Angaben ergibt sich eine durchschnittliche Abbauleistung von etwa 0,3 bis
45 2,4 mg Cyanursäure pro g Trockengewicht und Stunde.

Die vorgenannten Verfahren zum mikrobiellen Abbau von Cyanursäure sind für praktische Zwecke unbefriedi-
50 gend, da ihre Abbauleistung zu gering ist oder die Verfahren unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden müssen. Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, dass nur Cyanursäure abgebaut werden kann, während gleichzeitig vorhandenes Ammelin und Ammelid nicht abgebaut wird.

Es ist daher das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein aerobes, mikrobielles Verfahren zum Abbau von Cyanursäure bereitzustellen, das eine für praktische Zwecke ausreichende Abbauleistung besitzt, so dass die im Abwasser enthaltene
60 Cyanursäure schnell und vollständig abgebaut werden kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem das nach der Dealkylierung erhaltene, aus Cyanursäure, Ammelin und Ammelid bestehende Gemisch ohne vorherige Hydrolyse von
65 Ammelin und Ammelid zu Cyanursäure direkt mikrobiell abgebaut werden kann.

Es wurde nun gefunden, dass Pilze der Gattung *Sporothrix* Cyanursäure als einzige Stickstoffquelle verwerten

können, wobei die Cyanursäure zu Kohlendioxid abgebaut wird.

Das erfindungsgemässe Verfahren zum Abbau von Cyanursäure in Cyannursäure enthaltendem Abwasser ist daher dadurch gekennzeichnet, dass man das Cyanursäure enthaltende Abwasser unter aeroben Bedingungen mit Kulturen von Pilzen der Gattung *Sporothrix* in Kontakt bringt.

Als Pilze der Gattung *Sporothrix* kommen insbesondere Pilze der Art *Sporothrix schenkii* in Betracht. Besonders geeignete Stämme dieser Art sind CBS 472.48, CBS 539.36 und NRRL Y-11 307. Besonders geeignet ist der Stamm *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307.

Dieser Pilz wurde am 6.6.1978 beim USDA hinterlegt (Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois 61604).

Der Stamm *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307 wurde aus Klärschlamm von Abwässern von Anlagen zur Herstellung von Triazin-Herbiziden der Ciba-Geigy AG, Werk Kaisen, isoliert. Der zu den Fungi imperfecti gehörende Stamm kann morphologisch wie folgt beschrieben werden:

Wachstum auf Platten

Auf Mineralsalzmedium, dem 0,06 Gew.-% Ammoniumnitrat, 0,2 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 Gew.-% Glucose und 2 Gew.-% Agar zugefügt wurden, wächst der Pilz innerhalb von einem Tag bei 30 °C zu Kolonien von etwa 1 bis 2 mm Grösse aus. Nach 3 Tagen erreichen die Kolonien eine Grösse von etwa 6 bis 8 mm. Die Kolonien erscheinen anfangs glatt, werden aber bald samtig und feinkörnig strukturiert. Es können 2 Typen von Kolonien auftreten, nämlich Kolonien mit starker Luftmycelbildung und Kolonien mit schwacher Luftmycelbildung. Die Kolonien mit schwacher Luftmycelbildung sind von blass gelboranger bis gelbbrauner Farbe, ziemlich glatt und schwach runzlig und zeigen einen auslaufenden Rand. Die Kolonien mit starker Luftmycelbildung zeigen weissliche, kegelförmige Luftmycel-Strukturen.

Es ist keine spezifische Geruchsstoffbildung festzustellen.

Der Stamm wächst morphologisch im Agar als relativ schwach verzweigtes Mycel mit meist geradlinig verlaufenden Haupthyphen und oft fast senkrecht abzweigenden Nebenhyphen. Die Hyphen weisen eine Dicke von 1 bis 2 (bis 3) µm auf. Die konidiogenen Hyphen treten zerstreut auf und entstehen orthotropisch von undifferenzierten Hyphen. Sie sind linear und von unterschiedlicher Grösse, in der Nähe der Basis breiter und gegen das Ende auslaufend. Sie sind meist etwa 10 bis 40 µm lang und etwa 2 bis 4 µm breit. Apikal werden Konidien meist an einem bis mehreren konidientragenden, cylindrischen Dentikeln durch sympodiales Wachstum abgeschnürt. Die Konidien sind hyalin, glatt- und dünnwandig, länglich ellipsoid-eiförmig bis fast fadenförmig und meist 2–6 × 1,5–3 µm gross.

Wachstum in Submerskultur

In Submerskultur unter Verwendung von Mineralsalzmedium dem 0,06 Gew.-% Ammoniumnitrat, 0,2 Gew.-% Hefeextrakt und 0,5 Gew.-% Glucose zugesetzt wurden, wächst der Pilz hyalin und blass beige-orange oder leicht bräunlich, mit Hyphen von etwa 1 bis 3 µm Dicke. Konidiogene Zellen treten vereinzelt, jedoch meist häufig auf. Die Konidienbildung ist sehr stark. Es ist auch Sekundärkonidienbildung zu beobachten. Die Morphologie der Hyphen, der konidiogenen Zellen und der Konidien in Submerskultur ist dem auf Agarplatten beobachteten Wuchstyp sehr ähnlich.

Der erfindungsgemässe Abbau der im Abwasser vorhandenen Cyanursäure mit Pilzen der Gattung *Sporothrix* kann in verschiedener Weise durchgeführt werden, nämlich

- a) mit wachsenden Zellen,
- b) mit ruhenden Zellen

- c) mit immobilisierten Zellen und
- d) mit immobilisierten, aus Kulturen von Pilzen der Gattung *Sporothrix* hergestellten Enzympräparaten.

Die erfindungsgemäss zu verwendenden Pilze der Gattung *Sporothrix* werden zunächst auf einem geeigneten Basis-Medium gezüchtet und dann dem Abwasser zugesetzt. Ein geeignetes Basis-Medium ist beispielsweise wie folgt zusammengesetzt:

Kaliumdihydrogenphosphat	0,30 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat-dodecahydrat	2,00 g/l
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,05 g/l
Calciumchlorid-Dihydrat	0,05 g/l
Diverse Spurenelemente	3,4 mg/l

Das Basis-Medium wird nach Zugabe von 0,5 Gew.-%

- Glucose oder Saccharose zum Züchten der Pilze verwendet.

Die einzelnen, obengenannten Methoden a) bis d) zum Abbau von Cyanursäure mit Pilzen der Gattung *Sporothrix* werden wie folgt durchgeführt:

- a) Abbau von Cyanursäure mit wachsenden Zellen

Der Abbau von Cyanursäure mit wachsenden Zellen wird in der Weise durchgeführt, dass man das Abwasser mit einem Pilz der Gattung *Sporothrix* animpft. Dabei müssen im Einzelfall nötigenfalls Phosphate und weitere Kohlenstoff- und Stickstoffquellen beigelegt werden, um ein gutes Wachstum des Pilzes zu gewährleisten. Geeignete Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie z. B. Glucose, Saccharose oder Melasse. Geeignete Stickstoffquellen sind Stickstoffverbindungen, wie Ammoniumnitrat, Harnstoff, Biuret, Natriumnitrat und Ammoniumchlorid. Die spezifische Abbauleistung ist am besten, wenn Cyanursäure als einzige Stickstoffquelle dient.

- b) Abbau von Cyanursäure mit ruhenden Zellen

Der verwendete Pilz wird auf einen geeigneten Basis-Medium vorgezuchtet, das als einzige Stickstoffquelle Cyanursäure und als Kohlenstoffquelle einen Zucker, beispielsweise Glucose, Saccharose oder Melasse, enthält. Der so gezüchtete Pilz wird geerntet und dem cyanursäurehaltigen Abwasser zugesetzt.

- c) Abbau von Cyanursäure mit immobilisierten Zellen

Der wie unter b) beschriebene vorgezuchtete Pilz wird auf einen geeigneten Träger, auf dem er durch chemische oder physikalische Bindung fixiert werden kann, gebracht. Geeignete Träger sind beispielsweise Polyacrylamid-Gele, wie z. B. N,N'-Methylen-bis-acrylamid und Diacrylamiddimethyläther, sowie N',N'-Diallyltartardiamid. Der mit dem Pilz beladene Träger wird dann mit dem cyanursäurehaltigen Abwasser, beispielsweise in einer Kolonne, in Kontakt gebracht. Diese Arbeitsweise kommt insbesondere für die kontinuierliche Durchführung des Verfahrens in Betracht.

- d) Abbau von Cyanursäure mit Enzym-Präparaten

Der wie unter b) vorgezuchtete Pilz wird geerntet und nach üblichen Methoden, beispielsweise durch Ultraschall oder French-Press aufgeschlossen. Das so gewonnene Enzym-Präparat wird auf einem geeigneten Träger fixiert, wobei als Träger Silica Gel, DEAE-Sephadex und durch Bromcyan aktivierte Cellulose in Betracht kommen. Der mit dem Enzym-Präparat beladene Träger wird dann, beispielsweise in einer Kolonne, mit dem cyanursäurehaltigen Abwasser in Kontakt gebracht. Diese Arbeitsweise kommt ebenfalls für die kontinuierliche Durchführung des Verfahrens in Betracht.

Der erfindungsgemässe Abbau von Cyanursäure unter Verwendung eines Pilzes der Gattung *Sporothrix* kann bei

Temperaturen von 5 bis 35 °C, vorzugsweise 25 bis 35 °C, durchgeführt werden. Der Abbau mit wachsenden Zellen gemäss Variante a) wird vorteilhaft bei 20 bis 35 °C, vorzugsweise bei 30 °C, durchgeführt.

Der Salzgehalt des zu reinigenden Abwassers ist nicht kritisch. Beispielsweise beeinträchtigen 2 Gew.-% Natriumchlorid die Abbauleistung nicht. Die Konzentration von Cyanursäure kann bis zu 0,3 Gew.-% (Löslichkeitsgrenze) betragen. Die Anwesenheit anderer Triazinverbindungen stört die Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens nicht.

Wenn das zu reinigende Abwasser neben Cyanursäure noch Ammelin und Ammelid enthält, besteht eine vorteilhafte Variante des erfindungsgemässen Verfahrens darin, dass man für den Abbau dieser Verbindungen neben einem Pilz der Gattung *Sporothrix* einen zweiten Mikroorganismus verwendet, der mit dem Pilz verträglich ist und der den Abbau von Ammelin und Ammelid zu Cyanursäure bewirkt. Ein geeigneter Mikroorganismus dieser Art ist Bakterium NRRL B-11 308.

Es wurde am 6.6.1978 beim USDA hinterlegt (Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois 61604).

Dieses Bakterium ist mit Pilzen der Gattung *Sporothrix* verträglich und zur Bildung von Mischkulturen befähigt.

Der Bakterienstamm NRRL B-11 308 wurde aus Klärschlamm von Abwässern von Anlagen zur Herstellung von Triazin-Herbiziden der Ciba-Geigy AG, Werk Kaisten, Schweiz, isoliert und bisher nicht näher identifiziert. Es handelt sich vermutlich um ein gramnegatives Bakterium. Der Wachstumstest auf «Oxi/Ferm-Tubes» bzw. «Entero Tubes» (Hoffmann-La Roche & Co., Basel) ergab nur bei Harnstoff und Zitrat eine positive Reaktion, d. h. der Stamm ist fähig, Harnstoff zu spalten und Zitrat zu verwerten. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Stamm auf Glucose gut, auf Saccharose jedoch sehr schlecht wächst. Als gute Stickstoffquellen dienen Ammoniumnitrat, N-Äthylharnstoff, Harnstoff und Biuret, während auf Barbitursäure und Uracil nur sehr schlechtes Wachstum festzustellen ist. Der Stamm kann morphologisch wie folgt beschrieben werden:

Wachstum auf Platten

Auf Mineralsalzmedium, dem 0,06 Gew.-% Ammoniumnitrat, 0,2 Gew.-% Hefeextrakt, 0,5 Gew.-% Glucose und 2 Gew.-% Agar zugesetzt wurden, wächst der Stamm bei 30 °C innerhalb von einem Tag zu Kolonien von 0,5 bis 1 mm Grösse. Nach 3 Tagen erreichen die Kolonien eine Grösse von 3 bis 5 mm. Die Kolonien zeigen orange-beige Farbe und einen scharf begrenzten Rand. Sie sind nicht strukturiert und erscheinen leicht gewölbt, glatt, glänzend und wässrig. Diese Eigenschaften verändern sich im Verlauf des Kolonienwachstums kaum.

Als besonders geeignet zur Reinigung von Abwässern, die neben Cyanursäure Ammelin und Ammelid enthalten, hat sich die von *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307 und *Pseudomonas* sp. 123 B NRRL B-11 308 gebildete Mischkultur erwiesen.

Das erfindungsgemässe Verfahren zeichnet sich gegenüber bekannten, mikrobiellen Verfahren zum Abbau von Cyanursäure durch eine wesentlich verbesserte Abbauleistung aus. So werden bei Verwendung von Pilzen der Gattung *Sporothrix* Abbauleistungen von 20 bis 30 mg Cyanursäure pro g Trockengewicht und Stunde erreicht. Durch diese Abbauleistung werden kurze Behandlungszeiten ermöglicht. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass durch Verwendung von Mischkulturen auch Abwässer gereinigt werden können, die neben Cyanursäuren noch Ammelin und Ammelid enthalten. Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens besteht

schliesslich darin, dass wohohl die Pilze der Gattung *Sporothrix* als auch das *Pseudomonas* sp. 123 B NRRL B-11 308 Nitrat- und Ammoniumionen als Stickstoffquelle verwerten und aus dem Abwasser entfernen.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Abbau von Cyanursäure zu Kohlendioxid mit wachsenden Zellen von *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307

Eine einer stationären Kultur entnommene Probe des Stammes *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307 wurde in Basis-Medium der Zusammensetzung

Kaliumdihydrogenphosphat	0,30 g/l
Dinatriumhydrogenphosphat-dodecahydrat	2,00 g/l
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,05 g/l
Calciumchlorid-Dihydrat	0,05 g/l
Diverse Spurenelemente	3,4 mg/l

eingimpft, das 0,5 Gew.-% Glucose und 1000 ppm ¹⁴C-

markierte Cyanursäure enthält. In Abständen von einer Stunde wurden Proben entnommen, in denen die relative Pilzmenge durch Messung der optischen Dichte (OD 546 nm) und die Menge der restlichen Cyanursäure durch Dünnschichtchromatographie und radioaktive Bilanzierung bestimmt wurde.

Die Versuchsergebnisse sind im Diagramm der Zeichnung I dargestellt, wobei sich die durchgezogene Kurve auf die spezifische Abbauleistung und die gestrichelte Kurve auf das Wachstum, ausgedrückt durch die optische Dichte bei 546 nm bezieht.

Der Versuch wird unter Verwendung von 200 ppm ¹⁴C-markierter Cyanursäure und zusätzlich 600 ppm Ammoniumnitrat wiederholt. Auch die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind im Diagramm der Zeichnung I dargestellt, wobei sich wiederum die durchgezogene Kurve auf die spezifische Abbauleistung und die gestrichelte Kurve auf das Wachstum, ausgedrückt durch die optische Dichte bei 546 nm, bezieht.

Beispiel 2

Abbau von Ammelin zu Cyanursäure durch Bakterium NRRL B-11 308

Eine Probe des Bakteriums NRRL B-11 308 wird auf einem Vollmedium, bestehend aus einem Basismedium der in Beispiel 1 gegebenen Zusammensetzung, Glucose (1 Gew.-%) und Hefeextrakt (0,5 Gew.-%) mit 20 ppm Ammelin wachsgelassen. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (OD 546 nm=20.0) werden der Kultur 5 ppm ¹⁴C-markiertes Ammelin zugegeben. Anschliessend werden der Kultur stündlich Proben entnommen, in denen die Metabolitenverteilung durch Dünnschichtchromatographie bestimmt wurde.

Die Versuchsergebnisse sind in dem Diagramm der Zeichnung II dargestellt.

Beispiel 3

Abbau von Ammelin zu CO₂ mit Mischkulturen der Stämme *Sporothrix schenkii* NRRL B-11 307 und Bakterium NRRL B-11 308

Die Stämme *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307 und Bakterium NRRL B-11 308 werden auf einem Vollmedium, das aus dem in Beispiel 1 angegebenen Basismedium 1 Gew.-% Glucose und 0,5 Gew.-% Hefeextrakt besteht, wachsgelassen und mit dem gleichen Medium auf eine optische Dichte OD 546 nm von 1 verdünnt. Von der erhaltenen Mischung wird für die Überimpfung eine Mischreihe hergestellt, in der der Anteil von Bakterium NRRL B-11 308 in Schritten von 10% von 100% auf 0% abnimmt und korre-

spondierend dazu der Anteil von *Sporothrix schenkii* NRRL Y-11 307 von 0 auf 100% zunimmt. Die erhaltenen Einzelmischungen werden dann auf frisches Nährmedium übergeimpft, das 2,5 ppm ^{14}C -markiertes Ammelin enthält, wo-

bei die Impfmengung einem Zehntel der erhaltenen Kultur entspricht. Nach 2 Tagen wird die restliche Radioaktivität der einzelnen Mischungen bestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt.

% Bakt. NRRL B-11308	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
% <i>Sporothrix schenkii</i>											
NRRL Y-11307	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
% restl. Radioaktivität	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100

638 470

2 Blatt Blatt 1



