

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 253 045 B1

5(51) C 12 Q 1/02
C 12 Q 1/54
C 12 N 11/08
G 01 N 33/18

PATENTAMT der DDR

(21)	WP C 12 Q / 293 435 8	(22)	05.08.86	(45)	05.09.90
				(44)	06.01.88

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Riedel, Klaus, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Renneberg, Reinhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem.; Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Liebs, Peter, Dr. sc. Dipl.-Biol.; Ritter, Edit; Scheller, Frieder, Prof. Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem.; Lange, Klaus-Peter, Dipl.-Biol.; Ott, Peter, Dr.-Ing.; Dipl.-Ing., DD

(54) Verfahren zur Sofortbestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB)

ISSN 0433-6461

4 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Sofortbestimmung des „Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB)“ von komplex zusammengesetzten Medien, vorzugsweise Abwasser, mittels mikrobiologischer Sensoren durch Messung der Stromänderung pro Zeiteinheit, **gekennzeichnet dadurch**, daß die für den Sensor benutzten Mikroorganismen durch einmalige Inkubation des gesamten Sensors in dem zu untersuchenden Medium adaptiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mikroorganismen reine Mikroorganismenkulturen sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kurzzeitbestimmung des BSB und der Respirationsrate von Mikroorganismen, zur Bestimmung der Summenkonzentration biologisch abbaubarer organischer Substanzen sowie zur Ermittlung des Gehaltes von spezifischen organischen Inhaltsstoffen von Stoffgemischen in wäßriger Phase und zur Ermittlung der Hemmwirkung von Beimischungen auf die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen. Anwendungsgebiet ist die Kontrolle und Steuerung biotechnologischer Prozesse, insbesondere der Abwasserbehandlung, Fermentation und des Umweltschutzes.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Der „Biochemische Sauerstoffbedarf“ (BSB; engl. BOD = biochemical oxygen demand) ist einer der meist benutzten Tests zur Kontrolle der Abwasserqualität und gibt die für den Abbau organischen Materials durch Mikroorganismen verbrauchte Sauerstoffmenge an.

Der konventionelle Test benötigt einen Zeitaufwand von 5 Tagen (BSB₅) und ist damit für eine Kontrolle und Steuerung von Abwasserreinigungsprozessen nicht geeignet. Der Einsatz von Biosensoren, die eine Kombination von fixierten Mikroorganismen mit einer Sauerstoffelektrode darstellen, brachte einen wesentlichen Fortschritt in der BSB-Bestimmung (GB 1586291). Die Bestimmungszeit liegt zwischen 5–20 min.

Geeignet für einen mikrobiologischen BSB-Sensor sind alle Mikroorganismen, die organisches Material unter Sauerstoffverbrauch abbauen. Die für den BSB-Sensor ausgewählten Mikroorganismen werden in der üblichen Weise kultiviert und nach Immobilisierung zur Präparation des Sensors eingesetzt.

Die Wirksamkeit und Genauigkeit des Sensors hängt von der Potenz der eingesetzten Mikroorganismen ab, die im Abwasser vorhandenen organischen Verbindungen oxydativ abzubauen. Im allgemeinen nutzen aber Mikroorganismen nur die Substrate, die sie unbedingt zur Aufrechterhaltung des Metabolismus benötigen. Die Voraussetzungen hierfür werden in der Anzucht der Zellen gelegt. Die bisher entwickelten mikrobiologischen Sensoren zur BSB-Bestimmung berücksichtigen diesen Aspekt nicht, d. h. es werden die für den Sensor eingesetzten Mikroorganismen in Grundmedien, die Peptone, Glukose und einige Salze enthalten, angezogen. Die mit diesen Mikroorganismen präparierten Sensoren reagieren im wesentlichen nur auf die während der Anzucht vorhandenen Substrate. Andere werden nicht oder kaum angezeigt, da die entsprechenden Transport- und Abbausysteme fehlen. Es können also nicht alle im Abwasser enthaltenen organischen Substrate erfaßt werden. Voraussetzung für eine hohe Genauigkeit des BSB-Sensors ist aber die Erfassung aller organischen Bestandteile des Abwassers, die biologisch abgebaut werden können.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, biotechnologische Prozesse durch kurzfristige Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs und der Respirationsrate von Mikroorganismen effektiver zu gestalten, Elektroenergie zum Sauerstoffeintrag einzusparen und die Wirkung toxischer Stoffe in Havariefällen zu begrenzen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, mittels eines mikrobiologischen Sensors den vollständigen biochemischen Sauerstoffbedarf für unterschiedliche, komplex zusammengesetzte wäßrige Medien, wie z. B. verschiedene Abwässer oder Fermentationslösungen, in einer Zeitspanne von weniger als 2 min durch die Messung der Beschleunigung der Respirationsrate zu bestimmen, den qualitativen Nachweis des Gehaltes an spezifischen organischen Substraten zu ermöglichen sowie die Hemmwirkung von Beimischungen auf die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen zu ermitteln.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein mikrobiologischer Sensor mit dem jeweils zu bestimmenden Medium 1–2 Tage inkubiert wird. Die damit erreichte Adaption der Mikroorganismen führt dazu, daß die für die Aufnahme der organischen Bestandteile des wäßrigen Mediums notwendigen Transportsysteme und die für den oxydativen Abbau der zu untersuchenden Substrate benötigten Enzymgarnituren optimal ausgeprägt werden. In Verbindung mit einer schonenden Immobilisierung der Mikroorganismen wird dadurch die Voraussetzung für eine hohe Reaktivität des mikrobiologischen Sensors für das adaptierte Medium geschaffen, wodurch es möglich wird, diesen für wiederholte Bestimmung des Wertes der ersten Ableitung der Funktion der Respirationskurve durch die Messung der Beschleunigung der Respirationsrate nach Dosierung des

zu bestimmenden Mediums als Stromänderung pro Zeiteinheit anzuwenden und damit sofort eine Meßgröße für den vollständigen BSB zu erhalten und/oder gleichzeitig durch Vergleich mit Eichkurven den qualitativen Nachweis des Gehaltes an spezifischen organischen Substraten und/oder die Hemmwirkung von Beimischungen auf die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen zu ermitteln.

Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß für die zu untersuchenden Medien ohne Verdünnung oder andere Aufschlüsse sofort eine für die Steuerung von Bioreaktoren oder die Verhinderung von Schädigungen bei Havarien notwendige Bestimmung aller von Mikroorganismen assimilierbaren organischen Bestandteile, die Kinetik deren Abbaus und/oder die Beschleunigung oder Verzögerung von Beimischungen auf die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen sowie gleichzeitig der qualitative Nachweis des Gehaltes an spezifischen organischen Substanzen möglich wird. Neben der optimalen Einflußnahme auf die Stoffwechselprozesse bei Bioreaktoren wird eine Verringerung des Energieaufwandes durch Steuerung der Sauerstoffzufuhr z.B. in Belebungsbecken von Kläranlagen erreicht. Die Erfindung wird nachstehend an Beispielen erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Zur BSB-Bestimmung stärkehaltiger Abwasser werden *B. subtilis*-Zellen eingesetzt, die in einem stärkehaltigen Medium kultiviert werden (200 ml stärkehaltiges Abwasser, 5 g Casamino acids, 5 g Ammoniumchlorid ad 1 l 0,15 M Phosphatpuffer pH 6,0). Die Zellen werden nach 18–20stündiger Kultivierung auf Rotationsschüttlern bei 30°C zu Beginn der stationären Phase geerntet, abzentrifugiert und im Phosphatpuffer pH 6,8 resuspendiert. 500 µl dieser 10 mg Trockengewicht enthaltenden Suspension werden mit 500 µl einer 10%igen Polyvinylalkohollösung gemischt und zu einer Fläche ausgestrichen. Nach Immobilisierung bei 4°C wird ein Stück Folie (2 mm × 2 mm) auf die Polyäthylenmembran einer Sauerstoffelektrode plaziert und durch eine Dialysemembran meßseitig abgeschlossen. In einer gerührten, bei 30°C temperierten Meßzelle mit 2,5 ml 0,1 mol. Phosphatpuffer pH 6,8 werden die zu untersuchenden Proben gegeben. Mittels eines Meßverstärkers wird bei –600 mV die Änderung der Stromstärke pro Zeiteinheit nach Dosierung der Probe gemessen. Diese Änderungsgeschwindigkeit wird nach Eichung des Sensors mit einer Glukose- (150 mg/l)-Glutaminsäure-Lösung (150 mg/l) als Maß für den BSB genutzt. Ein 2. Sensor wurde entsprechend obiger Beschreibung präpariert, aber mit *B. subtilis*-Zellen, die in einem Glukose enthaltenden Medium kultiviert wurden (gleiches Medium wie oben, aber anstelle des Stärkeabwassers mit 20 g Glukose). Dieser Sensor wurde direkt und nach einer 2tägigen Inkubation mit dem o.g. stärkehaltigen Medium in der Meßzelle zur BSB-Bestimmung genutzt.

In Tabelle 1 sind die mit den beschriebenen Sensorvarianten ermittelten BSB-Werte von stärkehaltigem Abwasser im Vergleich zum konventionellen BSB₅-Test zusammengestellt:

Tabelle 1

Bestimmung des BSB (mg/l) stärkehaltiger Abwasser mit *B. subtilis*-Sensoren

Abwasserprobe	BSB ₅ mg/l	BSB-Sensor		
		Stärke-Anzucht	Glukose-Anzucht	Glukose-Anzucht + Inkubation mit Stärke
Probe 1	5 300	5 500	2 500	5 400
Probe 2	6 100	6 200	2 800	6 000

Beispiel 2

Zur Bestimmung des BSB von alkoholhaltigen Abwässern werden Sensoren mit *Candida boidinii*, die kultiviert wurden im folgenden Medium: Pepton 0,5%, Hefeextrakt 0,5% und Glukose 1% genutzt.

Die Immobilisierung der Hefen und die Präparation der Sensoren sowie die Meßprocedure entsprechen der im Beispiel 1 beschriebenen Art und Weise.

Tabelle 2 gibt die mit den verschiedenen Sensortypen ermittelten BSB-Werte der untersuchten alkoholhaltigen Abwasserproben wieder.

Tabelle 2

Bestimmung des BSB (mg/l) alkoholhaltiger Abwasser mit *Candida-boidinii*-Sensoren

Abwasserprobe	BSB ₅	BSB-Sensor		
		Alkohol-Anzucht	Glukose-Anzucht	Glukose-Anzucht + Inkubation mit Alkohol
1	9 800	9 750	500	9 300
2	8 600	8 800	450	8 500

Beispiel 3

Trichosporon cutaneum-Zellen werden 36h in einem Peptonmedium (Pepton 0,5%, Malzextrakt 0,5%, Hefeextrakt 0,5%, Glukose 1%) kultiviert. Die Immobilisierung und die Präparation der Sensoren werden, wie im Beispiel 1 beschrieben, vorgenommen. Zur BSB-Bestimmung verschiedener Abwasser werden folgende, durch Vorinkubation modifizierte Trichosporon cutaneum-Sensoren eingesetzt:

- unbehandelt
- 24h mit stärkehaltigem Abwasser in der Meßzelle inkubiert
- 24h mit alkoholhaltigem Abwasser in der Meßzelle inkubiert.

Tabelle 3 demonstriert die mit den modifizierten BSB-Sensoren ermittelten BSB-Werte.

Tabelle 3

Bestimmung des BSB (mg/l) verschiedener Abwasser mit unterschiedlich vorbehandelten Trichosporon-cutaneum-Sensoren

Abwasser	BSB ₅	Trichosporon-cutaneum-Sensor		
		unbehandelt	Vorbehandlung mit stärkehaltigem Abwasser	Vorbehandlung mit alkoholhaltigem Abwasser
stärkehaltiges Abwasser	6 100	770	6 200	500
alkoholhaltiges Abwasser	8 600	470	500	8 500

Beispiel 4

Der im Beispiel 1 beschriebene Sensor mit *B. subtilis* wird zur Untersuchung toxischer Abwasser genutzt. Hierzu wurden Modellsysteme eingesetzt, in denen zu einer Glukose-Glutaminsäuremischung (150mg Glukose und 150 mg Glutaminsäure pro l), die international als BSB-Standard Verwendung findet, Dinitrophenol bzw. Chlormercuribenzoat addiert wurde, wonach die Verminderung der Beschleunigung der Respiration im Vergleich zur Kontrolle erfaßt wurde. Der Hemmeffekt der gewählten Inhibitoren ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4

Untersuchung der toxischen Wirkung von Abwassern am Beispiel eines Modellsystems

	BSB (mg/l)	Hemmung (%)
Glukose-Glutaminsäure-Mischung (Kontrolle)	550	
toxisches Abwasser (Glukose-Glutaminsäure-Mischung + Dinitrophenol (0,05 mM))	270	50
toxisches Abwasser (Glukose-Glutaminsäure-Mischung + Chlormercuribenzoat 0,1 mM)	200	64