



SCHWEIZERISCHE Eidgenossenschaft
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ **CH 685 246 A5**

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-Liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑥① Int. Cl.⁶: C 12 N 1/20
C 12 N 1/14
C 02 F 3/34
C 12 S 13/00

// (C 12 N 1/20, C 12 R 1:40)
(C 12 N 1/14, C 12 R 1:645)

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑲ Gesuchsnummer:	3789/93	⑦③ Inhaber: Ludwig Bartl, Konstanz (DE) Josef Felber, Zürich Dana Horakova, Brno (CZ) Miroslaw Nemecek, Ceska (CZ)
⑳ Anmeldungsdatum:	13.04.1993	⑦② Erfinder: Horakova, Dana, Brno (CZ) Nemecek, Miroslaw, Ceska (CZ)
⑳ Priorität(en):	15.04.1992 CZ 1157-92	⑦④ Vertreter: Felber & Partner AG, Patentanwälte, Zürich
㉔ Patent erteilt:	15.05.1995	⑧⑥ Internationale Anmeldung: PCT/EP 93/00897 (De)
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.05.1995	⑧⑦ Internationale Veröffentlichung: WO 93/21348 (De) 28.10.1993

⑤④ **Gemisch von Mikroorganismen, dessen Verwendung zur Biodegradation von Kohlenwasserstoffen, sowie Verfahren zu seiner Applikation.**

⑤⑦ Das Gemisch von natürlichen Mikroorganismen bewirkt eine Biodegradation des Erdöls und der Erdölprodukte. Es enthält *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl 5:1 bis 1:1. Das Gemisch induziert man durch Kultivierung in Gegenwart von Ölsäure. Nachfolgend wirkt man mit ihm auf Kohlenwasserstoffe unter Zufuhr von Sauerstoff sowie in Anwesenheit von Stimulationsstoffen bei einem pH von 4,5 bis 7,5 und bei einer Temperatur von 5°C bis 35°C.



Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Gemisch von einzelnen, in der Natur vorkommenden Mikroorganismen, das in seiner Zusammensetzung Kohlenwasserstoffe biologisch degradieren kann. Bei den Kohlenwasserstoffen ist dabei besonders an Erdöl, seine verschiedenen Derivate, sowie an Erdölprodukte gedacht. Im weiteren bezieht sich die Erfindung auch auf die Verwendung des Gemisches zur Biodegradation von Kohlenwasserstoffen. Schliesslich gibt die Erfindung spezielle Verfahren zur Kultivierung und Applikation des Gemisches für die Biodegradation von ölverschmutzten Böden und Gewässern an.

Das Interesse an der gezielten Nutzung von Mikroorganismen für die biologische Degradation von Erdöl, seiner Derivate und Produkte hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Schon im Jahre 1903 wurden die ersten Organismen beschrieben, welche Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzten. Gegenwärtig sind mehr als 40 Mikroorganismen-Gattungen bekannt, welche die aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffe im Zuge einer biologischen Degradation nutzen. Diese Organismen wurden aus den Ozeanen, aus Süsswasser-Gewässern sowie aus dem Boden isoliert.

Die Anzahl der Bakterien und der Pilze, die fähig sind, Erdöl-Kohlenwasserstoffe biologisch zu degradieren, steigt nach Erdölhaverien lokal steil an. Diese Stoffe treten in bedeutendem Mass als Selektionsgas auf.

Vom genetischen Gesichtspunkt her gesehen ist es einsehbar, dass die Fähigkeit eines Grossteils von Mikroorganismen, die Erdölkohlenwasserstoffen zu degradieren, von Plasmid kontrolliert wird. Durch den Nachweis der Übertragung von Plasmid wurde es auch möglich, den steilen Anstieg der Anzahl degradierender Organismen zu erklären.

Das Erdöl als Substrat für Mikroorganismen stellt ein extrem komplexes Gemisch von Kohlenwasserstoffen dar. Die saturierte Erdölfraction umfasst n-Alkane, verzweigte Alkane und Zyklalkane. Die Biodegradation der n-Alkane bis C₄₄ wird am häufigsten von der monoterminalen Attacke unter Entstehung von Karbonsäuren verwirklicht, die weiterhin durch β -Oxidation abgebaut werden. Dieser Prozess kann jedoch eine Akkumulierung mancher mehr oder weniger toxischer Fettsäuren herbeiführen.

Die verzweigten isoprenoiden Alkane werden durch w-Oxidation unter Entstehung von Dikarbonsäuren abgebaut. Gegen eine Biodegradation sind die terminal verzweigten Alkane sehr widerstandsfähig. Sie blockieren die β -Oxidation und haben die Tendenz, sich im Milieu zu kumulieren. Nach der spontanen Degradation einer Erdölverunreinigung kommt es häufig zum Entstehen tripentazyklischer Verbindungen, die im Milieu persistent sind. Daraus geht hervor, dass die qualitative Zusammensetzung des Erdöls und der Erdölprodukte ihre Degradabilität bedeutend beeinflusst.

Bei dem Metabolismus der Erdölkohlenwasserstoffe spielen zwei weitere Prozesse eine bedeutsame Rolle – die Kooxidation und Prolongation. Manche Erdölkomponenten, die nach etablierter Meinung der Fachwelt nicht abbaubar sind, können nämlich von Mikroorganismen in Gegenwart anderer Kohlenwasserstoffe, welche das Wachstum von Mikroorganismen ermöglichen, degradiert werden. Der Degradationsprozess des erfindungsgemässen Gemisches von Kohlenwasserstoffen, bedingt durch Kooxidationsprozesse, ist deshalb keinesfalls vergleichbar mit der Fähigkeit der Reinkulturen, die einzelnen Kohlenwasserstoffe zu degradieren.

Die Geschwindigkeit einer mikrobiellen Degradation der Erdölkohlenwasserstoffe wird von einer ganzen Reihe von Faktoren beeinflusst, welche direkt oder indirekt auf das Wachstum und den Metabolismus der mikrobiellen Population einwirken. Als bedeutsam zeigt sich der physikalische Zustand der Kohlenwasserstoffe, weil die Kohlenwasserstoffe an der «Trennlinie» Wasser-Kohlenwasserstoff am intensivsten degradiert werden. Zu den weiteren abiotischen Faktoren gehören die Temperatur und die zur Verfügung stehenden Nährstoffe. Die meisten heterotrophen Mikroorganismen sind fähig, Kohlenwasserstoffe in einem breiten Temperaturbereich von 0°C bis 70°C zu degradieren. Die Temperatur beeinflusst nicht nur die Geschwindigkeit, mit welcher die Degradation verläuft, sondern vor allem auch den physikalischen Zustand der Kohlenwasserstoffe, was in enger Verbindung zum selektiven Druck der Temperatur auf die mikrobiellen Gemeinschaften steht, die das Oekosystem bilden. Bei der komplexen Bewertung muss die Temperatur zusammen mit anderen Faktoren berücksichtigt werden, jedoch muss sie keineswegs als limitierender Faktor auftreten.

Die Geschwindigkeit der Degradation von Erdölprodukten wird in bedeutendem Ausmass von der Anwesenheit von Stickstoff und Phosphor beeinflusst, welche gemeinsam mit kohlenstoffhaltigen Spaltstoffen in die Biomasse eingebaut sind. Die optimalen Mengenverhältnisse zwischen dem Kohlenstoff und dem Stickstoff einerseits und dem Kohlenstoff und dem Phosphor andererseits hängen von der qualitativen Zusammensetzung des Erdöls oder der Erdölprodukte und den abiotischen Faktoren des Milieus ab. Stickstoff und Phosphor sind auch die üblichen Komponenten der «Stimulatoren», welche die Biodegradationsprozesse stimulieren.

Für die gewerbliche Anwendbarkeit von Mikroorganismen im Zuge der Sanierung von kontaminierten Böden oder Gewässern spielt die Abbaurate sowie die Qualität der Degradation eine herausragende Rolle. Um diese Abbaurate zu beschleunigen, unterscheidet man nach drei Hauptkategorien:

1. Fertilisation: Hierbei beschränkt man sich darauf, das Milieu für die im kontaminierten Boden oder Gewässer inherenten Mikroorganismen zu optimieren. Man geht davon aus, dass in einem solchen verschmutzten Boden oder Gewässer öldegradierende Mikroorganismen ohnehin in ausreichender Qualität und Quantität vorhanden sind, und konzentriert sich deshalb darauf, hauptsächlich Stickstoff, Phosphor

und Kalium sowie gegebenenfalls einige Spurenelemente zuzugeben, sowie die Atmungsfähigkeit der vorhandenen, stets aeroben Mikroorganismen durch Zufuhr von Luft zu unterstützen. Hierfür kann der Boden regelmässig gelockert und gewendet werden, oder aber mittels Luftleitungen und Pumpen mit Luft versorgt werden. Oftmals wird ein mehrere Meter hoch aufgeschichteter Erdhaufen über ein System von durch ihn verlegten perforierten Rohren besaugt und bepumpt (Vakuum-Heap-System). Die Fachwelt verspricht sich von dieser Technik die grössten Erfolge, weil man insbesondere bei Ölfällen in Gewässern davon ausgeht, dass dort öldegradierende Mikroorganismen rasch in ausreichender Menge vorhanden sein werden, und die Degradation eher infolge der mangelnden Versorgung dieser Organismen mit Nahrung und Luft gehemmt wird.

2. Seeding: Als eigenständige Technik oder zusätzlich zu obengenannter Methode wird das Seeding als Technik angewendet. Darunter versteht man das Einbringen von zusätzlichen, öldegradierenden Mikroorganismen in das kontaminierte Material. Solche Präparate, die von verschiedenen Firmen in Umgebungen mit Erdölverschmutzungen eingesetzt werden, enthalten üblicherweise Organismen einer einzigen Art. Der Einsatz solcher Präparate ist für frische Verunreinigungen dort angebracht, wo im Milieu noch nicht Produkte des Metabolismus zugegen sind, welcher infolge der dort natürlicherweise vorhandenen Organismen abläuft. In der Fachwelt hat sich aber die Meinung etabliert, dass mit der zusätzlichen Einführung weiterer natürlicher Mikroorganismen nicht sehr viel zu gewinnen ist. Darüberhinaus neigt die Öffentlichkeit im allgemeinen zu Vorbehalten gegenüber der Transplantation von fremden Mikroorganismen, weil – zu recht oder zu unrecht –, deren unkontrollierbares Wachstum, begleitet von unliebsamen, allenfalls toxischen Nebenwirkungen, befürchtet wird.

3. GEM: Dieses ist eine Abkürzung für die englische Bezeichnung «Genetically Engineered Microorganismus», also genetisch manipulierte Mikroorganismen, welche besonders herausragende Qualitäten in bezug auf ihre Öl-Degradierungsfähigkeit aufweisen. Gegenüber dieser Technik bestehen die grössten Vorbehalte, sodass deren Anwendung wohl zunehmend beschränkt wird.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Gemisch von natürlichen Mikroorganismen anzugeben, welches eine bedeutend höhere Degradationsrate für Kohlenwasserstoffe in Böden und Gewässern aufweist sowie leicht kultivierbar und praktisch anwendbar ist. Weiter ist es eine Aufgabe der Erfindung, anzugeben, wie dieses Gemisch verwendet wird sowie ein Verfahren zur Kultivierung und Applikation anzugeben.

Diese Aufgabe wird gelöst von einem Gemisch von natürlichen Mikroorganismen für die Biodegradation von Kohlenwasserstoffen, insbesondere von Erdöl und Erdölprodukten, das sich dadurch auszeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 5:1 bis 1:1 enthält.

Für seine Verwendung im Zuge der Sanierung von kontaminierten Böden und Gewässern wird es bei einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 bis 7,5 und im Temperaturbereich von 5° bis 35°C in einer Menge von zwischen 1 bis 10 Gramm pro Liter appliziertes Anwendungspräparat eingesetzt. Pro m³ kontaminierter Boden werden etwa 5 bis 20 Liter Anwendungspräparat ein- oder mehrmals ausgebracht.

Das Verfahren zu seiner Verwendung besteht grundsätzlich im ein- oder mehrmaligen Besprühen der kontaminierten Masse mit in Wasser gelöstem Gemisch, wonach das Milieu in der kontaminierten Masse durch Zufuhr von Luft und Nährlösung nach der herkömmlichen Methode optimiert wird.

Die Erfindung geht grundsätzlich von der Erkenntnis aus, dass es entgegen der verbreiteten Ansicht von Fachleuten möglich ist, die Degradationsgeschwindigkeit von Erdölstoffen, wie sie durch die lokal natürlich vorhandenen Mikroorganismen-Gemeinschaften in einem bereits optimierten Milieu gegeben ist, durch das Inkorporieren von künstlich gezüchteten Gemeinschaften natürlicher Mikroorganismen, welche eine erhöhte Affinität zu den gegebenen Stoffen besitzen, entscheidend zu erhöhen.

Als sehr vorteilhaft erweist sich dabei die Applikation künstlich zusammengestellter und gezüchteter Gemeinschaften natürlicher Mikroorganismen, welche die Fähigkeit besitzen, in grösserem Ausmass Koordinationsprozesse zu nutzen und dadurch die Degradationsprozesse bedeutend beschleunigen und «qualitätsfördernd» auf sie wirken.

Das erfindungsgemässe Gemisch ermöglicht eine effektivere Nutzung des Substrates der Erdölstoffe durch eine Vereinigung bzw. ein Gemisch (Konsortium) von natürlichen Mikroorganismen. Das Wesentliche der Erfindung bildet ein Gemisch von Mikroorganismen, das die Mikroorganismen *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl 5:1 bis 1:1 enthält. Beide Organismen wurden aus der Umgebung der Erdölbohrung Hodonín in der Tschechischen Republik isoliert. Nach der Isolierung wurden die Mikroorganismen nicht mehr genetisch aufbereitet, sondern natürlich belassen.

Pseudomonas putida ist ein gebräuchliches Kontraminat des Bodens, des Wassers und der Pflanzen. Es kommt auch in der Umgebung von Krankenhäusern vor. Selten wird es aus klinischen Proben als opportun pathogen isoliert.

Geotrichum candidum andererseits ist ein übliches Kontaminat von Milch sowie von verschmutzten Wasser. Selten kommt es im klinischen Material als bedingt pathogen für Mensch und Tier vor.

Auch das Gemisch selbst ist weder toxisch noch pathologisch. Dieses wurde anhand umfangreicher wissenschaftlicher Tests nachgewiesen und ist zertifiziert.

Unter anderem wurde das Gemisch, nachfolgend stets BIOREM RC 1 genannt, in Flüssigform an 24 Kaninchen, 60 Mäuse und 30 Meerschweinchen in je 6 Gruppen im Rahmen eines Langzeitversuches teils intravenös injiziert, teils verfüttert. Dabei wurde folgendes wissenschaftlich nachgewiesen:

1. Es kam weder zu Gewichtsabnahmen noch zu akuten oder chronischen Erkrankungen irgendwelcher Art bei den behandelten Tieren.

2. Es wurde keine Veränderung im Benehmen der Tiere beobachtet wie zum Beispiel Appetitverlust, Gereiztheit oder Apathie.

5 3. In jeder Gruppe wurden makroskopische Veränderungen auf gewissen Organen untersucht, nämlich der Nieren, der Leber, der Lunge, der Lymphknoten und des Herzens. Es wurden keine pathologische oder toxikologische Veränderungen gefunden.

10 Die Art und Weise der Biodegradation von Kohlenwasserstoffen durch Verwendung dieses Gemisches der Mikroorganismen *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* beginnt damit, dass dieses Gemisch extern vermehrt wird und dass man es auf einem synthetischen Medium in Gegenwart von Ölsäure induziert. Hierauf wirkt man damit unter Zufuhr von Sauerstoff auf die zu degradierenden Kohlenwasserstoffe ein, in Gegenwart von Stimulationsstoffen, insbesondere von Stickstoff und Phosphor, eventuell von Spurenelementen, wobei das Verhältnis des Kohlenstoffes und des Stickstoffes während der Wirkung des Gemisches der vorangehend genannten Mikroorganismen im Bereich der Gewichtsverhältnisse 10 bis 100:1 erhalten wird.

15 Das optimale Milieu für eine Biodegradation der Kohlenwasserstoffe durch dieses Gemisch von Mikroorganismen ist der Erfindung nach ein Milieu mit einem pH von 4,5 bis 7,5 und einer Temperatur von 5° bis 35°C.

20 Für die Aufbereitung und Indikation des Gemisches von Mikroorganismen ist es nach der Erfindung angebracht, ein synthetisches Medium zu benutzen, das nur Phosphor und Stickstoff in löslicher Form, sowie Ölsäure enthält. Es ist vorteilhaft, den Ausgangs-pH-Wert des Kultivationsmediums im Bereich von 4,5 bis 7,5 zu wählen. Unter intensivem Durchlüften bei einer Temperatur von 20°C –25°C beträgt die Kultivationszeit 4–10 Tage, je nach den an die Dichte der bakteriellen Suspension gestellten Anforderungen. Das Präparat kann dann einer Lyophilisierung oder einer Trocknung unterzogen werden oder man kann es nach Wasserentzug in einem Gel verankern.

25 Das Präparat kann man nach der Methode «ex situ» oder «in situ» durch Aufspritzen auf kontaminierten Boden benützen oder durch Inokulieren in eine kontaminierte Wasserquelle, eventuell in durch Erdölstoffe kontaminiertes Wasser unter gleichzeitigem Hinzufügen eines metabolischen Stimulators. Die Methode bietet auch die Möglichkeit, einen mit synthetischem Milieu, einem Stimulator und kontaminierten Wasser gefüllten Fermentor zu nutzen. Das mikrobielle Gemisch wird in der Menge hinzugefügt, die der optischen Densität bei 620 nm (OD_{620}) im Bereich von 0,60 bis 1,90 entspricht. Der pH-Wert des Milieus wird in den Grenzen pH = 4,5 bis 7,5 gehalten. Der Degradationsprozess verläuft unter aeroben Bedingungen.

30 Insofern das mikrobielle Gemisch durch Aufspritzen auf den Boden nach der Methode «ex situ» appliziert wird, benutzt man 1 bis 10 Liter der gemischten Kultur mit dem Wert der optischen Densität bei 620 nm im Bereich 0,60 bis 1,00 pro 1 m³ Erdreich, in Abhängigkeit von der Feuchte und der Bodenstruktur.

35 Bei der Methode «in situ» wendet man 5 bis 15 Liter dieser Kultur pro m² an. In beiden Fällen ist es notwendig, das Erdreich vor und auch nach dem eigentlichen Applizieren zu lockern, um damit eine geeignete Aeration zu sichern. Die gemischte Kultur enthält bei der Anwendung zugleich Stimulationsstoffe.

40 Das Ergebnis der Anwendung des erfindungsgemässen Gemisches natürlicher Mikroorganismen ist eine Degradation des überwiegenden Teiles der in der Umgebung vorhandenen Erdölstoffe, die einerseits in Kohlendioxid (CO₂) übergeführt, andererseits in das Zellmaterial eingebaut werden. Gegebenenfalls können die Metaboliten in das aussenstehende Milieu ausgeschieden werden.

45 Der Vorteil dieses Gemisches und seiner Anwendung beruht vor allem darin, dass die entstehenden Metaboliten nicht toxisch sind. Weiter ist bei der Anwendung des Gemisches von Mikroorganismen auch die hohe Anfangsgeschwindigkeit der Degradation kontaminierender Stoffe von grosser Bedeutung. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass durch die Anwendung des Präparates die Anzahl der Mikroorganismen im Milieu in bedeutendem Mass angehoben wird, was insbesondere zur Verbesserung der Struktur des Erdbereichs beiträgt und dessen Zurückführung in den fast ursprünglichen Zustand sehr förderlich ist. Angesichts dessen, dass die angewandten Organismen aus der natürlichen Umgebung isoliert und genetisch nicht manipuliert worden sind, besteht keine Gefahr eines negativen Einflusses auf die Biosphäre.

Anwendungsbeispiele

Beispiel 1:

60 1000 ml des synthetischen Mediums mit dem Anfangsverhältnis Kohlenstoff : Stickstoff : Phosphor = 800 bis 400:6:1 wurden mit der vorbereiteten induzierten Kultur (BIOREM RC1) inokuliert, deren optische Densität $OD_{620} = 0,650$ ist, wobei das Verhältnis der Zellzahl *Pseudomonas putida* : *Geotrichum candidum* = 3:1 war. Der Ausgangswert betrug pH = 6,0. Die Kultivierung verlief bei 20°C bis 65 25°C unter Durchlüftung. Der Stimulationsstoff wurde zu Beginn der Kultivierung und ferner immer nach

5 bis 10 Tagen in solch einer Menge hinzugefügt, dass das Verhältnis zwischen dem Kohlenstoff und dem Stickstoff 60 bis 100:1 war. Der Gehalt an Erdölstoffen wurde mit Hilfe der Infrarot-Spektroskopie durch Vergleich der Transmittanz der Probe und des Standards bei einer Wellenzahl von 2920 cm⁻¹ gemessen.

5

10

15

20

Probe	RC1	Stimulator	Gehalt an Erdölstoffen (g.l ⁻¹)			
			0 Tage	10 Tage	24 Tage	38 Tage
rohes Erdöl:						
-	-		18,3	18,3	18,4	18,2
+	-		34,1	22,1	15,0	6,1
+	+		34,0	18,2	11,7	1,2
gebrauchtes Motorenöl:						
+	+		18,0	7,8	1,6	0,23
gebrauchtes Motorenöl und Rohöl im Verhältnis 1:1:						
+	+		18,3	8,2	3,0	0,62

Beispiel 2:

25

30

1000 ml des synthetischen Mediums wurden mit der bereiteten induzierten Kultur (BIOREM RC1) derart inokuliert, dass OD₆₂₀ = 0,700 war, bei einem Verhältnis der Zellenzahl Pseudomonas: Geotrichum = 3:1. Die getesteten Erdölprodukte wurden dem Gemisch zugefügt bis zur Konzentration 10 g.l⁻¹. Die Kultivierung verlief bei einer Temperatur, von 20°C bis 25°C unter Durchlüftung. Der Stimulationsstoff wurde immer nach 7 Tagen hinzugefügt – nach denselben Bedingungen wie in Beispiel 1. Der Gehalt an Erdölstoffen wurde mit Hilfe von Infrarot-Spektroskopie festgestellt. Es wurde die Transmittanz der Probe und des Standards bei einer Wellenzahl von 2920 cm⁻¹ gemessen.

35

40

45

Probe	Gehalt an Erdölstoffen in Gramm pro Liter			
Degradationsdauer:	10 Tage	24 Tage	38 Tage	42 Tage
Petroleum RT:	3,58	0,34	0,21	0,21
Motorenöl:	6,63	2,09	0,35	0,21
MS 8P OLEMS-2:	4,25	1,54	0,52	0,20
Hydraulikflüssigkeit AMG 10:	2,12	0,80	0,24	0,20
Benzin B3V:	3,63	2,07	0,80	0,26
Petroleum PN-3:	2,94	1,80	0,25	0,22
Petroleum PN-3 mit Antioxidans:	2,86	1,92	0,32	0,25

Beispiel 3:

50

55

Auf 1000 g Erdreich, das nach einer Havarie durch Erdölprodukte kontaminiert war, wurden 1000 ml der gemischten induzierten Kultur BIOREM RC1 bei OD₆₂₀ = 0,600 angewandt, bei einem Verhältnis der Zellenanzahl Pseudomonas : Geotrichum = 1:1. Die Kultivierung verlief bei 20°C bis 25°C in Glaswannen. Jeden zweiten Tag wurde das Erdreich durch mehrfaches Umwenden durchlüftet. Der Stimulationsstoff wurde immer nach 8 bis 10 Tagen unter den in Beispiel 1 angeführten Bedingungen hinzugefügt. Der Gehalt an Erdölstoffen wurde nach der Extraktion Tetrachlor mittels Infrarot-Spektroskopie bei einer Wellenzahl von 2920 cm⁻¹ gemessen.

60

65

Probe	Gehalt an Erdölstoffen in Gramm pro Liter		
Degradation sdauer:	10 Tage	24 Tage	40 Tage
ursprüngliche Probe:	1,2	1,2	1,2
Erdreich + RC1:	0,61	0,57	0,09
Erdreich + Kompost + RC1:	0,4,1	0,32	0,08

Die Kontaminierung des Erdreiches war verhältnismässig niedrig und demzufolge wurde die gemischte Kultur BIOREM RC1 nur zu Beginn des Biodegradationsprozesses angewandt. Im Falle einer grösseren Verunreinigung kann man den Prozess durch wiederholte Beigabe der gemischten Kultur im Verlauf der Biodegradierung beschleunigen.

5

Beispiel 4:

Eine Menge von 1000 ml synthetischen Mediums wurde mit Öl in einer Konzentration von 10 000 mg pro Liter verschmutzt. Bei der Degradation wurde das Verhältnis von zugefügtem Stickstoff und noch vorhandenem Kohlenstoff in bestimmten Grenzen gehalten. Dieser Versuch wurde mit verschiedenen Ölderivaten durchgeführt und es wurden folgende Degradationsraten erzielt:

10

Probenmaterial	Masse von Ölderivaten in mg l ⁻¹			
Degradationsdauer:	10 Tage	20 Tage	30 Tage	40 Tage
Rohöl	4920	2420	1080	107
Motorenöl	4620	1870	280	115
Altes Motorenöl	5420	2640	1430	360
Petroleum	3010	1970	490	195
Benzin	3980	2140	910	210

15

20

Beispiel 5:

Eine Menge von 1 kg trockenem Erdreich, verschmutzt mit 20 000 mg einer Mischung Rohöl, verschmutztem Öl und Petroleum wurde mit 20 Gramm BIOREM RC1 behandelt. Es wurden folgende Degradationsraten erzielt:

25

Probenmaterial	Masse der Öl-Derivate in mg pro kg trockenes Erdreich		
Degradationsdauer:	10 Tage	30 Tage	40 Tage
Rohöl	13200	7120	890
	(66,0%)	(35,6%)	(4,45%)
Motorenöl	11 610	4560	410
	(58,05%)	(22,8%)	(2,05%)
Petroleum	9980	3120	310
	(49,9%)	(15,6%)	(1,55%)

30

35

40

In Klammern ist der jeweils zu diesem Zeitpunkt verbleibende Prozentsatz des Öl-Derivates im Vergleich zum Beginn (100%) angegeben.

Beispiel 6:

22 m³ öl-kontaminiertes Erdreich wurde mit Kompost vermischt in einer Schicht von 30 cm Höhe im Freien aufgetragen. Alle drei Tage wurde das Erdreich gelockert und gewendet. Eine erste Kontrolle von gleichermassen kontaminiertem Erdreich (Nr. 1) wurde bloss mit Kompost gemischt, aber nicht mit BIOREM RC1 behandelt. Eine zweite Kontrolle von gleichermassen kontaminiertem Erdreich (Nr. 2) wurde überhaupt nicht behandelt. Die folgenden Resultate wurden erzielt:

45

50

55

60

65

CH 685 246 A5

	Probenmaterial	Konzentration von Öl-Derivaten in mg pro kg trockenes Erdreich			
		Degradationsdauer: 0 Tage	15 Tage	35 Tage	60 Tage
5	Erdreich mit Kompost und BIOREM RC1:	1698	267	151	98
		(100,0%)	(15,72%)	(8,89%)	(5,77%)
10	Kontrolle Nr. 1:	1698	1176	912	657
		110,0%)	(69,26%)	(53,71%)	(38,7%)
	Kontrolle Nr. 2:	1698	1656	1589	1504
		(100,0%)	(97,53%)	(93,58%)	(88,6%)

15 In Klammern ist der jeweils zu diesem Zeitpunkt verbleibende Prozentsatz des Öl-Derivates im Vergleich zum Beginn (100%) angegeben.

20 Beispiel 7:

Ölstoff-Biodegradation in Schwermetall-belastetem Schlamm

Konzentration der Öl-Derivate im Schlamm (mg pro Liter):				
Degradationsdauer:	3 Tage	14 Tage	21 Tage	35 Tage
25	78 600	91 500	29 400	9300
	± 170	± 130	± 140	± 90

30 Beispiel 8:

Ölstoff-Biodegradation des Abfallwassers auf dem festen Träger (Testperiode: 11. Juli 1992 bis 11. Oktober 1992):

Konzentration der Öl-Derivate im Wasser (g pro kg)				
Degradationsdauer:	0 Tage	30 Tage	60 Tage	90 Tage
35	84,39	64,50	38,22	8,64

40 Beispiel 9:

Motorenöl-Biodegradation im Boden (anlässlich eines Ölunfalls):

Methode	Konzentration der Öl-Derivate in mg/kg Boden					
	Degradationsdauer: 0 Tage	10 Tage	20 Tage	50 Tage	90 Tage	
45	Kompost:	813	564	380	309	217
	BIOREM RC1	813	407	317	185	119
50	Kompost und BIOREM RC1:	813	413	254	137	91
	Kontrolle:	813				691

55 Beispiel 10:

Ölstoff-Biodegradation in einem Boden mit alter Verschmutzung (Testperiode: 13. Juli 1992 bis 19. September 1992):

Konzentration der Öl-Derivate in mg/kg Boden				
Degradationsdauer:	0 Tage	16 Tage	36 Tage	67 Tage
60	1626	280	164	128

65

Beispiel 11:

Transformatorenöl-Biodegradation im Boden anlässlich eines Ölunfalls (Testperiode: 31. August 1992 bis 26. Oktober 1992):

Methode	Konzentration der Öl-Derivate in mg/kg Boden			
Degradationsdauer:	0 Tage	28 Tage	45 Tage	56 Tage
	16 180	5434	2562	781

Als Vergleichswert zu diesen Beispielen sei hier erwähnt, dass man zur gewerblichen Degradation eines Bodens mit 2000 mg Kohlenwasserstoffen pro kg Trockensubstanz hinunter auf 282 mg pro kg Trockensubstanz ca. 30 Wochen durchaus als Richtwert betrachtet (Zeitschrift TR Technische Rundschau, Das Schweizer Industriemagazin, Heft 3, 1993, Seite 28).

Das künstlich zubereitete Gemisch von Mikroorganismen ist in natürlichen Bedingungen stabil. Es ist im weiten Bereich des pH-Wertes zwischen 4,5 bis 7,5 und im Temperaturbereich von 5° bis 35°C aktiv. Bedingung für das Erzielen einer maximalen physiologischen Aktivität ist eine optimale Sauerstoffzufuhr (für die Oxidation von 3,5 g rohen Erdöls wird minimal 1 g O₂ benötigt) und die Anwesenheit eines Stimulationsstoffes. Das Gemisch ist in der Lage, die Erdölkohlenwasserstoffe sowohl bei hoher Belastung (über 10 g/l) als auch bei relativ niedriger Belastung (um 1 g/l) zu degradieren. In beiden Fällen können nach durchgeführter Degradation die Konzentrationen der per Norm bewilligten Erdölstoffe dektiert werden.

Das Gemisch von Mikroorganismen ist grundsätzlich in der Lage, Kohlenwasserstoffe enthaltende Abfälle zu entsorgen, insbesondere Erdöl und seine Produkte, sowie Folgen einer ökologischen Katastrophe zu beseitigen, bei der es zur Kontamination des Bodens oder des Wassers durch Erdölstoffe gekommen ist.

Patentansprüche

1. Gemisch von natürlichen Mikroorganismen für die Biodegradation von Kohlenwasserstoffen, insbesondere von Erdöl und Erdölprodukten, dadurch gekennzeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 5:1 bis 1:1 enthält.

2. Gemisch nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 1:1 enthält.

3. Gemisch nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 2:1 enthält.

4. Gemisch nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 3:1 enthält.

5. Gemisch nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 4:1 enthält.

6. Gemisch nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es *Pseudomonas putida* und *Geotrichum candidum* im Verhältnis der Zellenzahl von 5:1 enthält.

7. Verfahren zur Kultivierung des Gemisches nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch induziert wird durch Kultivierung in Gegenwart von Ölsäure, unter Zufuhr von Sauerstoff und unter Zugabe von Stimulationsstoffen, nämlich von Stickstoff, Phosphor und von Spurenelementen.

8. Verfahren zur Applikation des Gemisches nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrmals zwischen 1 Gramm und 10 Gramm Gemisch pro Liter Anwendungspräparat in einer Dosierung des Anwendungspräparates je nach Grad der Bodenverschmutzung von 5 bis 20 Litern pro zu behandelndem m³ Boden appliziert wird, und dass Sauerstoff sowie Stimulationsstoffe, nämlich Stickstoff, Phosphor sowie Spurenelemente in optimaler Menge zugeführt werden, wobei das Verhältnis des Kohlenstoffes und des Stickstoffes während der Wirkung des Gemisches im Bereich 10:1 bis 100:1 gehalten wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Milieu auf einem pH-Wert zwischen 4,5 bis 7,5 und auf einer Temperatur von 5° bis 35°C gehalten wird.

10. Verwendung eines Gemisches nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur gewerblichen Degradation von Kohlenwasserstoffen in Böden und Gewässern.