(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 27 340 T2** 2004.07.15

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 822 252 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 27 340.7**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 305 710.2**
(96) Europäischer Anmeldetag: **30.07.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.02.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.01.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 1/20**
A62D 3/00, C02F 3/34, B01D 53/84, B09C 1/10, C12S 5/00, C12S 13/00

(30) Unionspriorität:
20365396 01.08.1996 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE, DE, FR, GB, NL

(73) Patentinhaber:
Canon K.K., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner GbR, 80336 München

(72) Erfinder:
Kozaki, Shinya, Ohta-ku, Tokyo, JP; Yano, Tetsuya, Ohta-ku, Tokyo, JP; Imamura, Takeshi, Ohta-ku, Tokyo, JP

(54) Bezeichnung: **Mikrobielle Stamme, Verfahren zum Abbau von organischen Verbindungen und Verfahren zur Entgiftung der Umwelt**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf einen neuartigen Mikroorganismus und Verfahren zum biologischen Abbau von organischen Verbindungen und zur Umweltsanierung.

Verwandter Stand der Technik

[0002] Umweltverschmutzung mit schwer abbaubaren organischen Verbindungen, die toxisch vor Organismen sind, ist in den letzten Jahren ein ernsthaftes Problem geworden. Es wird angenommen, dass die Bodenverschmutzung mit flüchtigen chlorierten aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen wie etwa Tetrachlorethylen (PCE), Trichlorethylen (TCE) und Dichlorethylen (DCE) sich an Stellen der Papier- und Halbstoffindustrien, der Präzisionsinstrumentindustrie und verwandter Industrien in der Welt weit verbreitet hat. Tatsächlich wird oftmals berichtet, dass diese Schadstoffe durch Umweltuntersuchungen nachgewiesen wurde. Es wird angenommen, dass diese restlichen organischen Verbindungen in dem Boden im Regenwasser gelöst werden und in das Grundwasser gelangen, wodurch sie sich in der Umgebung ausbreiten. Da diese Verbindungen neben ihrer hohen Stabilität in der Umwelt beschuldigt werden karzinogen zu sein, wurde insbesondere die Kontamination von Grundwasser, das als eine Trinkwasserquelle verwendet wird, ein ernsthaftes soziales Problem. Daher ist die Reinigung von wässrigen Medien, wie etwa kontaminiertes Grundwasser und des Bodens und der umgebenden Atmosphäre durch Eliminierung oder Abbau der verschmutzenden organischen Verbindungen ein wichtiges Thema des Umweltschutzes, und zur Reinigung der Umwelt erforderliche Technologien wurden entwickelt. Zum Beispiel wurde eine Absorptionsverhandlung mit Aktivkohle und eine Abbaubehandlung durch Licht oder Wärme untersucht, aber diese sind vom Standpunkt der Behandlungskosten und der Anwendbarkeit nicht immer praktikabel.

[0003] Kürzlich wurde der mikrobielle Abbau chlorierter organischer Verbindungen wie TCE berichtet, welche stabil in der Umwelt sind, und Untersuchungen für ihre praktische Anwendung wurden begonnen. Das biologische Abbauverfahren hat verschiedene Vorteile, das halogenierte organische Verbindungen in harmlose Substanzen durch Auswahl geeigneter Mikroorganismen abgebaut werden können, grundsätzlich werden keine spezifischen Chemikalien benötigt und die Erhaltungskosten und das Labor für den Vorgang können gespart werden.

[0004] Beispiele von Mikroorganismen, die TCE abbauen können, sind Welchia alkenophila sero 5 (USP 4877736, ATCC 53570), Welchia alkenophila sero 33 (USP 4877736, ATCC 53571), Methylocystis sp. Stamm M (Agric Biol. Chem., 53, 2903 (1989), Biosci. Biotech. Biochem. 56, 486 (1992), ibid 56, 736 (1992)), Methylosinus trichosporium OB3b (Am. Chem. Soc. Natl. Meet. Dev. Environ. Microbiol., 29, 365 (1989), Appl. Environ. Microbiol., 55, 3155 (1989), Appl. Biochem. Biotechnol., 28, 877 (1991), Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 2-92274, Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 3-292970), Methylomonas sp. MM2 (Appl. Environ. Microbiol., 57, 236 (1991)), Alcaligenes denitrificans ssp. xylosoxidans JE75 (Arch. Microbiol., 154, 410 (1990)), Alcaligenes eutrophus JMP134 (Appl. Environ. Microbiol., 56, 1179 (1990)) Alcaligenes eutrophus FERM-13761 (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr.7-123976), Pseudomonas aeruginosa JI104 (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 7-236895), Mycobacterium vaccae JOB5 (J. Gen. Microbiol., 82, 163 (1974), Appl. Environ. Microbiol., 55, 2960, (1989), ATCC 29678), Pseudomonas putida BH (J. of Japan Sewage Work Assoc. (Gesuido Kyokai-shi), 24, 27 (1987), Pseudomonas sp. Stamm G4 (Appl. Environ. Microbiol., 52, 383, (1986), ibid 53, 949 (1987), ibid 54, 951 (1989), ibid 56, 279 (1990), ibid 57, 193 (1991), USP 4925802, ATCC 53617, diese wurde zuerst als Pseudomonas cepacia klassifiziert, aber später dann als Pseudomonas sp.), Pseudomonas mendocina KR-1 (Bio/Technol., 7, 282 (1989), Pseudomonas putida F1 (Appl. Environ. Microbiol., 54, 1703 (1988), ibid 54, 2578 (1988)), Pseudomonas fluorescens PFL12 (Appl. Environ. Microbiol., 54, 2578 (1988)), Pseudomonas putida KWI-9 (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 6-70753), Pseudomonas cepacia KK01 (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 6-22769), Nitrosomonas europaea (Appl. Environ. Microbiol., 56, 1169 (1990)) und Lactobacillus vaginalis sp. nov (Int. J. Syst. Bacteriol., 39, 368 (1989), ATCC 49540).

[0005] Das Problem der praktischen Anwendung dieser abbauenden Bakterien zur Sanierung der Umwelt ist, dass sie Chemikalien wie etwa aromatische Verbindungen oder Methan als eine Induktionssubstanz (einen Induktor) benötigen.

[0006] Obwohl aromatische Verbindungen, wie etwa Phenol oder Toluol, hervorragende Induktoren sind, ist eine intensive Kontrolle notwendig, falls diese Verbindungen in die Umwelt abgegeben werden, da sie toxisch sind. Methan ist ein entzündbares Gas, so dass es dort eine Gefahr gibt und eine Schwierigkeit beim kontrollierten Einbringen davon in die Umwelt.

[0007] Um die vorher beschriebenen Probleme zu lösen entwickelten Nelson et al. ein Verfahren der Verwendung von Tryptophan, einer Aminosäure, als ein Induktor für den Abbau von flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 4-502277). Obwohl dieses Verfahren die Toxizität und Gefahr des Induktors selbst in einem gewissen Maß vermeiden kann, ist Tryptophan eine sehr teure Verbindung und die Kompliziertheit des kontrollierten Einbringens einer spezifischen Substanz in die Umwelt ist nach wie vor nicht gelöst. Die Zugabe überschüssiger Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in die Umwelt ist vom Blickpunkt der Eutrophierung nicht erwünscht. Da ferner derartige TCE-abbauende Enzyme induzierbare Enzyme sind, wird die einmal induzierte enzymatische Aktivität über nur wenige Stunden bis zu einem Tag normalerweise gehemmt, was eine weitere Induktion danach erforderlich macht, und es gibt ein Problem, dass der Abbau von TCE kompetitiv durch die Anwesenheit des Induktionsmittels gehemmt wird.

[0008] Kürzlich wurde versucht ein Plasmid mit einem DNA Fragment, das eine Oxygenase oder Hydroxylase als ein TCE-abbauendes Enzym kodiert, in ein Wirtsbakterium einzubringen, um die TCE-Abbauaktivität unter Verwendung eines harmlosen Induktors zu exprimieren oder sie konstitutiv in der Abwesenheit irgendeines Induktors zu exprimieren. Zum Beispiel wurden derartige DNA Fragmente aus Pseudomonas mendocina KR-1 gewonnen (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 2-503866), Pseudomonas putida KWI-9 (Japanische Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 6-105691) und Pseudomonas putida BH (Summary of 3rd Conference on Pollution of Ground Water/Soil and its Protective Countermeasure, S. 213 (1994)).

[0009] Diese rekombinanten Stämme haben jedoch ein derartiges Problem, dass ein sehr teueres IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid) als ein Induktor erforderlich ist, oder dass die Stabilität des Plasmids in dem Wirtsbakterienstamm nicht ausreichend ist. Überdies unterliegt das Einbringen rekombinanter Stämme in die Umwelt bestimmte Regulationen bzgl. der öffentlichen Akzeptanz.

[0010] Um diese Probleme zu lösen, erzeugten Seals et al. einen mutanten Stamm von Pseudomonas sp. G4 mit einer TCE-Abbauaktivität ohne die Notwendigkeit eines Induktors (in diesem Fall Phenol oder Toluol) durch ein Verfahren unter Verwendung eines Transposons (Appl. Environment.

[0011] Microbiol., 58, 3977 (1992), PCT Anmeldung internationale Veröffentlichungsnummer WO92/19738). Die TCE-Abbauaktivität dieser G4-Mutante ist jedoch nicht ausreichend neben den Problem der Instabilität aufgrund des Transposons. Da das Transposon selbst ein Antibiotikaresistenzgen, wie etwa eine Kanamycinresistenz, trägt, kann es einige unterwünschte Effekte durch eine horizontale Übertragung auf andere Mikroorganismen geben, falls der Mutantenstamm in die Umwelt abgegeben wird.

[0012] Als eine Gegenmaßnahme gegen dieses Problem wird in Environmental Science & Technology, Vol. 30, No. 6, 1986, pp. 2045–2052 berichtet, dass eine Mutante, Burkholderia (Pseudomonas) cepacia $PR1_{301}$ (hiernach als „$PR1_{301}$" bezeichnet), welche TCE ohne Induktor abbauen kann, durch Mutagenisierung des vorgehenden Stamms G4 unter Verwendung von Nitrosoguanidin anstelle von genetischer Manipulation erhalten wurde. Jedoch ist gemäß den Daten des vorherigen Berichts, zum Beispiel **Fig.** 3 in der rechten Spalte auf Seite 2048 oder **Fig.** 7 in der linken Spalte auf Seite 2050, die TCE-Abbaufähigkeit von $PR1_{301}$ im Bereich von ppb, ungenügend für die Sanierung der mit TCE verunreinigten Umwelt.

[0013] Wie bisher beschrieben, sind die im Stand der Technik bekannten Bakterienarten nicht immer befriedigend von dem Standpunkt, dass ein keine Induktoren benötigender Mikroorganismus die tatsächlichen Bedingungen erforderlich für den Abbau aromatischer Verbindungen oder flüchtiger chlorierter organischer Verbindung erfüllen sollte, und eine ausreichende Abbaufähigkeit exprimieren sollte. Daher gibt es einen dringenden Bedarf Mikroorganismen mit tatsächlich erforderlichen Eigenschaften zu erzeugen. Bevorzugt haben diese Mikroorganismen derartige Eigenschaften, dass sie eine ausreichende Fähigkeit zum Abbau eines Schadstoffs, wie etwa aromatische Verbindungen und halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen haben, dass ihre Wachstumsbedingungen unterschiedlich von den herkömmlichen, im Stand der Technik bekannten Mikroorganismen sind, so dass ihr Anwendungsbereich oder ihre Anwendungsform ausgeweitet werden kann. Die Behandlung von flüssigen Abfällen oder Boden mit TCE unter Verwendung eines Mikroorganismus vorausgesetzt, ist es für den Mikroorganismus unter schwierigen Bedingungen erforderlich, wie etwa flüssigen Abfall oder Boden, zu proliferieren, während die erforderliche TCE-abbauende Aktivität erhalten bleibt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Wie vorher erwähnt, sind mikrobielle Arten mit ausreichender Abbaufähigkeit für aromatische Verbindungen und/oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen und mit praktisch vorteilhaften Eigenschaften verglichen zu den herkömmlichen mikrobiellen Arten dringend erforderlich.

[0015] Demgemäß ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung einen neuartigen Mikroorganismus zur Verfügung zu stellen, der aromatische Verbindungen oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen ohne Verwendung eines Induktors abbauen kann.

[0016] Die andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren für den wirksamen biologischen Abbau von organischen Verbindungen zur Verfügung zu stellen.

[0017] Die weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, ein Verfahren für die wirksame Sanierung der Um-

welt durch biologischen Abbau von Schadstoffen in der Umwelt zur Verfügung zu stellen.

[0018] Gemäß einem ersten Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein neuartiger Mikroorganismus JM2N (FERM BP-5961) zur Verfügung gestellt, der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0019] Gemäß einem zweiten Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung, wird ein Verfahren zum biologischen Abbau von aromatischen Verbindungen oder chlorierten aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen zur Verfügung gestellt, durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM2N (FERM BP-5961), der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0020] Gemäß dieser Gesichtspunkte werden organische Verbindungen ziemlich wirkungsvoll biologisch abgebaut, selbst in der Abwesenheit von anderen Mikroorganismen.

[0021] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Sanierung einer Umwelt kontaminiert mit einem Schadstoff zur Verfügung gestellt mit: Abbau des Schadstoffs durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM2N (FERM BP-5961), der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0022] Gemäß dieser Gesichtspunkt können Schadstoffe ziemlich wirkungsvoll selbst in der Anwesenheit anderer Mikroorganismen biologisch abgebaut werden.

[0023] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Sanierung einer mit einem Schadstoff kontaminierten Umgebung zur Verfügung gestellt, mit: Abbau des Schadstoffs durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM2N (FERM BP-5961), der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante des Stamms J1 (FERM BP-5102).

[0024] Gemäß diesem Gesichtspunkt können Schadstoffe selbst in der Umgebung in der andere Mikroorganismen ebenfalls vorhanden sind relativ wirkungsvoll abgebaut, wobei die verschmutzte Umwelt mit hoher Wirksamkeit saniert wird.

[0025] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein neuartiger Mikroorganismus JM6U (FERM BP-5962) zur Verfügung gestellt, der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0026] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren für den biologischen Abbau von aromatischen Verbindungen oder chlorierten aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM6U (FERM BP-5962) zur Verfügung gestellt, der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0027] Gemäß diesen Gesichtspunkten werden organische Verbindungen selbst in der Anwesenheit anderer Mikroorganismen relativ wirkungsvoll biologisch abgebaut.

[0028] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Sanierung einer mit einem Schadstoff verschmutzten Umwelt zur Verfügung gestellt mit: Abbau des Schadstoffs durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM6U (FERM BP-5962), der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0029] Gemäß diesem Gesichtspunkt werden die Schadstoffe selbst in der Umgebung in der andere Mikroorganismen ebenfalls vorhanden sind relativ wirkungsvoll abgebaut, wobei die verschmutzte Umwelt mit relativ hoher Effizienz wiederhergestellt wird.

[0030] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein neuartiger Mikroorganismus JM7 (FERM BP-5957) zur Verfügung gestellt, der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0031] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Sanierung einer Umwelt verschmutzt mit einem Schadstoff zur Verfügung gestellt mit: Abbau des Schadstoffs durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM7 (FERM BP-5957), der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0032] Gemäß dieser Gesichtspunkte werden organische Verbindungen selbst in der Anwesenheit anderer Mikroorganismen wirkungsvoll biologisch abgebaut.

[0033] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Sanierung einer mit einem Schadstoff verschmutzten Umwelt durch Einsatz eines neuartigen Mikroorganismus JM7 (FERM BP-5957) zur Verfügung gestellt, der konstitutiv eine Oxygenase exprimiert, eine Mutante vom Stamm J1 (FERM BP-5102).

[0034] Gemäß diesem Gesichtspunkt werden organische Verbindungen wirkungsvoll abgebaut, selbst in der Anwesenheit anderer Mikroorganismen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0035] Die Figur ist eine grafische Darstellung, die die TCE-Abbaurate in jeder Wachstumsphase des Stamms JM2N des Stamms JM6U, des Stamms JM7 und des Stamms JM1 darstellt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0036] Die verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung werden nun hiernach weiter beschrieben.
[0037] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung offenbarten den Stamm J1 (FERM BP-5102) in der japanischen Patentanmeldung Offenlegungsschrift Nr. 8-66182 als einen Mikroorganismus, der wirkungsvoll aromatische Verbindungen wie etwa Phenol oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie etwa Phenol, oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie etwa Trichlorethylen, in der Anwesenheit eines Induktors, wie etwa Phenol, abbauen kann. Durch Mutagenisierung des Stamms J1 mit einem Mutagen erhielten die Erfinder dieser Erfindung einen neuartigen Stamm JM1 (FERM BP-5352), eine Mutante vom Stamm J1, die aromatische Verbindungen oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen ohne einen Induktor abbauen kann, obwohl die mikrobiologischen Eigenschaften identisch zum Stamm J1 sind. Von weiteren Untersuchungen der durch Mutagenisierung induzierten Mutantenstämme des Stamms J1 erhielten die Untersucher dieser Erfindung drei weitere Stämme, welche konstitutiv eine Oxygenase exprimieren und in den mikrobiologischen Eigenschaften identisch zum Stamm JM1 sind, aber sich vom Stamm JM1 zum Beispiel in der Abbaufähigkeit für organische Verbindungen im nicht sterilisierten Boden und in der Wachstumsrate in einem Kulturmedium mit der gleichen Kohlenstoffquelle unterscheiden. Diese drei Stämme unterscheiden sich voneinander in ihren Abbaufähigkeiten von organischen Verbindungen und in der Wachstumsrate in einem Kulturmedium der gleichen Quelle, wobei diese Eigenschaften nach weitergeführter Subkultivierung jedes Stammes beibehalten wurden. Daher wurden diese drei Stämme als neuartige Stämme unterschiedlich zum Stamm JM1 angesehen und es wurden ihnen die Namen Stamm JM2N, Stamm JM6U und Stamm JM7 gegeben und beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology (FERM BP-5961, FERM BP-5962 bzw. FERM BP-5957) hinterlegt.
[0038] Die mikrobiologischen Eigenschaften dieser neuartigen drei Stämme werden im Folgenden aufgelistet.

Mikrobiologische Eigenschaften

[0039] Gram-Färbung und Morphologie: Gram negativ, Stäbchen Wachstum auf Kulturmedium:
BHIA: gut
MacConkey: möglich
Koloniefarbe: cremefarben
Temperaturoptimum: 25°C > 30°C > 35°C
Beweglichkeit: negativ (im halbfesten Medium)
TSI (Schräge/Stichkanal): alkalisch/alkalisch, H2S (–)
Oxidase: positiv (schwach)
Katalase: posititiv
Zuckerfermentation:
Glucose: negativ
Sacharose: negativ
Raffinose: negativ
Galactose: negativ
Maltose: negativ
Urease: positiv
Äskulin Hydrolyse (β-Glucosidase): positiv
Silbernitratreduktion: negativ
Indolproduktion: negativ
Glucoseoxidation: negativ
Arginindihydrolase: negativ
Gelatine Hydrolyse (Proteinase): negativ
β-Galactosidase: negativ
Assimilierung von Verbindungen
Glucose: negativ
L-Arabinose: negativ
D-Mannose: negativ
D-Mannitol: negativ
N-Atectyl-D-glucosamin: negativ
Maltose: negativ
Kaliumglucoronat: negativ
n-Caprinsäure: positiv
Adipinsäure: negativ

dl-Maleinsäure: positiv
Natriumcitrat: positiv
Phenylacetat: negativ

[0040] Es sollte festgehalten werden, dass der vorher erwähnte $PR1_{301}$ und die Stämme der vorliegenden Erfindung wird M2N (FERM BP-5961), JM6U (FERM BP-5962) und JM7 (FERM BP-5957) vollständig unterschiedliche Stämme sind. Obwohl keine mikrobiologischen Eigenschaften von $PR1_{301}$ in Environmental Science & Technology, Bd. 30, Nr. 6, 1986, S. 2045–2052, dass $PR1_{301}$ beschrieben werden, wird beschrieben, dass $PR1_{301}$ eine spontane Revertante von Burkholderia cepacia $G4_{301}$ ist, welche durch Mutagenisierung von Burkholderia cepacia G4 mit N-Methyl-N-nitrosoguanidin (NTG) erhalten wurde. Daher wird angenommen, dass die mikrobiologischen Eigenschaften von $PR1_{301}$ identisch mit dem Ausgangsstamm G4 sind. Die mikrobiologischen Eigenschaften des Stamms G4 sind gemäß der Beschreibung in WO90/06901 wie folgt.

[0041] Gramfärbung und Morphologie: Gram negativ, Stäbchen
Urease: negativ
Äskulin Hydrolyse (β-Glucosidase): negativ
Silbernitratreduktion: positiv
Indolproduktion: negativ
Glucoseoxidation: negativ
Arginindihydrolase: negativ
Gelatine Hydrolyse: negativ
β-Galactosidase: negativ
Assimilierung von Verbindungen
L-Arabinose: positiv
D-Mannose: positiv
D-Mannitol: positiv
N-Acetyl-D-glucosamin: positiv
Maltose: negativ
Kaliumglucoronat: positiv
n-Caprinsäure: positiv
Adipinsäure: negativ
dl-Maleinsäure: positiv
Natriumcitrat: ±
Phenylacetat: positv

[0042] Da die mikrobiologischen Eigenschaften des vorher beschriebenen Stammes G4 sich deutlich von denen der Stämme JM2N, JM6U und JM7 dieser Erfindung unterscheiden, wurde beschlossen, dass PR_{301} ein zu den Stämmen JM2N, Jm6U und JM7 vollständig unterschiedlicher Stamm ist.

[0043] Jeder der Stämme JM2N, JM6U und JM7 baut chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen als auch aromatische Verbindungen wie etwa Phenol und Kresol ab, was anzeigt, dass diese Stämme natürlicherweise eine Beständigkeit gegen diese Verbindungen haben. Wie aus der Tatsache ersichtlich ist, dass diese Verbindungen normalerweise als ein Sterilisationsmittel verwendet werden, sind diese Verbindungen für die meisten Mikroorganismen gefährlich. Obwohl diese Verbindungen oftmals in Abfallflüssigkeit enthalten sind, würden die Stämme JM2N, JM6U und JM7 weder absterben noch die Aktivität würde gehemmt werden, selbst in der Anwesenheit dieser Chemikalien, was den Abbau von flüchtigen, chlorierten organischen Verbindungen ermöglicht.

[0044] Bei Abbau von flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen in der Umwelt wie dem Grundwasser und dem Boden wird kein Induktor, wie etwa Phenol, benötigt, aber herkömmliche Nährstoffe, wodurch das Vorgehen vereinfacht wird, neben der Lösung der Probleme, dass toxische und hochgefährliche Induktoren in die Umwelt abgegeben werden. Zusätzlich weist die Oxygenase, ein Enzym, welches flüchtige chlorierte organische Verbindungen abbaut, keine kompetitive Hemmung durch aromatische Verbindungen auf, wodurch wirkungsvoll nur flüchtige chlorierte organische Verbindungen abgebaut werden.

[0045] Die für die Kultivierung der erfindungsgemäßen JM2N, JM6U und JM7 verwendeten Nährstoffe können jede Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle und anorganische Salze sein, vorausgesetzt, dass die für die herkömmliche mikrobielle Kultur erforderlich und durch die erfindungsgemäßen Mikroorganismen assimilierbar sind. Zum Beispiel kann mit Hefeextrakt für einige Nährstoffe ergänztes JM9-Medium verwendet werden. Die Zusammensetzung des M9-Mediums ist wie folgt:
$NaHP_2O_4$: 6,2 g
KH_2HPO_4: 3,0 g
NaCl: 0,5 g
NH_4Cl: 1,0 g
in 1 Liter Kulturmedium; pH 7,0.

[0046] Die Kultivierung kann unter anaeroben Bedingungen entweder als Flüssigkultivierung oder Festkulti-

vierung durchgeführt werden. Die bevorzugte Kultivierungstemperatur ist um 30°C.

– Verfahren für den Erhalt der Mikroorganismen –

[0047] Das Verfahren verwendet zum Erhalt neuartiger mikrobieller Stämme JM2N, JM6U und JM7 der vorliegenden Erfindung wird erläutert. Derartige Stämme können durch Unterziehen des Stammes J1 (FERM BP-5102) unter einen Mutagenisierungsvorgang unter Verwendung eines Mutagens erhalten werden.
[0048] Jedes im Stand der Technik bekannte Mutagen kann verwendet werden, wie physikalische oder chemische Mutagene, zum Beispiel ultraviolettes Licht als physikalisches Mutagen, N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin, Ethylmethanesulfonat, Nitrit- oder Acridinfarbstoff als ein chemisches Mutagen.

– Verfahren für den Abbau organischer Verbindungen und der Umweltsanierung –

[0049] Die Abbaubehandlung für organische Verbindungen (zum Beispiel aromatische Verbindungen und chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen) unter Verwendung der erfindungsgemäßen, neuartigen mikrobiellen Stämme kann durch in Kontakt bringen der organischen Verbindungen in einem wässrigen Medium, Boden und Luft mit den vorher beschriebenen Mikroorganismen durchgeführt werden. Jedes Verfahren zum in Kontakt bringen der Mikroorganismen mit den organischen Verbindungen kann verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Organismen ihre Abbauaktivitäten aufweisen können, ein diskontinuierliches (Batch-) Verfahren, ein halbkontinuierliches Verfahren oder ein kontinuierliches Verfahren sind anwendbar. Die Mikroorganismen können im halbimmobilisierten Zustand oder immobilisiert auf einem geeigneten Träger verwendet werden. Die zu behandelnden Gegenstände, wie etwa Abfallflüssigkeit, Boden oder Luft können, wenn notwendig, einer Vorbehandlung unterzogen werden.

Abbau organischer Verbindungen oder Schadstoffe in einem wässrigen Medium

[0050] Die erfindungsgemäße Abbaubehandlung der aromatischen organischen Verbindungen oder chlorierten aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen in einem wässrigen Medium kann durch in Kontakt bringen der in dem wässrigen Medium vorhandenen aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen, mit den vorher beschriebenen Stämmen JM2N, JM6U und JM7 durchgeführt werden. Während repräsentative Ausführungsbeispiele für die Anwendung hiernach beschrieben werden, können jedoch die erfindungsgemäßen Mikroorganismen für jede Reinigungsbehandlung von den aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen in dem wässrigen Medium ohne Begrenzung auf diese Ausführungsformen verwendet werden.
[0051] Das einfachste Verfahren ist zum Beispiel den Stamm JM2N, JM6U oder JM7 direkt in das mit aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen halogenierten organischen Verbindungen verschmutzte wässrige Medium einzubringen. Obwohl es bevorzugt ist den pH, die Salzkonzentration, die Temperatur und die Konzentration der Schadstoffe in dem wässrigen Medium einzustellen, können die Stämme JM2N, JM6U und JM7 ihre Abbauaktivität aufrecht erhalten, außer die Umwelt ist extrem sauer oder alkalisch oder hat eine hohe Salzkonzentration. Sie können ebenfalls um 15°C proliferieren, was als eine mittlere Temperatur von Grundwasser in Japan angenommen wird, wobei ihre Abbauaktivität gut aufrecht erhalten wird.
[0052] In einem weiteren Anwendungsausführungsbeispiel wird ein Fermentationsbehälter vorgesehen um die Stämme JM2N, JM6U oder JM7 zu kultivieren, worin ein mit aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen verschmutztes wässriges Medium für den Abbau bei einer festgesetzten Fließgeschwindigkeit eingebracht wird. Das Einbringen und Ausbringen des wässrigen Mediums kann kontinuierlich, in Abständen oder schubweise in Abhängigkeit von der Behandlungskapazität durchgeführt werden, und eine derartige Systemkontrolle kann das Abbausystem in Übereinstimmung mit der Konzentration der aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen, halogenierten organischen Verbindungen optimieren.
[0053] In einer anderen Ausführungsform werden die Stämme JM2N, JM6U und JM7 an einen Träger angehaftet, zum Beispiel Bodenteilchen, gefolgt durch Einfüllen des Trägers in ein Reaktionsgefäß, in welches ein wässriges Medium verschmutzt mit organischen Verbindungen für die Abbaubehandlung eingebracht wird. Für diesen Zweck kann jeder Träger als ein Träger sowie die Bodenteilchen verwendet werden, aber diejenigen mit einer hohen Haltekapazität für Mikroorganismen und welche bei der Belüftung nicht hinderlich sind, werden stärker bevorzugt. Zum Beispiel können verschiedene für Bioreaktoren in der medizinischen Industrie, der Lebensmittelindustrie und der Abwasserbehandlung herkömmlich verwendete mikrobielle Träger ebenfalls als Materialien verwendet werden, welche für Mikroorganismen besiedelbare Räume zur Verfügung stellen.
[0054] Spezifisch enthalten derartige Träger anorganische granuläre Träger, wie etwa poröses Glas, Keramik, Metalloxide, Aktivkohle, Kaolinit, Bentonit, Zeolith, Silicagel, Aluminiumoxid und Anthracoid; Träger im Gelzustand, wie etwa Stärke, Agar, Chitin, Chitosan, Polyvinylalkohol, Algininsäure, Polyacrylamid, Carragenan, Agarose und Gelatine; Ionenaustauscher-Zellulose, Ionenaustauscherharz, Zellulosederivate, Glutaralde-

hyd, Polyacrylsäure, Polyurethan und Polyester. Natürliche Zellulosematerialien, wie etwa Baumwolle, Hanf oder Papier, oder natürliche Ligninmaterialien, wie etwa Sägemehl oder Baumrinde, sind ebenfalls für die Verwendung erhältlich.

– Abbau von organischen Verbindungen und Schadstoffen im Boden –

[0055] Erfindungsgemäß wird die Abbaubehandlung von aromatischen Verbindungen und/oder chlorierten organischen Verbindungen im Boden durch den Kontakt der im Boden vorhandenen aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen mit dem Stamm JM2N (JM6U oder JM7) durchgeführt. Repräsentative Anwendungsausführungsbeispiele werden hiernach beschrieben, wobei diese Stämme zur Reinigung aromatischer Verbindungen und/oder flüchtiger chlorierter organischer Verbindungen in jedem Boden ohne Begrenzung durch diese Ausführungsbeispiele verwendet werden können.
[0056] Ein vergleichsweise einfaches und bevorzugtes Verfahren umfasst das direkte Einbringen des Stamms JM2N, JM6U oder JM7 in den mit aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen verschmutzten Boden. Als ein Einbringungsverfahren wird der Mikroorganismus auf die Oberfläche des Bodens aufgebracht oder durch eine tief in die Erde gegrabene Vertiefung, falls die Behandlung in einer relativ tiefen Schicht durchgeführt wird. Falls ein Druck durch Luft oder Wasser ausgeübt wird, kann der Mikroorganismus wirkungsvoller in einem weiteren Bereich sich ausbreiten. In diesem Fall ist es bevorzugt, die Bodenbedingungen geeignet für das Überleben des Stamms JM2N, JM6U oder JM7 einzustellen. Es ist ebenfalls bevorzugt einen Träger für den Mikroorganismus zu verwenden, da die Wachstumsrate der Stämme JM2N, JM6U und JM7 in der Anwesenheit eines Trägers, wie etwa eines stark Wasser absorbierenden Polymers usw. ansteigt.
[0057] Da diese Mikroorganismen bei einer Temperatur von 15°C proliferieren, d. h. einer mittleren Temperatur des Bodens in Japan, können sie ausreichend Aktivität für den Abbau von organischen Verbindungen und Schadstoffen aufrecht erhalten.
[0058] In einer weiteren Ausführungsform wird der Stamm JM2N, JM6U oder JM7 an einen Träger angehaftet, in ein Reaktionsgefäß gefüllt und dann in den Boden eingebracht, hauptsächlich in den mit Schadstoffen, wie etwa aromatische Verbindungen und/oder chlorierten aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen, kontaminierten Wasserkörper. Das Reaktionsgefäß hat bevorzugt ein derartigen Aufbau wie einen Zaun oder ein Filmblatt, so dass es einen weiten Bereich im Boden abdecken kann. Die Träger können in diesem Fall aus bisher beschriebenen Materialien hergestellt werden.

– Abbau von organischen Verbindungen/Schadstoffen in der Gasphase –

[0059] Schadstoffe in der Gasphase können durch in Kontakt bringen der in der Gasphase vorhandenen Schadstoffe mit dem Stamm JM2N, JM6U oder JM7 abgebaut werden. Während ein repräsentatives Ausführungsbeispiel für den Abbau im Folgenden beschrieben wird, ist diese Erfindung nicht darauf begrenzt, aber die erfindungsgemäßen Stämme sind für jede Reinigungsbehandlung von aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten organischen Verbindungen in der Gasphase einsetzbar.
[0060] In einer Ausführungsform werden die Stämme JM2N, JM6U oder JM7 in einem Kulturgefäß kultiviert, in welches mit Schadstoffen verschmutzte Luft in einer vorbestimmten Fließgeschwindigkeit eingebracht wird, um die Schadstoffe abzubauen. Während das Verfahren zum Einbringen nicht begrenzt ist, ist es bevorzugter, dass das Kulturmedium durch Einbringen von Luft bewegt wird, um die Belüftung zu vereinfachen. Die Luft kann kontinuierlich eingebracht oder abgelassen werden, aber Behandlungen durch ein schubweises Verfahren oder ein Intervallverfahren ist ebenfalls in Abhängigkeit von der Behandlungskapazität des Gefäßes möglich, und eine derartige Systemkontrolle kann das Abbausystem in Übereinstimmung mit der Konzentration der aromatischen Verbindungen und/oder der flüchtigen halogenierten organischen Verbindungen optimieren.
[0061] In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird der Stamm JM2N, JM6U oder JM7 an einen Träger angehaftet, zum Beispiel Bodenteilchen, in ein Reaktionsgefäß gefüllt, in welches mit aromatischen Verbindungen und/oder flüchtigen chlorierten Verbindungen kontaminierte Luft eingebracht wird, um die Schadstoffe abzubauen. Die vorher erwähnten Träger können zu diesem Zweck verwendet werden.
[0062] Zusätzlich gibt es als die Trägermaterialien, welche den Mikroorganismus sowohl erhalten als auch versorgen können, Kompost, der häufig in der Landwirtschaft, Forstwirtschaft und Fischereinwirtschaft verwendet wird; Pflanzentrockenstoffe, wie etwa Malz, Stroh, Sägemehl, Reiskleie, Sojabohnenquarkabfall und Bagasse; und Meeresabfälle, wie etwa Krabbenschalen oder Hummerschalen.
[0063] Zur Reinigung der verschmutzten Luft kann der Mikroorganismus in ein Gefäß gefüllt mit einem Träger oder nach vorheriger Kultur mit dem Träger angebracht werden. Die Reaktionsbedingungen, wie etwa Nährstoffe, Wassergehalt und Sauerstoffkonzentration sollten wünschenswerter weise für die wirksamen Abbaureaktionen beibehalten werden. Das Verhältnis zwischen dem Volumen des Trägers und des Wassergehalts in dem Reaktionsgefäß kann unter Berücksichtigung des mikrobiellen Wachstums und der Belüftungswirksam-

keit gewählt werden, und die Form des Reaktionsgefäßes kann in Abhängigkeit vom Volumen und der Schadstoffkonzentration der zu behandelnden Luft eingestellt werden. Auf jeden Fall werden diese Bedingungen bestimmt, um den Kontakt der Luft mit dem auf dem Träger festgehaltenen Mikroorganismus zu vereinfachen. Reaktionsgefäße in der Form einer Säule, eines Rohrs, eines Tanks oder einer Kiste werden vorteilhafterweise verwendet. Das Reaktionsgefäß mit einem derartigen Aufbau kann in eine Einheit zusammen mit einem Belüftungsrohr oder einem Luftfilter aufgebaut werden, in Abhängigkeit von ihrer Kapazität wahlweise in Serie geschaltet.

[0064] Die verschmutzte Luft kann zunächst durch das Trägermaterial adsorbiert werden und die Wirkung der Mikroorganismen kann in seltenen Fällen nicht beobachtet werden. Jedoch wird gesagt, dass der an den Träger absorbierte Schadstoff nach einer bestimmten Zeitspanne abgebaut wird und ein neuer Schadstoff auf der Oberfläche des Träger adsorbiert wird, von dem der erste Schadstoff durch Abbau entfernt wurde, wodurch die Absorptionskapazität des Trägers regeneriert wird. Folglich wird eine konstante Abbaurate ohne Sättigung der Schadstoff-eliminierenden Fähigkeit erwartet.

[0065] Herkömmliche mikrobielle Kulturmedien können für die Proliferation des erfindungsgemäßen Mikroorganismus zur Reinigung von Schadstoffen verwendet werden. Zum Beispiel Bouillonmedium, M9-Medium, 2 × YT-Medium, L-Medium oder ein Medium mit Polypepton, Hefeextrakt und Kohlenstoffquellen wie etwa Zuckern und organischen Säuren in einem angemessenen Verhältnis ist anwendbar. Diese Medien sind in einer flüssigen Form oder einer gelartigen Form anwendbar, hergestellt durch Zugabe von Agarose zu der flüssigen Form.

[0066] Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die Behandlung von Abfallflüssigkeit, Boden und Luft in einem geschlossenen System oder einem offenen System einsetzbar. Verschiedene Verfahren zur Immobilisierung des Mikroorganismus auf dem Träger oder für die Erleichterung des Wachstums des Mikroorganismus können zusammen verwendet werden.

Beispiel 1

Erzeugen der mikrobiellen Stämme JM2N, JM6U und JM7

(1) Erzeugen der Mikroorganismen A, B und C durch Mutagenisierung des Stamms J1.

[0067] Kolonien des Stamms J1 auf einem Agarmedium wurden in 100 ml M9-Medium mit 0,1% Hefeextrakt und 200 ppm Phenol inokuliert und unter Schütteln in einem Sakaguchikolben bei 30°C für 18 Stunden kultiviert. 10 ml Kultur wurden zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurden 5 ml M9-Medium mit 20 ppm NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) und 200 ppm Phenol zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden unter Schütteln bei 30°C kultiviert.

[0068] Die Kultur begann innerhalb von zwei bis drei Stunden aufgrund der Bildung von 2 Hydroxymuconsäuresemialdehyd, einem Zwischenabbauprodukt von Phenol, gelb zu werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultur auf einem M9-Agarmedium mit 100 ppm Indol und 0,1% Hefeextrakt ausgestrichen und bei 30°C inkubiert.

[0069] Zwei Tage später waren dort 25 Kolonien mit tiefblauer Farbe, gebildet aufgrund des Indigos, als ein Oxidationsprodukt von Indol.

[0070] Jede Kolonie wurde isoliert und in M9-Medium nur ergänzt mit 0,1 Hefeextrakt, inokuliert und unter Schütteln bei 25°C 24 Stunden kultiviert. 10 ml jeder Kultur wurden in eine 27,5 ml-Glasflasche überführt. Nach Versiegeln der Flasche mit einem Butylgummistopfen und einer Aluminiumkappe wurde gasförmiges TCE in die Flasche unter Verwendung einer Spritze gegeben, gefolgt durch Schütteln bei 25°C für den biologischen TCE-Abbau. Die anfängliche Konzentration von TCE war 12 ppm, unter der Annahme, dass das gesamte zugegebene TCE vollständig in der Kultur gelöst hat. Die TCE-Konzentration jedes Kulturmediums nach 6 Stunden wurde durch Gaschromatographie (GC-14B, hergestellt von Shimadzu Seisakusho Co., Säule: hergestellt von J & B Co.: DB-624) gemessen.

[0071] Drei Vergleichsproben, 1: M9-Medium mit 0,1% Hefeextrakt aber ohne Zellen, 2: ein Kulturmedium in welchem der Stamm J1 wie vorher beschrieben wuchs, 3: ein Kulturmedium in welchem der Stamm JM1 wie vorher beschrieben wuchs, wurden hergestellt und einen Abbautest von TCE unter Verwendung jeder Vergleichsprobe wurde ebenfalls durchgeführt. Im Ergebnis gab es drei Proben, die identische TCE-Abbaufähigkeiten mit jener der Vergleichsprobe 3 aufwiesen, und jede Probe wird hiernach als A, B und C bezeichnet. Die Restkonzentration an TCE in jeder der drei Proben wird in der Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Probe A	Probe B	Probe C
TCE Rest-konzentration (ppm)	11,7	11,2	1,1	1,1	1,4	1,2

(2) Vergleich der Wachstumsrate der Mikroorganismen A, B und C und des Stammes JM1.

[0072] Jeder Mikroorganismus der Proben A, B und C (hiernach als Mikroorganismen A, B und C bezeichnet) und des Stamms JM1 wurde gründlich an das M9-Medium mit Natriummalat adaptiert. Spezifisch wird jede Kultur der Proben A, B und C und der Probe 3 in M9-Medium mit 0,05 Hefeextrakt und 1% Natriummalat zu 1/100 des Volumens zugegeben und für 48 Stunden bei 25°C kultiviert. Dann wurde 1/100 des Volumens der Kultur in M9-Medium mit 2% Natriummalat gegeben und weiter bei 25°C für 48 Stunden kultiviert, was zweimal wiederholt wurde. Dann wurde 1/100 des Volumens der erhaltenen Kultur in M9-Medium mit 2% Natriummalat gegeben und für 72 Stunden bei 15°C kultiviert. Die derartig erhaltene Kultur wurde auf einem Agarmedium mit 1% Natriummalat ausgestrichen und bei 15°C für 3 Tage kultiviert. Als Ergebnis wurden 10 bis 15 Kolonien auf jedem Agarmedium gebildet. Jeder Mikroorganismus A, B und C zeigten im Vergleich eine zueinander unterschiedliche Koloniegröße, ebenfalls unterschiedlich zu der Koloniegröße des Stamms JM1. Die mittleren Koloniegrößen der Mikroorganismen A, B und C und des Stamms JM1 sind in der Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Stamm JM1	Mikro-organismus A	Mikro-organismus B	Mikro-organismus C
Mittlerer Koloniedurchmesser (mm)	2,2	5,1	6,5	4,2

[0073] Eine Kolonie jeder auf dem Agarmedium gewachsenen Kontrolle wurde fünfmal im M9-Flüssigmedium mit 2% Natriummalat subkultiviert und die Endkultur wurde auf M9-Medium mit 1% Natriummalat ausgestrichen und bei 15°C für drei Tage inkubiert. Die Reihenfolge jeder mittleren Koloniegröße war Stamm B > Stamm A > Stamm C > Stamm JM1, wie in der Tabelle 2 gezeigt, was bestätigt, dass dort ein klarer Unterschied zwischen den Wachstumsraten der Mikroorganismen A, B und C als auch des Stamms JM1 vorhanden ist, und dass der Unterschied nach der Subkultivierung jeder Probe erhalten bleibt.

(3) Vergleich der Abbaufähigkeit der Mikroorganismen A, B und C und des Stamms JM1 von TCE im Boden.

[0074] Jede Kolonie der Mikroorganismen A, B und C und des Stamms JM1, gewachsen auf M9-Medium mit 1% Natriummalat, wurde in 200 ml des M9-Mediums mit 2% Natriummalat in einem Sakaguchikolben inokuliert und unter Schütteln bei 15°C für 70 Stunden kultiviert, wodurch jede Kultur der Mikroorganismen A, B und C und des Stamms JM1 erzeugt wurde.

[0075] Jede der vorherigen Kulturen wurde in M9-Medium mit 2% Natriummalat zu 1/100 des Volumens inokuliert, um Zellsuspensionen der Mikroorganismen A, B und C und des Stamms JM1 erzeugen.

[0076] Dann wurden mehrere 68 ml-Glasflaschen vorbereitet und 50 g nicht sterilisierter Sawarasand (Wassergehalt etwa 10%) in jede Flasche getan. Diese Glasflaschen wurden in 4 Gruppen aufgeteilt und zu den Flaschen jeder Gruppe wurde einer der Kulturen der Mikroorganismen A, B, C und des Stamms JM1 zugegeben (jeweils 5 ml). Nach Kultivierung aller baumwollverschlossener Glasflaschen bei 15°C für 0,8 Tage wurde jede mit einem Butylgummistoppen und einer Aluminiumkappe versiegelt.

[0077] Als Nächstes wurde gasförmiges TCE in jede Flasche jeder Gruppe mit einer Spritze eingebracht, so dass die TCE-Konzentration 50 ppm unter der Voraussetzung sein wird, dass das gesamte zugegebenen TCE vollständig im Wasser in der Flasche gelöst wird. Während der Inkubation jedes Glases mit zugegebenen TCE

bei 15°C wurde der Zeitverlauf der TCE-Konzentration in der Gasphase jeder Flasche durch Gaschromatographie für 3 Stunden ab der TCE-Zugabe gemessen. Die TCE-Abbaurate pro 1 ml Wasser in dem Boden (in der Annahme, dass der Mikroorganismus in den Gasflaschen in dem im Boden enthaltenen Wasser verteilt ist) und pro Zeiteinheit (ppm TCE/Stunde) wurde aus den erhaltenen Ergebnissen berechnet.

[0078] Der vorher beschriebene Vorgang wurde wiederholt, außer dass die Wachstumsphase während des Abbaus von TCE durch Änderung des Zeitraums der stationären Kultivierung von 0,8 Tagen auf 1,8 Tage, 2,8 Tage und 3,7 Tage geändert wurde. Jede Abbaurate (ppm TCE/Stunde/ml) der Mikroorganismen A, B und C und des Stamms JM1 entsprechend der stationären Kultivierungsdauer von 1,8 Tagen, 2,8 Tagen bzw. 3,7 Tagen, ausgerückt pro 1 ml in dem im Boden enthaltenen Wasser (in der Annahme, dass der Mikroorganismus in der Glasflasche in dem Bodenwasser verteilt ist) und pro Zeiteinheit wurde aus den erhaltenen Ergebnissen berechnet. Wie in der Figur gezeigt, zeigen die Ergebnisse an, dass obwohl das Muster der Wachstumsphase jeder Mikroorganismus ziemlich gut miteinander übereinstimmt, die TCE-Abbauraten zwischen den Mikroorganismen A, B, C und dem Stamm JM1 deutlich unterschiedlich waren.

[0079] Der Abbau von TCE in dem Boden wurde ebenfalls durch das gleiche Verfahren wie vorher beschrieben unter Verwendung der Mikroorganismen A, B und C, fünfmal subkultiviert in M9-Agarmedium mit 1% Natriummalat, durchgeführt. Als ein Ergebnis, wie in der Figur gezeigt, blieb der Unterschied in den TCE-Abbauraten der Mikroorganismen A, B, C und Stamm JM1 nach wie vor erhalten.

[0080] Von den Tatsachen, dass ein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate auf dem gleichen Kulturmedium zwischen den Mikroorganismen A, B und C und dem Stamm JM1 wie in Beispiel 1–(2) beschrieben beobachtet wurde, wobei dieser Unterschied selbst nach 5 Subkultivierungen beobachtet wurde, und dass ein signifikanter Unterschied in den TCE-Abbauraten ebenfalls zwischen den Mikroorganismen A, B und C und dem Stamm JM1, wie in Beispiel 1–(3) beschrieben, beobachtet wurde, wobei der Unterschied selbst nach den Subkulturen beobachtet wurde, wurde geschlossen, dass die Mikroorganismen A, B und C sich vom Stamm JM1 unterscheiden, und dass die Mikroorganismen A, B und C voneinander unterschiedliche, neuartige Mikroorganismen sind. Die Mikroorganismen wurden daher im National Institut of Bioscience & Human Technology, Agency of Industrial Science Technology (Tsukubashi, Ibaragi Präfektur) mit der folgenden Bezeichnung und der Hinterlegungsnummer der Mikroorganismen A, B und C hinterlegt:

Mikroorganismus A: JM2N; FERM BP-5961
Mikroorganismus B: JM6U; FERM BP-5962
Mikroorganismus C: JM7; FERM BP-5957

– Abbau von organischen Verbindungen/Verfahren für die Umweltsanierung durch Stamm JM2N (Beispiele 2 bis 4) –

Beispiel 2

Abbau von DCE in einer wässrigen Lösung unter Verwendung des Stamms JM2N

[0081] Eine Kolonie des Stammes JM2N, gewachsen auf M9-Agarmedium mit 1% Natriummalat, wurde in 200 ml M9-Medium mit 2% Natriummalat in einem Sakaguchikolben inokuliert und unter Schütteln bei 15°C für 70 Stunden kultiviert.

[0082] Ein 10 ml-Aliquot des vorherigen Kulturmediums wurde in eine 27,5 ml-Glasflasche gegeben und der DCE-Abbau wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 1–(1) untersucht, außer, dass 10 ppm cis-1,2-Dichlorethylen (cis-1,2-DCE) und traps-1,2-Dichlorethylen (traps-1,2-DCE) zugegeben wurden, und 5 ppm 1,1-Dichlorethylen (1,1-DCE) anstelle von 5 ppm TCE zugegeben wurden.

[0083] Die Konzentration des restlichen DCE nach 6 Stunden Kultivierung wurde durch dasselbe, für das restliche TCE verwendete Verfahren in Beispiel 1–(1) gemessen. Die Probe in welche kein Mikroorganismus zugegeben wurde, wurde als eine Vergleichsprobe verwendet. Wie in der Tabelle 3 aufgelistet, zeigten die Ergebnisse, dass der Stamm JM2N vorteilhafterweise ebenfalls Dichlorethylen abbauen kann.

Tabelle 3

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM2N
cis-1,2-DCE	98 (%)	11 (%)
trans-1,2-DCE	97	14
1,1-DCE	91	18

Beispiel 3

Abbau von aromatischen Verbindungen in einer wässrigen Lösung unter Verwendung des Stamms JM2N (Flüssigkultursystem)

[0084] Der Zeitverlauf der Konzentrationsänderung der aromatischen Verbindungen wurde durch dasselbe Verfahren wie in Beispiel 2 gemessen, außer, dass die abbauenden Chemikalien 200 ppm Phenol, 200 ppm o-Kresol und 200 ppm m-Kresol (jeweils direkt zugegeben) und 50 ppm Toluol (als ein Gas zugegeben) waren. Die Konzentrationen an Phenol und Cresol wurden durch Flüssigchromatographie gemessen, während die Konzentration an Toluol durch Gaschromatographie gemessen wurde. Der restliche Anteil jeder Verbindungen nach 6 Stunden wird in der Tabelle 4 gezeigt. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen, dass der Stamm JM2N diese aromatische Verbindung wirkungsvoll abbauen kann.

Tabelle 4

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM2N
Phenol	99(%)	9(%)
o-Cresol	99	11
m-Cresol	98	11
Toluol	95	4

Beispiel 4

Abbau von TCE in der Gasphase durch Belüftung der Kulturflüssigkeit von Stamm JM2N

[0085] Eine Kolonie des Stamms JM2N, gewachsen auf M9-Agarmedium mit 1% Natriummalat wie in Beispiel 1–(2), wurde in einen Sakaguchikolben mit 200 ml M9-Medium ergänzt mit 2 Natriummalat inokuliert und unter Schütteln bei 15°C für 70 Stunden kultiviert.

[0086] Ein 30 ml-Aliquot der vorherigen Kultur wurde in eine 68 ml-Glasflasche gegeben, durch welche die Luft, welche eine gesättigte Lösung von TCE belüftet hatte, bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min für 30 min durchgeleitet wurde. Dann wurde die Flasche vollständig mit einem Butylgummistoppen und einer Aluminiumkappe versiegelt und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Der restliche Anteil von TCE nach 24 Stunden wurde durch Gaschromatographie gemessen.

[0087] Als eine Kontrolle wurde das restliche TCE in einem ähnlichen System aber ohne Mikroben durch Gaschromatographie gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 gezeigt. Es ist aus den Ergebnissen offensichtlich, dass Stamm JM2N TCE in der Gasphase abbauen kann.

Tabelle 5

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM2N
TCE Restanteil(%)	94	42

– Abbau von organischen Verbindungen durch den Stamm JM6U/Verfahren für die Umweltsanierung (Beispiele 5 bis 7)–

Beispiel 5

Abbau von TCE in einer wässrigen Lösung unter Verwendung des Stamms JM6U

[0088] Die DCE-Abbaufähigkeit des Stamms JM6U wurde durch dasselbe Verfahren wie in Beispiel 2 gemessen, außer dass der Stamm JM2N in Beispiel 2 durch den Stamm JM6U ersetzt wurde.

[0089] Als eine Kontrolle wurden keine Mikroorganismen zugegeben. Der restliche Anteil von DCE nach 6

Stunden Inkubation wird in der Tabelle 6 gezeigt. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen, dass der Stamm JM6U DCE abbauen kann.

Tabelle 6

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM6U
cis-1,2-DCE	96(%)	25(%)
trans-1,2-DCE	98	19
1,1-DCE	94	22

Beispiel 6

Abbau von aromatischen Verbindungen in der wässrigen Phase unter Verwendung des Stamms JM6U (Flüssigkultursystem)

[0090] Der Abbau von aromatischen Verbindungen wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 3 durchgeführt, außer dass der Mikroorganismus der Stamm JM2N durch den Stamm JM6U ersetzt wurde. Die Restanteile der aromatischen Verbindungen nach 6 Stunden Inkubation sind in der Tabelle 7 gezeigt.
[0091] Dieses Beispiel zeigt, dass der Stamm JM6U verschiedenen aromatische Verbindungen abbauen kann.

Tabelle 7

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM6U
Phenol	99(%)	19(%)
o-Cresol	99	22
m-Cresol	98	18
Toluol	96	12

Beispiel 7

Abbau von TCE in der Luft durch Belüften der Flüssigkultur des Stamms JM6U

[0092] Der Abbau von TCE in der Luft wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 4 durchgeführt, außer, dass der Stamm JM6U anstelle von JM2N verwendet wurde. Als eine Kontrolle wurde der Restanteil an TCE in dem gleichen Experimentalsystem ohne Mikroben wie in Beispiel 4 gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 gezeigt. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen, dass TCE in der Luft durch den Stamm JM6U abgebaut werden kann.

Tabelle 8

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM6U
TCE Restanteil (%	91	51

– Abbau von organischen Verbindungen unter Verwendung des Stammes JM7/Verfahren zur Umweltsanierung (Beispiele 8 bis 10) –

Beispiel 8

Abbau von DCE in einer wässrigen Lösung durch Stamm JM7

[0093] Der Abbau von DCE wurde durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 2 gemessen, außer dass der Stamm JM7 anstelle JM2N verwendet wurde. Als eine Kontrolle wurde ein Experimentalsystem ohne Mikroorganismen verwendet. Der Restanteil von DCE nach 6 Stunden Inkubation wird in Tabelle 9 gezeigt. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen, dass der Stamm JM7 DCE abbauen kann.

Tabelle 9

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM7
cis-1,2-DCE	98(%)	15(%)
trans-1,2-DCE	97	18
1,1-DCE	91	25

Beispiel 9

Abbau von aromatischen Verbindungen in wässriger Lösung unter Verwendung von JM7 (Flüssigkultursystem)

[0094] Der Abbau von aromatischen Verbindungen wurde in der gleichen Art und Weise wie in Beispiel 3 durchgeführt, außer dass der Stamm JM7 anstelle des Stamms JM2 verwendet wurde. Die Restanteile der aromatischen Verbindungen nach 6 Stunden Inkubation werden in der Tabelle 10 gezeigt. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen, dass der Stamm JM7 verschiedene aromatische Verbindungen abbauen kann.

Tabelle 10

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM7
Phenol	99(%)	12(%)
o-Cresol	99	14
m-Cresol	98	17
Toluol	95	7

Beispiel 10

Abbau von TCE in der Luft durch Belüften der Flüssigkultur des Stamms JM7

[0095] Der Abbau von TCE wurde durch das gleiche Verfahren wie in Beispiel 4 durchgeführt, außer, dass der Stamm JM7 anstelle des Stamms JM2N verwendet wurde. Als eine Kontrolle wurde der Restanteil an TCE nach 24 Stunden in dem gleichen Experimentalsystem ohne Mikroben gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 gezeigt. Die Ergebnisse in diesem Beispiel zeigen, dass der Stamm JM7 TCE in der Luft abbauen kann.

Tabelle 11

	Kontrolle (ohne Zellen)	Stamm JM7
TCE Rest-anteil (%)	94	51

[0096] Wie aus den vorherigen Beschreibungen offensichtlich; haben die neuartigen Stämme JM2N, JM6U und JM7 die Fähigkeiten zum Abbau organischer Verbindungen ohne Induktoren.
[0097] Unter Verwendung dieser Mikroorganismen ist es möglich, wirkungsvoll organische Verbindungen abzubauen, als auch wirkungsvoll die mit verschiedenen Schadstoffen verschmutzte Umwelt, wie etwa organischen Verbindungen, sanieren zu können.
[0098] Überdies können diese Mikroorganismen wirkungsvoll Schadstoffe in einer nicht sterilisierten Umwelt abbauen, wodurch die Wirksamkeit der Umweltsanierung erhöht wird.

Patentansprüche

1. Mikroorganismus ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
JM2N, hinterlegt als FERM BP-5961;
JM7, hinterlegt als FERM BP-5957; und
JM6U, hinterlegt als FERM BP-5962,
wobei jeder der Mikroorganismen ein Mutantenstamm des Stammes J1 ist, hinterlegt als FERM BP-5102, und jeder konstitutiv eine Oxygenase exprimiert.

2. Verfahren zum biologischen Abbau aromatischer Verbindungen oder chlorierter aliphatischer Kohlenwasserstoffverbindungen durch Verwendung eines Mikroorganismus nach Anspruch 1.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die aromatische Verbindung wenigstens eine organische Verbindung ausgewählt aus Phenol, Toluol und Kresol ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die chlorierten aliphatischen Kohlenwasserstoffverbindungen wenigstens eine organische Verbindung ausgewählt von Trichlorethylen und Dichlorethylen sind.

5. Verfahren zur Sanierung einer mit einem Schadstoff kontaminierten Umwelt, mit Abbau des Schadstoffs durch Einsatz eines Mikroorganismus nach Anspruch 1.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Umwelt ein wässriges Medium ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das wässrige Medium mit einem Träger in Kontakt gebracht wird auf dem sich der Mikroorganismus befindet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Träger auf dem sich der Mikroorganismus befindet, in einem Behälter angeordnet wird und das wässrige Medium von einer Seite eingelassen und von der anderen Seite des Behälters ausgelassen wird.

9. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Umwelt ein Boden ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Mikroorganismus in dem wässrigen Medium enthalten ist und das wässrige Medium in den Boden eingebracht wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei wenigstens ein Nährstoff für den Mikroorganismus und Sauerstoff in den Boden eingebracht wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das wässrige Medium in den Boden durch Anlegen von Druck über eine in den Boden vorgesehene Injektionsvertiefung eingebracht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Mikroorganismus in eine flüssige Phase aufgenommen wird, gefolgt vom Einbringen des Bodens in die flüssige Phase.

14. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Boden mit dem Träger in Kontakt gebracht wird auf dem sich der Mikroorganismus befindet.

15. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Umwelt Luft ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Luft in die den Mikroorganismus aufnehmende, flüssige Phase eingebracht wird.

17. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Luft mit dem Träger in Kontakt gebracht wird auf dem sich der Mikroorganismus befindet.

18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Luft von einer Seite eingelassen und von der anderen Seite des Behälters ausgelassen wird, der den Träger enthält auf dem sich der Mikroorganismus befindet.

19. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Schadstoff eine aromatische Verbindung ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die aromatische Verbindung wenigstens eine von Phenol, Toluol oder Kresol ist.

21. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Schadstoff chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindungen ist.

22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffverbindung wenigstens eine von Trichlorethylen oder Dichlorethylen ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR

