

Dibenzofuran: Bakterielle Mineralisierung

– Kinetik des Abbaus in heterogenen Systemen

K. Figge¹, A. Wernitz

NATEC Institut für naturwissenschaftlich-technische Dienste GmbH, W-2000 Hamburg 50, Behringstraße 154

P. Fortnagel, R.-M. Wittich, H. Harms

Institut für Allgemeine Botanik, Abt. Mikrobiologie, Universität Hamburg, W-2000 Hamburg 52, Ohnhorststraße 52

Zusammenfassung. In Flüssigkulturen und in Mustern unterschiedlicher Böden wurde der Abbau von Dibenzofuran (DBF) durch eine Reinkultur des Stammes *Pseudomonas* sp. HH69 und durch ein aus *Pseudomonas* sp. NRM und dem Nocardia-ähnlichen Stamm NRH bestehendes Konsortium zeitlich verfolgt und bilanziert.

In belüfteten Flüssigkulturen (Batchverfahren) verwerteten Reinstamm und Konsortium Dibenzofuran als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. Uniform ¹⁴C-markiertes DBF wurde zu über 61 % in ¹⁴CO₂ überführt, etwa 20 % des Radiokohlenstoffes wurden in die Zellmasse aufgenommen und 16 % waren in zeitweilig in der Kulturflüssigkeit akkumulierenden Metaboliten sowie in nicht weiter verwertbaren Stoffwechselendprodukten wiederzufinden.

In verschiedenen Testböden, die mit DBF in Konzentrationen zwischen 0,2 und 192 ppm kontaminiert waren, wiesen die Mikroorganismen Abbauleistungen auf, die mit denen in Flüssigkulturen vergleichbar waren. So wurde durch den Stamm *Pseudomonas* sp. HH69 Dibenzofuran in den sterilen Testböden innerhalb von 10 Tagen bis zu 75 % in CO₂ überführt.

Abstract. Dibenzofuran: Bacterial Mineralization. The degradation of uniformly ¹⁴C-labelled dibenzofuran (DBF) by the strain *Pseudomonas* sp. HH 69 and a consortium consisting of the DBF-degrading *Pseudomonas* strain NRM and an accompanying Nocardia-like strain NRH, was monitored in liquid-batch cultures and in different soil samples.

Experiments involving the strain and a consortium in aerated liquid cultures (batch process) showed that DBF was utilized as a source of energy and carbon. Thereby, more than 65 % of DBF is rapidly converted to CO₂, about 20 % to biomass and only about 10 % to slow-degrading intermediate metabolites, respectively. The same microorganisms also exhibited comparable degrees of degradation efficiency in various types of soils contaminated with DBF. For instance, DBF, uniformly distributed in sterile soil samples, in concentrations between 0.2 to 200 ppm, was converted to CO₂, within 10 days, to the extent of about 75 % by the strain *Pseudomonas* sp. HH 69.

1 Einleitung

Polyhalogenierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane sind seit geraumer Zeit als toxische Problemstoffe erkannt [1 – 5]. Sie werden hauptsächlich infolge der gewerblichen und industriellen Aktivitäten des Menschen weit verbreitet in der Umwelt und sogar in Nahrungsmitteln angetroffen. Sie widerstehen dem mikrobiellen Abbau [6, 7], wobei ein möglicher Grund für diese Persistenz in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften liegt, z.B. schlechte Wasserlös-

lichkeit und hohe Stabilität der anellierten, mit Halogenen substituierten aromatischen Kerne [8,9].

Diese Arbeit beschreibt die Kinetik und Bilanz der Mineralisierung von Dibenzofuran (DBF) – das ist das Grundgerüst der halogenierten Dibenzofurane – durch Bakterien in Flüssigkulturen und definierten Testböden (zur Mineralisierung von halogenierten Dioxinen und Furanen vgl. Abschnitt 4). Der Abbauweg für diese Verbindung wurde von uns bereits beschrieben [10].

2 Versuchsdurchführung

2.1 Mikroorganismen

Für die DBF-Abbauversuche wurde der Reinstamm *Pseudomonas* sp. HH69 [10] und ein bezüglich seiner Abbauleistung identisches Zwei-Spezies-Konsortium eingesetzt, bestehend aus dem gelb gefärbten, abbauaktiven Bakterienstamm *Pseudomonas* sp. NRM sowie dem begleitenden, Supplie liefernden Nocardia-ähnlichen Stamm NRH, der bisher nicht näher untersucht wurde (Supplie sind Substanzen, die für den normalen, bakteriellen Stoffwechsel erforderlich sind, z.B. Vitamine).

Die Anzucht der Mikroorganismen erfolgte bei 28 °C in phosphatgepufferter Mineralsalzlösung (vgl. Abschnitt 2.3) mit DBF als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle in der unten beschriebenen Apparatur auf einem Rundschüttler (Modell SM 25-C, Fa. E. Bühler, Tübingen) bei 125 Umdrehungen pro min.

2.2 Modellsubstrat

Halogenfreies Dibenzofuran (DBF, chem. Reinheit > 99 %; Aldrich-Chemie, Steinheim) diente als Modells substrat. Es wurde zur Anzucht der Mikroorganismen (vgl. Abschnitt 2.1) und zur Ermittlung ihrer Abbauleistungen in Flüssigkultur und Boden eingesetzt.

Um den DBF-Abbau verfolgen und eine vollständige Bilanzierung aufstellen zu können, wurde dieses nicht-markierte DBF mit [U-¹⁴C] Dibenzofuran (¹⁴C-DBF : 290,25 MBq (7,84 mCi)/mmol, chem. und radiochem. Reinheit > 99,3 %; Amersham Buchler, Braunschweig) zu Radioaktivitäten von 40,61 kBq (1,098 μCi) und 14,34 kBq (0,388 μCi) pro mg verschnitten.

¹ Korrespondenz: Dr. K. Figge

Tabelle: Kenndaten der Testböden

Bodenparameter	Bodenart				
	Kalkmarsch-Ah ^{a)}	Podsol-Aeh ^{b)}	Pseudogley/ Pelosol-PSd ^{c)}	Braunerde BvAh ^{d)}	Standardboden der BBA ^{e)}
Mineralische Bestandteile:					
– Ton [Gew.-%]	15	1,8	77	5,0	6,3
– Schluff [Gew.-%]	60	5,0	20	16	18
– Sand [Gew.-%]	20	91	3	79	75
– Kalk [Gew.-%]	1,2	0	0	0	0
Org. C-Gehalt [Gew.-%]	2,3	2,0	0,35	0,76	1,2
pH-Wert (CaCl ₂)	7,0	2,9	4,7	5,5	6,3
WK _{max.} [Gew.-%]	38	23	35	15	22
Spez. Oberfläche [m ² /g] ^{f)}	3,01	0,14	44,2	1,50	nicht best.

a) Finkhaushalligkoog b. Husum, Schleswig-Holstein
 b) Segeberger Forst b. Bad Segeberg, Schleswig-Holstein
 c) Waldhof b. Mannheim, Baden-Württemberg

d) Forst am Belauer See b. Bornhöved, Schleswig-Holstein
 e) Neustadt am Rügenberge (Borstel), Niedersachsen
 f) nach der Aufbereitung der Böden (→ Abschnitt 2.4)

2.3 Flüssigmedium und Bodenmaterial

Mineralische Nährlösung

Die phosphatgepufferte Mineralsalzlösung (Zusammensetzung vgl. [10]) wurde in steriler Form mit ¹⁴C-DBF in Flüssigkultur und Boden verwendet.

Testböden

Die Tabelle zeigt die wesentlichen Eigenschaften der 4 verschiedenen Bodentypen. Bei der Auswahl der aus bodenkundlicher Sicht für weite Gebiete Deutschlands repräsentativen Testböden [11] wurde auf eine möglichst große Bandbreite von pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff und spezifischer Oberfläche geachtet. Die Böden wurden vor ihrem Einsatz von groben Bestandteilen befreit, bis zu einem Restwassergehalt < 0,5 Gew.-% getrocknet, auf eine Korngröße ≤ 2 mm gesiebt und mit Dampf sterilisiert.

2.4 Versuchsprinzip und -ablauf

Die Versuche zum Abbau von Dibenzofuran (DBF) in Flüssigkulturen bzw. Böden wurden stets als Parallelansätze in dafür hergerichteten, belüfteten 300 ml-Erlenmeyerkolben durchgeführt.

Dazu wurden im Falle der Flüssigkulturen jeweils 100 mg feinkristallines ¹⁴C-DBF (→ Abschnitt 2.2) in die Kolben eingewogen, diese mit je 50 ml steriler mineralischer Nährlösung aufgefüllt und zum Zeitpunkt t₀ mit 2,5 ml der frisch angezüchteten, konzentrierten Bakteriensuspension (ca. 10⁶ Organismen des abbauaktiven Stammes pro ml Suspension) inokuliert.

Im Vergleich hierzu erforderten die Vorarbeiten für die DBF-Abbauversuche in Böden einen größeren apparativen und zeitlichen Aufwand. So wurden zunächst mit der in Abb. 1 gezeigten Apparatur definierte, in Aceton/Wassergemisch (1 : 1,3 (v/v)) gelöste Mengen an ¹⁴C-markiertem DBF zerstäubt und dabei gleichmäßig in die vorgelegten Bodenmaterialien eingemischt (je Ansatz 30 ml DBF-

Lösg. ± 0,042 – 42,6 mg DBF auf 212,5 g Boden). Die DBF-Verteilung wurde auf Gleichmäßigkeit kontrolliert.

Zur Beurteilung der Gleichmäßigkeit der DBF-Verteilung wurden jedem der insgesamt 10 kontaminierten Bodenmaterialien 20 Stichproben von jeweils ca. 100 mg entnommen und nach dem Prinzip der kombinierten Verbrennungs- und Flüssigszintillationstechnik auf Radioaktivität bzw. die dazu äquivalente DBF-Menge überprüft. Die Meßdaten wurden zur Berechnung der mittleren Radioaktivitäts- bzw. Substanzkonzentrationen in den kontaminierten Materialien sowie der zugehörigen relativen Standardabweichungen s_e (%) eingesetzt, die zwischen 4,4 und 9,9 lagen.

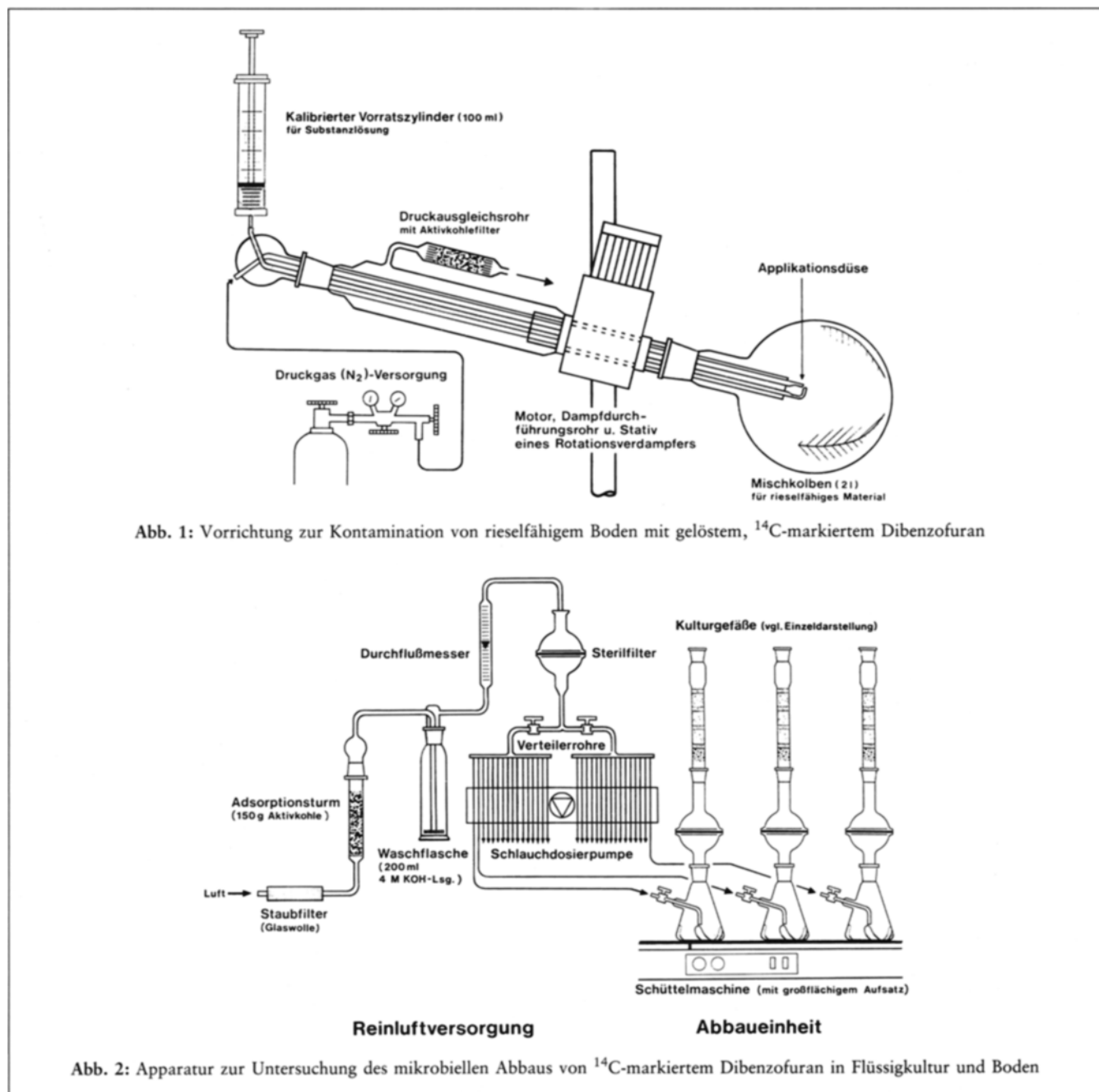
Nach diesen Vorarbeiten wurden die Kulturkolben jeweils mit 50 g der ¹⁴C-DBF-haltigen, radiometrisch charakterisierten Bodenmaterialien beschickt. Die anschließende Beimpfung der Proben (Zeit t₀) mit jeweils 4,0 ml frisch angezüchteter Bakteriensuspension (ca. 10⁸ Organismen des abbauaktiven Stammes pro ml Suspension) und die Einstellung der Wassergehalte der Proben durch Nährsalzlösung auf 40 % ihrer max. Wasserkapazitäten [12] erfolgte mittels eines stationären Zerstäubers (Prinzip → Abb. 1).

Die Abbauversuche wurden mit Hilfe der in Abb. 2 gezeigten Apparatur in einem auf 28 °C temperierten Raum durchgeführt.

Zur getrennten Absorption von flüchtigen organischen Verbindungen und freigesetztem Kohlendioxid (CO₂ ↑) besaßen die Kulturkolben rohrförmige Aufsätze, die mit abwechselnden Schichten aus reiner bzw. paraffinierter Quarzwolle und Natronkalk gefüllt waren. Die Kolben wurden mit steriler Luft (2–3 ml/min) durchströmt, die zur Reinigung und Entfernung von CO₂ über eine Kaskade aus Staubfilter, Aktivkohleturm, mit 4M Kalilauge gefüllter Gaswaschflasche und Sterilfilter (Porenweite 0,2 µm) geleitet wurde, und im Falle der Flüssigkulturen permanent geschüttelt (Kreisbewegung, 125 Upm).

Zu definierten Zeiten t_n wurden jeweils die Inhalte aus zwei gleichbehandelten Kulturkolben und ihren Aufsätzen radioanalytisch untersucht.

Zu diesem Zweck wurde die Belüftung der Kulturkolben 10 min lang auf 160 ml pro min erhöht, um dadurch das CO₂ und/oder flüchtige organische Metaboliten aus den Kopfräumen der Kolben zu verdrän-



gen und vollständig am Natronkalk bzw. auf der paraffinierten Quarzwolle festzulegen. Die Inhalte der Kulturkolben wurden zur Wiedergewinnung von nicht umgesetztem, kristallinem DBF über Glasfaserfilter filtriert und sowohl die Kolben als auch Filter dreimal mit je 5 ml eiskalter Mineralsalzlösung gewaschen.

Die auf den Filtern zurückgehaltenen DBF-Mengen wurden in Methanol gelöst und durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Die vorfiltrierten Flüssigkulturen, denen man aliquote Volumina (jeweils 3,0 ml) für die Bestimmung der Zellzahlen nach dem Plattengußverfahren entnahm, wurden sofort auf 5 °C abgekühlt, 30 min bei 11 000 x g zentrifugiert und die Überstände zusätzlich über Membranfilter (Porenweite 0,2 µm) gegeben. Durch diesen Vorgang (einschl. Waschschr. itte) wurden die Flüssigkulturen jeweils in Biomasse (Zellmasse) und Kulturbrühe getrennt. Danach wurden aliquote Teile der vorher lyophilisierten Biomassen nach dem Prinzip der kombinierten Aufschluß- (mit Protosol) bzw. kombinierten Verbrennungs- und

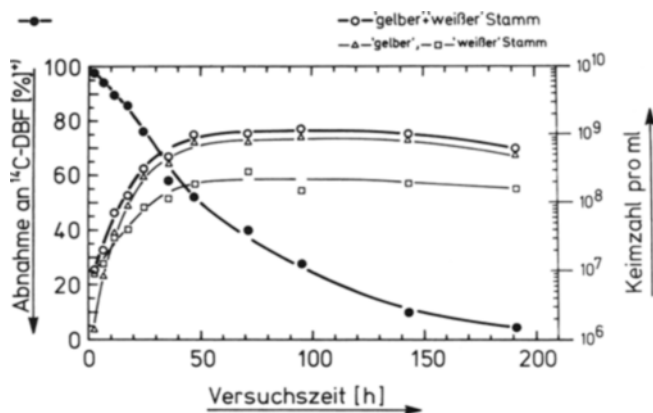
Flüssigszintillationstechnik und ebenso aliquote Volumina der Kulturbrühen durch direkte Flüssigszintillationszählung auf ihre Radioaktivitäten untersucht und anhand der Meßdaten die Gesamtradioaktivitäten in beiden Komponenten der Flüssigkulturen berechnet. Die Restmengen an Biomasse und Kulturbrühe dienten zur Isolierung von DBF-Metaboliten.

Die paraffinierte Quarzwolle aus den Absorptionenaufsätzen beider Kulturkolben wurde mit Methanol extrahiert und die erhaltenen Extrakte auf flüchtige, ^{14}C -markierte DBF-Metabolite untersucht. Gleichzeitig wurden die entsprechenden Schichten Natronkalk quantitativ aus den Aufsätzen in Reaktionskolben überführt. Die durch das Ansäuern mit konz. HCl aus dem Natronkalk freigesetzten CO_2 -Mengen (einschl. $^{14}\text{CO}_2$) wurden mit einem N_2 -Strom in zwei hintereinander geschaltete, mit Flüssigabsorber (Gemisch org. Amine) gefüllte Gaswaschflaschen getrieben, dort vollständig fixiert und der Flüssigszintillationsmessung zugeführt.

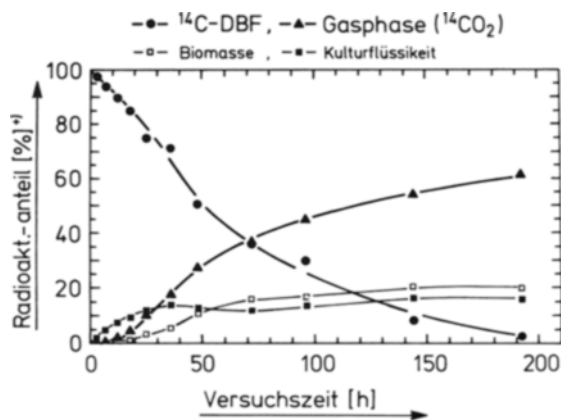
Die Behandlung und Aufarbeitung der mit **Bodenproben** beschickten Kulturkolben erfolgte in weiten Bereichen analog; jedoch wurden hier nur die in den Absorptionsaufsätzen der Kulturkolben gebundenen Radioaktivitäten vermessen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die wesentlichen Größen, die den Abbau des Dibenzofurans (DBF) durch das Zwei-Spezies-Konsortium NRM/NRH bei 28 °C in belüfteter phosphatgepufferter Mineralsalzlösung beschreiben, zeigt Abb. 3 als Funktion der Zeit.



*) eingesetzte ¹⁴C-DBF-Menge (100 mg) = 100%



*) bezogen auf die im Kulturgefäß insgesamt wiedergefundene Radioaktivität

Abb. 3: Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen zum Abbau von Dibenzofuran durch das Zwei-Spezies-Konsortium NRM (gelb)/NRH (weiß) in Flüssigkultur

Demnach betrug der initiale Zelltitel des abbauaktiven Bakterienstammes *Pseudomonas* sp. NRM 1,3 · 10⁶ Zellen pro ml Kulturflüssigkeit. Die Zellzahl stieg in den ersten 50 Stunden, in denen die Hälfte des vorhandenen DBF verbraucht wurde, um den Faktor 700 an und fiel in den darauf folgenden 142 Stunden nur wenig ab. In diesem Zeitabschnitt wurde mit geringerer Geschwindigkeit auch die restliche DBF-Menge weitgehend mineralisiert.

Die radiometrische Bilanzierung des gesamten Abbauvorganges zeigte, daß das abbauaktive Konsortium innerhalb von 192 Stunden

- über 61 % des eingesetzten Dibenzofurans in CO₂ überführte,
- ca. 20 % des DBF-Kohlenstoffs in die Zellmasse aufnahm,
- ca. 16 % in Form wasserlöslicher Metaboliten in die Kulturbrühe ausschied.

Durch den Einsatz **radiochromatographischer Methoden** konnte bestätigt werden, daß sich dabei verschiedene Metaboliten, z.B. Salicyl- und Gentisinsäure, vorübergehend in der Kulturbrühe anreicherten und im Verlauf der Kultivierung weiter abgebaut wurden. Im Gegensatz dazu verblieben z.B. die ebenfalls akkumulierenden Chromanonderivate [10] als sog. *dead-end* Produkte in den Flüssigkulturen.

Für den DBF-Abbau in Böden durch den in seinen Abbaueigenschaften mit dem Zwei-Spezies-Konsortium NRM/NRH vergleichbaren Bakterienstamm *Pseudomonas* sp. HH69 wurden die in der Tabelle charakterisierten Testböden eingesetzt.

Die Befunde in Abb. 4 zeigen, daß DBF (bei Vorlage von 12 bis 20 bzw. 119 bis 192 ppm) in den Testböden, deren pH-Werte zwischen 4,7 und 7,0 lagen, innerhalb von 10 Tagen zu 60 bis 75 % in CO₂ überführt wurde und zwar unabhängig davon, wie hoch der organische C-Gehalt bzw. wie groß die spezifische Oberfläche des einzelnen Bodens war. Dagegen wurde unter sonst gleichen Voraussetzungen in dem stärker sauren Testboden Podsol (pH-Wert 2,9) kein signifikanter Abbau des DBF festgestellt.

Dieser bei übersäuerten Böden häufig beobachtete Sachverhalt konnte dadurch geändert werden, daß durch Zusatz von CaCO₃ der pH-Wert des Podsoles auf 5,4 bzw. 5,9 angehoben wurde (den Erfolg dieser Maßnahme zeigt → Abb. 5).

Darüber hinaus konnte anhand des DBF-Abbaus im neutralen Testboden Kalkmarsch gezeigt werden, daß der Stamm *Pseudomonas* sp. HH69 neben einer guten Abbauleistung zusätzlich die Fähigkeit besitzt, auch kleinste, adsorptiv an Bodenpartikel gebundene DBF-Mengen zu mobilisieren und dadurch für sich bioverfügbar zu machen. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, wurde das im Testboden Kalkmarsch vorgelegte DBF – unabhängig von der jeweils vorhandenen Konzentration – im Bereich von 0,2 ppm (Sanierungsgrenzwert für Schadstoffe) bis 152 ppm innerhalb von

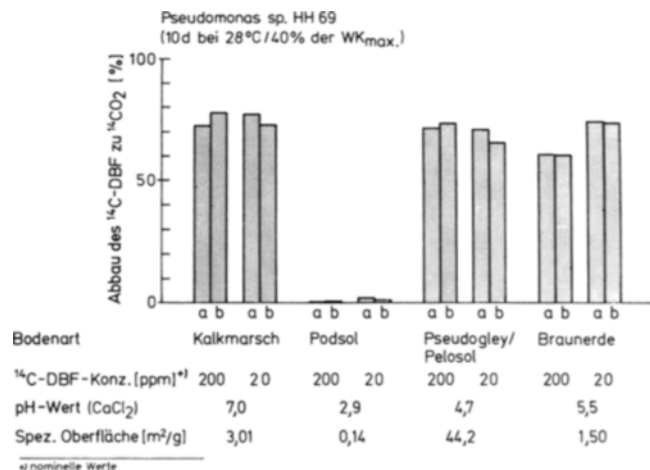


Abb. 4: Mikrobieller Abbau von Dibenzofuran zu CO₂ in verschiedenen Versuchsböden

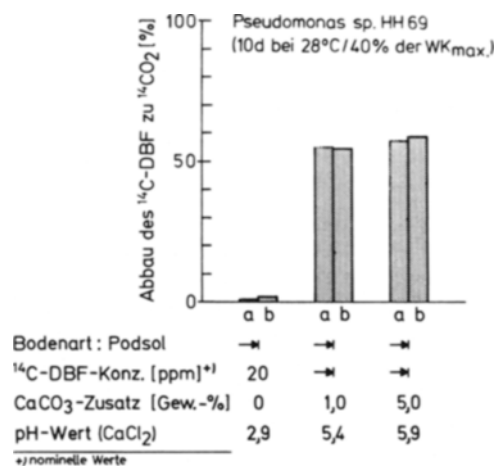


Abb. 5: Mikrobieller Abbau von Dibenzofuran zu CO_2 im sauren Versuchsboden Podsol ohne und nach CaCO_3 -Zusatz

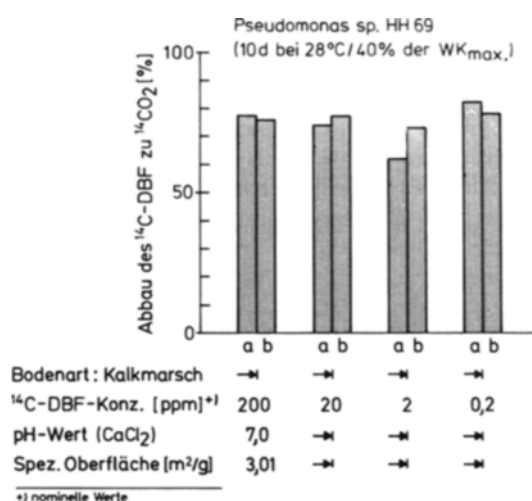


Abb. 6: Mikrobieller Abbau von Dibenzofuran zu CO_2 im neutralen Versuchsboden Kalkmarsch als Funktion der DBF-Konzentration

10 Tagen zu etwa 75 % in CO_2 überführt. Die restliche DBF-Menge sollte analog zu den Versuchen in Flüssigkulturen in die Biomasse eingebaut worden sein bzw. als exkretierte *dead-end* Metaboliten vorliegen. Dies ist ein Beispiel für eine effizient verlaufende, biologische Dekontamination eines Bodens.

4 Schlußfolgerung

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Grundkörper der polyhalogenierten Dibenzofurane – das halogenfreie Dibenzofuran (DBF) – durch geeignete Bakterienstämme innerhalb kurzer Zeit in Flüssigkulturen vollständig mineralisiert wird. Das gleiche gilt auch für die Destruktion des DBF bei optimalen pH-Werten in den verschiedenen, für weite Gebiete Deutschlands repräsentativen Testböden.

Wir vermuten, daß auch mit dem mittlerweile zur Verfügung stehenden Bakterienstamm *Pseudomonas paucimobilis* RW1 [13], der zur Verwertung von nicht-halogeniertem Dibenzo-p-dioxin in Flüssigkulturen befähigt ist, unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen ähnlich hohe Umsätze in den verschiedenen Bodentypen erzielt werden. Entsprechende Abbauleistungen erhoffen wir von Mischkulturen [13] hinsichtlich der **Mineralisierung von niedrig halogenierten Furanen und Dioxinen**.

Die Arbeiten wurden vom Bundesminister für Forschung und Technologie gefördert (BMFT-Projekt Nr. 0318896A/B).

5 Literatur

- [1] H. THOMA: PCDD/F-concentrations in chimney soot from house heating systems. *Chemosphere* 17, 1369 – 1372 (1988)
- [2] H. BARTELS; J. W.J. GIELEN; G. BREHM: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, polychlorierte Dibenzodioxine und polychlorierte Dibenzofurane aus Verbrennungsanlagen-Emissionen und deren Bekämpfung. *VDI-Bericht* 574, 377 (1985)
- [3] J. M. CZUCZWA; R. A. HITES: Environmental fate of combustion-generated polychlorinated dioxins and furans. *Environ. Sci. Technol.* 18, 444 – 450 (1984)
- [4] A. REISCHL; H. THOMA; M. REISSINGER; O. HUTZINGER: PCDD und PCDF in Koniferennadeln. *Naturwissenschaften* 74, 88 – 89 (1987)
- [5] J. J. RYAN; R. LIZOTTE; T. SAKUMA; B. MORI: Chlorinated dibenzo-p-dioxins, chlorinated dibenzofurans, and pentachlorophenol in canadian chicken and pork samples. *J. Agric. Food Chem.* 33, 1021 – 1026 (1985)
- [6] M. PHILIPPI; V. KRASNOBAJEV; J. ZEYER; R. HÜTTER: Fate of TCDD in microbial cultures and in soil under laboratory conditions, in: *Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds*, (Eds. T. LEISINGER, R. HÜTTER, A. M. COOK, J. NÜESCH) Academic Press, London, S. 221 – 233 (1981)
- [7] C. T. WARD; F. MATSUMARA: Fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in a model aquatic environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 7, 349 – 357 (1978)
- [8] C. A. FEWSON: Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends Biotechnol.* 6, 148 – 153 (1988)
- [9] H.-J. KNACKMUS: Über den Mechanismus der biologischen Persistenz von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen. *Chemikerzeitung* 5, 213 – 219 (1975)
- [10] P. FORTNAGEL; H. HARMS; R.-M. WITTICH; S. KROHN; H. MEYER; V. SINNWELL; H. WILKES; W. FRANCKE: Metabolism of dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. HH69 and the mixed culture HH27. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1148 – 1156 (1990)
- [11] H.-P. BLUME; G. BRÜMMER; H.-W. DÖRING; G. MILDE; H. SCHARPENSEEL; E. SCHLICHTING: Böden und Modellsysteme – Methoden zur Prognostifizierung der ökotoxikologischen Auswirkung von Chemikalien in Böden: Testvorschläge und Stufenplan ihres Einsatzes, in: *Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien*, Bd. 2, Boden und Modellsysteme, Arbeitsgemeinschaft „Böden und Chemikalien“, Bericht 1979 – 1983, Eds. F. FÜHR, H.-M. BIEL, W. THIELERT (Jül-Spez-224, Oktober 1983 (ISSN 0343-7639))
- [12] K. SCHINKEL; H.-G. NOLTING; J.-R. LUNDEHN: Richtlinie der BBA, Braunschweig, für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4 – 1 „Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus (vormals BBA-Merkblätter Nr. 36 und 56) vom Dezember 1986
- [13] R.-M. WITTICH: unveröffentlicht

Eingegangen: 02. 04. 1991

Akzeptiert: 03. 05. 1991