

Sanierung von CKW Altlasten durch Unterstützung des mikrobiellen Abbaus mit nullwertigem Nanoeisen

-BIANO-

(B 420003)

Endbericht

Fördergeber:

Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus (BMNT)
(vormals Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (BMLFUW))
A-1012 Wien, Stubenring 1

Vertreten durch:

KPC Kommunalkredit Public Consulting GmbH
A-1092 Wien, Türkenstraße 9

Förderungsnehmer:

AIT Austrian Institute of Technology GmbH
Dept. Energy (bei Einreichung Dept. Health&Environment)
Environmental Resources and Technologies
Konrad-Lorenz-Straße 24
3430 Tulln a. d. Donau

Thomas G. Reichenauer:

+43(0)664/815 78 78

thomas.reichenauer@ait.ac.at

Autoren: Univ-Doz. Mag. Dr. Thomas G. Reichenauer, DI Philipp Schöftner, DI Dr Bernhard Wimmer,
Priv-Doz. Mag. Dr. Angela Sessitsch, Dr. Tanja Kostic, DI Dorothea Summer

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 2. | Arbeits- & Zeitplan | 3 |
| 3. | AP1 - CKW Abbau im Labormaßstab – Batchversuche..... | 4 |
| 3.1 | <i>Task 1.1 Reaktivitätsversuche – CKW Abbau unter verschiedenen Experimentalbedingungen</i> | <i>4</i> |
| 3.1.1 | Abbau von PCE durch Fe(0) | 4 |
| 3.1.2 | Mikrobieller Abbau von PCE Dehalococcoides-Kulturen | 10 |
| 3.1.2.1 | Beschreibung der durchgeführten mikrobiellen Versuche | 10 |
| 3.1.2.2 | Resultate der mikrobiologischen Abbauversuche | 16 |
| 3.1.3 | Abbau von PCE durch eine Kombination von Eisensuspension und Mikroorganismen | 23 |
| 3.1.3.1 | Beschreibung der durchgeführten Versuche zur Untersuchung einer kombinierten Sanierung | 23 |
| 3.1.3.2 | Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Untersuchung einer kombinierten Sanierung | 26 |
| 3.2 | <i>Task 1.2 Nachweis der mikrobiellen Aktivität.....</i> | <i>42</i> |
| 3.2.1 | Zellzahlbestimmung | 42 |
| 3.2.2 | FISH | 43 |
| 3.2.3 | Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Aktivität..... | 45 |
| 3.2.3.1 | DNA Sequenzierung | 45 |
| 3.2.3.2 | Entwicklung eines passenden RNA Isolierungsprotokolls..... | 50 |
| 3.2.3.3 | Mikrobelle Charakterisierung der SiREM Proben | 55 |
| 3.2.3.4 | Nachweis von Dehalococcoides in den Lysimetern | 59 |
| 3.3 | <i>Schlussfolgerungen aus AP1.....</i> | <i>60</i> |
| 4. | AP2 - CKW Abbau Lysimeter..... | 62 |
| 4.1 | <i>Task 2.1 Einbringung von CKW und Eisenpartikel in den Untergrund</i> | <i>62</i> |
| 4.1.1 | Verteilung von DNAPL Phase im Aquifer | 62 |
| 4.1.2 | Kontrollierte Injektion von Eisenpartikeln in den Grundwasserleiter | 66 |
| 4.1.3 | Herstellung von sauerstofffreiem Wasser zur Etablierung eines anoxischen Grundwasserleiters..... | 72 |
| 4.1.4 | Austestung der Wasserstoffversorgung durch verschiedene Eisenpartikeltypen im Säulenversuch | 73 |
| 4.1.5 | Kistenversuch zum Austesten des geplanten Lysimeter-Versuchsaufbaus sowie der Anordnung der LCKW- Eisen- und Inokulum-injektions-positionen | 77 |
| 4.2 | <i>Task 2.2 Konditionierung der Lysimeter</i> | <i>85</i> |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.3 | <i>Task 2.3 Abbauversuche in den Lysimetern</i> | 88 |
| 4.3.1 | Versuchsdurchführung | 88 |
| 4.3.2 | Fluss durch die Lysimeterkammern und Milieubedingungen | 91 |
| 4.3.3 | Bildung von Wasserstoff | 98 |
| 4.3.4 | Verlauf der (C)KW-Konzentrationen und PCE-Abbau..... | 99 |
| 4.3.5 | PCE-Fracht im Gasraum über den Aquiferen und im Abfluss der Kammern..... | 106 |
| 4.4 | Schlussfolgerungen AP2 | 108 |
| 5. | Zusammenschau und Empfehlungen | 110 |
| 6. | Literatur | 111 |
| 7. | Anhang | 113 |
| 7.1 | <i>Zusammensetzung des Mediums und der verwendeten Lösungen der mikrobiellen Batch-Versuche</i> | 113 |
| 7.2 | <i>Analytik – Methodenetablierung und angewandte Methoden</i> | 114 |
| 7.3 | <i>Molekularbiologische Untersuchungen</i> | 119 |
| 7.4 | <i>Herstellung von sauerstofffreiem Wasser zur Etablierung eines anoxischen Grundwasserleiters</i> | 124 |
| 7.5 | <i>Kistenversuch – detaillierte Darstellung der (C)KW Konzentrationen in den verschiedenen Probenahmestellen über die Versuchsdauer</i> | 126 |
| 7.6 | <i>Lysimeterversuch: Darstellung der (C)KW-Konzentrationen in den einzelnen Kammern</i> | 131 |

1. Einleitung

Leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (LCKW), wie Perchlorethen (PCE), repräsentieren sehr häufige, toxische Schadstoffe im Grundwasser. Bisher werden LCKW-Schäden hauptsächlich mit Hilfe von Bodenluftabsaugung im ungesättigten Bereich, sowie Pump&Treat im Grundwasser behandelt. Diese konventionellen Sanierungsverfahren sind auf Grund ihrer teilweise sehr langen Laufzeit (mehrere Jahrzehnte) in Summe sehr teuer und werden mit zunehmender Laufzeit immer ineffizienter (Kosten pro entfernter Schadstofffracht). Darüber hinaus befinden sich zahlreiche LCKW-Kontaminationen im städtischen Bereich, somit unter zum Teil noch genutzten Gebäuden, wodurch häufig Sanierungsmaßnahmen, die mit großen baulichen Maßnahmen verbunden sind nicht, oder nur mit extrem großem Aufwand machbar sind. Deshalb werden derzeit neuartige In-situ Sanierungsverfahren entwickelt, mit Hilfe derer Kontaminationen unterhalb von Gebäuden und anderer Infrastruktur (z.B. Gleisanlagen) saniert werden können bzw. auch Kosten für teure Aushubmaßnahmen eingespart werden können.

Nullwertige Eisenpartikeln ($\text{Fe}(0)$; engl.: Zero Valent Iron (ZVI); nanoskalige Partikel: $n\text{Fe}(0)$, $n\text{ZVI}$) wurden bereits mehrmals zur Sanierung von kontaminiertem Grundwasser eingesetzt. Für die Anwendung zur Grundwassersanierung werden die Partikel direkt in den Grundwasserleiter injiziert, wo diese in Kontakt mit dem Schadstoff gelangen sollen. Hierbei geben die Partikel Elektronen an den Schadstoff ab, wodurch dieser vollständig dechloriert und dadurch in nicht mehr toxische und biologisch leicht mineralisierbare Substanzen umgewandelt wird. Allerdings reagiert $\text{Fe}(0)$ nicht nur mit dem Zielschadstoff, sondern auch mit Wasser unter der Bildung von Wasserstoff (H_2). Die Eisenpartikel weisen ein begrenztes Kontingent an Elektronen auf, die zur Reduktion von Schadstoffen und Wasser verwendet werden können. Die Reaktion mit Wasser vermindert daher die Effizienz der Sanierung erheblich.

LCKW, insbesondere PCE können unter geeigneten anaeroben Bedingungen auch sehr gut mikrobiell abgebaut werden. Der Abbau von höher chlorierten LCKW wie etwa PCE kann durch eine Vielzahl von Bakterien erfolgen. Oftmals kommt der Dechlorierungsprozess allerdings bei geringer chlorierten Verbindungen wie Dichlorethen oder Vinylchlorid zum Erliegen. Lediglich Bakterien der Gattung *Dehalococcoides* sind in der Lage, PCE vollständig ohne Akkumulation von toxischen Zwischenprodukten zu dechlorieren. Diese Bakterien sind strikt anaerob und beziehen ihre Energie ausschließlich aus der Chlororespiration, indem sie H_2 als Elektronendonator und LCKW als Elektronenakzeptoren benutzen (He et al., 2003; Maymo-Gatell, 1997; McCarty, 1997; Sun, 2002). Zusätzlich benötigen *Dehalococcoides* ausreichend Kohlenstoffquellen (z.B. Laktat oder Acetat) und Koronoide wie Vitamin B12 (Men et al., 2013; Seshadri, 2005) und reagieren sehr sensibel auf Sauerstoff (Amos et al., 2008).

In diesem Projekt wurde untersucht, ob der beim Einsatz von $\text{Fe}(0)$ entstehende Wasserstoff die Chlororespiration von *Dehalococcoides* fördern und damit den vollständigen Abbau von CKW unter

anaeroben Bedingungen verbessern kann. Eine solche Kombination würde die Nachteile der Einzelverfahren wie die schwierige Verteilbarkeit von Fe(0) im Untergrund einerseits und die mögliche Akkumulation von toxischen Zwischenprodukten beim anaeroben mikrobiellen Abbau andererseits aufheben.

Das Ziel des Projektes war es daher, den kombinierten Einsatz von Fe(0) und von *Dehalococcoides*-Kulturen in Bezug auf mögliche synergistische Effekte zu untersuchen.

2. Arbeits- & Zeitplan

Abbildung 1 illustriert das Schema der Projektstruktur und stellt die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Arbeitspaketen bzw. Arbeitsschritten dar. Die Details dazu werden in den darauffolgenden Abschnitten beschrieben.

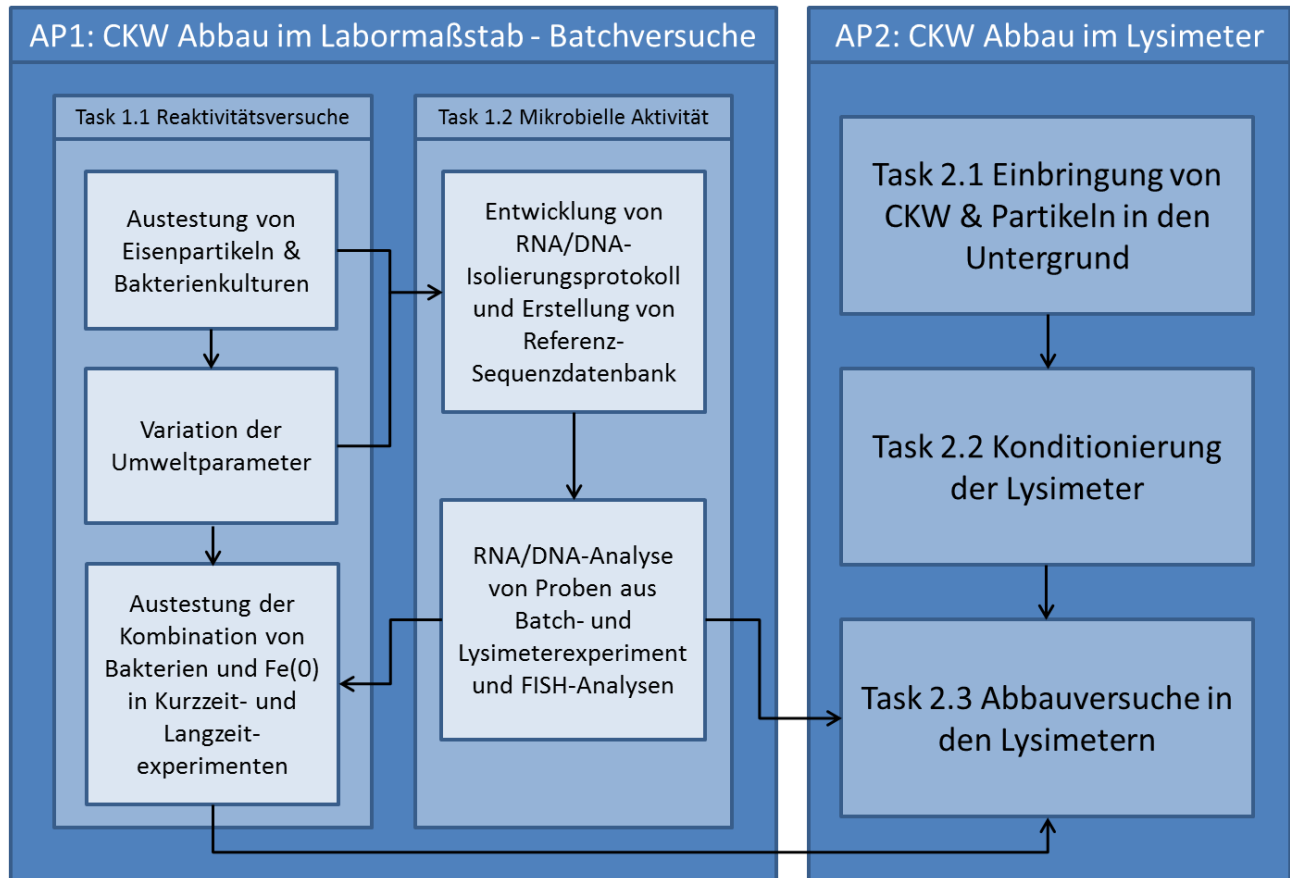


Abbildung 1: Schema der Projektstruktur und der Zusammenhänge der einzelnen Arbeitspakete

3. AP1 - CKW Abbau im Labormaßstab – Batchversuche

Das Ziel dieses Arbeitspaketes war es, in Batchversuchen verschiedene Experimentalbedingungen und deren Einfluss auf die Effizienz der Dehalogenierung von Perchlorethen (PCE) sowie auf die mikrobielle Gemeinschaft auszutesten, um die notwendigen Rahmenbedingungen zu identifizieren, die für einen kombinierten Abbau von PCE notwendig sind.

Die Effizienz des PCE Abbaus folgender Varianten wurden miteinander verglichen:

- Mikrobieller Abbau durch *Dehalococcoides*-Kulturen
- Chemischer Abbau durch Fe(0)
- Kombination von mikrobiellem und chemischem Abbau

3.1 Task 1.1 Reaktivitätsversuche – CKW Abbau unter verschiedenen Experimentalbedingungen

Alle Batch-Versuche zum CKW-Abbau, sowohl mikrobiell als auch chemisch, wurden in Glasgefäßen mit gasdichten Crimp-Verschluss durchgeführt. Die Versuche wurden in sauerstofffreier Atmosphäre in einer mit Argon-Gas gespülter Glovebox angesetzt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Proben geschüttelt und lichtgeschützt gelagert.

3.1.1 Abbau von PCE durch Fe(0)

In Tabelle 1 sind die Eisenpartikel angeführt und charakterisiert, die in diesem Projekt auf ihre PCE-abbauende Wirkung und durch sie hervorgerufene Wasserstoffbildung hin untersucht wurden.

Tabelle 1: Charakterisierung der im Projekt verwendeten Eisenpartikel

| Partikel | Partikelgröße ¹ | | | Spezifische Oberfläche | Alter ² | Hersteller |
|-------------------------|----------------------------|------|------|------------------------|--------------------|-------------------|
| | D10 | D50 | D90 | | | |
| | µm | | | m ² /g | Monate | |
| Nanofer Star | - | 0,05 | - | 17 | 4 | NANO IRON s.r.o. |
| RNIP | - | - | - | 28 | 36 | Toda Kogyo Europe |
| Ironflakes | 1,6 | 4,5 | 16,2 | 27 | 4 | UVR-FIA GmbH |
| Höganäs FeH4 | - | - | - | 52x10 ⁻³ | 5 | Höganäs GmbH |
| Höganäs AB | 32 | 56 | 82 | 84x10 ⁻³ | 5 | Höganäs GmbH |
| Höganäs <45µm | 24 | 41 | 59 | 74x10 ⁻³ | 5 | Höganäs GmbH |
| CarboIron | ~1,4 µm ³ | | | n.b. | n.b. | UFZ Leipzig |

¹ Partikeldurchmesser bei Durchgang von 10, 50, 90 M-%;

² Zeit von Partikelproduktion bis Versuchsansatz

³ Angabe UFZ Leipzig: durchschnittliche Partikelgröße ~ 1,4 µm
n.b...nicht bekannt

Für die Batchversuche wurden 130 ml Glasgefäße mit Septum-Crimp-Verschluss (siehe Abbildung 2) in sauerstofffreier Umgebung (mit Argon gespülte Glovebox) mit sauerstofffreiem und mit HEPES (zur pH-Stabilisierung) versetztem Wasser befüllt (Zusammensetzung des Reaktionsmediums siehe Tabelle 2). In Azeton gelöstes PCE wurde anschließend mittels gasdichter Spritze in die Reaktionsgefäße eingebracht. Danach wurden die Gefäße verschlossen und eine kurz zuvor hergestellte Eisensuspension zum Starten der Reaktion sowie Methan-Gas (60 V%, Rest CO₂) als interner Standard wurden zugegeben.

Tabelle 2: Auflistung der 6 durchgeführten Batchversuche zur Ermittlung der Reaktivität verschiedener Partikel.

| Versuch | Partikel | Medium | Menge Partikel | PCE (aq) Konzentration | HEPES pH-Puffer |
|---------------------------|----------------|----------------------|----------------|------------------------|-----------------|
| Partikel-Screening | Nanofer Star | Deionisiertes Wasser | 2,4 g/L | 40 mg/L | 12 g/L |
| | RNIP | | 2,4 g/L | 40 mg/L | 12 g/L |
| | Ironflakes | | 2,4 g/L | 40 mg/L | 12 g/L |
| | Höganäs FeH4 | | 50 g/L | 40 mg/L | 12 g/L |
| | Höganäs AB | | 50 g/L | 40 mg/L | 12 g/L |
| | Höganäs <45 µm | | 50 g/L | 40 mg/L | 12 g/L |

Für die Herstellung der Eisensuspension wurden 50 g Eisenpartikel in eine 250 ml Schottflasche überführt und nach Zugabe von 200 ml sauerstofffreiem Wasser mittel einem Dispergiergerät (IKA ULTRA-TURRAX T 18 basic) für 3 Minuten bei einer Leerlaufdrehzahl von 15600 rpm suspendiert und gleich nach Herstellung in die Probengefäße überführt. Aufgrund des schnellen Absinkverhaltens der Höganäs-Partikel (siehe Abbildung 3) war es nicht möglich diese als Suspension reproduzierbar in das Versuchsgefäß zu überführen. Daher wurde diese vor Zugabe des Wassers eingewogen und nicht vorab suspendiert. Anschließend wurde in regelmäßigen Abständen mittels GC-FID PCE und seine Abbauprodukte und mittels GC-WLD das gebildete Wasserstoffgas (H₂) gemessen. Vor den Messungen wurde mit einer leichtgängigen Spritze der entstandene Überdruck aus dem Gefäß entfernt und notiert. Um diesen wurden die anschließend erhaltenen Messergebnisse korrigiert. In parallel hergestellten und gleichbehandelten Ansätzen wurden zusätzlich der Fe(0)-Gehalt, der Gesamteisengehalt, der pH Wert und das Oxidations-Reduktions-Potential bestimmt. Zur Bestimmung des Fe(0)-Gehaltes wurde die Lösung mit konzentrierter HCl versetzt und der dabei entstehende Wasserstoff wurde gemessen und daraus der Fe(0)-Gehalt berechnet. Der Gesamteisengehalt wurde mit Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt.



Abbildung 2: Reaktionsgefäße der Batchversuche zum CKW-Abbau mit Eisenpartikeln (Ironflakes und Höganäs FeH₄)



Abbildung 3: Vergleich der Absinkgeschwindigkeit unterschiedlicher Eisenpartikel (Links: Ironflakes, Rechts: Höganäs FeH₄) innerhalb von 30 Sekunden

Abbau von PCE und Entstehung von Ethen und H₂

Die beobachteten PCE-Abbauraten der Nanoeisenpartikel waren beinahe um einen Faktor 10 schneller als jene der Mikropartikel (siehe Abbildung 4 und Tabelle 3). Wobei jene der Höganäs AB und <45 µm am langsamsten waren und sich die Ironflakes und Höganäs FeH₄-Partikel auch im selben Bereich bewegten. Bei der Beurteilung ist zu berücksichtigen, dass die Höganäs- Partikel im Vergleich zu den restlichen Partikeln um einen Faktor 21 höher dosiert waren aber auf Grund ihrer wesentlich geringeren Oberfläche trotzdem geringere Abbauraten aufwiesen. In der Anfangsphase des Versuchs bewirkten die Ironflakes eine ähnliche PCE-Abbauraten wie die Nanofe Star-Partikel, danach flachte die Abbaukurve jedoch ab und glich jenen der Höganäs FeH₄-Partikel. Der schnelle Abbau zu Beginn ist wahrscheinlich auf die spezielle Form der Ironflakes-Partikel zurückzuführen. Das Abflachen der Abbaukurve im Versuchsverlauf könnte darin begründet sein, dass die Partikel während der Reaktion ihre spezielle Form und dadurch auch ihre relativ zur ihrem Volumen große Oberfläche verloren haben und somit die Reaktivität abnahm. Zusätzlich wurde während des Abbaus mit Ironflakes-Partikeln die Entstehung einer Vielzahl an Kohlenwasserstoffen (unter anderem Vinylchlorid) gemessen, wobei nicht alle Produkte identifiziert werden konnten. Insbesondere aufgrund der Bildung von Vinylchlorid wurden die Ironflakes-Partikel nicht mehr weiter untersucht. Während des Abbaus von PCE durch die Eisenpartikel wurde unter anderem Ethen gebildet. Auch dabei wiesen die Nanopartikel eine raschere und teilweise höhere Bildungsrate auf als die übrigen getesteten Produkte (siehe Abbildung 5). Auch hier konnte wahrscheinlich aufgrund der flockenförmigen Form der

Ironflakes und der damit höheren spezifischen Oberfläche zu Versuchsbeginn eine starke Ethenbildung beobachtet werden, die sich im weiteren Versuchsverlauf allerdings verlangsamt. Schließlich kam es zu einer Abnahme des Ethengehalts in den Gefäßen mit Ironflakes (siehe Abbildung 5), da gleichzeitig Ethan in einem weiteren Schritt gebildet wurde. Vergleicht man die Höganäs Partikel untereinander, so führten die FeH4-Partikel zu den höchsten Ethenkonzentrationen. Diese wiesen nach der Anfangsphase auch höhere Ethenbildungsraten als die Ironflakes-Partikel auf. Jedoch muss auch hier die eingesetzte Partikelmenge, die bei den Höganäs Partikeln 21-mal höher war, berücksichtigt werden. In Bezug auf die Wasserstoffentwicklung wurden mit den Nanofer Star-Partikeln die höchsten H₂-Gehalte freigesetzt. Verglichen mit RNIP Nano-Partikeln war die Wasserstoffentwicklung der Nanofer-Partikeln nach 35 Versuchstagen viermal höher (Abbildung 6). Dementsprechend höher ist die unerwünschte anaerobe Korrosion (Oxidation von Fe(0)) von Nanofer-Partikeln. Dadurch verringern sich die Reaktionsdauer sowie die Partikeleffizienz von Nanofer-Partikeln deutlich. Auch bei den Ironflakes war die H₂-Entwicklungsrate am Versuchsanfang hoch und flachte nach einiger Zeit ab und bewegte sich anschließend im selben Konzentrationsbereich wie die der übrigen Mikropartikel und RNIP-Partikel. Im Hinblick auf den Wasserstoffbedarf der *Dehalococcoides* kann eine zu hohe H₂-Konzentration auch negative Effekte haben, da dadurch andere, um den Wasserstoff konkurrierende, Bakteriengruppen einen Vorteil haben können und den Wasserstoff für ihren, nicht PCE-abbauenden, Metabolismus verwenden können (Yang and McCarty, 1998).

Tabelle 3: Beobachtete Reaktionskonstanten für PCE-Abbau der untersuchten Eisenpartikel

| | $k_{\text{obs}} [\text{h}^{-1}]$ |
|----------------|--|
| Nanofer Star | $16,3 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-4}$ |
| RNIP | $24,4 \times 10^{-4} \pm 3,6 \times 10^{-4}$ |
| Ironflakes | $5,8 \times 10^{-4} \pm 0,7 \times 10^{-4}$ |
| Höganäs FeH4 | $5,9 \times 10^{-4} \pm 0,1 \times 10^{-4}$ |
| Höganäs AB | $4,0 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$ |
| Höganäs <45 µm | $4,1 \times 10^{-4} \pm 0,04 \times 10^{-4}$ |

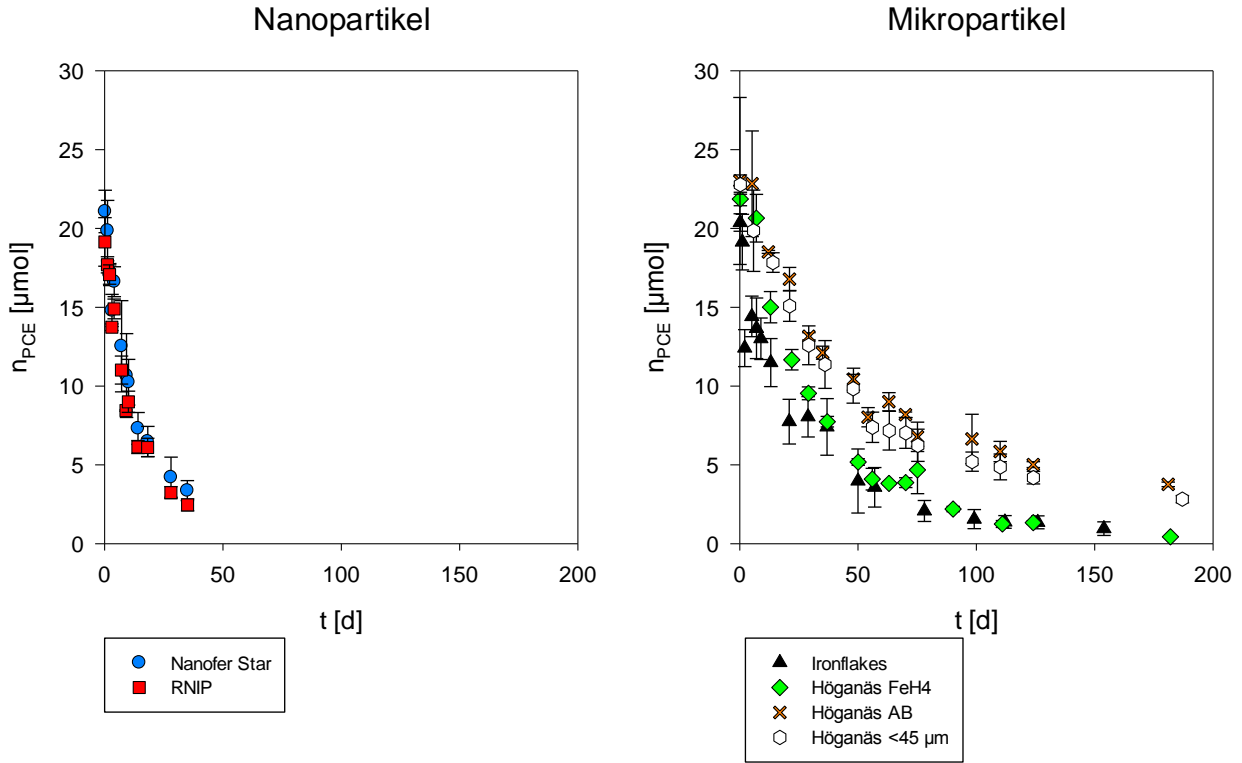


Abbildung 4: Mittelwerte des PCE-Abbaus der verwendeten Eisenpartikel (n=3); c(Nanofer, RNIP, Ironflakes) = 2,4 g/l, c(Höganäs) = 50g/l

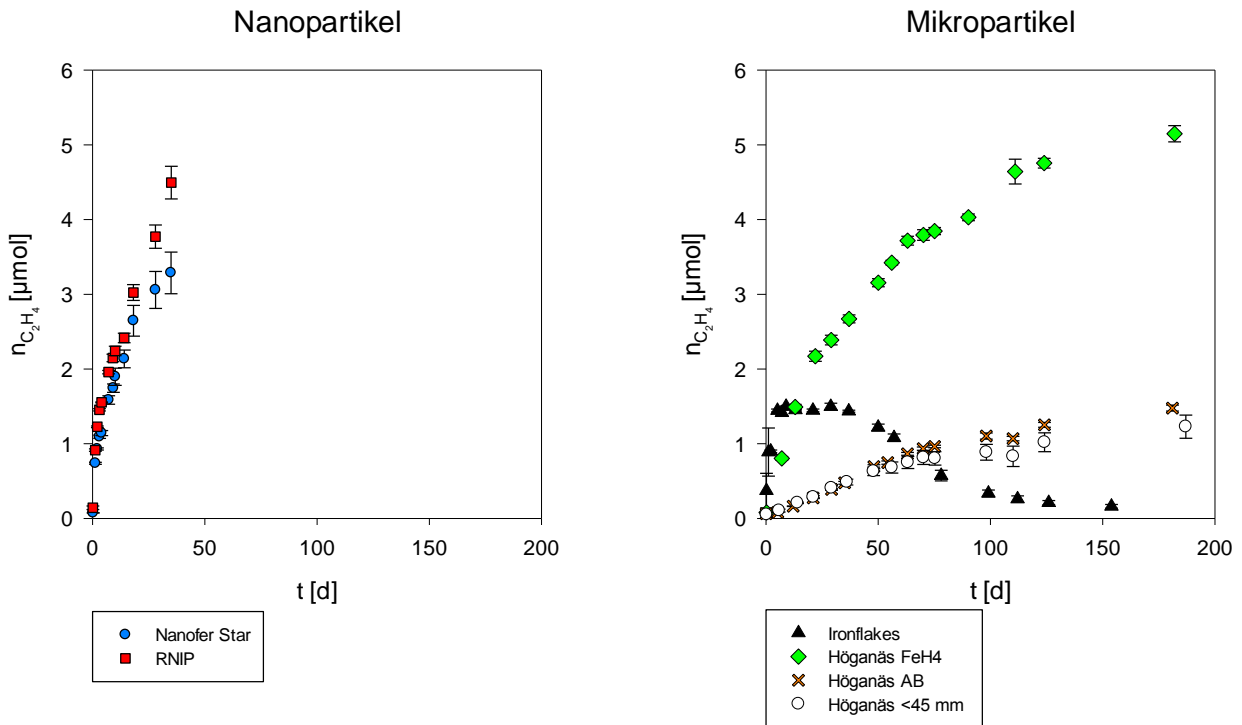


Abbildung 5: Mittelwerte des entstandenen Ethens beim PCE-Abbau durch die verwendeten Eisenpartikel (n=3); c(Nanofer, RNIP, Ironflakes) = 2,4 g/l, c(Höganäs) = 50g/l

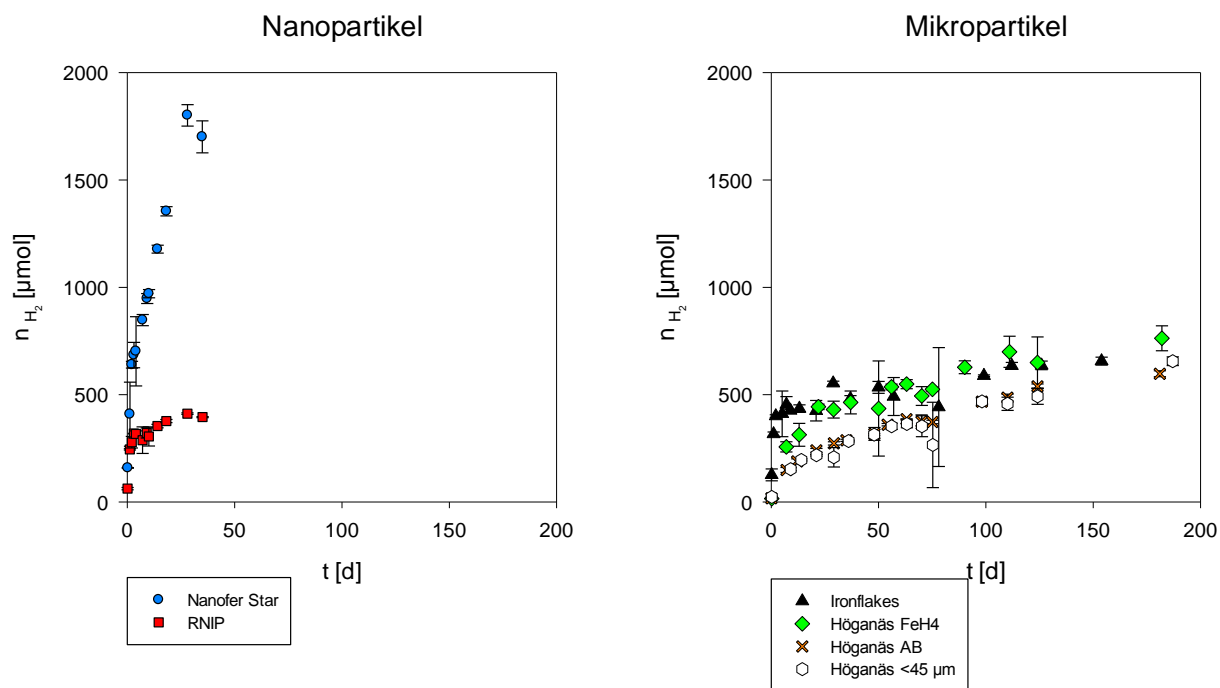


Abbildung 6: Mittelwerte des entstandenen H₂ im Batch-Versuchsverlauf mit den verwendeten Eisenpartikeln (n=3) ; c(Nanofer, RNIP, Ironflakes) = 2,4 g/l, c(Höganäs) = 50g/l

3.1.2 Mikrobieller Abbau von PCE *Dehalococcoides*-Kulturen

3.1.2.1 Beschreibung der durchgeführten mikrobiellen Versuche

Ergänzend zu den Abbauprobversuchen mit Eisen wurde die Abbauleistung verschiedener Bakterienkulturen bei unterschiedlichen Umweltbedingungen untersucht. Nachfolgend werden die verwendeten Kulturen sowie die bisher durchgeführten mikrobiellen Abbauprobversuche tabellarisch dargestellt (Tabelle 4 und Tabelle 5). Diesen Tabellen folgt eine genaue Beschreibung der durchgeführten Versuche und der Ergebnisse.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kulturen zum Abbau von PCE

| Kulturbezeichnung | Bezugsquelle |
|--------------------|---|
| UFZ A | UFZ Leipzig (https://www.ufz.de/index.php?de=1623) |
| UFZ B | UFZ Leipzig (https://www.ufz.de/index.php?de=1623) |
| Commercial Batch 1 | N.N |
| Commercial Batch 2 | N.N |
| Commercial Batch 3 | N.N |
| NTP | NTP ENVIRO Netherlands http://www.ntpgroep.nl/index.php/en/environment/groundwater-remediation-and-process-control |
| SiREM KB-1 | SiREM Canada http://siremlab.com/ |

Tabelle 5: Auflistung aller 21 durchgeführten mikrobiellen Batch-Versuche inklusive den relevanten biologischen Versuchsbedingungen und dem erfolgten Grad der Dechlorierung

| Versuch | Kultur | Medium | Biol. Versuchsbeding. | Endprodukte |
|--|--------------|--|--|------------------|
| Kultur-Screening Bei Idealbedingungen | UFZ A | Deionisiertes Wasser mit diversen Zusatzstoffen | Idealbedingungen | Kein Abbau |
| | UFZ B | | | Kein Abbau |
| | Com. Cult. 1 | | | Kein Abbau |
| | Com. Cult. 2 | | | Kein Abbau |
| | Com. Cult. 3 | Carbonatisch-erdalkalisches Wasser | | Ethenbildung |
| | NTP | (Leitungswasser) | | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | | | Vollst. Dechlor. |
| NTP Kultur Parameter-Variation | NTP | Carbonatisch-erdalkalisches Wasser | Brunnenwasser | Ethenbildung |
| | | | ≠ Autoklaviert | Ethenbildung |
| | | | Reaktion bei 10 °C | Ethenbildung |
| | | Carbonatisch-erdalkalisches Wasser + Aquifermaterial | Gelagerte Kultur | cis-DCE |
| | | | ≠Spurenmetalle | cis-DCE |
| KB-1 Kultur Parameter-Variation | SiREM KB-1 | Carbonatisch-erdalkalisches Wasser + Aquifermaterial | ≠H ₂ | Vollst. Dechlor. |
| | | | ≠H ₂ ≠Vitamine | Vollst. Dechlor. |
| | | | ≠ H ₂ ≠Spurenmetalle | Vollst. Dechlor. |
| | | | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Spurenmetalle | Vollst. Dechlor. |
| | | | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Spurenmetalle | Vollst. Dechlor. |
| | | | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Spurenmetalle 10°C | Vollst. Dechlor. |
| | | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Spurenmetalle ≠Hefe | Vollst. Dechlor. | |
| | | | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Spurenmetalle | Vollst. Dechlor. |
| | | | ≠Hefe Reaktion bei 10°C | Vollst. Dechlor. |

Kultur-Screening bei Idealbedingungen

Zunächst wurden Versuche mit UFZ A-, UFZ B-, Commercial Batch 1- und Commercial Batch 2-Kulturen angesetzt, bei denen allerdings aus unterschiedlichen Gründen kein Schadstoffabbau erzielt werden konnte. Daraufhin wurde der Versuchsaufbau für die weiteren Versuche und Kulturen adaptiert und verbessert. Der adaptierte Versuchsaufbau kann als Idealbedingung für einen anaeroben, mikrobiellen Abbau in Batchversuchen gesehen werden. Den Mikroorganismen wurden hierbei für das Wachstum notwendige Substanzen (z.B. Nährstoffe, Spurenmetalle, Vitamine) zugegeben und es wurden Bedingungen geschaffen, die gemäß Literatur als Ideal für den Abbau von Schadstoffen gesehen werden können (pH-Wert, anoxische Bedingungen). Unter diesen, im Folgenden näher beschriebenen Idealbedingungen wurden die Abbauleistungen der Kulturen Commercial culture 3, NTP und SiREM KB-1 unter Zugabe von Na-Laktat als C-Quelle untersucht:

Die Versuche wurden, um Kontakt mit für die Bakterien toxischem Sauerstoff zu vermeiden, in einer mit Argon gespülten Glovebox angesetzt ($O_2 < 50$ ppm). Zunächst wurde sauerstofffreies, carbonatisch-erdalkalisches Wasser (Leitungswasser bzw. Brunnenwasser vom Standort des zukünftigen Lysimeterversuchs) mit Resazurin, der Tracemetal-Solution und mit HEPES, zur pH-Stabilisierung, versetzt. Das so vorkonditionierte Wasser wurde anschließend in die Versuchsgefäße überführt und die jeweilige Kohlenstoffquelle (Na-Laktat, Na-Azetat, Melasse, Ethyllaktat, Ethylbutyrat oder Ethanol) zugegeben. Hierbei wurden die Mengen der zugegebenen Kohlenstoffquellen auf die Anzahl der C Atome normiert. Um eine Konzentration von 120 mg/L C-Atomen in den Reaktionsgefäßen zu erreichen, wurden 373 mg/L Na-Laktat, 410 mg/L Na-Azetat, 679 mg/L Melasse, 236 mg/L Ethyllaktat, 193 mg/L Ethylbutyrat oder 230 mg/L Ethanol zugegeben. Anschließend wurden die Hefeextraktlösung und die kurz zuvor hergestellte, lichtgeschützt gelagerte und sterilfiltrierte Vitaminlösung zugegeben. Nach Zugabe des $Na_2S \cdot 9H_2O$ wurde das Bakterieninokulum in die Versuchsgefäße überführt und die Gefäße mit einem Crimp-Verschluss mit einem teflonbeschichteten Septum gasdicht verschlossen. Anschließend wurden in Azeton gelöstes PCE (32 mg/L PCE in den Reaktionsgefäßen) sowie 100 µl Propan-Gas (60% in N_2) als interner Standard in die Reaktionsgefäße eingebracht. Danach wurden die Reaktionsgefäße eine Stunde geschüttelt damit sich eine Wasser-Gasphasen Gleichgewicht einstellen konnte. Um den PCE-Abbau anzutreiben, wurde vor der ersten GC-Messung 100 µl H_2 -Gas in die Probengefäße eingebracht. Die genauen Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Medien sind im Anhang 7.1 angeführt. Mittels GC-FID wurden in regelmäßigen Abständen PCE und seine Abbauprodukte gemessen. Um dabei einen Sauerstoffeintrag zu vermeiden, wurde die Probenahmespritze vorab mit Inertgas (N_2) mehrmals gespült und das bei der Injektion entnommene Volumen durch N_2 ersetzt. Aufgrund des schnellen PCE-Abbaus bei den NTP-Kulturen unter Idealbedingungen wurde, nach vollständigem PCE-Abbau, dreimal erneut PCE zugegeben.

Parametervariationen; *Beschreibung der Abweichungen von den Idealbedingungen bei der Versuchsdurchführung*

In den vorangegangenen Versuchen wurde beobachtet, dass die Kulturen NTP und SiREM KB-1 in der Lage waren PCE unter Idealbedingungen abzubauen und Ethen zu bilden. Ziel der Parametervariationen war es zu untersuchen, ob es möglich ist mit diesen Kulturen auch PCE abzubauen, wenn die Reaktionsparameter von den Idealbedingungen abweichen. Im Fall einer Sanierung im Feld ist es gewünscht, die Sanierung so einfach und so kostengünstig, wie möglich umzusetzen. Dementsprechend soll der Einsatz von Additiven wie Vitamine, Nährstoffe oder Spurenmetalle möglichst gering gehalten werden. Es wurde daher untersucht, ob der mikrobiologische Abbau auch noch funktioniert, wenn einer oder mehrere dieser Additive nicht zugegeben werden. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich Veränderungen der Milieubedingungen

(Wassertyp, Reaktion bei 10°C) auf den mikrobiellen Abbau von PCE auswirken. Hierbei war das Ziel zu testen, ob die Bakterienkulturen auch unter variierenden Bedingungen PCE abbauen können.

Vorangegangene Untersuchungen am AIT haben gezeigt, dass verschiedene C-Quellen für den mikrobiellen Abbau verwendet werden können (Na-Laktat, Na-Azetat, Melasse, Ethyllaktat, Ethylbutyrat oder Ethanol). Unter Idealbedingungen wurde Na-Laktat verwendet, da es gemäß wissenschaftlicher Literatur für den mikrobiellen Abbau von PCE gut geeignet ist. Na-Laktat ist allerdings ausgesprochen teuer (4800 € /kg „Sigma-Aldrich“) und daher für eine Anwendung bei einer Sanierung nur bedingt geeignet. Da der Abbau mit NTP Kulturen selbst unter Idealbedingungen in manchen Wiederholungen nicht gut funktioniert hat, wurde bei der Parametervariation weiterhin Na-Laktat als C-Quelle eingesetzt. Bei jenen Parametervariationen die mit SiREM-KB-1 durchgeführt wurden, wurde hingegen Melasse eingesetzt. Melasse ist ein Abfallprodukt aus der Zuckererzeugung aus Zuckerrüben und ist dementsprechend günstig (~1€/kg).

NTP Kultur – Parametervariationen

In diesem Abschnitt werden die in Tabelle 5 angeführten variierten biologischen Versuchsbedingungen näher beschrieben:

Brunnenwasser - Ursprünglich unter Idealbedingungen wurde Wasser aus der lokalen Trinkwasserversorgung von Seibersdorf verwendet. Dieses Wasser in den Reaktionsgefäßen wurde durch ein Wasser aus einem lokalen Brunnen in Seibersdorf (Niederösterreich) ersetzt.

≠Autoklaviert – Hierbei wurde das eingesetzte Wasser nicht vorab autoklaviert. Etwaige im Wasser beziehungsweise in den Flaschen befindliche Organismen traten dadurch potenziell in Konkurrenz mit den PCE abbauenden Organismen.

Reaktion bei 10°C – Die Reaktionstemperatur in dem Batchversuch unter Idealbedingungen wurde nach dem Abbau des zugegebenen PCE auf 10°C reduziert. Rund 10-12°C entsprechen üblichen Temperaturen in österreichischen Grundwässern. Ebenso entspricht dies in etwa jenen Temperaturen, die im Altlastensimulator (Kapitel 4) angestrebt wurden.

Gelagerte Kultur – Hierbei wurde das Inokulum (nach Start des Abbaues unter Idealbedingungen) rund 4 Monate im Kühlschrank gelagert, bevor es für den Mikrobiellen Abbau herangezogen wurde.

≠Spurenmetalle – In diesem Ansatz wurde auf die Zugabe der Spurenmetall-Lösung (Tabelle 21) verzichtet. Des Weiteren wurde Aquifermaterial (Quarzand 0,5-2mm) in die Reaktionsgefäße zugegeben. Die Reaktionsgefäße mit Aquifermaterial wurden nicht mehr geschüttelt, sondern lediglich auf einem Horizontalschüttler bei 60 spm aufrecht stehend hin und her gewippt.

≠Spurenmetalle, ≠Vitaminlösung – In diesem Ansatz wurde auf die Zugabe der Spurenmetall-Lösung (Tabelle 21), sowie auf die Zugabe der Vitaminlösung (Tabelle 22) verzichtet. Des Weiteren wurde Aquifermaterial (Quarzsand 0,5-2mm) in die Reaktionsgefäße zugegeben. Die Reaktionsgefäße mit Aquifermaterial wurden nicht mehr geschüttelt, sondern lediglich auf einem Horizontalschüttler bei 60 spm aufrecht stehend hin und her gewippt.

SiREM KB-1 Kultur – Parametervariationen

Die Kultur SiREM KB-1 zeigte unter Idealbedingung einen unvergleichbar schnellen Abbau von PCE sowie eine schnelle und vollständige Dechlorierung aller chlorierten Zwischenprodukte. Bei den Parameter-Variationsversuchen mit KB-1 wurden daher die Reaktionsgefäße, das Wasser sowie das Aquifermaterial nicht autoklaviert. Des Weiteren wurde bei allen Versuchen Melasse als Kohlenstoffquelle eingesetzt sowie Aquifermaterial (Quarzsand 0,5-2mm) in die Reaktionsgefäße zugegeben. Die Reaktionsgefäße mit Aquifermaterial wurden nicht mehr geschüttelt, sondern lediglich auf einem Horizontalschüttler bei 60 spm aufrecht stehend hin und her gewippt. In dieser Versuchsreihe wurden schrittweise ein Additiv nach dem anderen nicht mehr zugegeben, um eine Minimalvariante zu identifizieren, bei der der Abbau von PCE nicht beeinträchtigt wird.

≠ H₂ – Es wurde auf die Zugabe von 100µl H₂ unmittelbar nach der Zugabe von PCE verzichtet. Für den mikrobiellen Abbau zu Ethen strickt notwendiger H₂ musste daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden.

≠ H₂ ≠ Vitamine – Es wurde auf die Zugabe von H₂ und auf die Zugabe von Vitaminen verzichtet. H₂ sowie benötigte Vitamine (insbesondere Vitamin B₁₂) mussten daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden.

≠ H₂ ≠ Spurenmetalle - Es wurde auf die Zugabe von H₂ und auf die Zugabe von Spurenmetalle verzichtet. H₂ musste daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden. Die im Wasser befindlichen Spurenmetalle mussten ausreichen, um den mikrobiellen Abbau zu ermöglichen.

≠ H₂ ≠ Vitamine ≠ Spurenmetalle – Es wurde auf die Zugabe von H₂, auf die Zugabe von Vitaminen und auf die Zugabe von Spurenmetallen verzichtet. H₂ sowie benötigte Vitamine (insbesondere Vitamin B₁₂) mussten daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden. Die im Wasser befindlichen Spurenmetalle mussten ausreichen, um den mikrobiellen Abbau zu ermöglichen. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt. Das zweite Mal diente er als Referenzversuch für die im Folgenden erläuterten Parametervariationen. Dies war notwendig, da für die im Folgenden erläuterten Parametervariationen ein neues Inokulum verwendet wurde.

≠ H₂ ≠ Vitamine ≠ Spurenmetalle 10°C - Es wurde auf die Zugabe von H₂, auf die Zugabe von Vitaminen und auf die Zugabe von Spurenmetallen verzichtet. H₂ sowie benötigte Vitamine (insbesondere Vitamin B₁₂) mussten daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden. Die im Wasser befindlichen Spurenmetalle mussten ausreichen, um den mikrobiellen Abbau zu ermöglichen. Des Weiteren wurde die Reaktionstemperatur auf im Grundwasser übliche 10 °C reduziert.

≠ H₂ ≠ Vitamine ≠ Spurenmetalle ≠ Hefe - Es wurde auf die Zugabe von H₂, auf die Zugabe von Vitaminen und auf die Zugabe von Spurenmetallen verzichtet. H₂ sowie benötigte Vitamine (insbesondere Vitamin B₁₂) musste daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden. Die im Wasser befindlichen Spurenmetalle mussten ausreichen, um den mikrobiellen Abbau zu ermöglichen. Des Weiteren wurde auf die Zugabe von Hefeextrakt verzichtet. Damit wurde den Bakterien die letzte anthropogene Quelle für Vitamin B₁₂ sowie verschiedene Aminosäuren entzogen.

≠ H₂ ≠ Vitamine ≠ Spurenmetalle ≠ Hefe Reaktion bei 10°C - Es wurde auf die Zugabe von H₂, auf die Zugabe von Vitaminen und auf die Zugabe von Spurenmetallen verzichtet. H₂ sowie benötigte Vitamine (insbesondere Vitamin B₁₂) mussten daher vom Konsortium im Zuge des Abbaus der Melasse gebildet werden. Die im Wasser befindlichen Spurenmetalle mussten ausreichen, um den mikrobiellen Abbau zu ermöglichen. Des Weiteren wurde auf die Zugabe von Hefeextrakt verzichtet. Damit wurde den Bakterien die letzte anthropogene Quelle für Vitamin B₁₂ sowie verschiedene Aminosäuren entzogen. Des Weiteren wurde die Reaktionstemperatur auf im Grundwasser übliche 10 °C reduziert.

3.1.2.2 Resultate der mikrobiologischen Abbauprobungen

Commercial Culture - Batch 3

Unter Idealbedingungen konnte in einer von vier Wiederholungen ein relevanter Abbau von PCE beobachtet werden (Abbildung 7). In dieser Wiederholung wurde nach rund 70 Tagen Vinylchlorid gebildet, welches anschließend vollständig zu Ethen abgebaut werden konnte. In den drei anderen Wiederholungen wurde über 120 Tage kaum oder gar kein PCE abgebaut. In Summe wurden aus den knapp 250 μmol zugegebenem PCE maximal 20 μmol Abbauprodukte gebildet, wobei hiervon maximal 0,15 μmol Ethen war. In Wiederholung 1 wurde auch deutlich mehr Methan gebildet (225 μmol nach 129 Tagen) als in den drei anderen Wiederholungen (78 ± 6 μmol nach 119 Tagen). Methanogene Bakterien waren demnach in allen Versuchsansätzen aktiv, wenn auch in Wiederholung 1 signifikant aktiver.

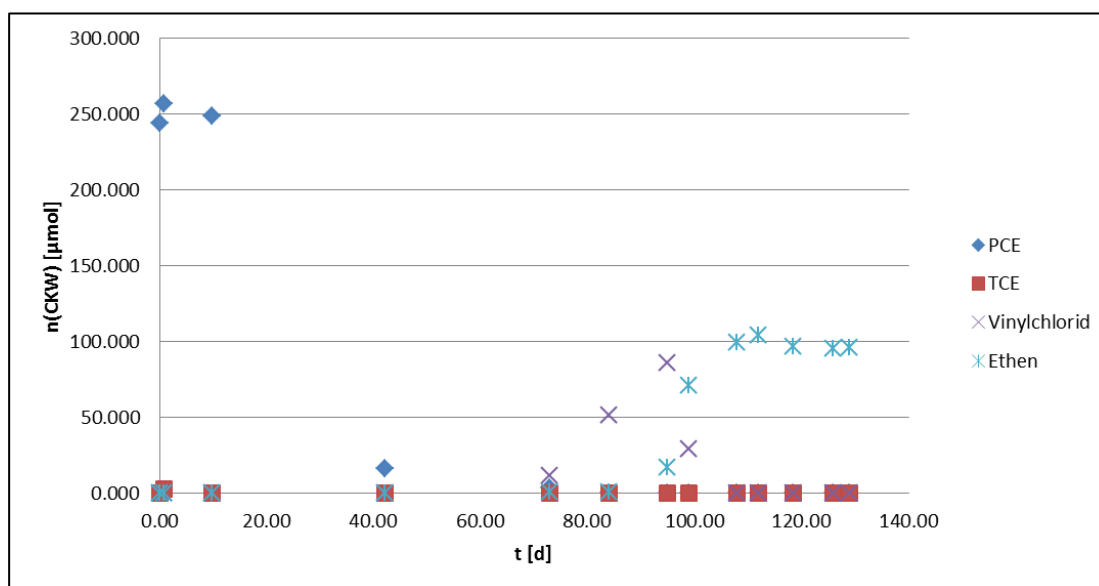


Abbildung 7: Commercial culture Batch 3 Idealbedingungen - Wiederholung 1: Abbau von PCE und Entstehung von Abbauprodukten (1000 mL Reaktionsgefäß)

NTP Kultur

Unter Idealbedingungen konnte in einer von zwei Wiederholungen eine vollständige Dechlorierung von PCE und allen chlorierten Abbauprodukten beobachtet werden (Abbildung 8). Der Abbau von PCE war in diesem Reaktionsgefäß unerwartet schnell, sodass bereits drei Tage nach der PCE Dotation (erste Messung nach der PCE Dotation) bereits kein PCE mehr nachgewiesen werden konnte. Dementsprechend rasch war der Anstieg von cis-DCE in den Reaktionsgefäßen, wobei der Abbau von cis-DCE zu Ethen wesentlich langsamer, binnen 200-250 Tagen erfolgte. Im Zeitraum von 77-230 Tagen wurde die Reaktionstemperatur auf 10°C verringert. Dies verringerte die Geschwindigkeit der Dechlorierung, cis-DCE wurde dennoch weiter umgesetzt. Dieser Abbau war allerdings nicht reproduzierbar. In der zweiten Wiederholung wurde PCE sehr langsam, binnen rund 125 Tagen abgebaut, wobei während der gesamten Versuchsdauer von 216 Tagen vorwiegend cis-DCE gebildet wurde und lediglich 2 µmol Ethen entstanden.

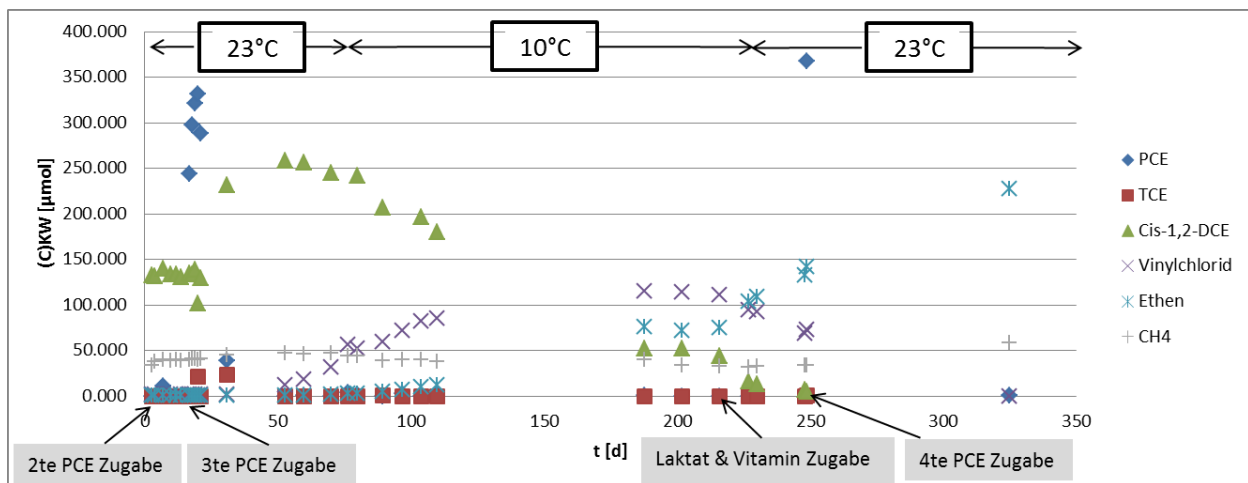


Abbildung 8: NTP-Kultur Idealbedingungen – Wiederholung 2: Abbau von PCE und Entstehung von Abbauprodukten (1000 mL Reaktionsgefäß)

In Brunnenwasser wurde PCE ähnlich schnell abgebaut, wie im Wasser aus der lokalen Wasserversorgung in Seibersdorf (Idealbedingungen). Der Gehalt des dechlorierten Abbauproduktes Ethen war allerdings nur gering. Über eine Versuchsdauer von über 200 Tagen wurden in den verschiedenen Wiederholungen maximal 5 µmol Ethen nachgewiesen (PCE Startkonzentration ~250 µmol). Ähnlich wie unter Idealbedingungen wiesen die drei Wiederholungen (Reaktionsgefäße) sehr unterschiedliche Reaktions-eigenschaften auf. Aufgrund der mangelhaften Reproduzierbarkeit unter Idealbedingungen, sowie in Versuchen mit Brunnenwasser ist es schwierig zu beurteilen, ob das Brunnenwasser die Ursache für den etwas schlechteren Abbau war.

Bei Versuchen mit nicht autoklaviertem Wasser waren ähnliche Abbaukurven zu beobachten, wie in der Parametervariation „Brunnenwasser“. PCE (~250 µmol) wurde sehr schnell abgebaut, wobei als Abbauprodukte nach über 200 Tagen im wesentlichen cis-DCE und geringere Mengen von Vinylchlorid (maximal 80 µmol) und Ethen (maximal 5 µmol) gefunden wurden. Auch unter diesen Versuchsbedingungen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

Nach 4 Monaten Lagerung (10°C) wurde dasselbe Inokulum, wie in den voran beschriebenen Versuchen mit NTP für den Abbau von PCE unter Idealbedingungen eingesetzt. Durch die vorangegangene Lagerung verzögerte sich der Abbau von PCE auf über 40 Tage. Über eine Versuchsdauer von 118 Tagen wurde das PCE ausschließlich zu cis-DCE abgebaut. Dies zeigte, dass eine Lagerung der Kulturen zu „Alterungsprozessen“ führt, die die Abbauleistung beeinflussen können. Die Kultur kann sich aber wieder erholen und den Schadstoff (PCE) nach einer längeren Anfangsphase wieder abbauen.

Bei Versuchen ohne ergänzende Zugabe von Spurenmetallen war nach der Versuchsdauer von 120 Tagen noch immer nicht abgebautes PCE in den Reaktionsgefäßen, wobei cis-DCE als einziges Abbauprodukt in zwei von vier Reaktionsgefäßen gemessen wurde. In den beiden anderen Reaktionsgefäßen wurde überhaupt kein Abbau festgestellt.

Bei Versuchen ohne ergänzende Zugabe von Spurenmetallen und Vitaminen wurde in keinem der vier Reaktionsgefäße (Wiederholungen) ein Abbau beobachtet.

SiREM KB-1 Kultur

Unter Idealbedingungen konnte PCE binnen weniger als einem Tag abgebaut werden (Abbildung 9). Unmittelbar mit dem Abbau von PCE entstand cis-DCE, welches auch binnen 6 Tagen vollständig zu Ethen abgebaut werden konnte wobei als Zwischenprodukt Vinylchlorid gebildet wurde. Neben dem Abbau von PCE wurde auch die Entstehung von CH₄ beobachtet. Die als C-Quelle zur Verfügung gestellte Melasse wurde demnach zu einem großen Teil zu Methan reduziert. Eine gewisse Aktivität von komplementär arbeitenden Bakterien ist gemäß Literatur erforderlich, da diese Substanzen bilden, die für den Abbau von PCE durch *Dehalococcoides* erforderlich sind. Gleichzeitig konkurrieren methanogene Bakterien allerdings mit PCE abbauenden Bakterien, um den vorhandenen Wasserstoff (Xiu et al., 2010; Yang and McCarty, 1998). Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar, was an den geringen Standardabweichungen in Abbildung 9 gut erkennbar ist.

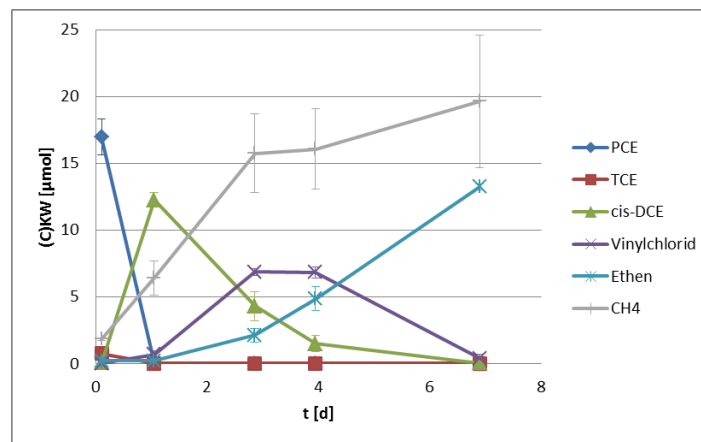


Abbildung 9: SiREM KB-1 Kultur Idealbedingungen – Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen: Abbau von PCE und Entstehung von Abbauprodukten (130 mL Reaktionsgefäß)

Der mikrobielle Abbau von PCE war unter Idealbedingungen, bei Verwendung der mikrobiellen Kultur KB-1 von SiREM deutlich schneller, als unter Einsatz der Kulturen NTP und Commercial Culture 3 (Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9). Es wurde daher in weiterer Folge untersucht, wie sich der mikrobielle Abbau von PCE durch die Kultur KB-1 verändert, wenn man verschiedene Additive (H₂, Vitamine, Spurenmetalle, Hefeextrakt) nicht zugibt und wenn man die Reaktionstemperatur von 23 °C auf 10 °C absenkt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, ob eine zusätzliche Zugabe von H₂, Vitaminen und Spurenmetallen unterlassen werden kann, ohne dadurch den mikrobiellen Abbau von PCE zu beeinträchtigen (Abbildung 10). Hierfür wurde ein neues Inokulum verwendet. Das Weglassen der Additive hatte keinen negativen Einfluss auf den mikrobiellen Abbau von PCE, PCE wurde gleich schnell abgebaut und cis-DCE wurde etwa gleich schnell gebildet und auch wieder abgebaut. Interessant war, dass das gebildete VC in jener Variante mit Vitaminen und Spurenmetallen geringfügig langsamer gebildet wurde und die Konzentration

auch nach 10 Versuchstagen noch immer anstieg während in den Versuchen ohne Vitamine und Spurenmetalle die VC Konzentration bereits nach 8 Tagen abnahm. Dementsprechend wurden bei der Entstehung des Endproduktes Ethen Unterschiede zwischen den Varianten beobachtet. In der Variante mit Vitaminen und Spurenmetallen wurde Ethen am langsamsten gebildet, was auf den verzögerten Abbau von VC zurückzuführen ist. Am schnellsten wurde Ethen in jener Variante gebildet, in der weder Vitamine noch Spurenmetalle zugegeben wurden. Auf die Bildung von Methan hatte die Zugabe von Vitaminen und Spurenmetallen keine Auswirkung. Unabhängig von den Versuchsbedingungen wurde über die Versuchsdauer (10 Tage) gleich viel CH_4 ($\sim 55\mu\text{mol}$) gebildet. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar, was an den geringen Standardabweichungen in Abbildung 10 gut erkennbar ist.

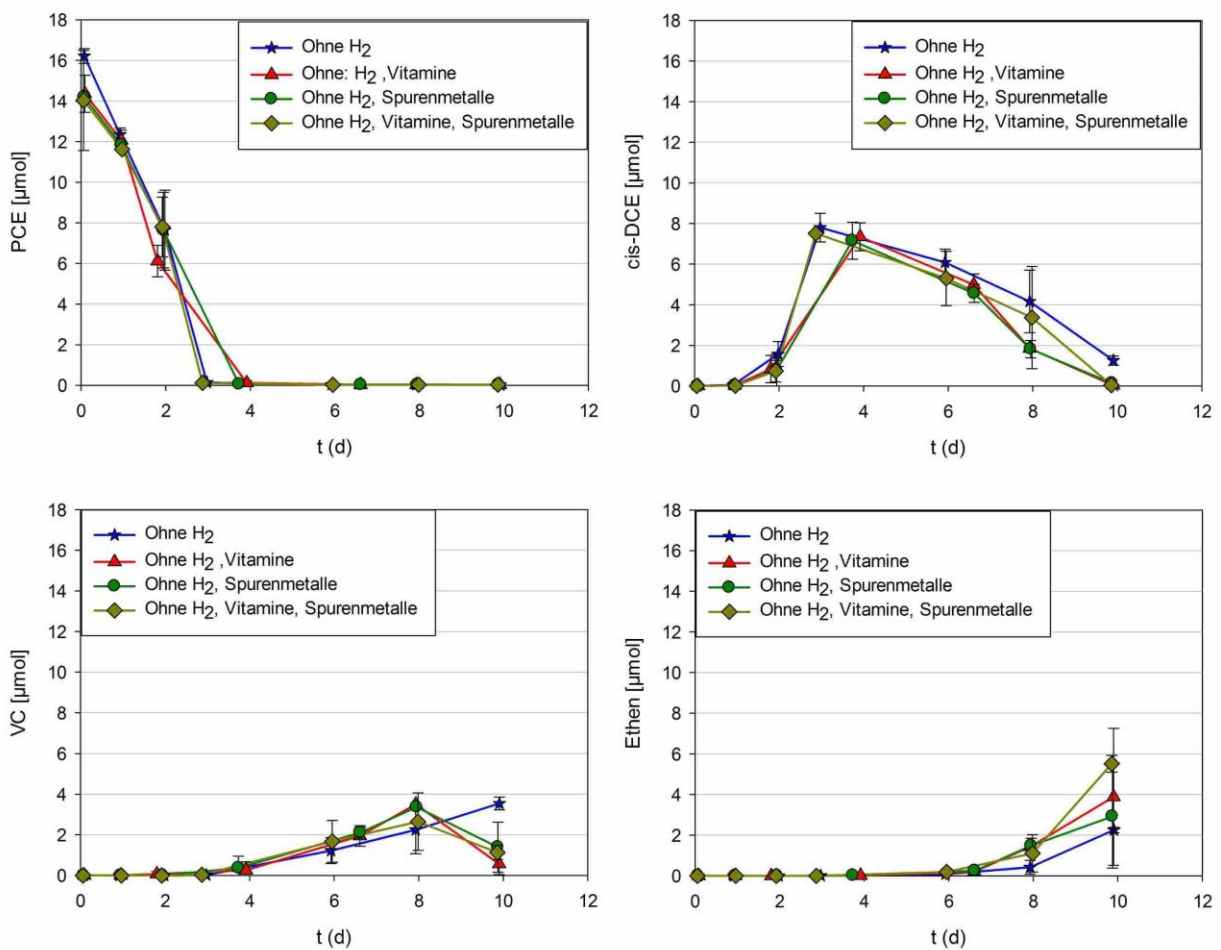


Abbildung 10: SiREM KB-1 Kultur Parametervariationen – Vergleich des mikrobiellen Abbaus, wenn Wasserstoff, Vitamine oder Spurenmetalle nicht ergänzend zugegeben werden. Abbau von PCE und Entstehung von Abbauprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Wie oben beschrieben, wurde in der vorangegangenen Versuchsreihe beobachtet, dass in den Batchversuchen auf die Zugabe von Vitaminen und Spurenmetallen verzichtet werden kann, ohne dadurch den mikrobiellen

Abbau zu beeinträchtigen. Es wurde daher in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob zusätzlich auch auf die Zugabe von Hefeextrakt verzichtet werden kann. Hefeextrakt besteht vorwiegend aus Aminosäuren, die von den Bakterien verwertet werden können. Des Weiteren enthält Hefeextrakt zahlreiche Vitamine, insbesondere das für den mikrobiellen Abbau von PCE benötigte Vitamin B₁₂. Zusätzlich wurde der Abbau von PCE bei den beiden Varianten mit und ohne Hefeextrakt bei einer Reaktionstemperatur von 10 °C (statt 23 °C) untersucht.

Der Verzicht auf die Zugabe von Hefeextrakt hatte keinen Einfluss den Abbau von PCE, sowie auf die Umwandlung von PCE zu cis-DCE, VC und Ethen (Abbildung 11), weder bei 23 °C Reaktionstemperatur noch bei 10 °C Reaktionstemperatur. Bei 23 °C Reaktionstemperatur wurde PCE binnen 2 Tagen vollständig abgebaut und binnen 5 Tagen zu Ethen umgebaut. Zwischenzeitlich entstanden etwa 5 µmol cis-DCE und etwa 3,5 µmol VC. In jenen Reaktionsgefäßen die auf 10 °C gekühlt wurden, wurde PCE in etwa 5-mal langsamer abgebaut, wobei zwischenzeitlich etwa 7 µmol cis-DCE und 3,5 µmol VC entstanden. Der Versuch ohne Zugabe von H₂, Vitaminen und Spurenmetallen bei 23 °C wurde in dieser Versuchsreihe genauso durchgeführt, wie in der vorangegangenen (Abbildung 10). Dies war notwendig, da für die in Abbildung 11 dargestellte Versuchsreihe ein neues Inokulum verwendet wurde. Durch diese Wiederholung wurde ein Vergleich zwischen den beiden Versuchsreihen ermöglicht. Der Abbau von PCE war im Rahmen der zweiten Versuchsreihe etwas schneller. Dies kann dadurch erklärt werden, dass für die beiden Versuchsreihen zwei unterschiedliche Inokula der Kultur KB-1 verwendet wurden. Die Bildung von Methan wurde ebenfalls nicht durch den Verzicht auf die Zugabe von Hefeextrakt beeinflusst. Über die Versuchsdauer (13 Tage) ist bei 23 °C rund 150 µmol CH₄ entstanden während bei 10°C über die Versuchsdauer (23 Tage) rund 45 µmol CH₄ entstanden sind. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar, was an den geringen Standardabweichungen in Abbildung 11 gut erkennbar ist.

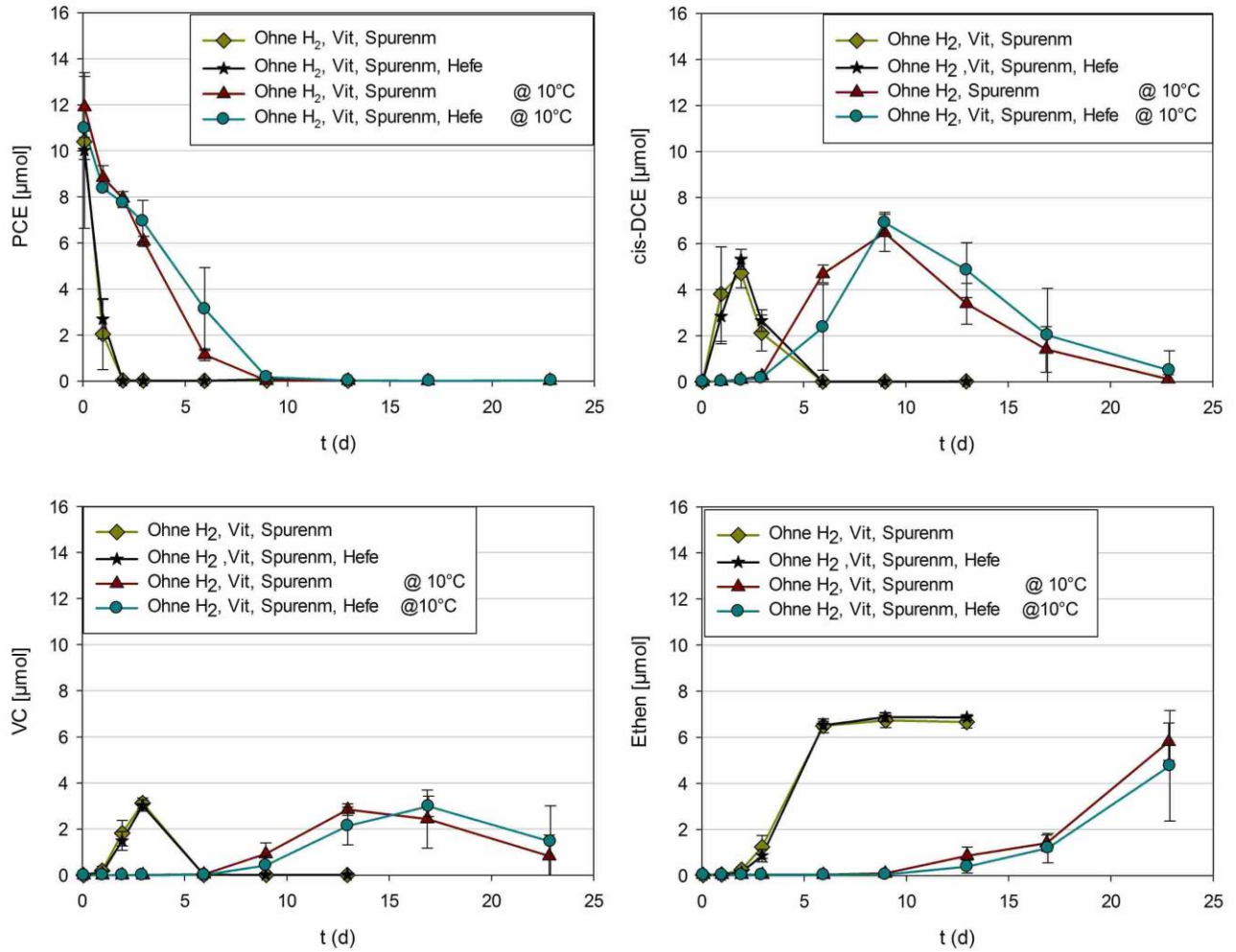


Abbildung 11: SiREM KB-1 Kultur Parametervariationen – Vergleich des mikrobiellen Abbaus, wenn Wasserstoff, Spurenmetalle, Vitamine und Hefeextrakt nicht ergänzend zugegeben werden sowie wenn die Reaktionstemperatur von Raumtemperatur (23 °C) auf 10 °C reduziert wird. Abbau von PCE und Entstehung von Abbauprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

3.1.3 Abbau von PCE durch eine Kombination von Eisensuspension und Mikroorganismen

Um die synergistische Wirkung einer kombinierten Anwendung von Fe(0) Partikeln mit der mikrobiellen Kultur SiREM KB-1 zu untersuchen wurden folgende Kombinationen untersucht:

- Fe(0) Partikel (Höganäs <45µm, Nanofer Star und CarboIron)
- Mikrobielle Kultur KB-1
- Fe(0) Partikel + Mikrobielle Kultur KB-1

3.1.3.1 Beschreibung der durchgeführten Versuche zur Untersuchung einer kombinierten Sanierung

Die Kombination von Fe(0) und mikrobiellem Abbau wurde im Rahmen von zwei Versuchsreihen untersucht. Einmal unter Bedingungen, die für den mikrobiellen Abbau als Idealbedingungen gelten (Kapitel 0) und einmal unter Bedingungen, die vorangegangen für den mikrobiellen Abbau als Minimalmedium definiert wurden (Kapitel 0). Die verwendeten Kohlenstoffquellen waren unter Idealbedingungen Na-Laktat (3,3 mM) und im Minimalmedium Melasse (679 mg/L). Eine Übersicht über die durchgeführten Versuche ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Auflistung aller 15 durchgeführten Batchversuche zur Untersuchung der synergistischen Effekte einer kombinierten Sanierung inklusive den relevanten biologischen Versuchsbedingungen und dem erfolgten Grad der Dechlorierung

| Versuch | Kultur | Partikel | Biol. Versuchsbeding. | Endprodukte |
|------------------------------|------------|----------------|--|------------------|
| Kombinierte Sanierung | - | Höganäs <45µm | + Aquifermaterial | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | - | | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | Höganäs <45 µm | Idealbedingungen + Aquifermaterial | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | Nanofer Star | | Vollst. Dechlor. |
| Fe(0) | - | Höganäs <45µm | | Vollst. Dechlor. |
| | - | Nanofer Star | + Aquifermaterial | Vollst. Dechlor. |
| | - | CarboIron | | Vollst. Dechlor. |
| Mikrobiologie | SiREM KB-1 | - | Minimalbedingungen | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | Höganäs <45µm | Raumtemperatur | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | Nanofer Star | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Trace metals | Vollst. Dechlor. |
| Fe(0)+ Mikrobiologie | SiREM KB-1 | CarboIron | ≠Hefe | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | - | Minimalbedingungen | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | Höganäs <45µm | 10°C Temperatur | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | Nanofer Star | ≠ H ₂ ≠Vitamine ≠Trace metals | Vollst. Dechlor. |
| | SiREM KB-1 | CarboIron | ≠Hefe | Vollst. Dechlor. |

Die Versuche nur mit Fe(0) Partikeln ohne Zugabe eines mikrobiellen Inokulums wurden durchgeführt wie in Kapitel 3.1.1 Eisenversuche beschrieben. Die Ansätze wurden allerdings folgendermaßen modifiziert:

- (i) die Zugabe von Aquifermaterial (Quarzsand 0,5-2 mm),
- (ii) die PCE Konzentration wurde von 40 auf 32 mg/L gesenkt,
- (iii) $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ wurde als Reduktionsmittel zugegeben
- (iv) die Eisenkonzentrationen wurden angepasst

Durch die durchgeführten Änderungen wurden die gleichen Bedingungen hergestellt, wie sie in den rein mikrobiellen Versuchen mit SiREM KB-1 umgesetzt wurden (Kapitel 3.1.2.1 Beschreibung der durchgeführten mikrobiellen Versuche).

Wie bereits beschrieben, wurden in einer ersten Versuchsreihe die synergistischen Effekte einer kombinierten Sanierung unter Bedingungen durchgeführt, die für den mikrobiellen Abbau als Idealbedingungen gelten. Verglichen wurde hierbei

- (i) der Abbau nur mit Höganäs <45µm Partikeln (20 g/L Partikeln),
- (ii) der rein mikrobielle Abbau unter Idealbedingungen,
- (iii) der Abbau wobei KB-1 gemeinsam mit Höganäs <45µm Partikeln (20 g/L Partikeln) eingesetzt wurde und
- (iv) der Abbau wobei KB-1 gemeinsam mit Nanofer Star Partikeln (1,0 g/L Partikeln) eingesetzt wurde (Tabelle 6).

Es wurde auch der Abbau nur mit Nanofer Star Partikeln untersucht. Leider ist bei diesem Versuch allerdings bei der Zugabe der Eisensuspension ein Fehler passiert, wodurch in etwa um den Faktor 2,5 mehr Fe(0) in die Reaktionsgefäße eingebracht wurde (2,4 g/L Partikel), als in den Versuchen mit Nanofer Star und KB-1 (1,0 g/L) Fe(0). Ein direkter Vergleich der beiden Versuche war daher nicht möglich. Dementsprechend werden auch die Daten dieses Versuches nicht graphisch dargestellt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die synergistischen Effekte einer kombinierten Sanierung in einem Medium durchgeführt, das für den mikrobiellen Abbau als Minimalmedium definiert wurde. Versuche mit SiREM KB-1 (alleine und kombiniert mit Fe(0)) wurden hierbei so durchgeführt, wie bei der Minimalvariante in Kapitel 3.1.2.1 „Beschreibung der durchgeführten mikrobiellen Versuche“ (also \neq H₂ \neq Vitamine \neq Trace metals \neq Hefe). Verglichen wurde hierbei:

- (i) der Abbau nur mit Höganäs <45µm Partikeln (20 g/L Fe(0)),
- (ii) der Abbau nur mit Nanofer Star Partikeln (1,0 g/L Fe(0)),
- (iii) der Abbau nur mit CarboIron Partikeln (1,0 g/L Fe(0)),
- (iv) der rein mikrobielle Abbau unter Minimalbedingungen
- (v) der Abbau, wobei KB-1 gemeinsam mit Höganäs <45µm Partikeln (20 g/L Fe(0)) eingesetzt wurde,
- (vi) der Abbau wobei KB-1 gemeinsam mit Nanofer Star Partikeln (1,0 g/L Fe(0)) eingesetzt wurde und
- (vii) der Abbau wobei KB-1 gemeinsam mit CarboIron Partikeln (1,0 g/L Fe(0)) eingesetzt wurde (Tabelle 6).

Die Versuche iv-vii wurden nach rund 50 Versuchstagen, beziehungsweise nach Abbau der dritten PCE Dotation auf 10°C gekühlt, um den kombinierten Abbau bei reduzierter Reaktionstemperatur zu untersuchen. Bei den Versuchen im Minimalmedium wurde die Eisenkonzentration - anders als in den Versuchen unter Idealbedingungen - auf die Menge an eingesetztem Fe(0) normiert und nicht auf die eingesetzte Partikelmenge. Diese Unterscheidung ist relevant weil die verschiedenen Partikeltypen unterschiedliche Fe(0) Gehalte aufweisen.

3.1.3.2 Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Untersuchung einer kombinierten Sanierung

I - Untersuchung von synergistischen Effekten einer kombinierten Sanierung unter Idealbedingungen

Unter Idealbedingungen war der abiotische Abbau von PCE durch Eisenpartikel wesentlich langsamer als der mikrobielle PCE Abbau (Abbildung 12) was bisherige Beobachtungen bestätigte, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden. Durch eine Kombination des mikrobiellen Abbaus mit den beiden Eisenpartikeln (Nanofer Star und Höganäs <45 µm) konnte der PCE Abbau unter den verwendeten Versuchsbedingungen gegenüber dem bereits sehr raschen Abbau mit Mikroorganismen alleine nicht beschleunigt werden. In Folge einer zweiten PCE Dotation nach 14 Versuchstagen war der PCE Abbau bei den kombinierten Versuchen sogar etwas langsamer als bei dem rein mikrobiologischen Abbauversuch. Dieser Effekt war bei den Nanopartikeln etwas ausgeprägter als bei den Mikropartikeln. Entsprechend dem verlangsamten PCE Abbau war auch die Entstehung der Abbauprodukte bei einem rein mikrobiellen Abbau schneller als bei den anderen Varianten (Abbildung 12). Neben der Optimierung des PCE Abbaus ist es ein erklärtes Ziel die Entstehung von Vinylchlorid (VC) im Zuge einer kombinierten Sanierung zu verhindern. Unter den untersuchten Bedingungen entstand VC sowohl in den mikrobiellen Abbauversuchen als auch in den kombinierten Abbauversuchen. Wobei Vinylchlorid weiter zu Ethen und Ethan abgebaut wurde und nicht als Endprodukt akkumulierte (Abbildung 12).

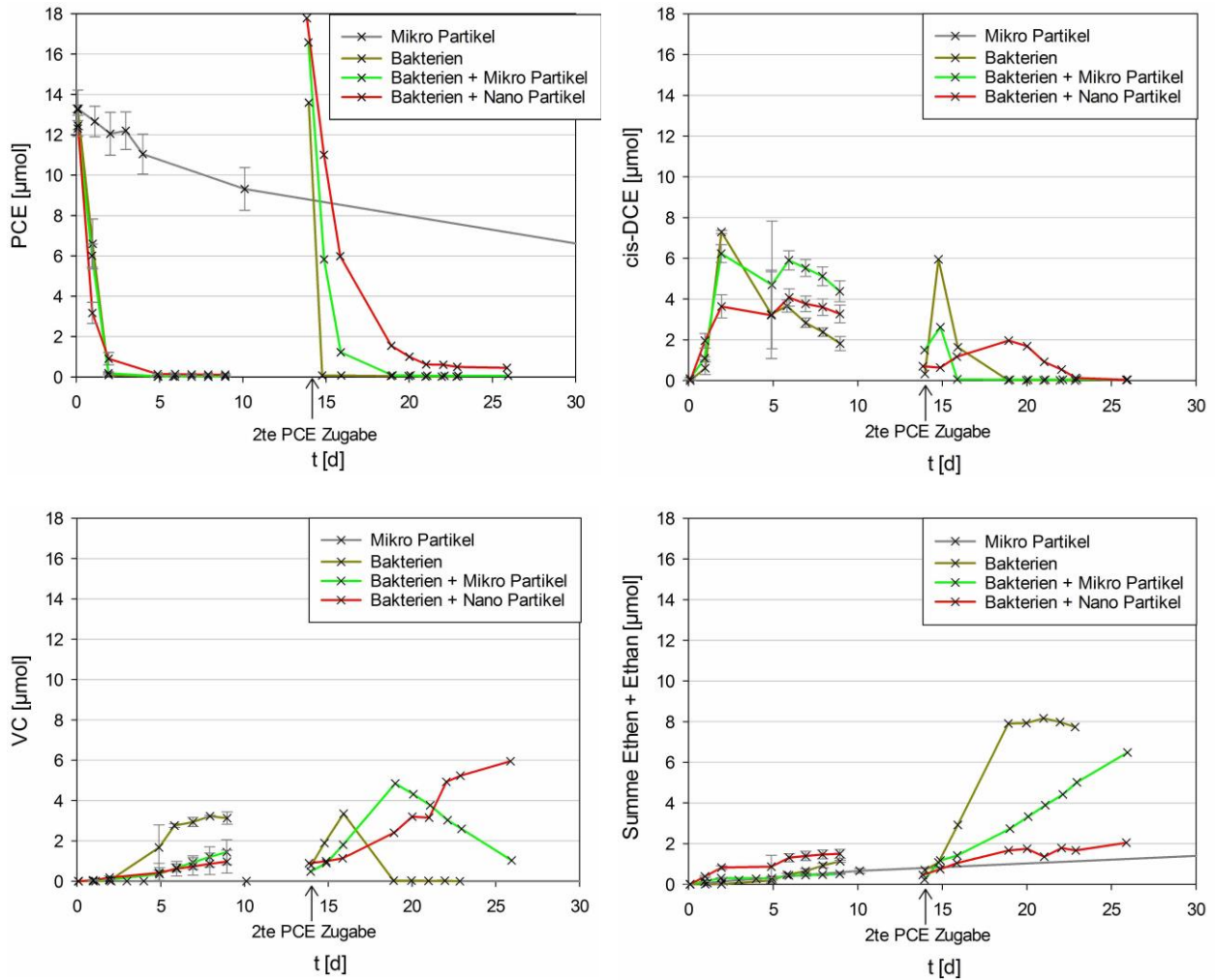


Abbildung 12: Kombiniertes PCE-Abbau unter Idealbedingungen – Vergleich des abiotischen Abbaus (NanoFer Star nm- und Höganäs µm-Partikel), des mikrobiellen Abbaus (Kultur SiREM KB-1) und der Kombination von diesen Eisenpartikeln mit einem mikrobiellem Abbau. Abbau von PCE und Entstehung von Reaktionsprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Die Dominanz der mikrobiellen Aktivität über die abiotische Aktivität ließ sich auch über die Entstehung der Abbauprodukte Ethen und Ethan beobachten (Abbildung 13). Bei der Reaktion von PCE mit den eingesetzten Eisenpartikeln entstehen sowohl Ethen als auch Ethan in einem Verhältnis von ungefähr 2/3 zu 1/3. Währenddessen entsteht durch den mikrobiellen Abbau von PCE ausschließlich Ethen. Insbesondere bei der Kombination mit Nanopartikeln zeigte sich, dass die Ethenproduktion stark verringert war, verglichen mit dem rein mikrobiellen Abbau (Abbildung 13).

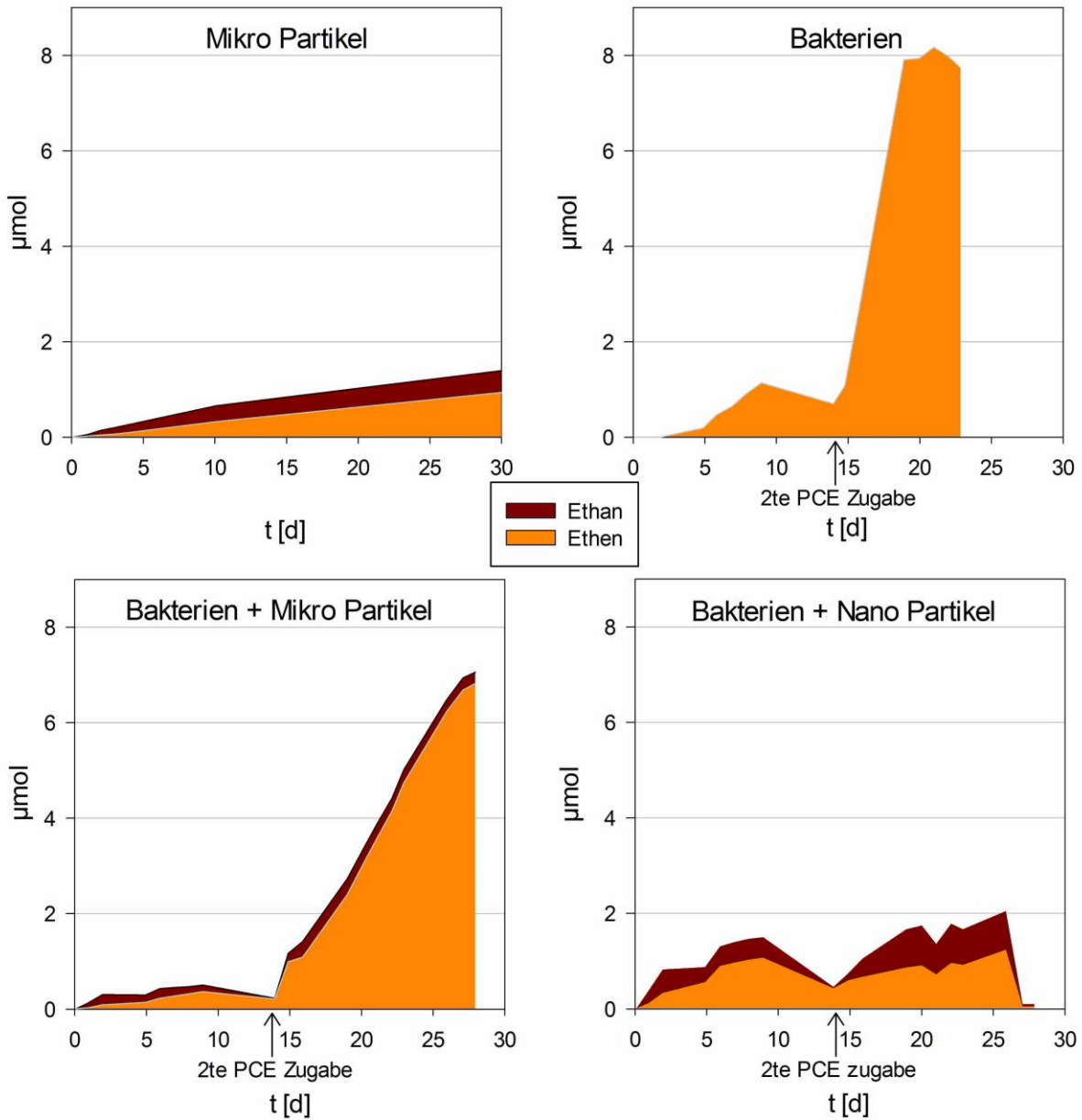


Abbildung 13: Kombinierte Sanierung unter Idealbedingungen – Vergleich des abiotischen Abbaus (NanoFer Star nm- und Höganäs μm -Partikel, des mikrobiellen Abbaus (Kultur SiREM KB-1) und der Kombination von diesen Eisenpartikeln mit einem mikrobiellem Abbau. Die Entstehung von Ethen und Ethan bei unterschiedlichen Versuchsvarianten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

Eine weitere Fragestellung war ob der von den Eisenpartikeln produzierte Wasserstoff von den Bakterien als Elektronendonator verwendet werden kann. Die Messung der Wasserstoffkonzentrationen in den Versuchsgefäßen zeigte deutlich, dass der Wasserstoff durch die mikrobiellen Aktivitäten verbraucht wurde (Abbildung 14). In Versuchen ohne Eisenpartikeln wurde Wasserstoff nicht untersucht. In Abbildung 14 sind daher keine Wasserstoff Messwerte für den rein mikrobiellen Abbau angeführt.

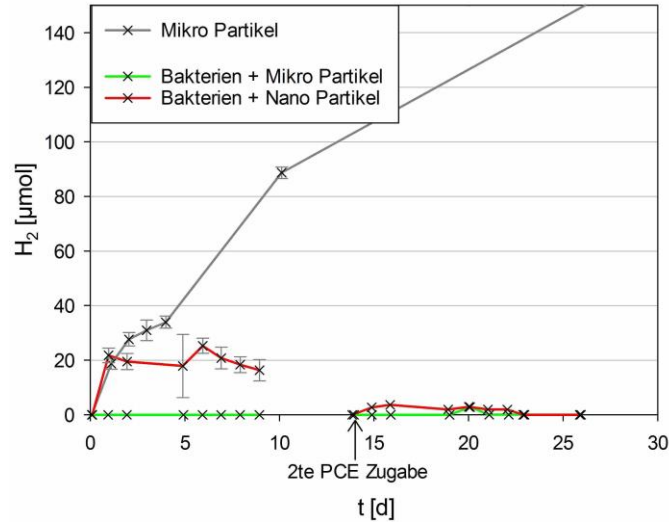


Abbildung 14: Kombinierte Sanierung unter Idealbedingungen – Vergleich der Wasserstoffentwicklung im Zuge des abiotischen Abbaus (Höganäs µm-Partikel) und der Kombination von Eisenpartikeln (Höganäs µm-Partikel und Nanofer Star nm Partikel) mit einem mikrobiellen Abbau. Die Versuche wurden in 130 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass unter idealen Laborbedingungen sowohl eine kombinierte Behandlung als auch eine rein mikrobielle Behandlung zu einem raschen Abbau von PCE führte, wobei in beiden Fällen das PCE vollständig zu Ethen und Ethan abgebaut wurde. Als Zwischenprodukt entstand allerdings Vinylchlorid. Es ist bekannt, dass unter ungünstigeren Bedingungen beziehungsweise unter Feldbedingungen der rein mikrobielle Abbau nicht immer zu einer vollständigen Dechlorierung von PCE führen muss. Insbesondere da die Versorgung mit Wasserstoff eine gut funktionierende mikrobielle Gemeinschaft voraussetzt und da nicht immer zu 100 Prozent die gewünschten Redox Bedingungen vorherrschen. Beide Parameter können durch den Einsatz von nullwertigem Eisen optimiert werden. Es wurde daher in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob durch die Kombination von Eisenpartikeln mit Bakterien synergistische Effekte festgestellt werden können, wenn die Reaktion einem definierten Minimalmedium durchgeführt wird. So wurden weiterhin ideale Redox Bedingungen gewährleistet, allerdings wurden etwaige Additive wie Vitamine, Spurenelemente und Hefeextrakt nicht zugegeben.

II - Untersuchung von synergistischen Effekten einer kombinierten Sanierung im Minimalmedium

Im Zuge dieser Versuchsreihe wurde zuerst der Abbau von PCE durch die drei Eisenpartikeln Höganäs<45µm (µm), NanoferStar (nm) und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle) untersucht und deren Reaktionseigenschaften mit dem rein mikrobiellen Abbau von PCE verglichen.

In weiterer Folge werden Ergebnisse dargestellt in denen der rein mikrobielle Abbau mit dem Abbau durch eine kombinierte Sanierung mit den drei Eisenpartikeln Höganäs<45µm, NanoferStar und CarboIron verglichen wird.

II-1 Bakterien vs. Eisenpartikel

Auch in einem Minimalmedium war der mikrobielle Abbau von PCE bedeutend schneller als der abiotische Abbau durch die verschiedenen Eisenpartikel (Abbildung 15). Daher wurde in den rein mikrobiellen Reaktionsgefäßen über die gleiche Versuchsdauer zwei weitere male PCE zugegeben. Bei den Versuchen mit CarboIron Partikeln war zu beachten, dass die rasche anfängliche Abnahme von PCE nicht auf dem Abbau von PCE beruhte, sondern dass PCE an der Aktivkohle gebunden wurde. Um eine Bilanzierung des PCE Abbaus über die Zeit zu ermöglichen wurden Wasserproben zur Bestimmung der Cl^- Konzentrationen genommen. Es zeigte sich bei der ionenchromatographischen Messung dieser Proben, dass in den Chromatogrammen der Chloridpeak von einer anderen, unbekanntem Substanz überlagert wurde. Wir vermuten, dass es sich dabei um eine Substanz handelt die im Inokulum vorliegt, da dieser Peak in der reinen Nährlösung - ohne Inokulum - nicht beobachtet wurde. Sowohl im Zuge des abiotischen Abbaus als auch im Zuge des mikrobiellen Abbaus wurde das PCE vollständig dechloriert, wobei während des rein mikrobiellen Abbaus zwischenzeitlich erhebliche Konzentrationen von cis-DCE und VC gebildet wurden (Abbildung 15). Diese wurden allerdings in weiterer Folge auch vollständig dechloriert. Bei Versuchen mit Eisenpartikeln wurde kaum cis-DCE ($<1 \mu\text{g/L}$) und VC ($<0,2 \mu\text{g/L}$) gebildet.

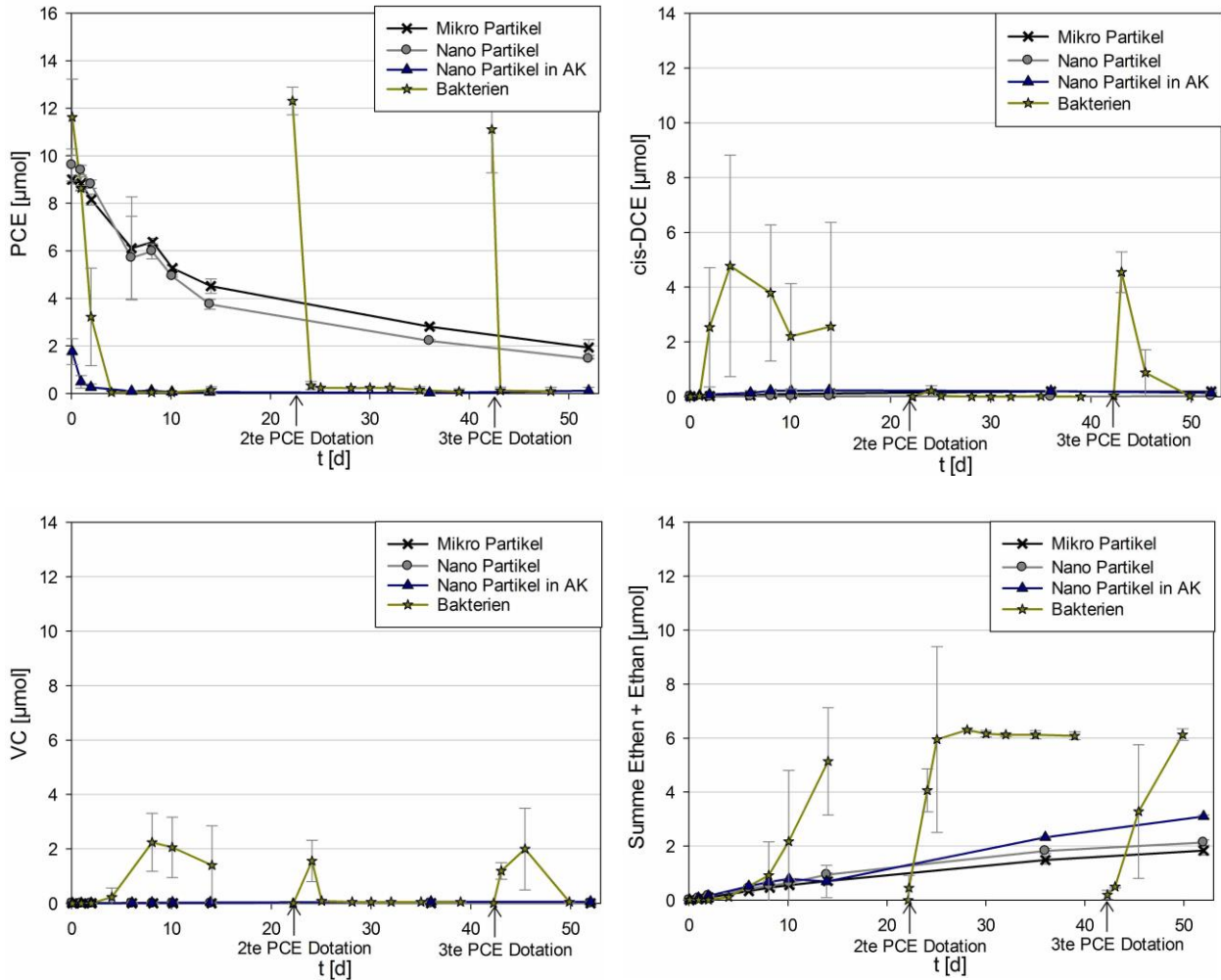


Abbildung 15: Vergleich des abiotischen Abbaus mit NanoFer StarPartikeln (nm), Höganäs<45 Partikeln (µm) und CarboIron Partikeln (nm eingebettet in Aktivkohle) mit dem rein mikrobiellem Abbau (Kultur SiREM KB-1. Abbau von PCE und Entstehung von Reaktionsprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. In den Reaktionsgefäßen mit „Bakterien“ wurde zwei weitere Male PCE zugegeben. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Wie bereits unter Idealbedingungen beobachtet wurde PCE durch den mikrobiellen Abbau ausschließlich zu Ethen dechloriert während die Eisenpartikeln PCE zu Ethen und Ethan dechlorierten (Abbildung 16).

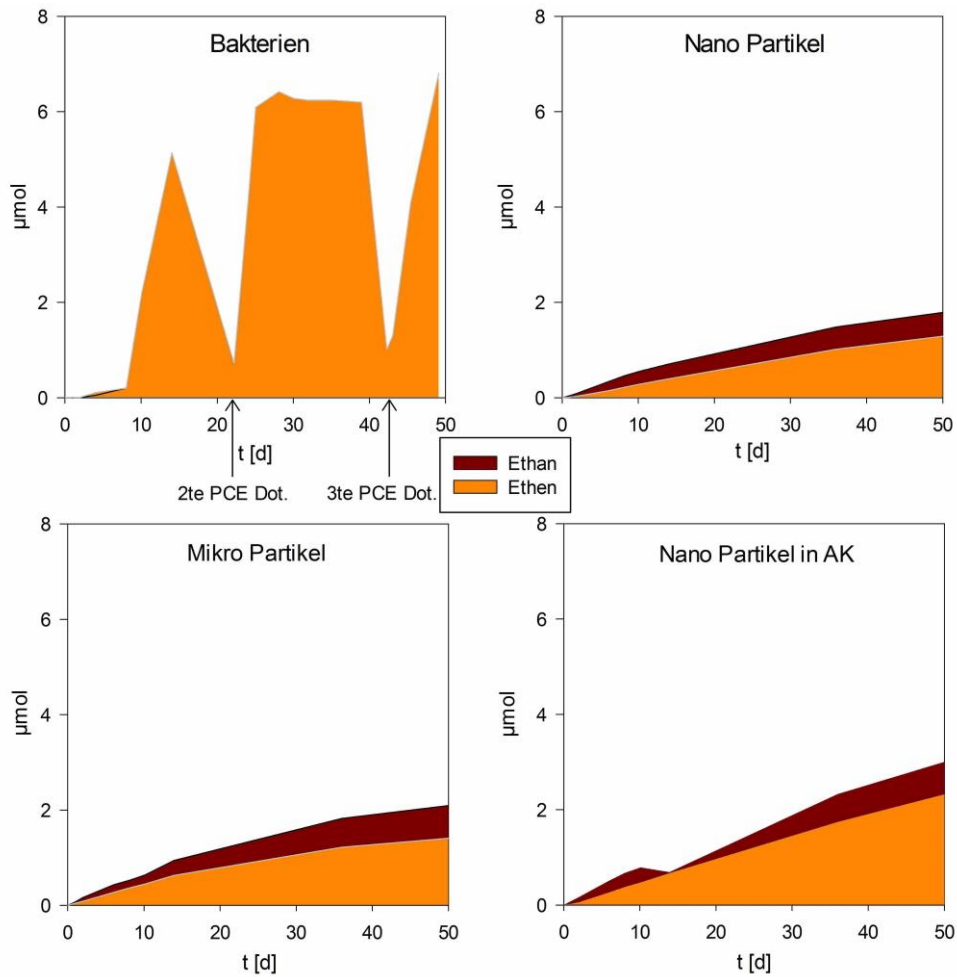


Abbildung 16: Vergleich von des abiotischen Abbaus mit NanoFer StarPartikeln (nm), Höganäs<45 Partikeln (μm) und CarboIron Partikeln (nm eingebettet in Aktivkohle)-, mit dem rein mikrobiellem Abbau (Kultur SiREM KB-1). Die Entstehung von Ethen und Ethan bei unterschiedlichen Versuchsvarianten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

Der durch die Oxidation von Eisenpartikeln entstandene Wasserstoff akkumulierte in den Gefäßen, wobei die Reaktion von NanoFer Star Partikeln mit Wasser zu deutlich höheren Wasserstoffkonzentrationen führte als die Reaktion der beiden anderen Partikeln mit Wasser (Abbildung 17). Allerdings wurde auch im Zuge des mikrobiellen Abbaus ohne Eisenpartikel immer wieder Wasserstoff detektiert, wenn auch in wesentlich geringeren Konzentrationen und nur an manchen Messzeitpunkten. Die mikrobielle Gemeinschaft war demnach zumindest temporär in der Lage mehr Wasserstoff zu bilden als verbraucht wurde.

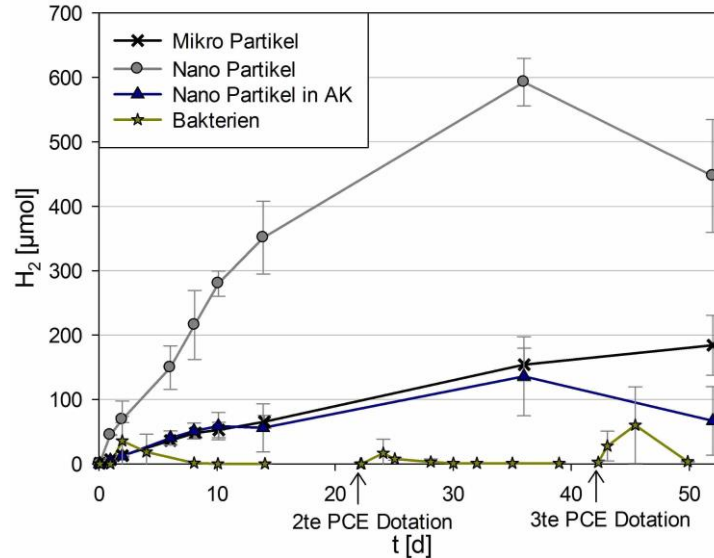


Abbildung 17: Vergleich der Wasserstoffentwicklung mit NanoFer StarPartikeln (nm), Höganäs<45 Partikeln (µm) und CarboIron Partikeln (nm eingebettet in Aktivkohle) und mit dem rein mikrobiellem Abbau (Kultur SiREM KB-. Die Versuche wurden in 130 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

II - 2 BAKTERIEN VS KOMBINIERT BEI RAUMTEMPERATUR

Nachdem unter Idealbedingungen im Labor keine synergistischen Effekte einer kombinierten Sanierung beobachtet wurden, wurde diese Versuchsreihe unter Bedingungen getestet, die als Minimalmedium definiert wurden. Dementsprechend wurden lediglich eine C-Quelle (Melasse), ein Reduktionsmittel (Natriumsulfid), Sand, Wasser, Eisenpartikel und / oder ein mikrobielles Inokulum den Reaktionsgefäßen zugesetzt. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur umgesetzt und insgesamt wurde dreimal PCE zugegeben, jeweils nachdem die vorangegangene Zugabe bereits abgebaut war.

Im Zuge der ersten PCE Dotation war der PCE Abbau bei der Kombination von Höganäs Partikeln mit einem mikrobiellem Abbau am schnellsten (Abbildung 18). Auch die Kombination mit NanoFer Star Partikeln bewirkte einen beschleunigten Abbau von PCE verglichen mit einem rein mikrobiellen Abbau. Diese unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeiten spiegelten sich auch in der Entstehung von Ethen und Ethan wider (Abbildung 18). Dieser synergistische Effekt konnte beim Abbau des anschließend zweimal zugegeben PCE nicht mehr beobachtet werden. PCE wurde in der Variante ohne Eisenpartikel (mikrobieller Abbau) am schnellsten abgebaut und Ethen und Ethan wurden in dieser Variante am schnellsten gebildet. Bei der Beurteilung von CarboIron muss berücksichtigt werden, dass diese Partikel chlorierte Ethene adsorbieren. Die rasche Abnahme von PCE und die geringen DCE und VC Konzentrationen sind daher nicht auf einen Abbau zurückzuführen sondern auf die Adsorption an der Aktivkohle. Eine solche Adsorption an CarboIron Partikeln wurde in Studien von Bleyl et al., 2013 und Mackenzie et al., 2012 bereits beobachtet. Des Weiteren

war die Bildung von Ethen und Ethan unter Einsatz von CarboIron wesentlich geringer als in den anderen Varianten. Ethen und Ethan werden von Aktivkohle nur in vernachlässigbarem Ausmaß gebunden (Mackenzie et al., 2012). Es ist daher davon auszugehen, dass der Abbau von PCE bei einer Kombination von CarboIron und einem mikrobiellen Abbau am langsamsten war. Cis-DCE und VC wurden unabhängig von der untersuchten Variante gebildet doch wurden diese weiter dechloriert. Lediglich unter Einsatz von CarboIron blieb die VC Konzentration über die gesamte Versuchsdauer stets unter 137 µg/L was wie bereits erläutert vor allem auf die Adsorption von VC an der Aktivkohle zurückzuführen ist.

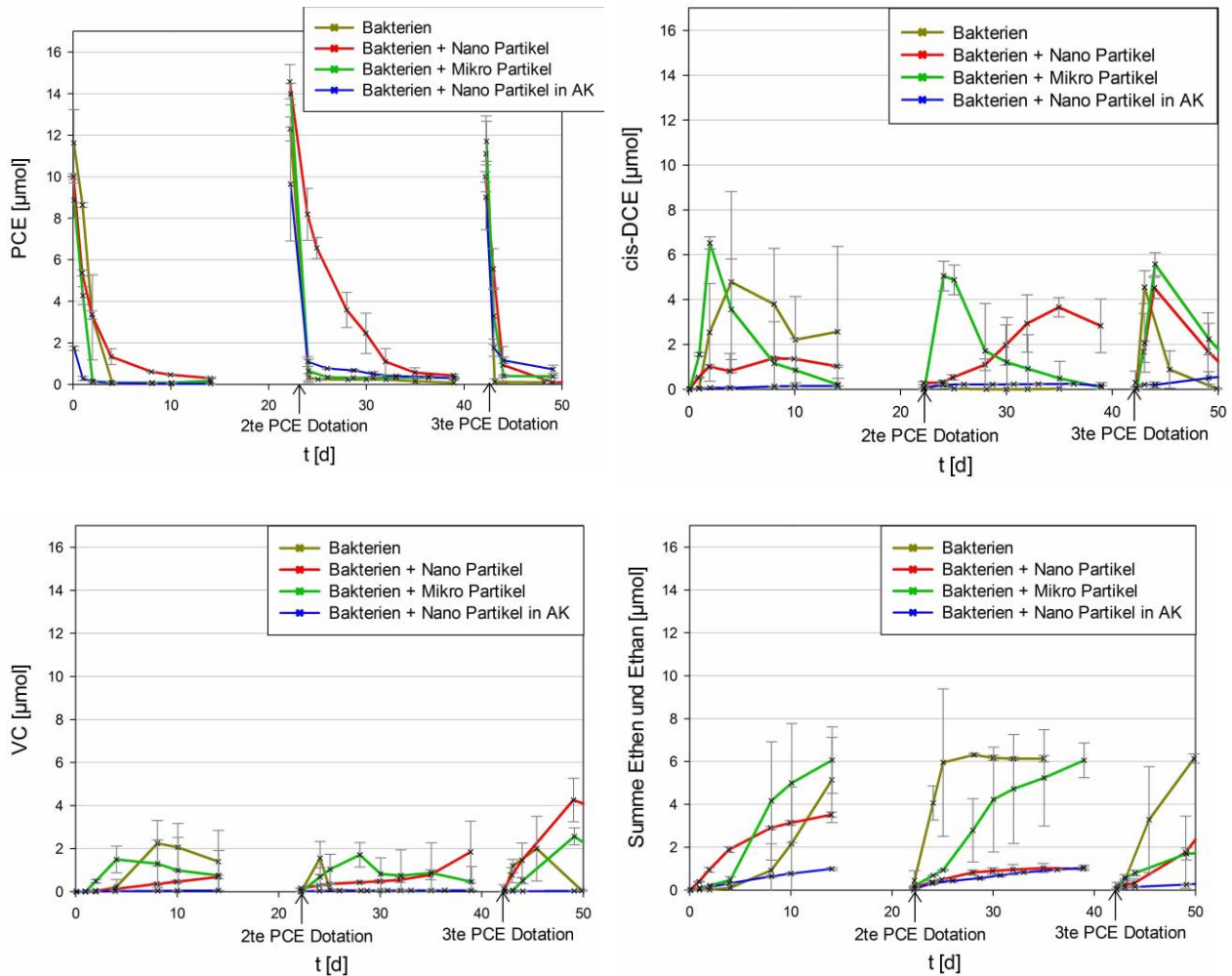


Abbildung 18: Vergleich des rein mikrobiellen Abbaus mit der Kombination mit den verschiedenen Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs<45 (µm) und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle). Abbau von PCE und Entstehung von Reaktionsprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Insbesondere in der Betrachtung der Entwicklung der Abbauprodukte Ethen und Ethan verdeutlicht sich die inhibierende Wirkung der Nanopartikel Nanofer Star und CarboIron auf den mikrobiellen Abbau (Abbildung 19). Die durch die Mikroorganismen bedingte Ethenproduktion wurde in Kombination mit beiden Partikeltypen beträchtlich verringert. Im Gegensatz zu den Nanopartikel (Nanofer Star und CarboIron) hatten die Mikropartikel (Höganäs) einen deutlich geringeren Einfluss auf den mikrobiellen Abbau von PCE und auf die Bildung von Zwischenprodukten.

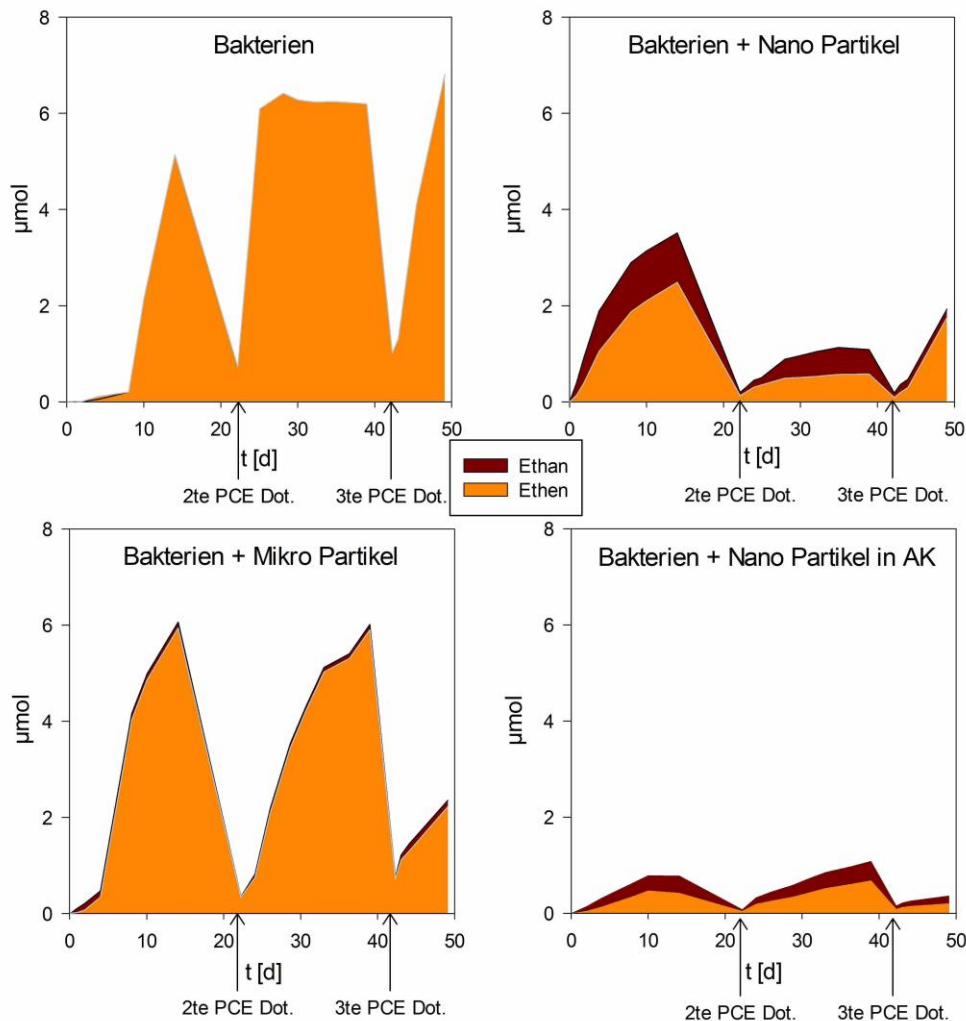


Abbildung 19: Vergleich des rein mikrobiellen Abbaus mit der Kombination mit den verschiedenen Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs <45 (μm) und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle). Die Entstehung von Ethen und Ethan bei unterschiedlichen Versuchsvarianten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

Der durch die Eisenpartikel generierte Wasserstoff wurde durch die mikrobielle Gemeinschaft aufgebraucht (Abbildung 20). Wie sich der Wasserstoff und die Eisenpartikeln auf die mikrobielle Zusammensetzung im Detail auswirkt muss noch im Zuge von DNA und FISH Analysen (Kapitel 3.2.3) untersucht werden.

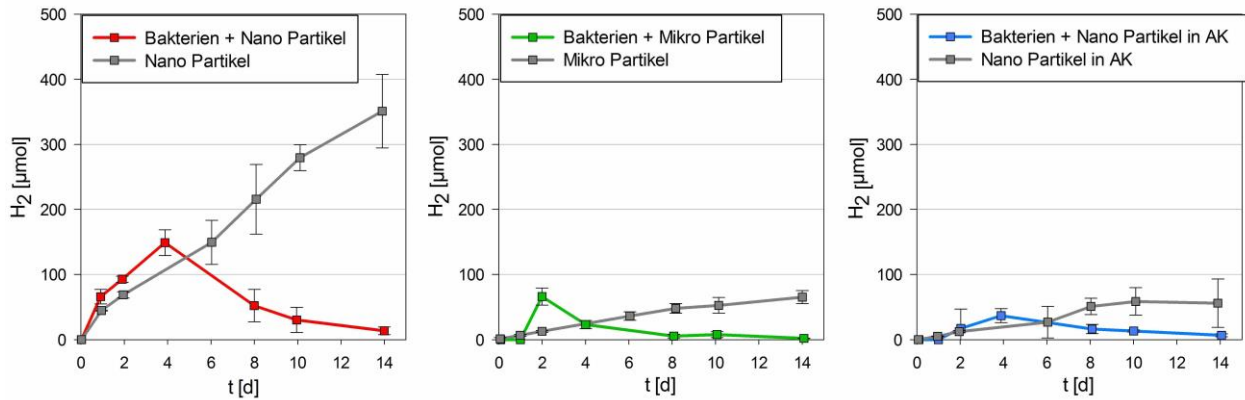


Abbildung 20: Wasserstoffbildung in den Reaktionsgefäßen während der Reaktion von Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs<45 (µm) und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle) in Wasser verglichen mit der Wasserstoffbildung bei einer Kombination der jeweiligen Eisenpartikel mit einem mikrobiellen Abbau von PCE. Die Versuche wurden in 130 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch in einem Minimalmedium sowohl eine kombinierte Sanierung als auch eine rein mikrobielle Sanierung zu einem raschen Abbau von PCE führte wobei in beiden Fällen das PCE zu Ethen und Ethan abgebaut wurde. Als Zwischenprodukt entstand allerdings Vinylchlorid. Bei fortlaufender Versuchsdauer zeigte sich ein inhibierender Effekt von Nanopartikeln auf den mikrobiellen Abbau von PCE und die Entstehung von Ethen und Ethan. Der mikrobielle Abbau sowie die Reaktivität sind maßgeblich von der Umgebungstemperatur abhängig. In einem nächsten Schritt wurde daher die Reaktionstemperatur in den bestehenden Reaktionsgefäßen auf 10°C reduziert. Diese Temperatur entspricht den üblicherweise in österreichischen Grundwässern vorherrschenden Temperaturen.

II - 3 BAKTERIEN VS KOMBINIERT BEI 10°C

Eine Reduktion der Reaktionstemperatur von Raumtemperatur auf 10°C bewirkte eine Verlangsamung des mikrobiellen Abbaus von PCE als auch der Entstehung von Zwischen- und Endprodukten (

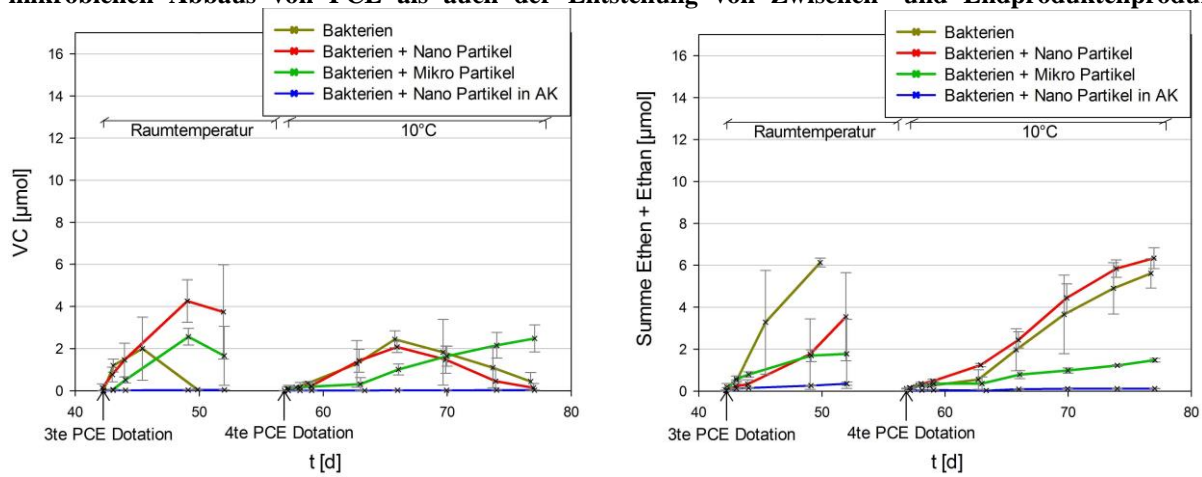
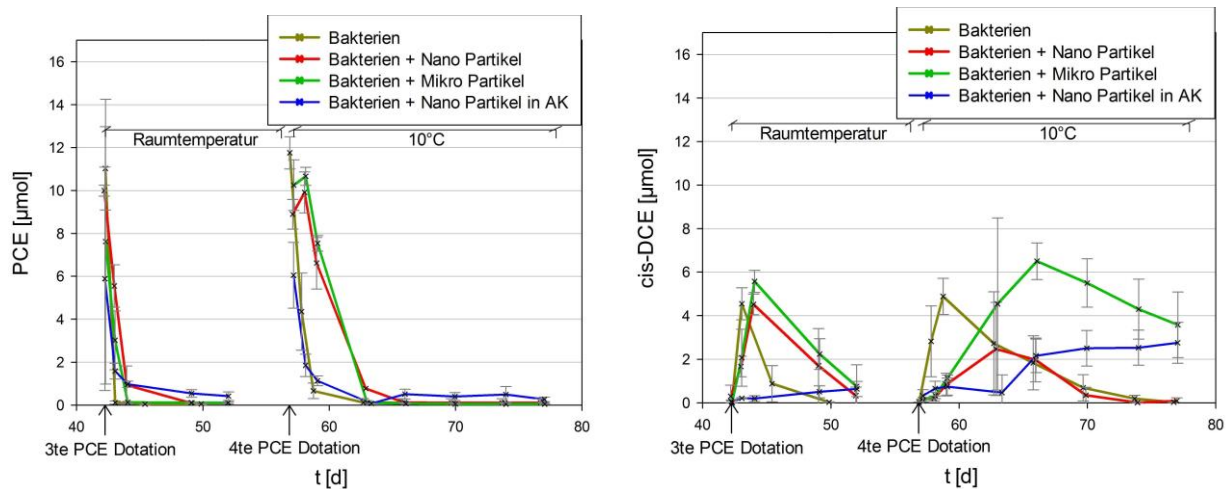


Abbildung 21, Graph Bakterien). Die Entstehung des Endproduktes Ethen reduzierte sich zwischen den beiden PCE Dotationen um den Faktor 2,52 von 0,78 µmol Ethen/Tag auf 0,31 µmol Ethen/Tag. In ähnlichem Ausmaß verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit von Eisenpartikeln bei einer Temperaturreduktion. Dies wurde bereits in dem vorangegangenen Projekt NanoSan am AIT beobachtet (BMLFUW, 2013). Anders als bei Raumtemperatur zeigte die Kombination des mikrobiellen Abbaus in Kombination mit Nanofer Star Partikeln keine Hemmung des mikrobiellen Abbaus (Abbildung 43 und Abbildung 44), wohingegen der Abbau von PCE bei einer Kombination mit Mikropartikeln oder in Aktivkohle eingebetteten Partikeln deutlich langsamer war als bei einem rein mikrobiellen Abbau. Insbesondere unter Einsatz von CarboIron wurde kaum mehr Ethen oder Ethan gebildet.



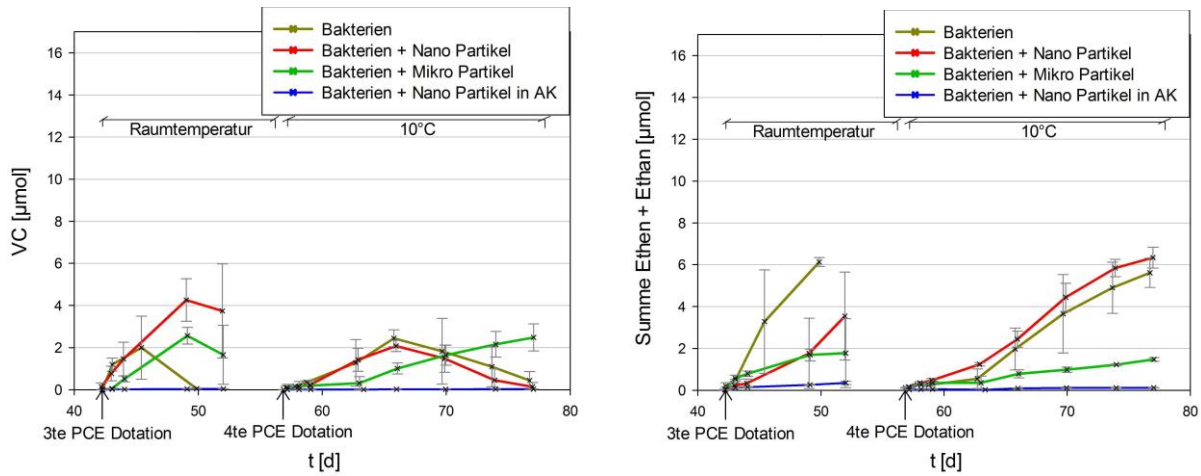


Abbildung 21: Vergleich des rein mikrobiellen Abbaus mit der Kombination mit den verschiedenen Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs<45 (μm) und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle) bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen. Abbau von PCE und Entstehung von Reaktionsprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

Wie bereits in den vorangegangenen Resultaten beobachtet, bewirkte der mikrobielle Abbau (unter Laborbedingungen) den wesentlichen Anteil des Abbaus von PCE während der abiotische Abbau von PCE um vielfaches langsamer ablief. Dementsprechend hoch war die Entwicklung von Ethen im Verhältnis zur Ethanproduktion (Abbildung 22).

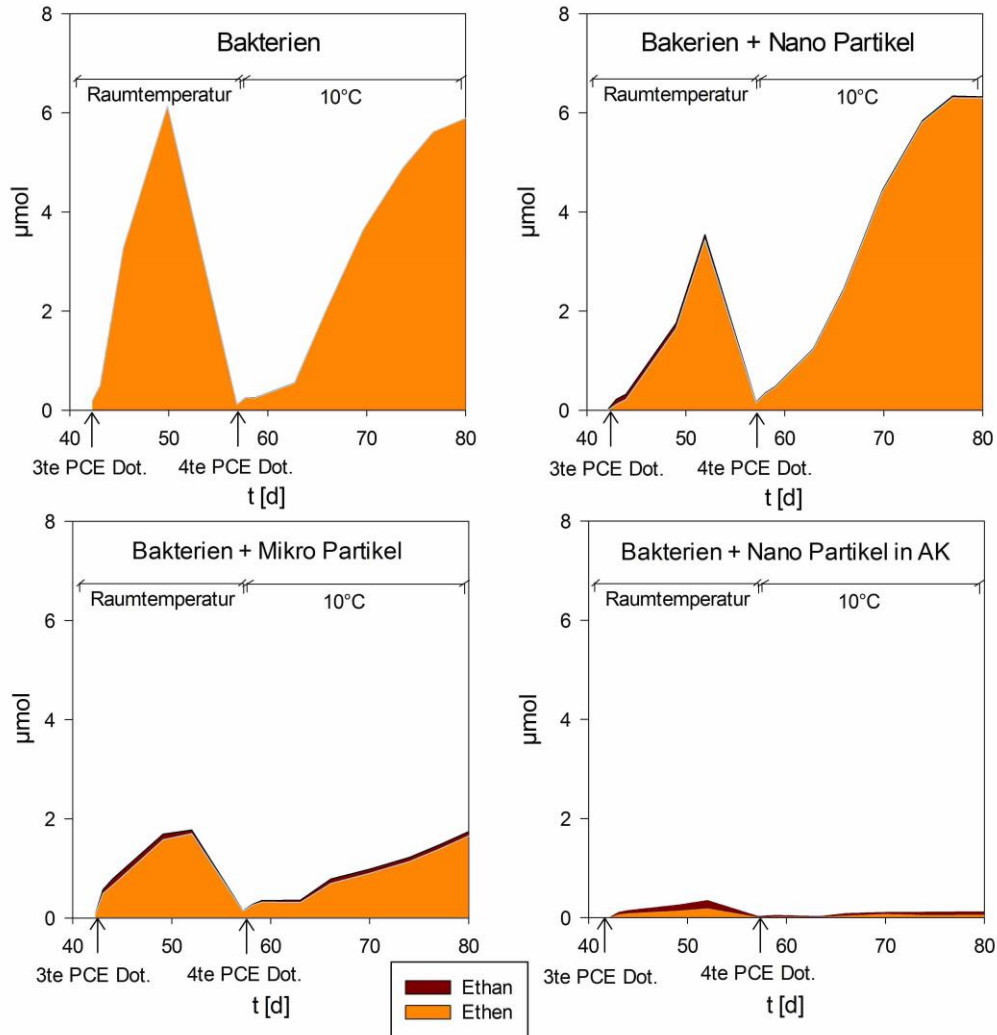


Abbildung 22: Vergleich des rein mikrobiellen Abbaus mit der Kombination mit den verschiedenen Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs<45 (μm) und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle) bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen. Die Entstehung von Ethen und Ethan bei unterschiedlichen Versuchsvarianten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte aus drei Wiederholungen.

Eine Reduktion der Reaktionstemperatur auf 10°C führte dazu, dass die Wasserstoffkonzentration in den Reaktionsgefäßen so gering wurde, dass sie mit den gegebenen analytischen Methoden nicht mehr detektiert werden konnte.

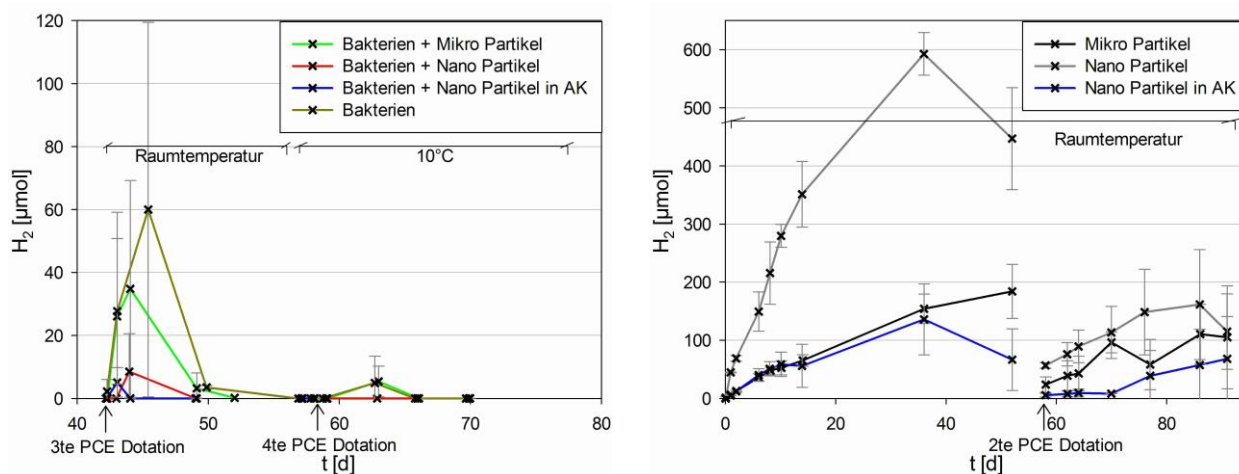


Abbildung 23a). Lediglich an Tag 63 konnte in den Versuchen mit Mikropartikeln sowie in dem Versuch ohne Eisenpartikeln einmal Wasserstoff (~6µmol) detektiert werden. Aufgrund der reduzierten Temperatur wurde weniger Wasserstoff von den Partikeln gebildet. Die Mikrobielle Wasserstoffzehrung war offenbar weniger reduziert so, dass der gebildete Wasserstoff weniger akkumulierte.

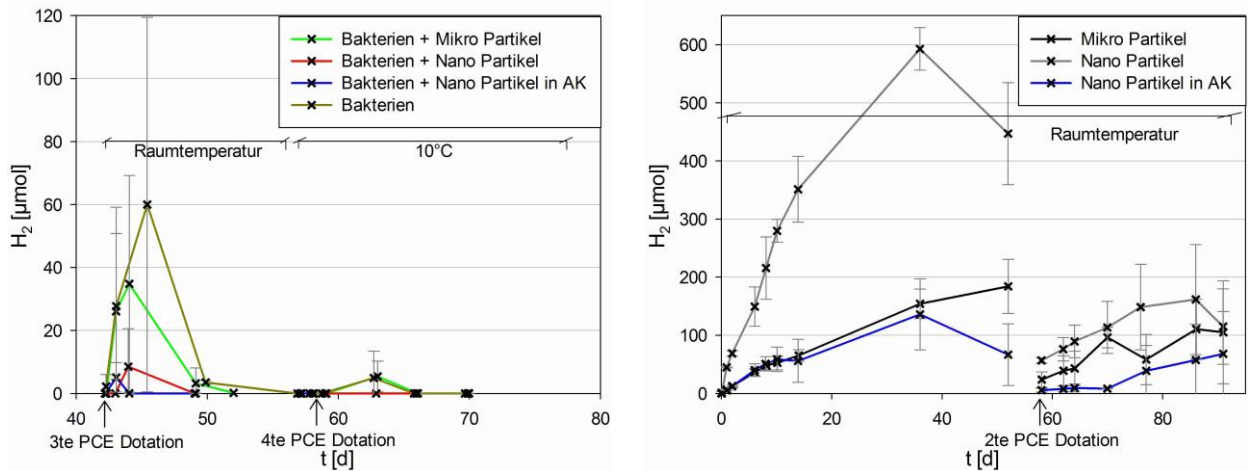


Abbildung 23:

- Wasserstoffbildung in den Reaktionsgefäßen bei der Kombination von Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs <math><45\ \mu\text{m}</math> und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle) mit mikrobiellem Abbau sowie bei einem rein mikrobiellem Abbau. Die Reaktionstemperatur wurde im Zuge der Reaktion auf 10°C reduziert.
- Wasserstoffbildung in den Reaktionsgefäßen bei Einsatz von Eisenpartikeln NanoFer Star (nm), Höganäs <math><45\ \mu\text{m}</math> und CarboIron (nm eingebettet in Aktivkohle) ohne Kombination mit mikrobiellem Abbau. Dieser Graph stellt die gleichen Daten dar wie Abbildung 17. Jedoch wird in diesem Graph auch die Wasserstoffentwicklung nach der zweiten PCE Dotation gezeigt.

Abbau von PCE und Entstehung von Reaktionsprodukten in 130 mL Reaktionsgefäßen. Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Wiederholungen.

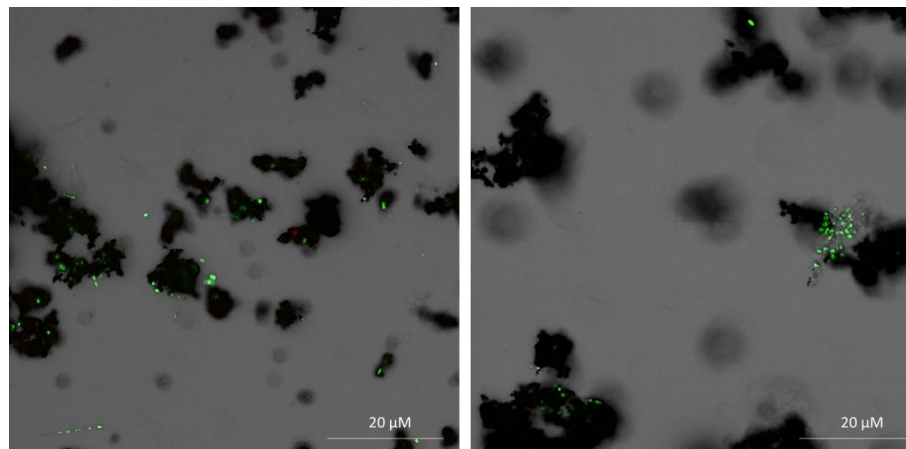
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch in einem Minimalmedium bei 10°C sowohl eine kombinierte Behandlung als auch eine rein mikrobielle Behandlung zu einer Dechlorierung von PCE führte, wobei in beiden Fällen das PCE zu Ethen und Ethan abgebaut wurde. Als Zwischenprodukt entstand allerdings auch bei 10°C Reaktionstemperatur Vinylchlorid, welches weiter zu Ethen und Ethan abgebaut wurde. Bei fortlaufender Versuchsdauer zeigte sich bei 10°C ein hemmender Effekt von Mikropartikeln sowie von Nanopartikeln in Aktivkohle auf den mikrobiellen Abbau von PCE und die Entstehung von Ethen und Ethan. Nanofer Star Partikel zeigten bei 10°C keine hemmende Wirkung auf den mikrobiellen Abbau, anders als bei Raumtemperatur. Neben der Temperaturreduktion kann dieser Effekt auch unter Umständen auf die Alterung der Nanofer Star Partikel zurückzuführen sein. Die zunehmende Oxidation des Partikelkerns sowie die Umwandlung der Oxidhülle könnte eine Verringerung der Partikeltoxizität bewirkt haben. Auf jeden Fall ist davon auszugehen, dass die Nanofer Partikel auch nach 57 Tagen (Beginn der Temperaturreduktion) noch reaktiv waren. Zum einen wurde noch eine Ethanentwicklung gemessen, die ausschließlich aus der abiotischen Reaktion zu erwarten ist. Zum anderen zeigten Versuche nur mit Eisenpartikeln, dass die Nanofer Star Partikeln unter den getesteten Bedingungen auch nach über 80 Tagen noch reaktiv waren (Abbildung 23b).

3.2 Task 1.2 Nachweis der mikrobiellen Aktivität

3.2.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl in der erhaltenen Ausgangskultur wurden zunächst Zellzählungen unter dem Lichtmikroskop mit Zählkammern (Hemocytometer C-Chip Neubauer improved) durchgeführt. Bei Vorversuchen mit *E. coli* konnten gute und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Jedoch erwies sich die Durchführung mit der erhaltenen KB-1 Kultur als schwieriger, aufgrund der kleinen Zellgröße und den Schwefelpartikeln, die sich im Inokulum befinden. Daher wurde versucht die Zellen mittels Syto9/Propidiumiodid zu Färben und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellzahl zu bestimmen. Dadurch sollten die erhaltenen Kulturen untereinander bezüglich ihrer Zelldichte verglichen werden, indem ein Verhältnis von gefärbten Organismen zu ungefärbten Hintergrund erstellt wird.

Es wurden zahlreiche Zellfärbungen mit der KB1-Kultur durchgeführt, allerdings erwies sich auch diese Methode nicht als geeignet um die Zellzahl in den erhaltenen Kulturen zu bestimmen, da die Bakterienzellen zur Agglomeration neigten und somit eine Zählung mit ausreichender Genauigkeit nicht möglich war.



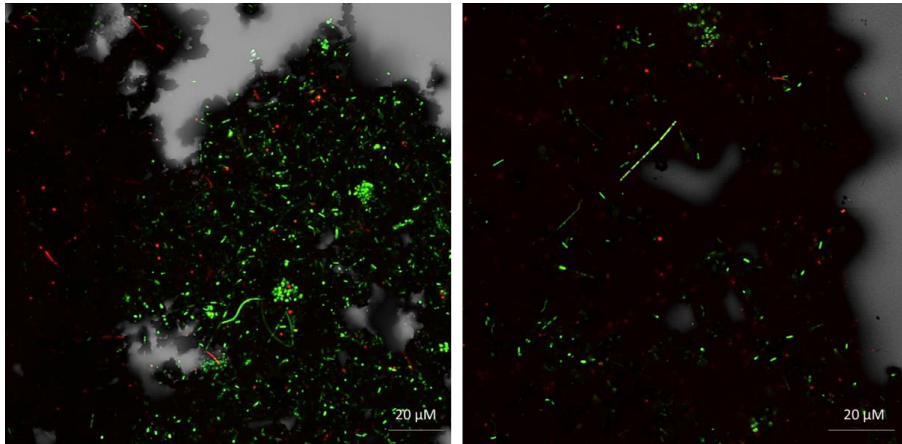


Abbildung 24: Fluoreszenz-Mikroskop-Foto der KB1-Kultur nach Syto9/Popidiumiodid-Färbung (grün: lebende Bakterien/Archea; gelb: tote Bakterien/Archea; rot: Fungi/ Oomyten, schwarz: leblose Partikel z.B.: Schwefelpartikel)

Auf Grund dieser Untersuchungen konnte allerdings geschlossen werden, dass der Kontakt mit Sauerstoff die Bakterien nicht sofort tötet, da der Großteil der gefärbten Organismen auf Grund der Grün-Färbung zu den lebenden Bakterien und Archea zu zählen waren und nur wenige Bakterien bzw. Archea (gelb) als tot identifiziert wurden. Allerdings sind mit dieser Methode lebenden Zellen nicht von solchen zu unterscheiden, bei denen es zu einer Ruhestarre kam, von der sich die Bakterien unter Umständen nicht erholen können. Es konnten auch einige Pilze oder Oomyceten (rot) erkannt werden, wobei Bakterien/Archea stark überwogen. Man kann auch erkennen, dass die Bakterien sich vorwiegend in der Nähe oder auf den Schwefelpartikeln im Inokulum befanden. Die Kultur bestand aus einem Konsortium unterschiedlicher Bakterien, es wurden Kokken und Stäbchen in unterschiedlichen Größen gefunden.

3.2.2 FISH

Mittels FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung) werden aktive Mikroorganismen mikroskopisch detektiert. Da ausschließlich aktive Organismen detektiert werden können, kann hierbei eine Aussage über die Aktivität verschiedener Mikroorganismen bei verschiedenen Versuchsansätzen getroffen werden. Mit passenden Sonden ist es möglich mit FISH die Aktivität von *Dehalococcoides* nachzuweisen. Neben der Aktivität ist es auch möglich die räumliche Verteilung verschiedener Mikroorganismen zu detektieren. Hierdurch ist es möglich Interaktionen zwischen verschiedenen Mikroorganismen zu beobachten.

Erste Vorversuche haben gezeigt, dass FISH Proben nicht ausgewertet werden konnten, wenn der in den Batchversuchen eingesetzte Sand ein Bestandteil der Probe war. Die Sandpartikel waren zu groß und störten daher die mikroskopische Detektion. Es werden daher Proben nur mit wässriger Lösung, aber ohne Sand analysiert.

Die FISH-Untersuchungen zeigten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Varianten mit und ohne Zugabe von Eisensuspension (Abbildung 25).

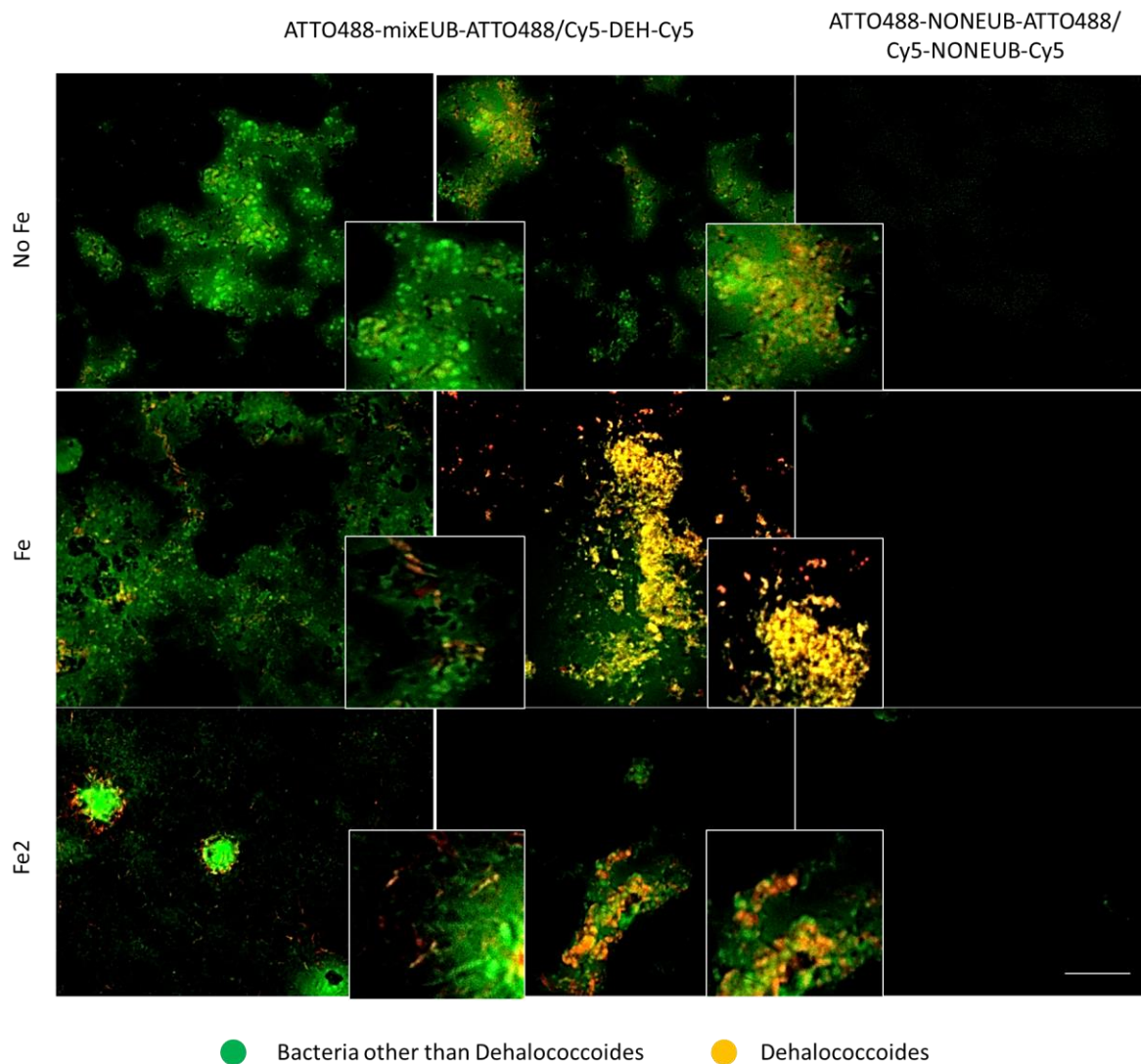


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer FISH-Präparation einer Suspension ohne Eisensuspension (NoFe) und von zwei gleichen Ansätzen mit Zugabe von Eisensuspension (Fe und Fe₂). Die Fotos zeigen Bakterien mit grüner Fluoreszenz (mixEUB) und *Dehalococcoides* mit gelb/oranger Fluoreszenz (Spezifische Sonde: DEH). Die drei Bilder in der rechten Spalte zeigen die Negativkontrolle. Skalierung die großen Quadrate: 20µm; die Ausschnitte (kleine Quadrate) sind 5x vergrößert.

In beiden Varianten waren die Zellen mehr oder weniger agglomeriert, wobei sich dazwischen mehr oder weniger große Bereiche befanden, die praktisch zellfrei waren. In einem Bereich eines der Präparate mit Eisensuspension konnte allerdings eine stärkere Agglomeration von Bakterien (grüne kreisförmige Strukturen), die von *Dehalococcoides* umgeben waren (gelb/oranger Rand) festgestellt werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein Eisenpartikel (agglomeriertes Nano-eisen) auf dem sich die Bakterienzellen angesiedelt haben und gemeinsam mit *Dehalococcoides* ein Konsortium bilden. Bei dieser

Vermutung handelt es sich allerdings nur um eine Spekulation. Eine vertiefende Verfolgung dieser Fragestellung war im Rahmen dieses Projektes nicht möglich, da nur orientierende FISH-Analysen geplant waren.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Aktivität

3.2.3.1 DNA Sequenzierung

Mit Hilfe von Extraktion und Sequenzierung von mikrobieller 16S ribosomaler RNA aus einer Probe kann auf das Vorhandensein bzw. Fehlen bestimmter Gruppen und Stämme von Mikroorganismen geschlossen werden. Mit Hilfe von geeigneten Primern können darüber hinaus in einer Probe spezifischen Genen, wie jener für reduktive Dehalogenasen detektiert werden.

Es wurden eine Sequenzierung und eine bioinformatische Analyse der 16S ribosomalen Ribonucleinsäure (16S rRNA) und zweier Gene für die reduktive Dehalogenase (*bvcA* und *vcrA*) mit den verwendeten *Dehalococcoides* Stämmen durchgeführt.

Basierend auf einer erweiterten Literaturrecherche wurden folgenden Primer für die Sequenzanalyse ausgewählt:

1. universelle bakterielle 16S rRNA Primer 8f und 1520r (Edwards et al., 1989; Massol-Deya et al., 1995)
2. *Dehalococcoides*-spezifische 16S rRNA Primer Dhc1f und Dhc264r (Perez de Mora et al., 2014)
3. universelle reduktive Dehalogenase Primer RRF2 und B1R (Krajmalnik-Brown et al., 2004)
4. *bvcA* (reduktives Dehalogenase Gen; baut PCE und TCE ab) Primer *bvcAF* und *bvcAR* (Holmes et al., 2006; Krajmalnik-Brown et al., 2004)
5. *vcrA* (reduktives Dehalogenase Gen; baut TCE ab) Primer (Holmes et al., 2006; Müller et al., 2004)

Die ausgewählten Primer ermöglichen einen hierarchischen Analyseansatz. Die universellen 16S Primer (1) werden eingesetzt, um zu überprüfen, ob bakterielle DNA in der Probe vorhanden ist bzw. ob die DNA Probe frei von PCR Inhibitoren ist. Des Weiteren erlaubt die Sequenzanalyse von diesem Amplikon den Einblick in die gesamte mikrobielle Gesellschaft der Proben. Die *Dehalococcoides*-spezifischen Primer (2) werden verwendet, um zu überprüfen, ob die *Dehalococcoides* Stämme in der Probe vorhanden sind. Mit universellen reduktive Dehalogenase Primern (3) werden die reduktive Dehalogenase Gene nachgewiesen, die dann mit den *bvcA* und *vcrA* Primern (4 und 5) weiter charakterisiert werden können.

Es wurden insgesamt 4 Proben untersucht (UFZ_A, UFZ_B, Commercial culture 1 und Commercial culture 2). Von jeder Probe standen insgesamt 5 ml zur Verfügung. Die Proben wurden in vier Aliquote à 1,25 ml

aufgeteilt, bakterielle Zellen mittels Zentrifugation (5' @ 13000 rpm) gewonnen und für weitere Analysen auf -20°C gelagert.

Für die DNA Extraktion wurde vorerst FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) verwendet. Jedoch war die Ausbeute (aufgrund von geringen Mengen an Ausgangsmaterial) für die weitere Analytik nicht genügend. Als Alternativansatz wurde die DNA Extraktion mittels InstaGene™ Matrix (Biorad) versucht. Diese Methode erwies sich als angemessen für das Probenmaterial und somit konnten die gewonnenen DNA Proben für die weitere Analytik (PCR Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung) verwendet werden.

16S rRNA Ergebnisse (1)

Die PCR Amplifikation funktionierte gut für die Proben UFZ_A, Commercial culture 1 und Commercial culture 2 (Abbildung 26). Die UFZ_B Probe ergab ein relativ schwaches Amplikon. Alle Amplikons wurden mittels StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene) kloniert. Nach dem Klonieren wurden die Inserts von einzelnen Klonen mittels M13 Primern amplifiziert und zum Sequenzieren an die Firma LGC (Deutschland) geschickt. Für die Sequenzierung wurden die Primer T3 und T7 verwendet. Die Sequenzen wurden im Sequencher™ v5.3 (Gene Codes Corporation) editiert und zusammengesetzt (basierend auf 99% Sequenzhomologie). Anschließend wurden die Sequenzen mittels RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) phylogenetisch zugeordnet und mittels NCBI blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert. Für jede Probe wurden 24 Klone sequenziert, nur 2 Klone davon konnten nicht analysiert werden (Mischsequenzen). Das Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

Die Proben UFZ_A und UFZ_B zeigten relativ große Ähnlichkeiten. Die meisten Sequenzen wurden zur Gattung der *Dehalococcoides* zugeordnet (19/24 (79%) in UFZ_A und 12/24 (50%) in UFZ_B Probe). Des Weiteren wurden in beiden Proben Sequenzen, die zur Gattung der *Soehngenia* gehören, identifiziert (2/24 (8%) in UFZ_A und 5/24 (21%) in UFZ_B Probe). Die UFZ_B Probe wies eine etwas größere Diversität auf – es wurden zusätzlich Gattungen der *Aminobacterium* (2/24 (8%)), *Syntrophomonas* (1/24 (4%)) und *Candidatus Cloacamonas* (1/24 (4%)) identifiziert. Dieses Ergebnis basiert jedoch nur auf 24 analysierten Sequenzen und ist somit nicht allzu robust. Wenige Sequenzen (2/24 (8%) in UFZ_A und 3/24 (12%) in UFZ_B Probe) konnten nicht genau identifiziert werden; das RDP Ergebnis zeigte unclassified *Firmicutes* bzw. unclassified Bacteria.

Probe Commercial culture 2 zeigte eine größere Diversität als die UFZ Proben. Es wurde nur eine (1/24 (4%)) zur Gattung *Dehalococcoides* zugeordnete Sequenz gefunden. Die meisten charakterisierten Sequenzen (6/24 (25%)) gehörten zur Gattung *Sedimentibacter*. Dabei konnten folgende Gattungen identifiziert werden: *Enterobacter* (3/24 (12%)), *Clostridium sensu stricto* (2/24 (8%)), *Clostridium IX* (1/24 (4%)) und *Acidivorax* (1/24 (4%)). Einige Sequenzen (10/24 (42%)) konnten nicht genau identifiziert

werden; das RDP Ergebnis zeigte hier unclassified *Acidaminococcaceae*, unclassified "*Bacteroidales*" und unclassified *Clostridiales*.

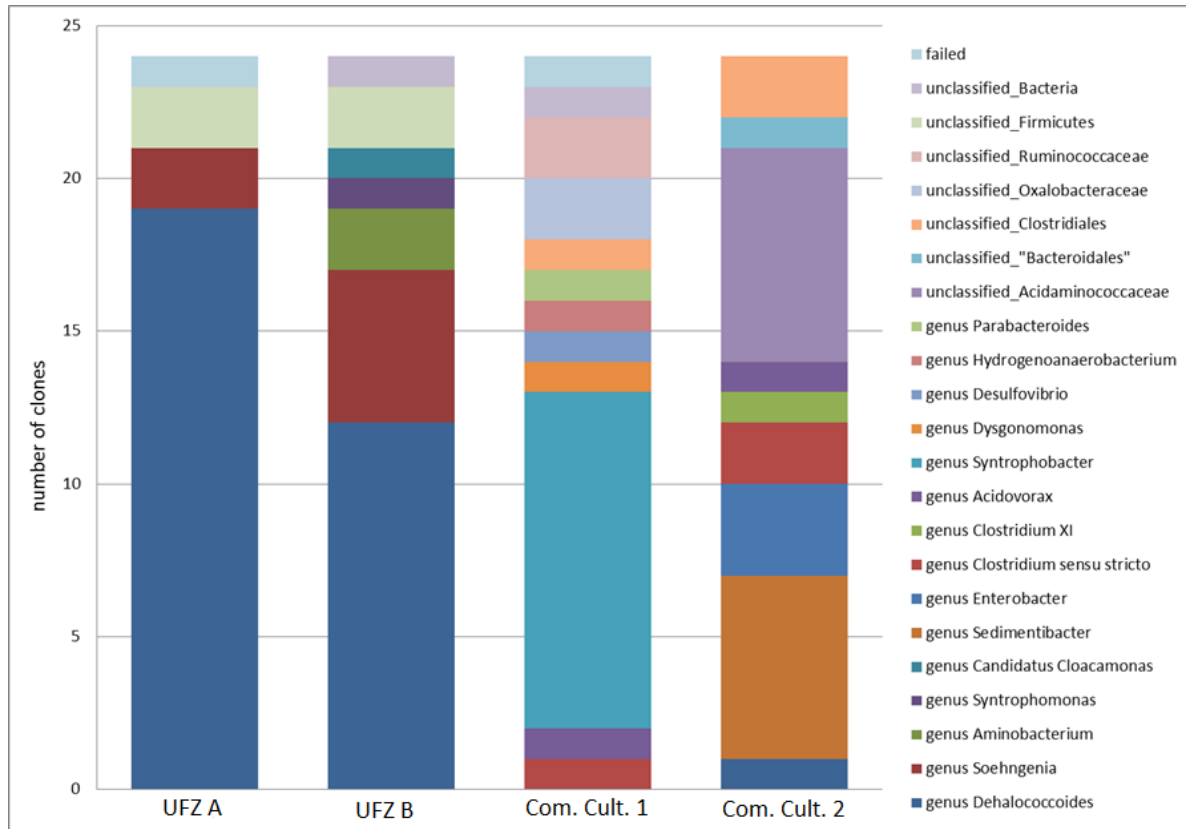


Abbildung 26: Identifikation von 16S rRNA Amplikons (die phylogenetische Zuordnung mittels RDP Classifier, Datensatz: „16S rRNA training set 14“, 95% Konfidenz-Grenzwert) der Proben UFZ A, UFZ B, Commercial Culture Batch 1 und Commercial Culture Batch 2.

In der Probe Commercial culture Batch 1 konnten keine zur Gattung *Dehalococcoides* zugeordneten Sequenzen gefunden werden. Die Gattung *Syntrophobacter* wurde als dominante Gattung identifiziert (11/24 (46%)). Andere identifizierte Gattungen (mit jeweils einer vorhandenen Sequenz, 1/24 (4%)) umfassten: *Clostridium sensu stricto*, *Acidovorax*, *Dysgonomonas*, *Desulfovibrio*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Parabacteroides*. Auch in dieser Probe konnten einige Sequenzen (6/24 (25%)) nicht genau identifiziert werden; das RDP Ergebnis zeigte unclassified *Clostridiales*, unclassified *Oxalobacteraceae*, unclassified *Ruminococcaceae*, unclassified *Bacteria*.

Die relativ hohe Anzahl an nicht genau identifizierbaren bzw. neuen Sequenzen (21/96 (22%)) bestätigt die Notwendigkeit, wie im Projektantrag bereits erwähnt, der Erstellung einer Referenzdatenbank mit einer Sequenzinformation der eingesetzten Stämme.

Insgesamt passt das Fehlen von *Dehalococcoides* spp. in den beiden Commercial Culture Proben sehr gut zum fehlenden PCE-Abbau, der mit diesen Kulturen gefunden wurde. Der fehlende Abbau von PCE in den UFZ-Proben konnte dagegen nicht auf das Fehlen von *Dehalococcoides* spp. zurückgeführt werden.

Dehalococcoides-spezifische 16S rRNA Ergebnisse (2)

Die PCR Amplifikation war positiv für alle vier Proben, was das Vorhandensein der Gattung *Dehalococcoides* bestätigt (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dies könnte für die Probe Commercial Culture Batch 1, widersprüchlich zu den Ergebnissen von universellen 16S rRNA Sequenzierung erscheinen; es sollte aber bedacht werden, dass die Ergebnisse von der universellen 16S rRNA Sequenzierung keinesfalls umfassend sind und daher anzunehmen ist, dass die Gattung *Dehalococcoides* auch in dieser Probe vorhanden ist, jedoch in relativ geringer Abundanz.

Pro Probe wurden wiederum 24 Klone sequenziert. In diesem Fall (Amplikongröße < 300 bp) wurde jedoch nur mit dem T3 Primer sequenziert. Die Sequenzen wurden im BioEdit v7.2.1 (Hall, 1999) editiert und aligned und anschließend mittels RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) phylogenetisch zugeordnet und mittels NCBI blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analysiert.

Aufgrund der kurzen Sequenzlänge (222 bp ohne Primersequenz) ist in diesem Fall die Zuordnung nur auf Gattungsebene möglich. Alle Sequenzen wurden zur Gattung *Dehalococcoides* zugeordnet. In den Proben UFZ_A und UFZ_B wurde nur ein Sequenztyp (mit maximum 2 Mismatches) gefunden. In den Proben Commercial Culture Batch 2 und Commercial Culture Batch 1 wurden zwei Sequenztypen gefunden – eine stimmte mit Sequenztyp aus Proben UFZ_A und UFZ_B überein und die zweite wies ein deutlich unterschiedliches Motiv auf (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).



Abbildung 27: Vergleich von repräsentativen *Dehalococcoides*-spezifische 16S rRNA Sequenzen (MultAlign v5.4.1; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). DH16S_A_1 repräsentative Sequenz aus Probe UFZ_A, DH16S_B_3 repräsentative Sequenz aus Probe UFZ_B, DH16S_C_1 und DH16S_C_11 repräsentative Sequenzen aus Probe Commercial Culture Batch 2, DH16S_D_1 und DH16S_D_12 repräsentative Sequenzen aus Probe Commercial Culture Batch 1. Die Region, in der sich zwei identifizierte Sequenztypen unterscheiden, ist mit einem schwarzen Rechteck markiert

Reduktive Dehalogenase Ergebnisse (3 – 5)

Die PCR Amplifikation mit den universellen Primern RRF2 und B1R (3) funktionierte gut für Proben wie UFZ_A und Commercial Culture Batch 2. Für die Proben UFZ_B und Commercial Culture Batch 1 wurden allerdings ganz schwache Amplikons beobachtet.

Pro Probe wurden 12 Klone zum Sequenzieren (mit T3 und T7 Primern) zu LGC Genomics geschickt. Die Sequenzen wurden dann im Sequencher (Gene Codes Corporation) editiert und zusammengesetzt und mittels NCBI blast analysiert. Die Ergebnisse (jeweils die ersten fünf) sind im Anhang (Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 25 und

Tabelle 26) zusammengefasst. Die meisten Sequenzen konnten dem Stamm *Dehalococcoides mccartyi* zugeordnet werden (Identität 99%). Dieser Stamm ist zu eine vollständigen Dechlorierung von PCE bis zu Ethen fähig (Schneidewind et al. 2014).

Bei der PCR Amplifikation von den *bvcA* und *vcrA* Genen (4, 5) konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

3.2.3.2 Entwicklung eines passenden RNA Isolierungsprotokolls

Es wurden folgende Produkte ausgetestet:

- FastRNA™ Pro Soil-Direct Kit (MP Biomedicals, LLC)
- SPLIT RNA Extraction Kit (Lexogen)
- RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (MoBio)
- RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)

FastRNA™ Pro Soil-Direct Kit wurde ausgewählt, weil damit erfahrungsgemäß sehr gute Ergebnisse erzielt werden. SPLIT RNA Extraction Kit ist ein neues Produkt, das mitgetestet wurde, weil in diesem Fall (laut Herstellerangaben) DNase Behandlung nicht notwendig ist und somit weniger RNA Abbau zu erwarten ist.

Nachdem diese Kits keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbrachten (geringe RNA Ausbeute, keine positive RT-PCR Ergebnisse), wurden RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit und RNeasy® Mini Kit als Alternativen getestet.

E. coli DH5 α (Gram-negatives Bakterium) und *B. subtilis* DSM 1091 (Gram-positives Bakterium) wurden als Kontrollen verwendet. Für die RNA Extraktion wurden beide Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (Zentrifugation 5' @ 13000 rpm und 4°C), die Pellets im flüssigen N₂ gefroren und auf -80°C gelagert.

Es wurden verschiedene *Dehalococcoides* spp. Produkte getestet (NTP, Commercial Culture und SiREM). Für alle Produkte wurde parallel (durch PCE-Konzentrationsmessung) die Aktivität bestimmt und es wurde festgestellt, dass das Produkt SiREM (<http://siremlab.com/kb-1-kb-1-plus/>) die beste Aktivität zeigte. Dementsprechend wurde dann der Fokus auf dieses Produkt gelegt. Die SiREM Proben wurden mehrmals entnommen (immer nachdem eine gute Aktivität bestätigt wurde). Die Proben wurden unter anoxischen Bedingungen (Glovebox) entnommen, geerntet mittels Zentrifugation (10^6 @ 10000 rpm und 4°C), die Pellets im flüssigen N₂ gefroren und auf -80°C gelagert. Der Überblick über allen getesteten Proben ist in der **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zusammengefasst.

Tabelle 7: Überblick über entnommene SiREM Proben

| Biano | Samples ID | Samples Beschreibung | Sampling Date | Volumen | RNA Protect |
|-------|------------|--|---------------|-----------|-------------|
| | B1 | Sirem (Sampling hat Katrin gemacht) | 08.03.2016 | 25 ml | nein |
| | B2 | Sirem (Sampling hat Katrin gemacht) | 08.03.2016 | 25 ml | nein |
| | B4 | Sirem OHNE (Laktan ohen H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja |
| | B5 | Sirem OHNE (Laktan ohen H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja |
| | B6 | Sirem Ideal (Laktan mit H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja |
| | B7 + B8 | Sirem Ideal (Laktan mit H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 +10 ml | ja |
| | B9 | Sirem Ideal (Laktan mit H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja |
| | B10 | Sirem Ohne (ohen H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja |
| | B11 | Sirem Pool (Pool von allen übrigen Proben B6-B9) | 03.05.2016 | 10 ml | nein |
| | B12 | Sirem Pool (Pool von allen übrigen Proben B6-B9) | 03.05.2016 | 20 ml | nein |
| | B14 | Sirem Melasse Vial 1_1 | 07.06.2016 | 10 ml | ja |
| | B15 | Sirem Melasse Vial 1_2 | 07.06.2016 | 10 ml | ja |
| | B16 | Sirem Melasse Vial 1_3 | 07.06.2016 | 10 ml | ja |
| | B17 | Sirem Melasse Vial 1_4 | 07.06.2016 | 10 ml | ja |
| | B19 | Sirem ohne Fe | 01.09.2016 | 10 ml | ja |
| | B20 | Sirem + Höganäs | 01.09.2016 | 10 ml | ja |
| | B21 | Sirem + Nanolron | 01.09.2016 | 10 ml | ja |
| | B22 | Sirem+ CarbonIron | 01.09.2016 | 10 ml | ja |

In den ersten Versuchen wurden parallel FastRNA™ Pro Soil-Direct Kit und SPLIT RNA Extraction Kit getestet. Diese Kits lieferten eine schlechte RNA Ausbeute (geringe Konzentration, Abbau). Dementsprechend mussten die Alternativen getestet werden (RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit und RNeasy® Mini Kit). Wie aus Abbildung 28 ersichtlich ist, lieferte RNeasy® Mini Kit die besten Ergebnisse und wurde für die weiteren Versuche ausgewählt.

Zusätzlich wurde auch das RNAprotect Cell Reagent (QIAGEN) getestet. Dieses soll die RNA weiter stabilisieren was in Hinblick auf die Lysimeter-Versuche wichtig war, weil in diesem Fall die Proben einen längeren Transportweg hatten.

Prinzipiell war die RNA Ausbeute bei allen Proben relativ gering (Tabelle 8) und die RNA war im Vergleich zur RNA, die aus Kontrollproben isoliert wurde, von schlechterer Qualität (keine eindeutige rRNA Banden, teilweise abgebaute RNA (Abbildung 29)).

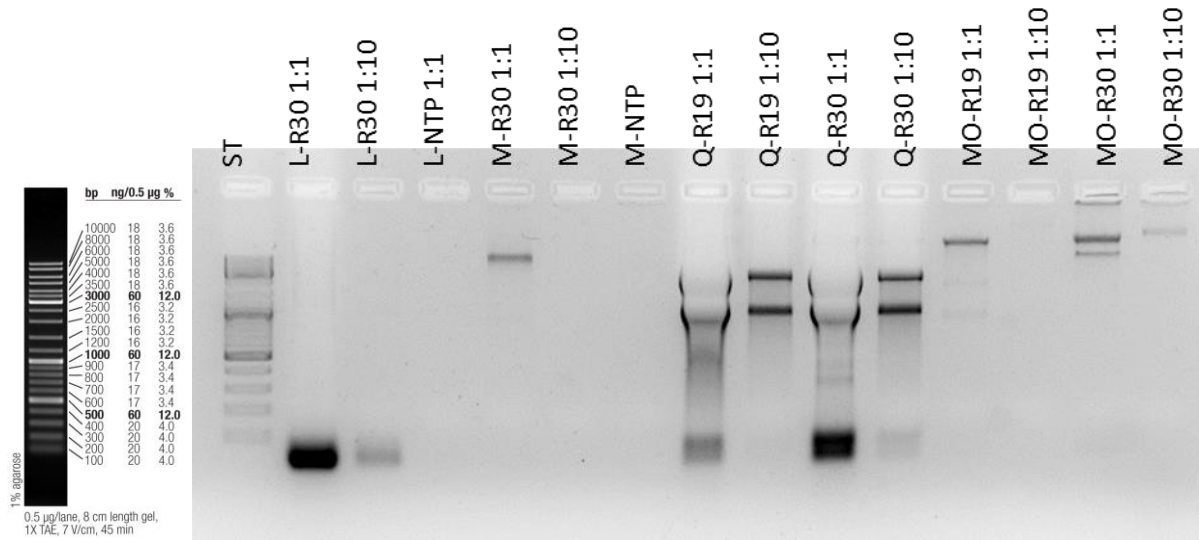


Abbildung 28: Vergleich von verschiedenen RNA Isolationsmethoden (20 µl von jeder Probe).

ST - O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)
 L - SPLIT RNA Extraction Kit (Lexogen)
 M - FastRNA™ Pro Soil-Direct Kit (MP Biomedicals, LLC)
 Q - RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)
 MO - RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (MoBio)

R30 - *E. coli* DH5α
 R19 - *B. subtilis* DSM 1091
 1:1 - unverdünnte RNA Probe
 1:10 - verdünnte RNA Probe

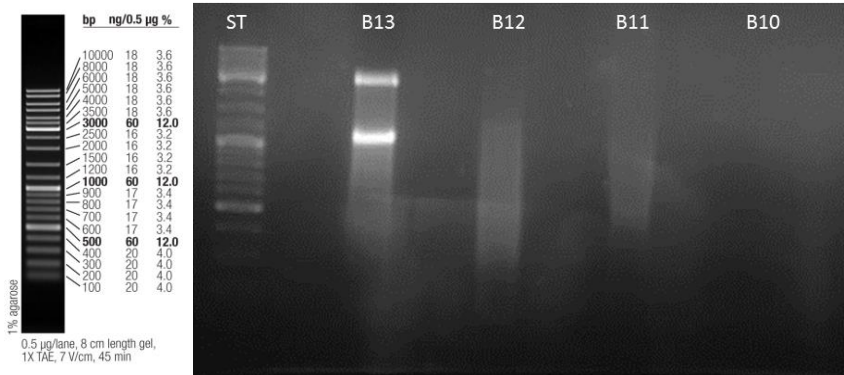


Abbildung 29: Beispiel von RNA Isolationseffizienz (20 µl von Probe B10 und 10 µl von Proben B11 – B13). ST: O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific), B13: *E. coli* DH5α, B10 - B12: SiREM Proben

Des Weiteren wurden cDNA Synthese und RT-PCR etabliert. Um sicher zu stellen, dass die etablierte PCR Systeme tatsächlich funktionieren wurde aus zwei SiREM Proben (BD1 und BD2) DNA isoliert und mit allen etablierten PCR Systemen getestet:

1. universelle bakterielle 16S rRNA Primer 8f und 1520r (Edwards *et al.*, 1989; Massol-Deya *et al.*, 1995)
2. *Dehalococcoides*-spezifische 16S rRNA (DH 16S rRNA) Primer Dhc1f und Dhc264r (Perez de Mora *et al.*, 2014)
3. universelle reduktive Dehalogenase (RDH) Primer RRF2 und B1R (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004)
4. *bvcA* (reduktives Dehalogenase Gen; baut PCE und TCE ab) Primer *bvcAF* und *bvcAR* (Holmes *et al.*, 2006; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004)
5. *vcrA* (reduktives Dehalogenase Gen; baut TCE ab) Primer Holmes *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2004)

Alle getesteten PCR Systeme lieferten mit SiREM DNA Template ein positives Ergebnis (Abbildung 30).

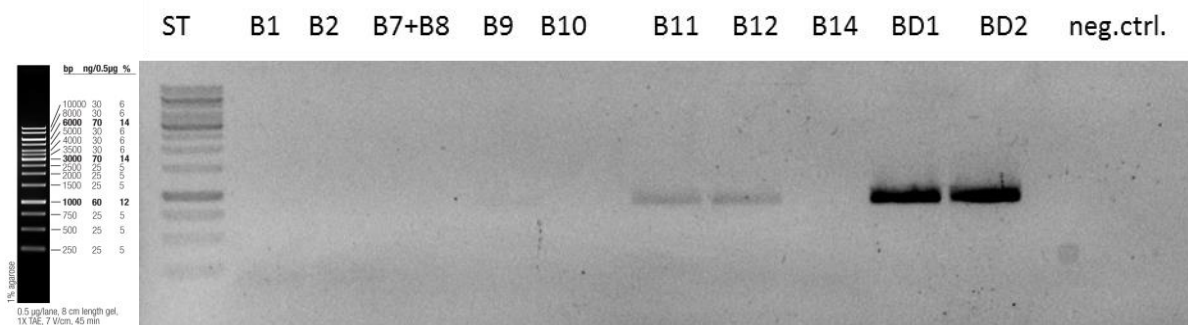


Abbildung 30: *bvcA* RT-PCR and PCR Ergebnis (10 µl von jeder Probe). ST - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). BD1 und BD2: PCR von SiREM gDNA Template; andere Proben: RT-PCR von SiREM cDNA Template

Die RNA Proben wurden zuerst mit universellen 16S rRNA Gen PCR getestet um eine DNA Kontamination auszuschließen. In allen Fällen konnte direkt aus RNA Probe eine PCR Amplifikation erzielt werden was auf eine DNA Kontamination hinweist. Dementsprechend wurde die RNA-Probe mit RNase-free DNaseI (Thermo Scientific) laut Herstellerprotokoll behandelt. Nach der DNaseI Behandlung blieb die 16S rRNA Gen PCR Amplifikation negativ was eine DNA-freie RNA Probe bestätigte.

Anschließend wurde aus den DNA-freien RNA Proben cDNA mit iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad) laut Herstellerprotokoll synthetisiert. Die ausgewählten Proben wurden mittels Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 31). Diese Analyse zeigte, dass die erhaltene cDNA eine durchschnittliche Größe von < 1kb hatte.

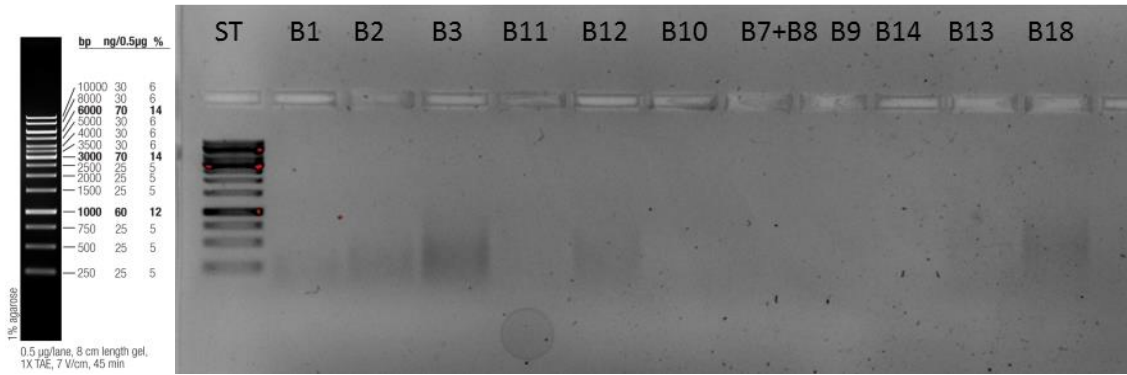


Abbildung 31: cDNA von ausgewählten Proben (2 µl). ST: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

Die cDNA Proben wurden dann mit ausgewählten PCR Systemen getestet. Die universelle bakterielle 16S rRNA RT-PCR (Primer 8f und 1520r) war ursprünglich negativ. Dies könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, dass die cDNA Fragmente nicht die notwendige Länge hatten um ein vollständiges Template für diese PCR Amplifikation zu bieten. Dementsprechend wurde die Amplifikation von einem kürzeren Fragment (Primer 8f und 518r (Muyzer et al., 1993)) versucht und diese war positiv (Abbildung 32)

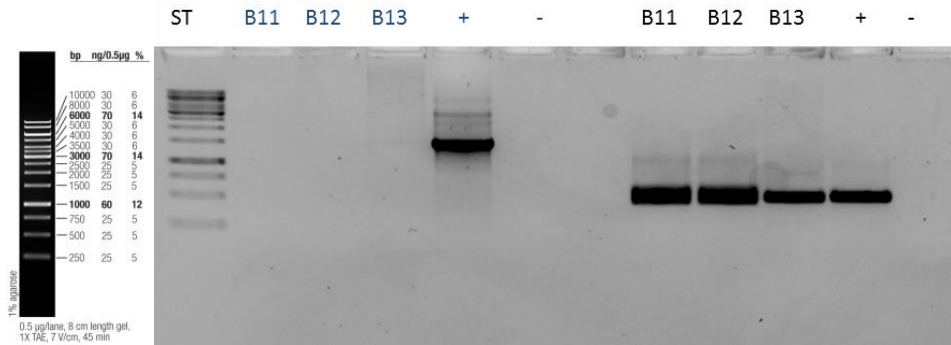


Abbildung 32: 16S rRNA RT-PCR mit Primerpair 8f/1520r links und 8f/518r rechts (7 µl). ST: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

Die gewonnen Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Für alle Proben konnten *Dehalococcoides*-spezifische 16S rRNA Fragmente (DH 16S rRNA) mittels RT-PCR amplifiziert werden was das Vorhandensein von *Dehalococcoides* spp. in den untersuchten Proben bestätigt. Funktionelle Gene konnten nur in zwei Proben nachgewiesen werden (B11 und B12, *bvcA* positiv). Diese prinzipiell negativen Ergebnisse für reduktive Dehalogenase können entweder dadurch erklärt werden, dass die Genexpression relativ gering war und die vorhandene mRNA unter dem Detektionslimit der PCR lag, oder die PCR-Fragmente (*bvcA* Gen 839 bp, *vcrA* Gen 1482 bp, universelle reduktive Dehalogenase (RDH) 1500 - 1700 bp) zu groß sind um aus cDNA amplifiziert zu werden (analog zu 16S rRNA Gen Problematik).

Tabelle 8: Überblick über Ergebnisse von SiREM Proben

| Biano Samples ID | Samples Beschreibung | Sampling Date | Volumen | RNA Protect | RNA Isolierung | 260/280 | 260/230 | ng/µl | cDNA | 16s PCR | 16s DH PCR | RDH PCR | vcrA PCR | bvcA PCR |
|------------------|--|---------------|-----------|-------------|-----------------|--------------------------------------|---------|-------|------|---------|------------|---------|----------|-------------|
| B1 | Sirem (Sampling hat Katrin gemacht) | 08.03.2016 | 25 ml | nein | ja (22.03.16) | 2,01 | 1,64 | 150,8 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B2 | Sirem (Sampling hat Katrin gemacht) | 08.03.2016 | 25 ml | nein | ja (22.03.16) | 1,99 | 1,67 | 204,1 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B3 | CTRL R30-4 (E.coli, von Katrin) | 24.11.2015 | 2 ml | nein | ja (22.03.16) | 2,05 | 1,85 | 662,5 | ja | pos. | neg. | neg. | neg. | neg. |
| B4 | Sirem OHNE (Laktan ohen H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja | nein | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B5 | Sirem OHNE (Laktan ohen H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja | nein | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B6 | Sirem Ideal (Laktan mit H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja | nein | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B7 + B8 | Sirem Ideal (Laktan mit H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 +10 ml | ja | ja (14.06.2016) | 1,43 | 0,53 | 7,9 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B9 | Sirem Ideal (Laktan mit H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja | ja (14.06.2016) | 1,08 | 0,24 | 3,0 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B10 | Sirem Ohne (ohen H2 Zugabe) | 03.05.2016 | 10 ml | ja | ja (13.05.16) | 1,49 | 0,46 | 11,1 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B11 | Sirem Pool (Pool von allen übrigen Proben B6-B9) | 03.05.2016 | 10 ml | nein | ja (13.05.16) | 1,96 | 0,71 | 36,0 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | leicht pos. |
| B12 | Sirem Pool (Pool von allen übrigen Proben B6-B9) | 03.05.2016 | 20 ml | nein | ja (13.05.16) | 1,95 | 0,28 | 76,3 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | leicht pos. |
| B13 | CTRL (E.coli, von Katrin) | 24.11.2015 | 2 ml | nein | ja (13.05.16) | 2,06 | 0,87 | 150,5 | ja | pos. | neg. | neg. | neg. | neg. |
| B14 | Sirem Melasse Vial 1_1 | 07.06.2016 | 10 ml | ja | ja (14.06.2016) | 1,72 | 0,75 | 10,7 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B15 | Sirem Melasse Vial 1_2 | 07.06.2016 | 10 ml | ja | nein | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B16 | Sirem Melasse Vial 1_3 | 07.06.2016 | 10 ml | ja | nein | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B17 | Sirem Melasse Vial 1_4 | 07.06.2016 | 10 ml | ja | nein | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| B18 | CTRL R30-5 (E.coli, von Katrin) | 24.11.2015 | 2 ml | nein | ja (14.06.2016) | 2,12 | 1,03 | 127,2 | ja | pos. | neg. | neg. | neg. | neg. |
| B19 | Sirem ohne Fe | 01.09.2016 | 10 ml | ja | ja (02.09.16) | 1,65 | 0,06 | 1,2 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B20 | Sirem + Höganas | 01.09.2016 | 10 ml | ja | ja (02.09.16) | nicht messbar, Sarnpel dunkel färbig | | | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B21 | Sirem + Nanolron | 01.09.2016 | 10 ml | ja | ja (02.09.16) | 1,66 | 0,43 | 6,0 | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B22 | Sirem+ Carbonlron | 01.09.2016 | 10 ml | ja | ja (02.09.16) | nicht messbar, Sarnpel dunkel färbig | | | ja | pos. | pos. | neg. | neg. | neg. |
| B23 | CTRL R30 (E.coli, von Katrin) | 01.09.2016 | 2 ml | nein | ja (02.09.16) | 2,11 | 0,82 | 239,7 | ja | pos. | neg. | neg. | neg. | neg. |

3.2.3.3 Mikrobielle Charakterisierung der SiREM Proben

Die Analyse des universellen bakteriellen 16S rRNA Gens (Primer 8f und 1520r; 23 analysierte Klone) zeigte, dass das Produkt SiREM von den Genera *Geobacter* und *Dehalococcoides* dominiert wird (Abbildung 33). Von 24 *Dehalococcoides*-spezifischen 16S rRNA (Primer Dhc1f und Dhc264r) Amplikons, waren 15 zu 100% identisch. Die restlichen Amplikons wiesen nur Punktmutationen auf (Abbildung 34). Da es sich aber in diesem Fall um ein kurzes Fragment handelte (222 bp ohne Primersequenz) konnten hier keine Aussagen auf Speziesebene getroffen werden.

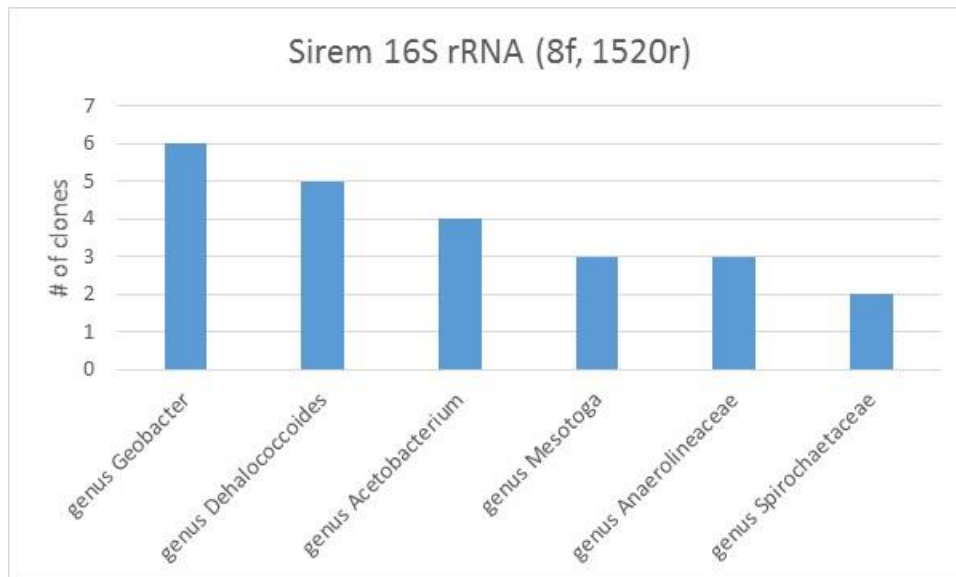


Abbildung 33: Identifikation von 16S rRNA Amplikons (die phylogenetische Zuordnung mittels RDP Classifier, Datensatz: „16S rRNA training set 14“, 95% Konfidenz-Grenzwert) der Probe SiREM

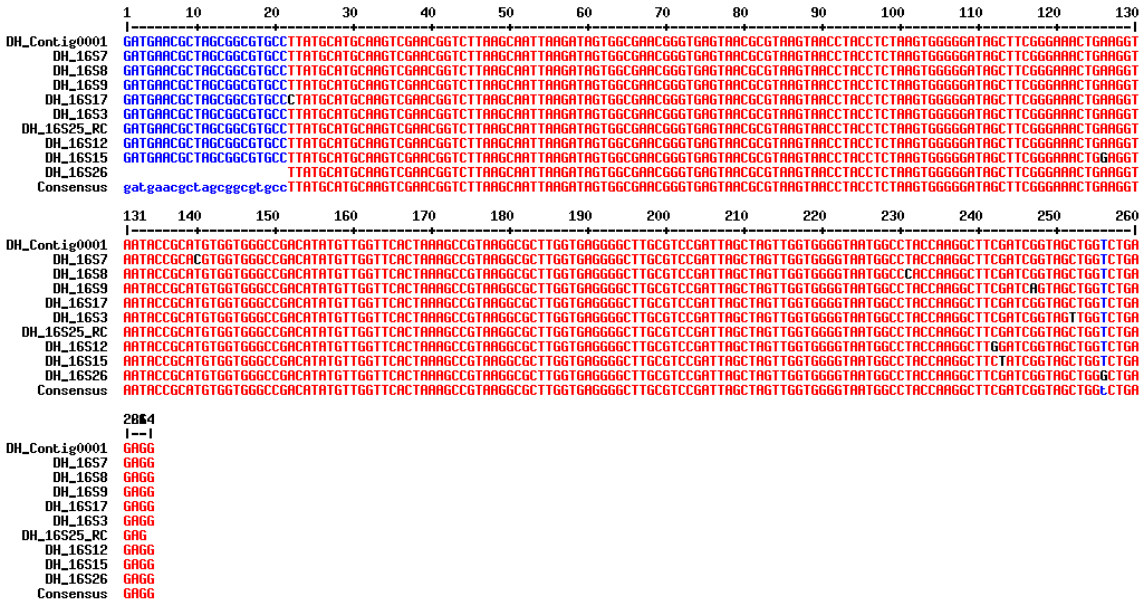


Abbildung 34: Vergleich von *Dehalococcoides*-spezifische 16S rRNA Sequenzen (MultAlign v5.4.1; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) aus Probe SiREM. DH_Contig0001 ist repräsentativ für die 15 idente Sequenzen.

Aus der Probe SiREM konnten sowohl universelle reduktive Dehalogenase (Primer RRF2 und B1R) als auch reduktive Dehalogenase Gene *bvcA* und *vcrA* amplifiziert und anschließend sequenziert und mittels NCBI Datenbank identifiziert werden.

Die Ergebnisse der universellen reduktiven Dehalogenase sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Der genauere Sequenzvergleich zeigte, dass einige analysierte Sequenzen eine 99%-ige Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Außerdem zeigen alle Sequenzen eine hohe Identität mit *Dehalococcoides mccartyi* Sequenzen aus der NCBI Datenbank.

Tabelle 9: Identifizierung von RDH Sequenzen aus Probe SiREM. Die Sequenzen die eine 99% Sequenzähnlichkeit haben sind im Klammer aufgelistet.

| Clone ID | Length (nt) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|-----------------------|-------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| RDH1 | 837 | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 1086 | 1086 | 70% | 0,0 | 99% | CP019968.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GT, complete genome | 1086 | 1086 | 70% | 0,0 | 99% | CP001924.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 1081 | 1081 | 70% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 1075 | 1075 | 70% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 1075 | 1075 | 70% | 0,0 | 99% | CP004080.1 |
| RDH3 (RDH6, RDH14) | 1654 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2907 | 2907 | 96% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2907 | 2907 | 96% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2874 | 2874 | 96% | 0,0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2874 | 2874 | 96% | 0,0 | 99% | CP004079.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2863 | 2863 | 96% | 0,0 | 99% | CP019968.1 |
| RDH4 (RDH9) | 1639 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2896 | 2896 | 96% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2896 | 2896 | 96% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2808 | 2808 | 96% | 0,0 | 99% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2808 | 2808 | 96% | 0,0 | 99% | CP006951.1 |
| | | Dehalococcoides sp. KB1 clone KB1RdhAB10 reductive dehalogenase prot | 2808 | 2808 | 96% | 0,0 | 99% | DQ177515.1 |
| RDH5 | 1614 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2883 | 3012 | 98% | 0,0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2811 | 2811 | 98% | 0,0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2806 | 2806 | 98% | 0,0 | 98% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1816 | 1948 | 98% | 0,0 | 87% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GY50, complete genome | 1810 | 1810 | 98% | 0,0 | 87% | CP006730.1 |
| RDH6 (RDH3, RDH14) | 1632 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2913 | 2913 | 97% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2913 | 2913 | 97% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2880 | 2880 | 97% | 0,0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2880 | 2880 | 97% | 0,0 | 99% | CP004079.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2868 | 2868 | 97% | 0,0 | 99% | CP019968.1 |
| RDH7 (RDH8, RDH18) | 1615 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2861 | 2964 | 97% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2861 | 2964 | 97% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2806 | 2908 | 97% | 0,0 | 99% | CP019968.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2806 | 2908 | 97% | 0,0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2806 | 2908 | 97% | 0,0 | 99% | CP004079.1 |
| RDH8 (RDH7, RDH18) | 1471 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2647 | 2750 | 98% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2647 | 2750 | 98% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2591 | 2694 | 98% | 0,0 | 99% | CP019968.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2591 | 2694 | 98% | 0,0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2591 | 2694 | 98% | 0,0 | 99% | CP004079.1 |
| RDH9 (RDH4) | 1623 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2872 | 2872 | 97% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2872 | 2872 | 97% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides sp. KB1 clone KB1RdhAB10 reductive dehalogenase prot | 2787 | 2787 | 97% | 0,0 | 99% | DQ177515.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2784 | 2784 | 97% | 0,0 | 98% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2784 | 2784 | 97% | 0,0 | 98% | CP006951.1 |
| RDH10 (RDH17) | 1587 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2854 | 4971 | 98% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2765 | 4877 | 98% | 0,0 | 98% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBDC2, complete genome | 2732 | 2732 | 98% | 0,0 | 98% | CP019868.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBDC1, complete genome | 2732 | 2732 | 98% | 0,0 | 98% | CP019867.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2721 | 4777 | 98% | 0,0 | 98% | CP019968.1 |
| RDH11 | 855 | NO hits in the NCBI DB | | | | | | |
| RDH13 | 1493 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2680 | 2680 | 97% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2680 | 2680 | 97% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBDC2, complete genome | 2669 | 2669 | 97% | 0,0 | 99% | CP019868.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBDC1, complete genome | 2669 | 2669 | 97% | 0,0 | 99% | CP019867.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi isolate WBC-2, complete genome | 2663 | 2663 | 97% | 0,0 | 99% | CP017572.1 |
| RDH14 (RDH3, RDH6) | 1495 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2680 | 2680 | 97% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2680 | 2680 | 97% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2647 | 2647 | 97% | 0,0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2647 | 2647 | 97% | 0,0 | 99% | CP004079.1 |
| | | Dehalococcoides sp. KB1 clone KB1RdhAB5 reductive dehalogenase prote | 2638 | 2638 | 96% | 0,0 | 99% | DQ177510.1 |
| RDH17 (RDH10) | 1441 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2645 | 4587 | 100% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBDC2, complete genome | 2562 | 2562 | 100% | 0,0 | 99% | CP019868.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBDC1, complete genome | 2562 | 2562 | 100% | 0,0 | 99% | CP019867.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2545 | 4482 | 100% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2534 | 2534 | 100% | 0,0 | 98% | CP004079.1 |
| RDH18 (RDH7, RDH8) | 1589 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2854 | 2951 | 97% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2854 | 2951 | 97% | 0,0 | 99% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2798 | 2895 | 97% | 0,0 | 99% | CP019968.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2798 | 2895 | 97% | 0,0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DCMB5, complete genome | 2798 | 2895 | 97% | 0,0 | 99% | CP004079.1 |
| RDH19 | 823 | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 1181 | 1352 | 80% | 0,0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 1181 | 1181 | 79% | 0,0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides sp. KB1 reductive dehalogenase catalytic subunit A gen | 1181 | 1181 | 79% | 0,0 | 99% | JX081249.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 1070 | 1241 | 80% | 0,0 | 96% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 1059 | 1230 | 80% | 0,0 | 96% | CP011127.1 |

Von insgesamt 16 untersuchten *vcrA* Sequenzen, konnten 14 zusammengestellt werden (bei zwei Sequenzen wurden nur partielle Sequenzergebnisse erhalten). Alle diese Sequenzen zeigten 99% Sequenzähnlichkeit. Die Analyse der repräsentativen Sequenz VCR1 (1437 nt;Tabelle 10) zeigte eine hohe Identität mit *Dehalococcoides mccartyi* Sequenzen aus der NCBI Datenbank was mit den Ergebnissen der universellen reduktiven Dehalogenase gut übereinstimmt.

Tabelle 10: Ergebnis von blastn Analyse der repräsentativen *vcrA* Sequenz VCR1 (1437 nt;

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Dehalococcoides sp. GT, complete genome | 2630 | 2630 | 100% | .0 | 9% | CP001924.1 |
| Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2619 | 2619 | 100% | .0 | 9% | CP004080.1 |
| Dehalococcoides mccartyi isolate WBC-2, complete genome | 2614 | 2614 | 100% | .0 | 9% | CP017572.1 |
| Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2614 | 2614 | 100% | .0 | 9% | AP014563.1 |
| Dehalococcoides sp. UCH007 DNA, complete genome | 2614 | 2614 | 100% | .0 | 9% | AP014722.1 |
| Dehalococcoides sp. ANAS2 reductive dehalogenase VcrA (vcrA) gene, complete cds | 2603 | 2603 | 100% | .0 | 9% | HM241732.2 |
| Dehalococcoides sp. VS, complete genome | 2603 | 2603 | 100% | .0 | 9% | CP001827.1 |
| Dehalococcoides mccartyi VS vinyl-chloride reductive dehalogenase operon, partial sequence | 2603 | 2603 | 100% | .0 | 9% | AY322364.1 |
| Dehalococcoides sp. 11a putative reductive dehalogenase (rdhA7) gene, partial cds | 2580 | 2580 | 100% | .0 | 9% | HM138519.1 |
| Dehalococcoides sp. KB1 clone KB1RdhAB14 reductive dehalogenase protein gene, partial cds | 2361 | 2361 | 89% | .0 | 9% | DQ177519.1 |
| Dehalococcoides mccartyi strain AD14-2 VC reductive dehalogenase (vcrA) gene, partial cds | 2187 | 2187 | 84% | .0 | 9% | KC342971.1 |

Von insgesamt 16 untersuchten *bvcA* Sequenzen zeigten 14 eine Sequenzähnlichkeit von 99%. Nur zwei Sequenzen (BVC2 und BVC 3) waren unterschiedlich, wobei es sich bei einer von diesen (BVC2) anscheinend um eine unspezifische Amplifikation handelte. Die Ergebnisse der blastn Analyse für die (für

alle andere analysierte Sequenzen) repräsentative Sequenz Contig[0030] und die Sequenz BVC3 sind im Tabelle 11 und Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnis der blastn Analyse der repräsentativen *bvcA* Sequenz Contig[0030] (806 nt)

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Dehalococcoides sp. BAV1, complete genome | 1432 | 1432 | 99% | 0.0 | 99% | CP000688.1 |
| Dehalococcoides sp. BAV1 putative vinyl chloride reductive dehalogenase <i>bvcA</i> mRNA, complete cds | 1426 | 1426 | 99% | 0.0 | 99% | AY563562.1 |
| Dehalococcoides sp. BAV1 putative reductive dehalogenase (RdhA6) and putative anchoring protein (RdhB6) genes, partial cds | 1426 | 1426 | 99% | 0.0 | 99% | AY553227.1 |
| Dehalococcoides sp. KB1 clone KB1RdhAB6 reductive dehalogenase protein and putative anchoring protein genes, partial cds | 1426 | 1426 | 99% | 0.0 | 99% | DQ177511.1 |

Tabelle 12: Ergebnis der blastn Analyse der *bvcA* Sequenz BVC3 (806 nt)

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Dehalococcoides sp. KB1 clone KB1RdhAB6 reductive dehalogenase protein and putative anchoring protein genes, partial cds | 1489 | 1489 | 100% | 0.0 | 100% | DQ177511.1 |
| Dehalococcoides sp. BAV1, complete genome | 1472 | 1472 | 100% | 0.0 | 99% | CP000688.1 |
| Dehalococcoides sp. BAV1 putative vinyl chloride reductive dehalogenase <i>bvcA</i> mRNA, complete cds | 1467 | 1467 | 100% | 0.0 | 99% | AY563562.1 |
| Dehalococcoides sp. BAV1 putative reductive dehalogenase (RdhA6) and putative anchoring protein (RdhB6) genes, partial cds | 1467 | 1467 | 100% | 0.0 | 99% | AY553227.1 |

3.2.3.4 Nachweis von *Dehalococcoides* in den Lysimetern

Über die RNA basierte Analytik kann man nur die Aktivität von *Dehalococcoides* spp. nachweisen (DH 16S RT-PCR) nicht aber ihre dehalogenierende Aktivität. Dementsprechend wurde der Plan für den Nachweis der mikrobiellen Aktivität im Lysimeter Versuch angepasst. Es wurde aus den vier Lysimeter-Kammern (mit Mikroorganismen, mit Mikroorganismen und Eisen, mit Eisen und ohne Behandlung (Negativ-Kontrolle)) jeweils bei zwei Probenahmestellen und zu zwei Zeitpunkten Proben in Triplikaten entnommen, DNA isoliert und die allgemeine *Dehalococcoides* spp. Aktivität über *Dehalococcoides* spp. spezifische 16S rRNA qPCR (DH 16S qPCR) untersucht. Diese qPCR wurde im Rahmen des Projekts entwickelt in dem wir die *Dehalococcoides*-spezifische 16S rRNA Fragment (Primer Dhc1f und Dhc264r) als Template für die Entwicklung von qPCR Primern und Probe mittels IDT Oligo Analyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

genommen haben. Die qPCR Ergebnisse sind in der Tabelle 27 dargestellt. Mit Ausnahme von Probe DIM haben alle anderen Proben übereinstimmende Ergebnisse in allen drei Replikaten geliefert. Von insgesamt 16 getesteten Proben konnte *Dehalococcoides* spp. rRNA nur in vier Proben (25%) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um jeweils eine Probe aus den Kammern C und D die sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Probenahme positiv waren. Diese qPCR Ergebnisse stimmen mit dem beobachteten PCE-Abbau sehr gut überein (siehe Lysimeterexperiment).

3.3 Schlussfolgerungen aus AP1

Der Abbau von PCE hat unter Laborbedingungen sowohl bei Einsatz von Eisenpartikeln, bei Einsatz von mikrobiellen Kulturen als auch bei einer Kombination der beiden Verfahren funktioniert und hat zur Bildung von Ethen und Ethan geführt. Der mikrobielle Abbau von PCE war unter Laborbedingungen bedeutend schneller als der abiotische Abbau mit Eisen. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten des mikrobiellen und des abiotischen Abbaus war der abiotische Abbau von PCE bei kombinierten Versuchen vergleichsweise gering. Ein synergistischer Effekt einer kombinierten Sanierung konnte unter Laborbedingungen nicht beobachtet werden. Es wurde aber auch beobachtet, dass die verschiedenen Partikel nur beschränkt inhibierend auf den mikrobiellen Abbau wirkten. Es ist zu vermuten, dass die beobachteten inhibierenden Effekte in Batchversuchen auf die unmittelbare räumliche Nähe der Partikel mit den Mikroorganismen in den Reaktionsgefäßen zurückzuführen ist. Auf so engem Raum wirken etwaige toxische Effekte potentiell stärker als bei größeren räumlichen Abständen zwischen Partikeln und Bakterien. In den Batches werden die Partikel sowie die Mikroorganismen homogen über den gesamten Boden verteilt. Hierfür werden die Reaktionsgefäße geschüttelt. Die FISH-Analysen geben zumindest leichte Hinweise darauf, dass die Mikroorganismen auf den Partikeloberflächen sitzen. Um hier eine belastbare Aussage treffen zu können wären jedoch wesentlich umfangreichere Untersuchungen notwendig.

Eine direkte Umlegung der im Zuge von Batchversuchen gewonnenen Erkenntnisse auf Feldanwendungen ist erfahrungsgemäß nicht möglich. Bei großskaligeren Versuchen kommen Bakterien vermutlich wesentlich weniger in direkten Kontakt mit den Eisenpartikeln. Neben der Thematik des direkten Kontaktes zwischen Partikeln und Mikrobiologie ist zu berücksichtigen, dass die Umweltbedingungen unter Feldbedingungen wesentlich vielfältiger und oft auch suboptimal sind im Vergleich zu den sehr gut definierten Batchversuchen. Dementsprechend herausfordernder werden die Umweltbedingungen für einen mikrobiellen Abbau im Feld. Auch wenn in einem Feldversuch möglicherweise zonenweise ähnlich Abbauraten erzielbar sind, wird es andere Bereiche geben in denen auf Grund ungünstiger Umweltbedingungen nur geringere Abbauraten erzielt werden können. Es ist daher anzunehmen, dass der mikrobielle Abbau von PCE im Feld nicht an jene Abbauraten heranreicht die wir in Laborversuchen beobachtet haben. Selbst in einem von uns in Batchversuchen definiertem Minimalmedium sind die

Randbedingungen für den mikrobiellen Abbau (z.B. das Redox Potential, konkurrierende autochthone mikrobielle Gemeinschaften oder die Versorgung mit einer Kohlenstoffquelle) noch sehr gut. Es ist auch bekannt, dass unter suboptimalen Bedingungen wie sie häufig im Feld auftreten der rein mikrobielle Abbau nicht immer zu einer vollständigen Dechlorierung von PCE führen muss. Insbesondere da die Versorgung mit Wasserstoff eine gut funktionierende mikrobielle Gemeinschaft voraussetzt und da nicht immer zu 100 Prozent die gewünschten Redox Bedingungen vorherrschen. Beide Parameter können durch den Einsatz von nullwertigem Eisen im Feldmaßstab optimiert werden und damit den mikrobiellen Abbau unterstützen beziehungsweise diesen sicherstellen.

Im Rahmen von Batchversuchen wurde gezeigt, dass ein Abbau von PCE durch eine Kombination von nullwertigen Eisenpartikeln und einem mikrobiellen Abbau (*Dehalococcoides* spp.) selbst auf sehr engem Raum (130 ml) möglich ist. In einem weiteren Schritt wurde daher die Kombination von Mikroorganismen und Eisenpartikel in einer realitätsnäheren, größeren Skala (Lysimeter) zu untersuchen. Diese Versuche werden im Kapitel 4 (AP2 – CKW Abbau Lysimeter) weiter beschrieben.

Basierend auf den 16S rRNA Sequenzierungsergebnissen der UFZ- und Commercial Culture-Proben können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- die Anwesenheit der Gattung *Dehalococcoides* konnte in allen Proben bestätigt werden
- die relative Abundanz von *Dehalococcoides* spp. war in den UFZ-Proben höher als in Commercial Culture-Proben
- die mikrobielle Diversität war in den Commercial Culture-Proben höher als in UFZ-Proben

Die mikrobielle Zusammensetzung der UFZ- und Commercial Culture-Proben scheint sehr unterschiedlich zu sein. Um dies zu bestätigen müssten diese Proben aber weiter sequenziert werden, weil die Anzahl von sequenzierten Klonen unzureichend ist um die beobachtete Diversität genau zu eruieren. Eine solche weitergehende Sequenzierung wurde nicht durchgeführt da die untersuchten Kulturen nicht weiter für Abbauprobversuche verwendet wurden. Alle weiteren Versuche wurden mit der Kultur SiREM KB-1 durchgeführt da diese wesentlich bessere Abbauleistungen zeigte. Dementsprechend wurde nachträglich noch das Produkt SiREM KB-1 analysiert (Sequenzanalyse von 16S rRNA und Genen für dehalogenierende Enzyme). Die Ergebnisse zeigten eine große Abundanz des Stammes *Dehalococcoides mccartyi*, was die hohe Abbauleistung dieses Konsortiums hervorragend erklärt.

4. AP2 - CKW Abbau Lysimeter

Für die Lysimeterversuche wurde das am Areal des AIT Austrian Institute of Technology in Seibersdorf bestehende Altlastenlysimeter eingesetzt. Ziel der Lysimeterversuche war es, die in den Batchversuchen ermittelten Erkenntnisse in großskaligen Experimenten, unter kontrollierten Bedingungen, möglichst praxisnahe umzusetzen und somit die Grundlagen für einen möglichen Pilotversuch an einem kontaminierten Standort zu schaffen.

4.1 Task 2.1 Einbringung von CKW und Eisenpartikel in den Untergrund

Eine kontrollierte Verteilung der CKW Phase, der Kohlenstoffquelle und der Nanoeisenpartikel im Untergrund ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Umsetzung von Abbauversuchen im Lysimeter. Daher wurden im Labor Vorversuche zur Einbringung und der nachfolgenden Verteilung der eingesetzten Substanzen in den Untergrund durchgeführt. Im Rahmen dieser Vorversuche wurden Einbringungsmethode und Einbringungspunkte für die Lysimeterversuche definiert. Hierfür wurden mit Farbtracer versetzte CKW und Eisenpartikel in ein Labormodell eingebracht und die räumliche sowie zeitliche Verteilung mittels Probenahmen überprüft. Zusätzlich wurde die Langzeit-Wasserstoffentwicklung von Nanofer Star, HöganäsAB und „Flakes“ Eisenpartikeln in Säulenversuchen untersucht.

4.1.1 Verteilung von DNAPL Phase im Aquifer

Austesten der Eignung von Sudan III zum Einfärben einer DNAPL Phase (CKW)

In einem ersten Schritt wurden geeignete Farbtracer gesucht, die in chlorierten Kohlenwasserstoffen löslich sind, aber deren Fließeigenschaften nicht wesentlich verändern. Die Verwendung von β -Carotin hat sich für die geplanten Experimente als nicht sinnvoll erwiesen, da dieses ausschließlich in pflanzlichen Ölen gelöst erhältlich ist und pflanzliche Öle die mikrobielle Aktivität maßgeblich beeinflussen können. Es wurde daher ein alternatives Färbemittel gesucht, das direkt in der CKW Phase löslich ist, aber selbst nicht abgebaut wird und das die mikrobielle Aktivität nicht beeinflusst. Als Alternative wurde Sudan Rot (Sudan III), ein ehemaliger Lebensmittelzusatzstoff, ausgewählt.

In einem ersten Schritt wurde mit Hilfe eines Viskosimeters untersucht, wie sich die Zugabe von Sudan III auf die Viskosität von PCE auswirkt. Bei 19.9°C betrug die Viskosität von PCE 5 mPa*s. Eine Zugabe von 0,13% (w/w) Sudan III bewirkte keine messbare Veränderung der Viskosität, wohingegen 5% bereits einen Anstieg der Viskosität auf 14 mPa*s bewirkten.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, bei welcher Konzentration sich Sudan III vom Sand, der in die Lysimeter eingebaut werden soll, optisch abhebt. Dies ist von Bedeutung, da der Einfluss von Sudan III auf

die Viskosität von PCE so gering wie möglich gehalten werden sollte. Hierfür wurden 20 ml Gefäße mit Quarzsand (0,5-2 mm Körnung) befüllt, der Porenraum mit Leitungswasser aufgefüllt, PCE mit Sudan III in den Konzentrationen 0,13%, 5,00% und 10% (w/w) eingefärbt und zugegeben. Die Mischung wurde mittels Vortexmischer homogenisiert (Abbildung 35 a, b). Unabhängig von der Sudan III Konzentration hebt sich das eingefärbte PCE eindeutig vom Sand ab. Des Weiteren verteilt sich Sudan III nicht in der wässrigen Phase. Es eignet sich somit sehr gut zum Anzeigen von PCE-Phase in Wasser.

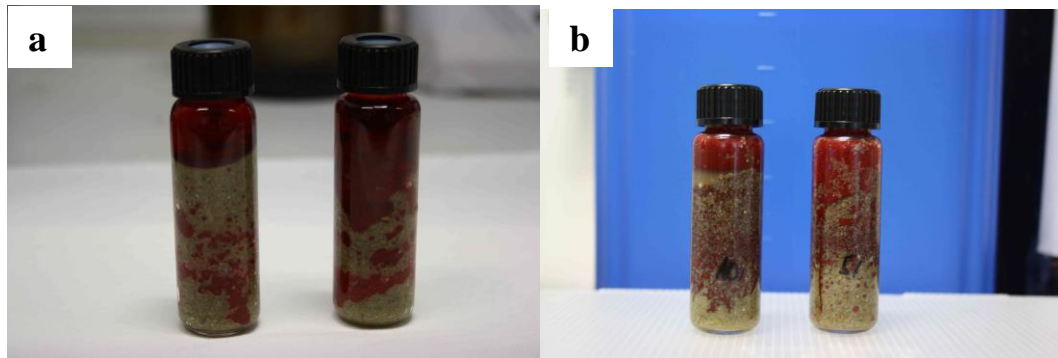


Abbildung 35: Sichtbarkeit von mit Sudan III eingefärbtem PCE. a) Mit 0,13 % (w/w) b) mit 5 und 10 % (w/w).

Um festzustellen, ob in PCE gelöstes Sudan III beim Versickern durch einen trockenen Quarzsand an der Oberfläche sorbiert und es dadurch zu einer chromatografischen Trennung des Farbstoffes vom PCE kommt, wurde ein einfacher Adsorptionstest durchgeführt. Hierfür wurden zwei vertikale Glassäulen aufgestellt und mit PCE (5% Sudan III) überstaut. Vier Tage später wurden die Säulen mit Leitungswasser überstaut (Abbildung 36 a, b).

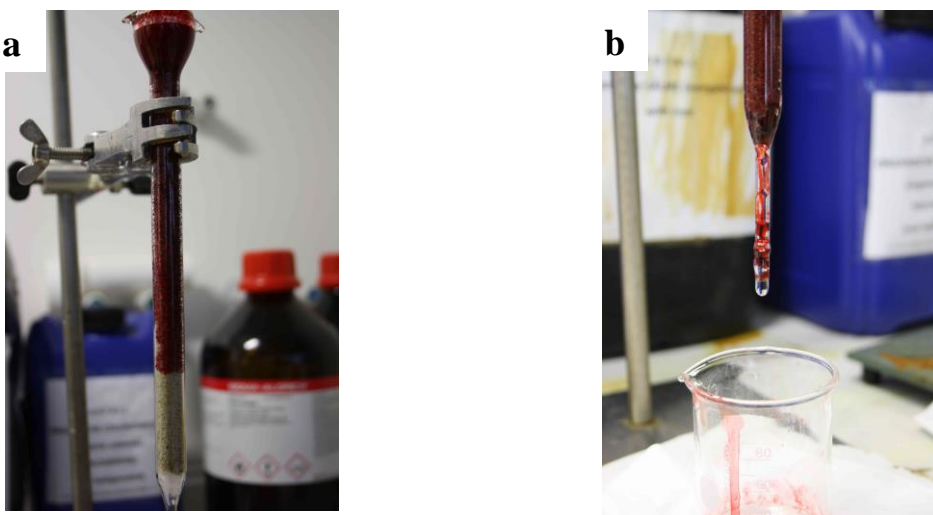


Abbildung 36: Adsorptionsversuch zum Austesten der Adsorption von Sudan III an Quarzsand. a) 15min nach Beginn des Überstaus mit PCE, b) 5 min nach Beginn der Spülung mit Wasser.

Eine chromatographische Trennung von Sudan III bei der Perkolations durch den Quarzsand fand nicht statt, da keine ungefärbte, befeuchtende PCE Front während der Infiltration zu beobachten war. Während des Überstaus mit Wasser kam dieses klar aus dem Säulenende, demnach hat sich das in PCE gelöste Sudan III nicht optisch erkennbar in Wasser gelöst.

In weiterer Folge wurde ein Versuch in einer Glasbox durchgeführt (Abbildung 37). Diese wurde am Grund mit feinkörnigem Sand 0/4 (Durchlässigkeitsbeiwert: 2×10^{-6} m/s bei starker Verdichtung) gefüllt. Diese Schicht stellt im Modell den Grundwasserstauer dar. Darüber wurde mit Grobsand (0,5-2mm Körnung, Durchlässigkeitsbeiwert: 4×10^{-3} m/s) ein „Aquiferbereich“ eingebaut. Die Abmessungen des Aquifers betragen 60x3x12 cm (LxBxH). Anschließend wurden der Stauer sowie der Aquifer von unten gesättigt und mit Hilfe einer Peristaltik Pumpe ein längs gerichteter Fluss mit 0,4 ml/min beziehungsweise 30 cm/d Abstandsgeschwindigkeit angelegt. In dieses System wurden mit einer Spritze an zwei unterschiedlichen Stellen je zwei ml PCE (mit 0,13 % Sudan III) injiziert (Abbildung 37 a, b). Einmal direkt auf den Stauer und einmal in mittlerer Höhe des Aquifers. Die auf diese Weise eingebrachte PCE Phase versickerte nicht in den Stauer und wies nur eine geringe laterale Ausbreitung auf der Staueroberfläche auf (Abbildung 37 c). Es ist daher auch in den Lysimeterkammern nicht damit zu rechnen, dass ein mit 0,13% Sudan III eingefärbtes PCE sehr weit vom Injektionsort weiter transportiert wird sowie, dass dieses in den Stauer eindringt.

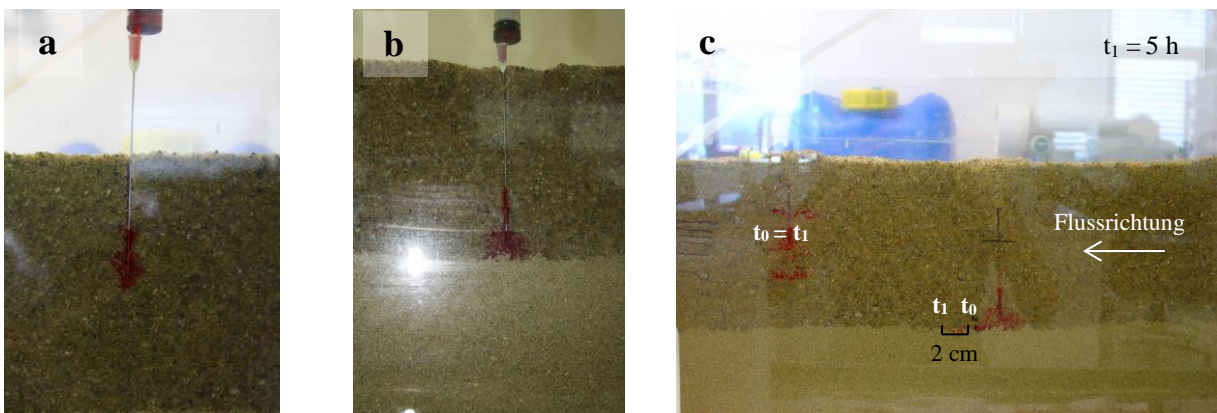


Abbildung 37: Verhalten von PCE Phase eingefärbt mit Sudan III im „Aquifer“ und am „Stauer“ aufliegend. a) Injektion von PCE in die Aquifermitte b) Injektion von PCE auf den Stauer c) Ausbreitung von PCE durch die Schwerkraft sowie durch den Fluss (t₀ = unmittelbar nach Beendigung der Injektion; t₁ = 5 h später)

Um beim Lysimeterversuch von relativ klaren Bedingungen bezüglich der Lage des Schadstoffherdes ausgehen zu können, war geplant das PCE im Aquiferbereich aufliegend auf dem Stauermaterial in einer definierten Höhe mit einem definierten Ausbreitungsradius zu injizieren. Es wurde daher in weiterer Folge in einem ähnlichen Versuch wie dem eben beschriebenen ausgetestet, ob eine größere Menge Schadstoff in das Stauermaterial eindringt. Dazu wurden mittels Spritze 25 ml mit Sudan III (gleiche Konzentration wie beim ersten Boxversuch) gefärbtes PCE mittig in einer Höhe von 2 cm über dem Stauer eingebracht. Es wurde wieder ein längsgerichteter Fluss wie im ersten Boxversuch angelegt. Es zeigte sich, dass auch bei

diesen Mengen die Porendurchmesser unter wassergesättigten Bedingungen klein genug waren, sodass kein PCE in das Stauermaterial eindrang. Die maximale laterale Ausbreitung wurde im Bereich der Injektionstiefe beobachtet (18 cm). Nach ca. 2 Stunden war keine weitere Ausbreitung des PCE mehr visuell zu erkennen, wobei sich auch eine kleine Menge PCE gegen die Strömungsrichtung bewegt hatte (Abbildung 38). Bei konstanten Randbedingungen konnte daraufhin über mehr als 10 Tage hinweg keine weitere Verlagerung beobachtet werden. Da sich auf der Rückseite der Glasbox eine ähnliche Ausbreitung des PCE ergab, konnte das vom PCE infiltrierte Bodenvolumen annähernd abgeschätzt werden. Nach dem Einbringen von 25 ml PCE betrug der Anteil an PCE im betroffenen Bodenvolumen ca. 20%-vol. Bei einem Anteil des Gesamtporenvolumens von 0,44 entsprach dies ca. 38% des Porenraumes. Unter diesen spezifischen Bedingungen einer geringen Möglichkeit der vertikalen Versickerung bedingt durch die Injektionsposition 2 cm über einem für PCE „undurchlässigen“ Stauer ergab sich also eine deutlich höhere Residualsättigung als in der Literatur angeführt. Kueper et. al (2003) gehen z.B. von einer Residualsättigung von 5-20% des Porenraumes aus.

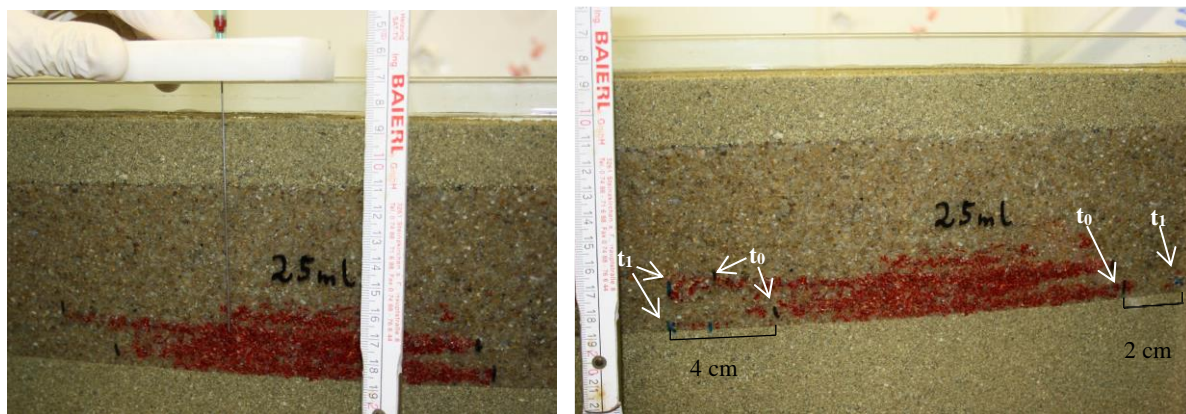


Abbildung 38: Einbringung von 25 ml gefärbtem PCE in eine Glasbox; links: nach Beendigung der Injektion (Dauer der Injektion ca. 18 min, die Spritze ist zu Anschauungszwecken der Injektionstiefe außerhalb der Box platziert); rechts: ca. 2 Stunden nach der Injektion

Bei Austrocknung der Glasbox und damit einhergehender Wasserspiegelabsenkung zeigte sich eindrucksvoll der Effekt der Wassersättigung, die verhinderte, dass sich auf Grund der unterschiedlichen Benetzungseigenschaften von Wasser und DNAPL das PCE weiter im Aquifer verteilte. Erst bei (teilweiser) Austrocknung setzte wieder eine Verlagerung des PCE ein. Schlussendlich konnte eine Verteilung über den gesamten „Aquiferbereich“ und ein teilweises Eindringen in den unterlagernden Stauer beobachtet werden (Abbildung 39). Für LCKW, die sich im Grundwasserschwankungsbereich befinden, ist demgemäß ein ähnlicher Mechanismus einer lateralen Phasenverlagerung zu erwarten.



Abbildung 39: Verlagerung des PCE bei Absenkung des Wasserspiegels durch Austrocknung

4.1.2 Kontrollierte Injektion von Eisenpartikeln in den Grundwasserleiter

Neben der kontrollierten Einbringung der LCKW-Phase ist eine kontrollierte Einbringung der Eisenpartikel unabdinglich. Nur wenn die Verteilung und Lage der LCKW-Phase und der Eisenpartikel in den Lysimetern gut geplant werden können, sind reproduzierbare Versuchsbedingungen in den verschiedenen Lysimeterkammern möglich. Aus diesem Grund wurden Vorversuche mit verschiedenen Partikeltypen (Nanofer Star, HöganäsAB und Flakes) durchgeführt. Es konnten keine Injektionsversuche mit RNIP oder CarboIron durchgeführt, da diese nicht in ausreichender Menge von den Herstellern zur Verfügung gestellt wurden.



Abbildung 40: Injektion von Nanofer Star Partikeln

In einem ersten Versuch wurde ein Kübel (ca. 12 Liter) mit Quarzsand (0,5-2 mm) gefüllt und der Porenraum mit Wasser gesättigt. In den Sand wurde ein Teflonschlauch (I.D. \varnothing 6 mm) vertikal eingebettet, in den eine Eisensuspension aus einem Vorratsgefäß 40 cm über dem Wasserspiegel im Kübel (also mit einem hydrostatischen Druck von 0,04 bar) eingebracht wurde (Abbildung 40). Auf den letzten 10 cm des Schlauches wurden 6 Löcher gebohrt über die, die Eisensuspension (Nanofer Star) in den Sand gelangte. Die Eisensuspension (50 g Partikel in 200 ml Wasser) wurde vorab mit einem Ultra Thurrax (3 min, 15.500 U/min) dispergiert und auf 8,33 g/l verdünnt. Hiervon wurden 900 ml injiziert. Ein großer Teil der so injizierten Partikel gelangte

entlang des Schlauches wieder an die Oberfläche. Eine Verwendung eines Packers erwies sich daher für zukünftige Injektionen als unerlässlich.

Im Anschluss wurden weitere Injektionsversuche in einer Box (Innenmaße L=111 cm, B=92 cm, H=61 cm) durchgeführt. Als Aquifer wurde Quarzsand (0,5-2,0 mm) verwendet. Der Stauer sowie der Aquifer wurden hierfür mit Wasser gesättigt. Die Injektionsleitungen (Teflonschlauch mit $A\varnothing$ 6 mm) wurden sowohl horizontal, als auch vertikal in den Aquifer eingebaut (Abbildung 41). Auf den letzten 20 cm des Schlauches wurden 10 Löcher gebohrt über die, die Eisensuspensionen in den Sand gelangten. Zusätzlich wurde am Ende der 20 cm Injektionslänge ein Packer (\varnothing 20 cm) montiert, um einen Transport der Eisenpartikel entlang der Injektionsleitung zu verhindern. Nach dem ersten Versuch mit nur einem Packer wurden zwischen den einzelnen Injektionslöchern weitere Packer (\varnothing 4,5 cm) montiert, um eine gleichmäßigere Ausbreitung der Partikel im Injektionsraum zu erzielen. Die Eisensuspensionen wurden über diesen Injektionsschlauch bei einem hydrostatischen Druck von 0,2 bar eingebracht. Die Partikel wurden vorab dispergiert (siehe erster Injektionsversuch im Kübel) und unmittelbar danach verdünnt und injiziert. Eine detaillierte Auflistung der durchgeführten Injektionen ist in Tabelle 13 dargelegt.



Abbildung 41: Einbringung der Injektionsleitungen in den Aquifer

Um die Verteilung der Partikel innerhalb der mit Eisenpartikeln durchdrungenen Injektionszone zu bestimmen, wurden Bodenproben aus diesem Bereich genommen. Die Proben wurden anschließend getrocknet (105 °C), gewogen und der Fe Gehalt mittels AAS bestimmt. Anschließend wurde die Partikelmenge der Beprobungszone berechnet. Hierfür wurden die Dichte des Quarzsandes mit 2,65 g/ccm³ und ein Porenvolumen von 44 % angenommen. Der Fe(0)-Gehalt der Partikel wurde mit 80% angenommen. Bisherige Batchversuche mit Nanofer Partikeln zeigten, dass etwa 100 mol Fe(0) benötigt werden, um ein mol PCE abzubauen (Schöftner et al., 2015). Im Rahmen der durchgeführten Partikelinjektionen wurden zwischen 7,5 g Partikel und 50 g Partikel injiziert. Für das Lysimeterexperiment ist geplant, 100 ml PCE und ca. 400 g Partikel (~260 g Fe(0)) in die Lysimeterkammern zu injizieren. Demnach wird lediglich rund 5%

der Fe(0)-Menge zugeführt, die für einen vollständigen Abbau (5452 g) benötigt würde. Die Eisenpartikel würden demnach eine Triggerfunktion für den mikrobiellen Abbau erfüllen, ein vollständiger Abbau der LCKW Phase durch Fe(0) ist dadurch aber ausgeschlossen.

Tabelle 13: Übersicht der durchgeführten Partikelinjektionen

| Versuch | Partikeltyp | Partikel- [g Partikel/l] | Suspension [l] | Partikel [g] | Injektionslage | Packer | Druck [bar] |
|---------|-------------|-----------------------------|-------------------|-----------------|----------------|----------|----------------|
| 1 | NF Star | 8,33 | 0,9 | 7,5 | Vertikal | Einfach | 0,2 |
| 2 | NF Star | 5 | 10 | 50 | Vertikal | Mehrfach | 0,2 |
| 3 | NF Star | 5 | 10 | 50 | Horizontal | Mehrfach | 0,2 |
| 4 | Höganäs AB | 5 | 10 | 50 | Horizontal | Mehrfach | 0,2 |
| 5 | Flakes | 3,5 | 10 | 35 | Horizontal | Mehrfach | 0,2 |

Die dispergierte und verdünnte **Nanofer Star** Partikelsuspension sedimentierte nur langsam im Vorratsbehälter, sodass eine homogene Injektion der Suspension ohne simultanes Rühren möglich war. Bei vertikaler Injektion mit nur einem Packer (Versuch Nr.1) wurden die Partikel zu einem großen Teil entlang der Injektionsleitung bis zum Packer transportiert, wo sie sich radial ausbreiteten (Abbildung 42a). Die Verteilung der Partikel im Aquifer entsprach schlussendlich einem nach unten gewandten Kegel mit einem Durchmesser von 20 cm (an der Unterseite des Packers), der 15 cm unter dem Packer spitz zusammenlief und ein Gesamtvolumen von etwa 1,5 l aufwies. Die Partikel wurden somit auf ein größeres Volumen verteilt, als die injizierte Suspension (900 ml) aufwies.

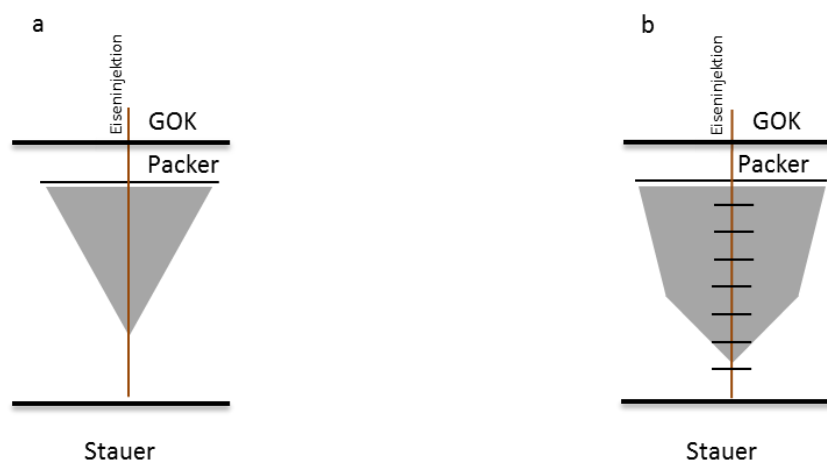


Abbildung 42: Partikelverteilung von Nanofer Star Partikeln bei vertikaler Partikelinjektion. a) Injektion von 0,9 l Eisensuspension (8,33 g/l) b) Injektion von 10 l Eisensuspension (5,0 g/l) mit mehreren Packern.

Es wurde eine weitere vertikale Injektion mit Nanofer Star Partikel durchgeführt, wobei mehrere Packer zwischen den einzelnen Injektionslöchern installiert wurden. Zusätzlich wurde die Menge der injizierten Suspension auf 10 l mit 5 g/l Eisenpartikel erhöht. Durch Anbringen der zusätzlichen Packer konnten die Partikel besser über die gesamte Länge der Injektionsleitung verteilt werden (Abbildung 42b).

Dennoch breiteten sich die Partikel auch mit mehreren Packern kegelförmig aus. Ähnlich der Injektion mit nur einem Packer traten die Partikel bevorzugt bei den ersten Injektionslöchern aus. Bei den letzten zwei Injektionslöchern wurde kein Partikelaustritt beobachtet. Das Gesamtvolumen der verteilten Partikel betrug 2,1 l, war also nur geringfügig größer als bei der Injektion von 900 ml Suspension.

Um die Verteilung der Partikel innerhalb dieser Injektionszone zu bestimmen, wurden vier Bodenproben gezogen (Abbildung 43). Aus 1-3 cm Tiefe sowie aus 9-12 cm Tiefe unter dem Packer, jeweils im Zentrum (direkt neben der Injektionsleitung) als auch am Rand der Injektionszone. Die Eisenmessungen zeigten eine relativ gleichmäßige Verteilung innerhalb der Injektionszone (siehe Tabelle 14).



Abbildung 43: Probenahme NF Star Partikel nach vertikaler Injektion

Im Lysimeter kann die Eisensuspension einerseits vertikal von oben als auch horizontal über seitliche Einlässe in die Lysimeterkammern injiziert werden. Es ist geplant, die Lysimeterkammern an der Oberseite gasdicht abzuschließen, um einen Eintritt von O₂ haltiger Luft zu verhindern. Da eine Durchführung durch diese Abdichtung die Gefahr einer undichten Stelle birgt, wird die Variante der seitlichen Injektion bevorzugt. Aus diesem Grund wurde auch versucht, Nanofer Star Partikel horizontal zu injizieren. Hierbei wurde eine seitliche Durchführung in die Box gebaut. Die Partikel wurden über die gesamte Injektionslänge sowohl nach unten als auch nach oben transportiert (Abbildung 44a). Nach unten wurde der Partikeltransport durch den Stauer nach 8 cm begrenzt. Nach oben wurden die Partikel bis zur GOK transportiert. Die größte laterale Ausbreitung wurde auf Höhe des Injektionsschlauches beobachtet und sank sowohl unterhalb als auch oberhalb der Injektionsleitung ab (Abbildung 44b). Insgesamt entsprach das Volumen der Injektionszone in etwa jener der vertikalen Injektion von Nanofer Star Partikeln (2,1 l).

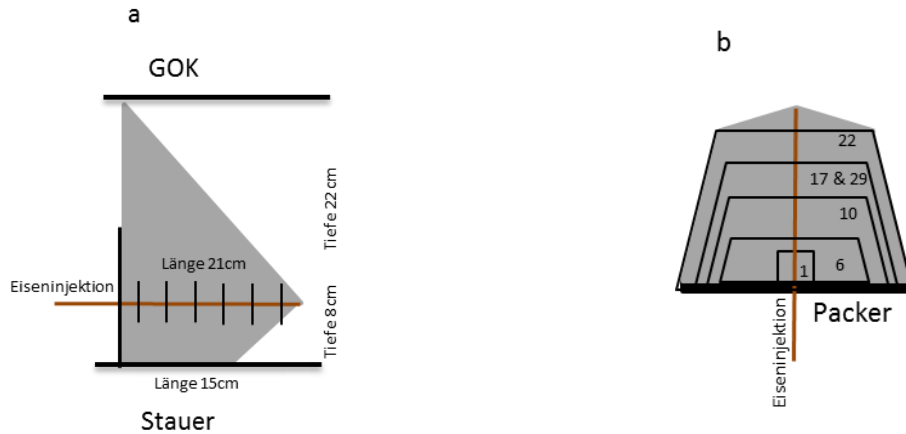


Abbildung 44: Partikelausbreitung von Nanofer Star Partikeln bei horizontaler Partikelinjektion. Injektion von 10 l Eisensuspension (5,0 g/l) mit mehreren Packern. a) Schnitt durch den Aquifer b) Grundriss; Zahlen stellen die Tiefe unter GOK dar.

Die dispergierte und verdünnte **Flakes** - Partikelsuspension sedimentierte langsam, sodass eine homogene, horizontale Injektion der Suspension ohne simultanes Rühren möglich war. Die Partikel traten über die gesamte Injektionslänge von 20 cm in den Aquifer aus und wurden maßgeblich nach unten, bis zum Erreichen des Stauers (10 cm Tiefe) transportiert (Abbildung 45). Die Injektionszone verbreiterte sich nach unten auf bis zu 15 cm. Das Gesamtvolumen der Injektionszone betrug in etwa 1,5 l. Die Ausbreitung der Partikel im Aquifer war demnach geringer, verglichen mit jener von Nanofer Star Partikeln.



Abbildung 45: Probenahme „Flakes“ Partikel nach horizontaler Injektion sowie 3D Skizze der Partikelausbreitung von „Flakes“ Partikeln (Injektion von 10 l Eisensuspension (3,5 g/l) mit mehreren Packern)

Es ist anzunehmen, dass die „Flakes“-Partikel aufgrund ihrer Größe besser vom Aquifer gefiltert wurden als die vielfach kleineren Nanofer Star Partikel. Diese Annahme wurde auch durch die durchgeführte Bestimmung der Partikelkonzentrationen im Porenraum der Injektionszone bestätigt. Hierfür wurden 5 cm nach Beginn des Injektionsschlauches vier Bodenproben genommen (Abbildung 45). Einmal 5-7 cm unterhalb des höchsten Punktes des ersten bzw. hintersten Packers (über dem Injektionsschlauch) sowie

einmal 7-9 cm unterhalb (direkt in Höhe des Injektionsschlauches). Von beiden Tiefen wurde jeweils eine Probe vom Zentrum, sowie vom Rand der Injektionszone genommen. Zentral am Schlauch wurde ein sehr hoher Partikelgehalt gefunden, während 2 cm und am Rand der Injektionszone geringe Gehalte gemessen wurden (Tabelle 14). Die Partikel im Porenraum des beprobten Aquifers konzentrierten sich demnach direkt am Injektionsschlauch, während im Randbereich, lediglich wenige Zentimeter daneben, der Partikelgehalt gering war.

Tabelle 14: Injektionsvolumen und Partikelgehalte (Masse an Eisen pro Bodenvolumen) der Injektionsversuche

| Nr | Partikeltyp | Injektions | Partikelgehalt | Partikelgehalt | Partikelgehalt | Partikelgehalt |
|----|-------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Volumen* | Zentrum 1§ | Zentrum 2§ | Rand 1§ | Rand 2§ |
| | | Liter | [g/l] | [g/l] | [g/l] | [g/l] |
| 1 | NF Star | 1,5 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 2 | NF Star | 2,1 | 19,0 | 24,5 | 10,1 | 16,2 |
| 3 | NF Star | 2,1 | n.b. | n.b. | n.b. | n.b. |
| 4 | Höganäs AB | n.b. | 49,9 | 15,4 | 3,8 | n.b. |
| 5 | Flakes | 1,5 | 149,5 | 35,0 | 7,8 | 7,1 |

*Visuell erkennbarer mit Eisenpartikeln durchdrungener Bodenbereich nach der Injektion; §Masse an Eisenpartikeln berechnet für 1 Liter Bodenvolumen nach erfolgter Injektion; n.b.: nicht bestimmt

Die dispergierte und verdünnte **HöganäsAB** Partikelsuspension sedimentierte sehr rasch im Vorratsbehälter, sodass eine homogene, horizontale Injektion der Suspension nicht möglich war. Für etwaige weitere Injektionen müsste eine spezielle Apparatur gebaut werden, die die Partikel während der Injektion in Schwebelage hält. Des Weiteren war es nicht möglich, die injizierten Partikel im Anschluss optisch vom Sand zu unterscheiden, da sich die grauen Höganäs Partikel optisch nicht vom Sand abhoben. Es wurden daher nach der Injektion Proben entlang der Injektionsleitung sowie unterhalb der Injektionsleitung genommen, um die Partikelkonzentration im Porenraum festzustellen. Es zeigte sich sehr deutlich, dass die Partikelkonzentration entlang der Injektionsleitung abnahm (zentrale Probe 1 im Vergleich zur zentralen Probe 2, Tabelle 14) und die Partikel im Aquifer nicht sehr weit transportiert wurden. Am Rand der Injektionszone (10 cm unterhalb der Injektionsleitung, direkt am Stauer) wurde lediglich eine geringe Partikelkonzentration festgestellt.

4.1.3 Herstellung von sauerstofffreiem Wasser zur Etablierung eines anoxischen Grundwasserleiters

Die im Lysimeterversuch für den Abbau von PCE eingesetzte Bakterienkultur ist strikt anaerob. Um sicherzustellen, dass diese Kulturen im simulierten Aquiferbereich des Lysimeters nicht in Kontakt mit Sauerstoff kommen, muss dieser aus dem zufließenden Wasser vorab weitestgehend entfernt werden. Eine einfache Methode, dies zu bewerkstelligen, besteht darin, Inertgas in das Wasser einzubringen, das den im Wasser gelösten Sauerstoff verdrängt. Um diesen Prozess zu optimieren, sind die eingebrachten Gasblasen möglichst klein zu halten, um damit die reaktive Oberfläche je eingesetzter Menge Gas zu erhöhen. Des Weiteren muss die optimale Kontaktzeit der Gasblasen im Wasser und damit die Größe des Reaktionsgefäßes ermittelt werden. Um diese Parameter zu optimieren und um dadurch die eingesetzte Inertgasmenge zu minimieren, wurden unterschiedliche technische Umsetzungen der Gaseinbringung ausgetestet (Details dazu siehe Anhang Kapitel 7.3).

Schlussendlich konnte ein zufriedenstellendes System entwickelt werden, mit dem eine Entfernung von Sauerstoff aus dem Wasser durch Einblasen von Stickstoff in reproduzierbarer Weise ermöglicht wird (Abbildung 46). Bei einer ausreichenden Stickstoffmenge betrug der Restsauerstoffgehalt stets $<0,05$ mg/l.

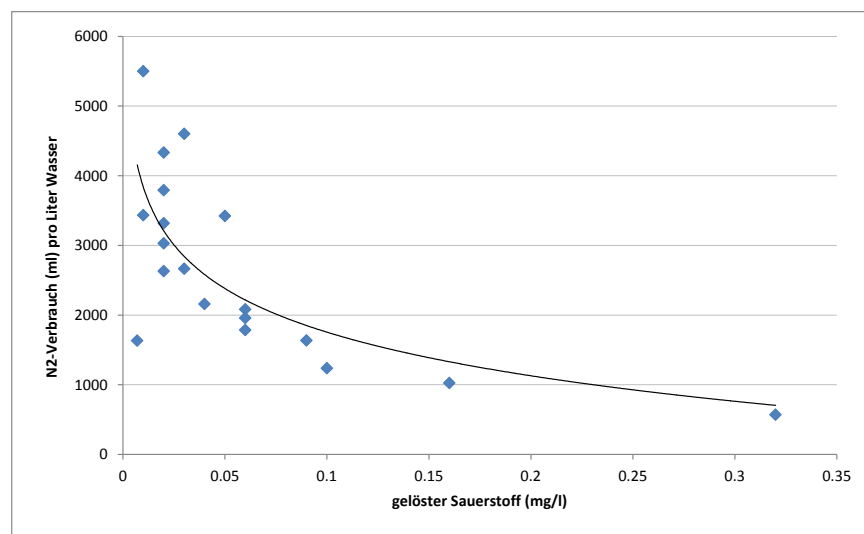


Abbildung 46: Erniedrigung der Konzentration von gelöstem Sauerstoff in Wasser in Abhängigkeit von der eingebrachten Stickstoffmenge

Da bei der Verdrängung des Sauerstoffs durch Einblasen von Stickstoff auch das gelöste CO₂ ausgeblasen wird, steigt der pH-Wert im aufbereiteten Wasser auf $> \text{pH } 8,6$. Da dies nicht den natürlichen Gegebenheiten entspricht (Wasser aus karbonatischen Grundwasserleitern liegt in vielen Fällen zwischen pH 7 und 8) und auch die CKW-abbauenden Mikroorganismen bei einem pH-Wert > 8 keine optimalen

Umgebungsbedingungen vorfinden, wird der pH im zugeführten Wasser durch Einbringen von CO₂ (2,5 ml/min) auf einen pH-Wert von ca. 7 abgesenkt.

4.1.4 Austestung der Wasserstoffversorgung durch verschiedene Eisenpartikeltypen im Säulenversuch

Neben dem Abbau von LCKW bildet nullwertiges Eisen durch die Reduktion von Wasser Wasserstoff (H₂). Dieser Wasserstoff soll im Zuge des Projektes BIANO als Elektronendonator für den anaeroben mikrobiologischen Abbau von LCKW verwendet werden. Um die Eignung von Eisenpartikeln bezüglich der kombinierten Anwendung von Fe(0) Partikeln und mikrobiologischem Abbau einzuschätzen, ist es daher wichtig mit welchen H₂ Konzentrationen im Abstrom der Fe(0) Injektionszone zu rechnen ist und über welchen Zeitraum dieser vorhanden ist.

Es wurden Säulenversuche durchgeführt, in die eine definierte Menge an Eisenpartikel (HöganäsAB, „Flakes“ oder Nanofer Star) eingebracht wurden. Anschließend wurde regelmäßig die Konzentration des gelösten H₂ im Abstrom der Fe(0) Zone über eine Zeitdauer von mehreren Monaten gemessen. Für die Säulenversuche wurden zwei Typen von Glassäulen verwendet, die bis auf den Durchmesser in der Ausführung ident waren (Abbildung 47). Die Säulen waren 60 cm lang und hatten einen Außendurchmesser von 5,5 cm beziehungsweise 10,5 cm. Der Zulauf wurde über eine Sinterplatte gleichmäßig über die Querschnittsfläche der Säule durch die Säule geströmt. Am Abfluss war eine Schraubverbindung für den Anschluss der Abflußleitung vorgesehen sowie eine Verschraubung mit einem austauschbaren Septum über das die Wasserprobenahme für die Messung des gelösten H₂ erfolgte.

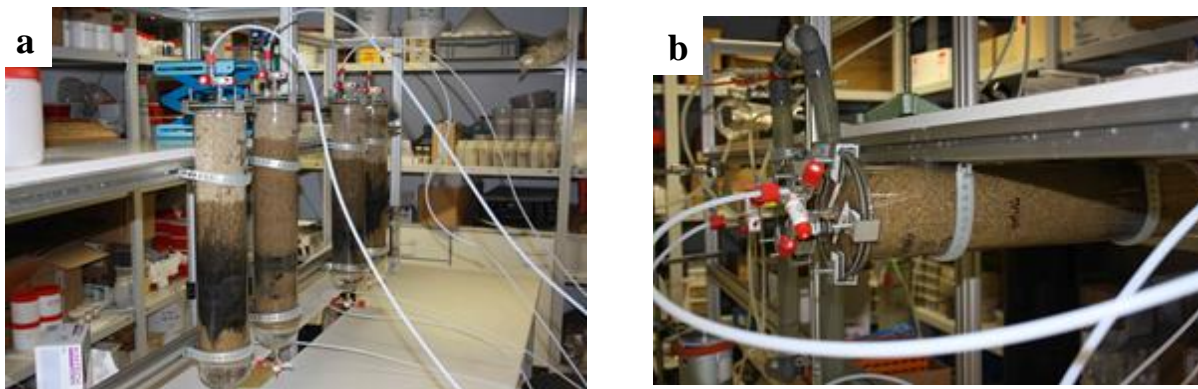


Abbildung 47: Befüllen der Säulen mit Quarzsand und Eisenzone. a) Sättigung der Säulen vertikal von unten mit O₂ freiem Wasser. b) Horizontale Lage der Säulen nach Sättigung

Der entstehende H₂ liegt im Aquifer in Form von Gasblasen vor, die sich einerseits langsam lösen und die sich andererseits selbst bewegen. Diese Bewegung der H₂ Gasblasen kann sowohl durch den Wasserfluss als auch durch den Auftrieb bedingt sein. Um den Einfluss dieser zwei Prozesse auf die Bewegung der H₂

Gasblasen auszutesten, wurde eine schmale Säule mit 50 g Nanofer Star Partikeln vertikal montiert. In diesem Fall werden die Gasblasen sowohl durch den Auftrieb als auch durch den Wasserfluss nach oben transportiert. Des Weiteren wurden 6 der breiten Säulen horizontal montiert (Abbildung 47b). In diesem Fall können die Gasblasen nur durch den Wasserfluss in Richtung des Abflusses transportiert werden. In die sechs horizontalen Säulen wurden je 5 g und 50 g Nanofer Star, HöganäsAB und „Flakes“ Partikeln zugegeben. Eine detaillierte Auflistung der durchgeführten Säulenversuche ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Durchgeführte Säulenversuche zur Austestung der Wasserstoffversorgung durch verschiedene Eisenpartikeltypen

| Partikeltyp | Partikelmenge [g Partikel] | Säulentyp | Lage der Säulen | Fluss [ml/min] | Abstands- geschwindigkeit [cm/Tag] |
|-------------|-------------------------------|-----------|-----------------|-------------------|--|
| NF Star | 50 | Schmal | Vertikal | 1 | 50 |
| NF Star | 5 | Breit | Horizontal | 1 | 30 |
| NF Star | 50 | Breit | Horizontal | 1 | 30 |
| Höganäs AB | 5 | Breit | Horizontal | 1 | 30 |
| HöganäsAB | 50 | Breit | Horizontal | 1 | 30 |
| Flakes | 5 | Breit | Horizontal | 1 | 30 |
| Flakes | 50 | Breit | Horizontal | 1 | 30 |

In einem ersten Schritt wurden die Säulen vertikal montiert, eine 7 cm Quarzsandschicht (0,5 – 2 mm) von oben als Aquifermaterial eingefüllt. Anschließend wurden die Säulen von unten mit Argon gespült und die Quarzsandschicht mit Wasser gefüllt, aus dem der Sauerstoff mittels Stickstoffdurchströmung ausgetrieben wurde. Über der Quarzsandschicht wurde eine ca. 9 cm hohe, Eisenpartikel beinhaltende Zone installiert. Hierfür wurden trockene Höganäs Partikel mit Sand vermischt und dieses Gemisch von oben eingefüllt und anschließend wie oben beschrieben mit Ar und mit anoxischem Wasser von unten befüllt. Im Falle von Nanofer Star und Flakes-Partikeln wurden die 50 g der Partikel zuvor in 200 ml Wasser dispergiert (siehe Kapitel 4.1.2) und diese Suspension von oben auf die trockene 9 cm hohe Fe(0) Injektionszone gegeben. Im Anschluss wurde die Fe(0) Injektionszone von oben bis zum Säulenende mit Quarzsand gefüllt und zeitgleich von unten mit anoxischem Wasser gesättigt (Abbildung 47a). Hierbei wurden in manchen Säulen die Eisenpartikeln mit dem Wasserstrom ein wenig nach oben transportiert, was die Fe(0) Zone vergrößerte.

Nachdem die Säulen befüllt und am Gerüst vertikal sowie horizontal befestigt wurden, wurden diese über ein Monat mit deoxygeniertem Wasser durchflossen (Abbildung 48). Hierfür wurde eine Vorratsgefäß (ca. 25 l) mit Wasser gefüllt. Aus diesem Vorratsgefäß wurden mit einer Peristaltikpumpe 20 ml/min in die Deoxygenierungsanlage (O₂ Entgasung) gepumpt. In dieser wurde das Wasser in zwei Strängen mit N₂ begast

(siehe Kap. 4.1.3). Der Gasfluss wurde für jeden Strang mit einem Rotameter reguliert. Aus der Deoxygenierungsanlage floss das Wasser in einen gasdicht verschlossenen Zwischenspeicher aus dem eine weitere Peristaltikpumpe 1 ml/min in jede der 7 Säulen pumpte. Das überschüssige Wasser im Zwischenspeicher floss zurück in den Vorratsbehälter. In dieser Leitung wurde eine O₂ Sonde installiert mit Hilfe derer der O₂ Gehalt im Zulauf der Säulen überwacht wurde.

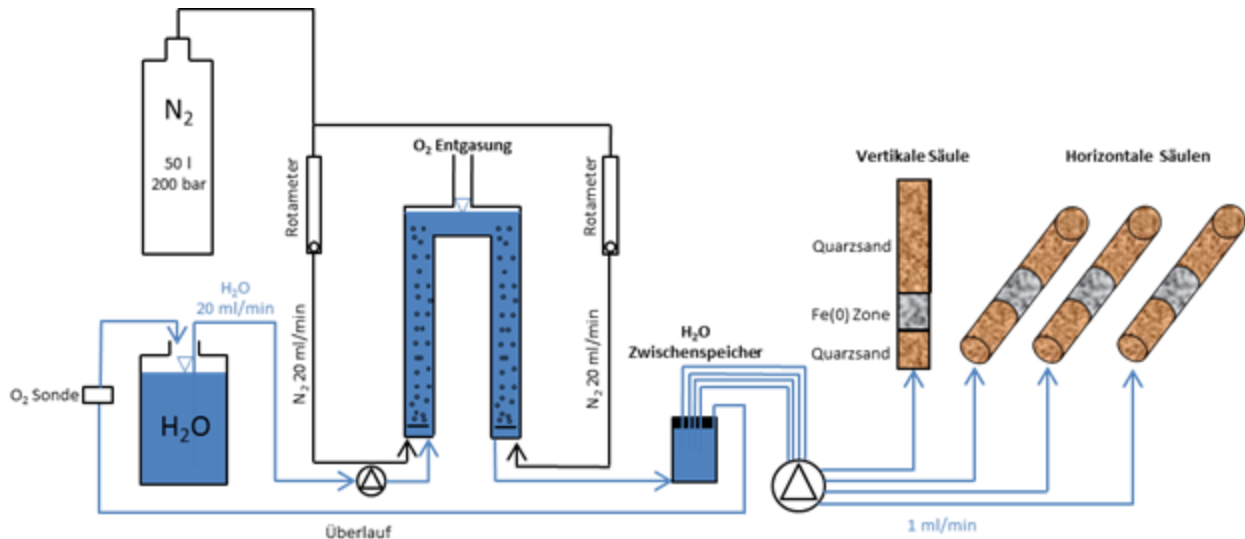


Abbildung 48: Versuchsaufbau für die Austestung der Wasserstoffversorgung durch verschiedene Eisenpartikeltypen

Binnen weniger Tage waren bei den Säulen mit Nanofer und Flakes Partikeln große Gasblasen erkennbar, sowohl bei den Varianten mit 50 g als auch bei 5 g Partikeln. Der Abfluss der Säulen befand sich im Zentrum des Querschnittes der Säulen (Abbildung 47b). Die Gasentwicklung bei diesen Säulen war so groß, dass dadurch bei den horizontalen Säulen das Wasser in der gesamten Oberhälfte der Säule (oberhalb des Abflusses) verdrängt wurde. In der vertikalen Säule wurde der Wasserstoff vertikal nach oben und über den Abfluss aus dem System getragen. Eine derartige Gasbildung wurde daher in der vertikalen Säule nicht beobachtet. Die Gasbildung bei Höganäs Partikeln war so gering, dass diese optisch von außen durch die Glassäule nicht erkennbar war. Gegen Versuchsende fiel die Wasserversorgung aus, wodurch anstelle von Wasser Luft in die Säulen gepumpt wurde (Versuchstag 24 bei horizontalen Säulen, Versuchstag 34 bei vertikaler Säule). Dadurch wurde einerseits Sauerstoff in die Säulen eingebracht und zusätzlich verdrängte das Gas in allen Säulen das Wasser in der gesamten Oberhälfte der Säule (oberhalb des Abflusses).

Neben der optisch erkennbaren Gasbildung wurde der gelöste Wasserstoff im Abfluss der Säulen gemessen. Hierfür wurden 5 ml Wasserprobe über das Probenahmeventil am Abfluss der Säulen genommen, diese in ein 10 ml Gefäß überführt und dieses gasdicht verschlossen. Nach mindestens einer Stunde im Gefäß wurde die Probe mittels GC-WLD gemessen. Eine genaue Beschreibung der Analytik sowie der Kalibration ist im Anhang angeführt. Die H₂ Konzentration im Abfluss war bei Nanofer Star Partikeln am höchsten. In den

vertikalen sowie der horizontalen Säule mit 50 g Partikeln stieg die Wasserstoffkonzentration binnen weniger Tage auf Werte nahe der Sättigung (1,6 mg/l) (Abbildung 49) und schwankte innerhalb der Versuchszeit zwischen 60 und 90%. In der Säule mit 50 g Flakes Partikeln stieg die Wasserstoffkonzentration auch innerhalb weniger Tage auf bis zu 50% Sättigung an und sank im Anschluss kontinuierlich ab. Dies spiegelt die Beobachtung in den durchgeführten Batchversuchen wieder, bei denen in den ersten Tagen sehr viel H₂ entstand und PCE sehr rasch abgebaut wurde, die Reaktivität der Partikel allerdings nach wenigen Tagen stark abnahm (Kapitel 3.1.1). Sowohl bei den Nanofer Partikeln als auch bei den Flakes waren die gemessenen H₂ Konzentrationen in den Säulen mit im Ablauf wesentlich geringer als bei jenen Säulen mit 50 g Partikeln.

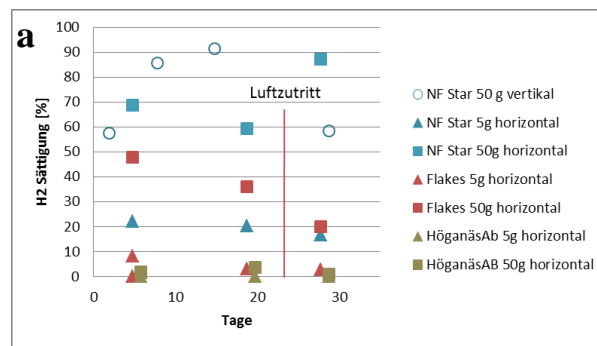


Abbildung 49: Gemessene H₂ Konzentrationen in der vertikalen Säule sowie den horizontalen Säulen unter Einsatz verschiedener Eisenpartikel mit verschiedenen Eisenmengen in den Säulen. Am Versuchstag 24 fiel die Wasserversorgung vorübergehend aus, wodurch anstatt von Wasser Luft in die Säulen gepumpt wurde. Die vertikale Säule wurde 10 Tage früher installiert. Der Luftzutritt war daher in dieser Säule an Tag 34.

Bei der Säule mit Nanofer Partikeln lag die H₂ Konzentration bei rund 20 % Sättigung, bei der Säule mit 5 g Flakes sank die Konzentration von 8% Sättigung auf 3%.ab. Die Wasserstoffbildung war im Falle von HöganäsAB Partikeln gering. In der Säule mit 50 g Partikeln wurden Konzentrationen zwischen 1 und 4% Sättigung gemessen. In jener mit 5 g Partikeln war die H₂ Konzentration unter dem Detektionslimit (1/30 Sättigung, 0,06 mg/l).

Um die Frage zu klären, wie lange die jeweiligen Partikel Wasserstoff bilden, werden Langzeitexperimente in Batchversuchen - wie in Kapitel 3 beschrieben - durchgeführt. Dabei wird untersucht, über welchen Zeitraum die in den Säulenversuchen eingesetzten Partikel Wasserstoff bilden. LCKW, Eisenpartikel in einer Konzentration von 15 g/l und Quarzsand werden in die Reaktionsgefäße zugegeben und das Wasser bei pH 7,5 gepuffert. Damit wurden Bedingungen geschaffen, die auch im Lysimeterversuch zu erwarten sind. Der in diesen Gefäßen entstehende Wasserstoff wird derzeit ca. wöchentlich gemessen. In regelmäßigen Abständen werden die Reaktionsgefäße in der Glovebox geöffnet, um den gebildeten Wasserstoff zu entfernen. Damit kann vermieden werden, dass der bereits gebildete Wasserstoff das weitere Ablaufen der Reaktion beeinflusst. Auf diese Weise wird die Erfassung von geringeren Wasserstoffbildungsraten nach längerer Versuchsdauer ermöglicht. Bei höheren Wasserstoffkonzentrationen könnten diffusive H₂ Verluste

aus dem Gefäß sowie Messungenauigkeiten (aufgrund der manuellen Injektion) die Wasserstoffneubildung überdecken.

4.1.5 Kistenversuch zum Austesten des geplanten Lysimeter-Versuchsaufbaus sowie der Anordnung der LCKW- Eisen- und Inokulum-injektions-positionen

Um für den Lysimeter-Großversuch die optimale Anordnung von Schadstoff- und Eisenpartikelinjektion auswählen zu können, wurde im Labor ein Boxversuch angelegt. Damit soll auch festgestellt werden, ob unter den gewählten Bedingungen einerseits noch eine ausreichende Konzentration an PCE im Aquifer für den mikrobiellen Abbau nach Durchtritt durch die mit Eisenpartikel versetzte Zone vorhanden ist und andererseits ob eine ausreichende Dauer der Wasserstoffbildung gewährleistet ist. Dazu wurde eine Kunststoffbox (Material PP, Maße innen: L=92 cm, B=58 cm, H=40 cm) präpariert, um äquivalent zum geplanten Lysimeterversuch einen Grundwasserstrom in einem Aquiferbereich unter anaeroben Bedingungen erzeugen zu können (Abbildung 50). Durch seitliche Zuführungen können einerseits eine Schadstoffinjektion und die Einbringung der Eisenpartikel erfolgen und andererseits können Wasserproben in unterschiedlichen Abständen vom Schadstoffherd gezogen werden. Als unterste Lage wurde ein Drainagekies mit 3 cm Mächtigkeit eingebaut. Der gut leitende Aquiferbereich bestehend aus einem Quarzsand mit Körnung 0,5/2 (Durchlässigkeitsbeiwert: 4×10^{-3} m/s) wurde jeweils oberhalb und an der Basis von einer gering leitenden Sandschicht (Körnung 0/4) begrenzt (Durchlässigkeitsbeiwert: 2×10^{-6} m/s bei starker Verdichtung).

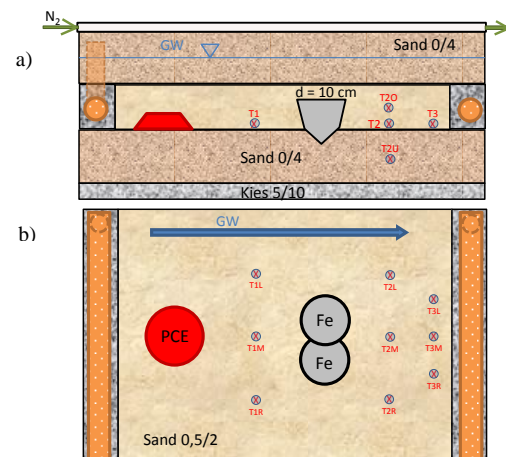


Abbildung 50: Lysimetervorversuch zur Ermittlung der PCE – Eisenpartikelanordnung mit kontinuierlichem Fluss unter kontrolliert anaeroben Bedingungen (a: Profilansicht der Befüllung, b: Grundriss mit Lage des PCE-Herds und der Eisenpartikel)

Vor der Befüllung mit Wasser wurde aus der befüllten Box durch Einleiten von Stickstoff der vorhandene Luftsauerstoff ausgetrieben. Die Elimination des Sauerstoffs im zuströmenden Wasser erfolgte ebenfalls

durch Austreiben mit Stickstoff. Der kontinuierliche Zustrom wurde mittels Pumpe auf ca. 4 ml/min eingeregelt, wodurch sich im Aquiferbereich eine Abstandsgeschwindigkeit von 1,1 cm/h ergab. Der Sauerstoffgehalt, der pH-Wert und das Redoxpotential des Wassers wurden vor Eintritt in die Box und beim Austritt in regelmäßigen Abständen erfasst. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass Wasser mit einem etwaigen zu hohen Sauerstoffgehalt während des Versuches in die Box gelangt war. Um den diffusiven Zutritt von Sauerstoff über die Abdeckung in die Box hinein zu minimieren, wurde im ca. 2 cm mächtigen Gasraum über der Sandfüllung ebenfalls eine kontinuierliche N₂-Durchströmung etabliert. Die Infiltration des Wassers und die Exfiltration erfolgten mittels perforierter Rohre (Durchmesser 5 cm), die am Anfang und am Ende des Aquiferbereiches situiert waren.

Nachdem sich in der Box konstante Strömungsbedingungen eingestellt hatten und der Sauerstoffgehalt im Abfluss eine Konzentration von ca. 0,35 mg/l erreicht hatte, wurden 20 ml PCE (entspricht 32,4 g) und 7 Tage später die Eisenpartikelsuspension injiziert. Die Eisenpartikeln wurden an zwei nebeneinander liegenden Punkten eingebracht, um eine ausreichende Injektionsbreite zu erreichen (Anordnung siehe Abbildung 50 b). Pro Injektionspunkt wurden 5 Liter Suspension mit jeweils 25 g Eisenpartikeln bei einem hydrostatischen Druck von 150 cm Wassersäule und einer Flussrate zwischen 415 und 455 ml/min eingebracht.

Der Sauerstoffgehalt konnte im zufließenden Wasser über die gesamte Versuchsdauer auf einem Niveau kleiner der Bestimmungsgrenze (BG) des Sensors (<0,03 mg/l) gehalten werden. Im Abfluss der Box sank er vom Start der Durchströmung kontinuierlich von 0,4 mg/l (Restsauerstoff nach Füllung) nach ca. 4 Wochen auf ebenfalls <BG (Abbildung 51a).

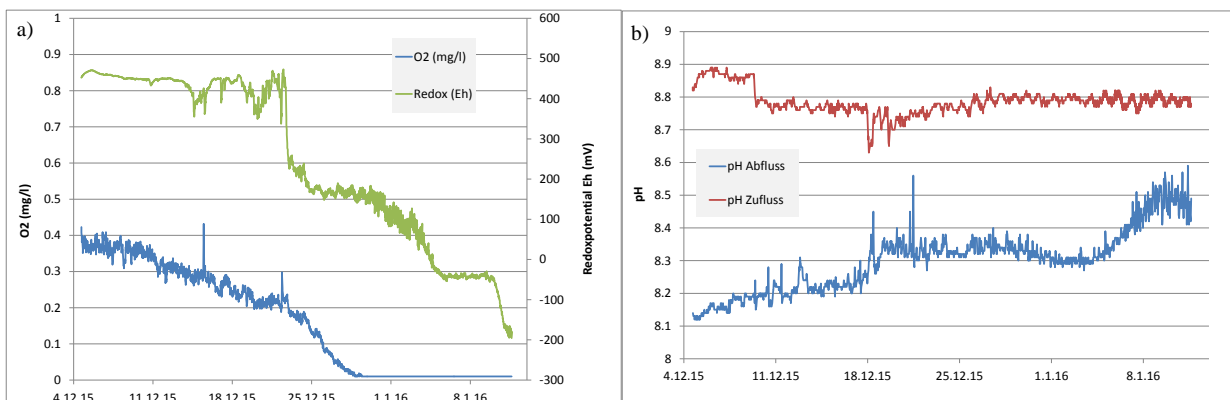


Abbildung 51: Verlauf des O₂-Gehalts und des Redoxpotentials im Abfluss der Box (a) und des pH-Wertes im Zu- und Abfluss (b) während des bisherigen Versuchsverlaufes

Da durch die Begasung mit Stickstoff auch das CO_2 im Wasser ausgetrieben wird, wurde der pH-Wert im Zufluss auf bis zu 8,8 erhöht (Leitungswasser Tulln: 7,6 - 7,9). Im Abfluss lagen die pH-Werte niedriger, wobei im Versuchsverlauf ein Anstieg von 8,1 auf 8,5 beobachtet wurde (Abbildung 51b).

Der Sauerstoffgehalt im zufließenden Wasser konnte während der gesamten Versuchsdauer auf $<0,1$ mg/l gehalten werden (meist $< \text{BG}$). Auch die Zudosierung der Melasse aus einem Vorratsbehälter störte das Austreiben des Sauerstoffes nicht. Im Gegenteil hat die Erhöhung der Salzkonzentration durch die Melassezugabe die Löslichkeit von Gasen eingeschränkt, wodurch noch geringere Sauerstoffgehalte im zufließenden Wasser erreicht werden konnten. Abbildung 52 zeigt den Verlauf der pH-Werte und des Redoxpotentials im abfließenden Wasser der Box. Der Sprung im pH-Wert zwischen März und April 2016 erklärt sich durch das Etablieren der CO_2 -Zugabe bei der Wasseraufbereitung. Dadurch konnte ein für Mikroorganismen optimaler pH-Bereich erzielt werden.

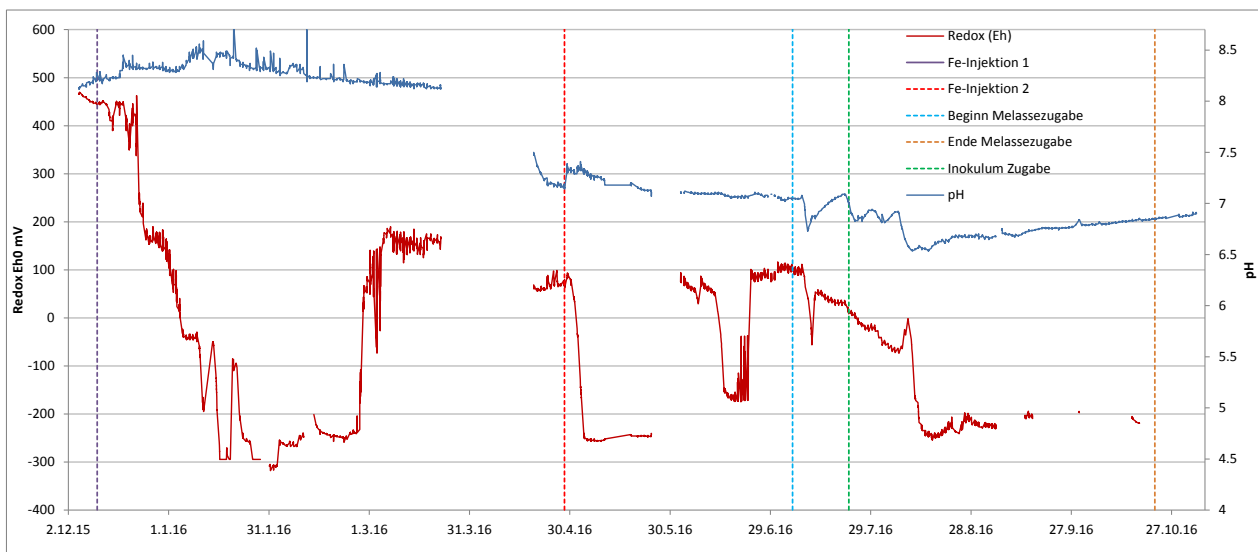


Abbildung 52: Verlauf des Redoxpotentials (E_{h0}) und des pH-Wertes im Boxversuches gemessen im Abfluss

Trotz Datenausfälle lassen die beiden Zugaben von $\text{Fe}(0)$ das Absinken des Redoxpotentials deutlich erkennen. Ebenfalls die Zugabe von Melasse bewirkte ein Absinken des Redoxpotentials auf ca. -200 mV(E_{h0}).

Die PCE-Konzentrationen nach der ersten Fe Injektion, aus den unterschiedlichen Bereichen des Aquifers sind in Abbildung 53 dargestellt. Bei den Probenahmestellen im Abstrom der Eiseninjektion (Transecte TM2 und TM3) war eine Abnahme der PCE-Konzentrationen nach den injizierten Eisenpartikeln auf ca. 12 bis 17% feststellbar im Vergleich zur oberstromigen Messstelle TM1. Im Randbereich wurde hingegen weniger Abbau durch das eingebrachte Eisen registriert (ca. 50% Abnahme). Die zweite Injektion von Eisenpartikeln bewirkte eine vergleichbare Abnahme der PCE Konzentration im Abstrom der Eiseninjektion.

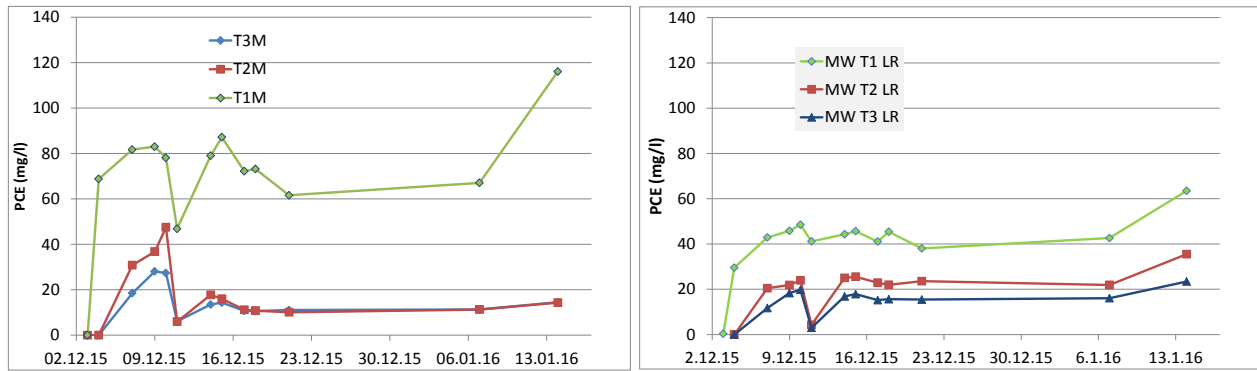


Abbildung 53: PCE Konzentrationen aus unterschiedlichen Bereichen der Versuchsbox während des bisherigen Versuchsverlaufes (Transekt 1 befindet sich oberstromig zu den injizierten Eisenpartikeln, die Transekte 2 und 3 abstromig); der kurzzeitige starke Rückgang der PCE-Konzentrationen am 11.12.2015 wurde durch die Einbringung der Eisensuspension (10.12.2015) hervorgerufen

Die PCE – Konzentrationen 5 cm über dem Stauer und 8 cm unterhalb der Staueroberkante auf Höhe des Transektes 2 sind in Abbildung 54 dargestellt. In der Messstelle 5 cm oberhalb des Stauers (T2O) wurde ein ähnlicher Verlauf auf etwas geringerem Konzentrationsniveau ermittelt wie in der entsprechenden Messstelle direkt auf dem Stauer (T2M).

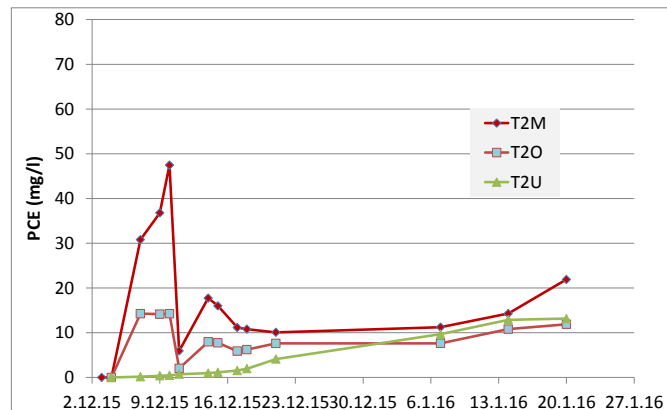


Abbildung 54: PCE-Konzentrationen 5 cm über der Staueroberkante (T2O) auf Höhe des Transektes 2 und im Stauer auf Höhe des Transektes 2 (8 cm unterhalb der Staueroberkante)

Im Bereich des Stauers war der Anstieg der PCE-Konzentration erwartungsgemäß langsamer. Erst nach ca. 5 Wochen konnten ähnliche Konzentrationen festgestellt werden wie in den entsprechenden Messstellen im Aquifer.

Erwartungsgemäß wurden die höchsten Konzentrationen an gelöstem Wasserstoff im zentralen Bereich des Aquifers unmittelbar im Abstrom zu den injizierten Eisenpartikeln gefunden (Probenahme am 11.1.2016), wobei (wahrscheinlich hervorgerufen durch das Aufsteigen von Gasbläschen) im oberen Bereich (T2O) höhere Gehalte auftraten als direkt am Stauer (T2M). Weiter abstromig und im Randbereich des Messtransektes 2 waren die H_2 -Konzentrationen geringer. Auch oberstromig zum injizierten Eisen konnte ein geringer Gehalt an gelöstem Wasserstoff festgestellt werden (T1M).

Tabelle 16: Gehalte an gelöstem Wasserstoff von ausgewählten Probenahmestellen des Boxversuches am 11.1.2016

| Probenahme stelle | gelöster Wasserstoff [mg/l] |
|----------------------|--------------------------------|
| T1M | 0,12 |
| T2R | 0,15 |
| T2M | 1,24 |
| T2L | 0,44 |
| T2O | 1,89 |
| T3M | 0,57 |

Wie bereits in Abbildung 52 dargestellt wurde über die Versuchsdauer (Dezember 2015 – Dezember 2016) zweimal Eisen injiziert und einmal ein mikrobielles Inokulum injiziert. Die Zugabe von 20mL SiREM KB-1 Kultur bewirkte einen ausgeprägten Abbau von PCE sowie die Entstehung von Zwischenprodukten (Abbildung 55). Detaillierte Messwerte aus allen Probenahmestellen in der Kiste sind im Anhang 7.5 dargestellt. Der mikrobielle Abbau bewirkte einen wesentlich stärkeren Abbau von PCE als der rein abiotischen Abbau durch Fe(0). Das Inokulum wurde direkt in dieselbe Aquiferzone zugegeben in die das Eisen injiziert wurde. Die Injektion des Inokulums erfolgte rund drei Monate nach der letzten Fe(0) Injektion. Es ist daher davon auszugehen, dass das Nano Eisen zu diesem Zeitpunkt noch aktiv war. Etwaige hemmenden oder synergistischen Effekte des Nano Eisens auf den mikrobiellen Abbau konnten nicht identifiziert werden. Hierfür wäre eine Vergleichsstudie notwendig in der verschiedene Varianten mit und ohne Eisen miteinander verglichen werden. Eine solche Vergleichsstudie wird im Frühjahr 2017 in Lysimetern durchgeführt (Kapitel 0 und 4.3). Der einjährige Kistenversuch hat jedenfalls gezeigt, dass der geplante Versuchsaufbau stabil über einen langen Versuchszeitraum funktioniert und in dieser Weise auch im Lysimeter umgesetzt werden kann. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der mikrobielle Abbau von PCE unter den getesteten Bedingungen gut funktionieren kann und dass durch eine Kombination von Eisenpartikeln mit einem mikrobiellen Abbau gute Sanierungserfolge erreicht werden können. Die beobachteten PCE Konzentrationen (~80 mg/L) in dem Kistenversuch waren weitaus höher als für gewöhnlich im Feld gemessene Werte und die Flussrate (30 cm/d) kann als ausgesprochen hoch betrachtet werden. Es ist daher davon auszugehen, dass der prozentuelle Abbau von PCE unter Feldbedingungen (geringere PCE Konzentration und geringerer Fluss) unter Umständen deutlich höher sein kann.

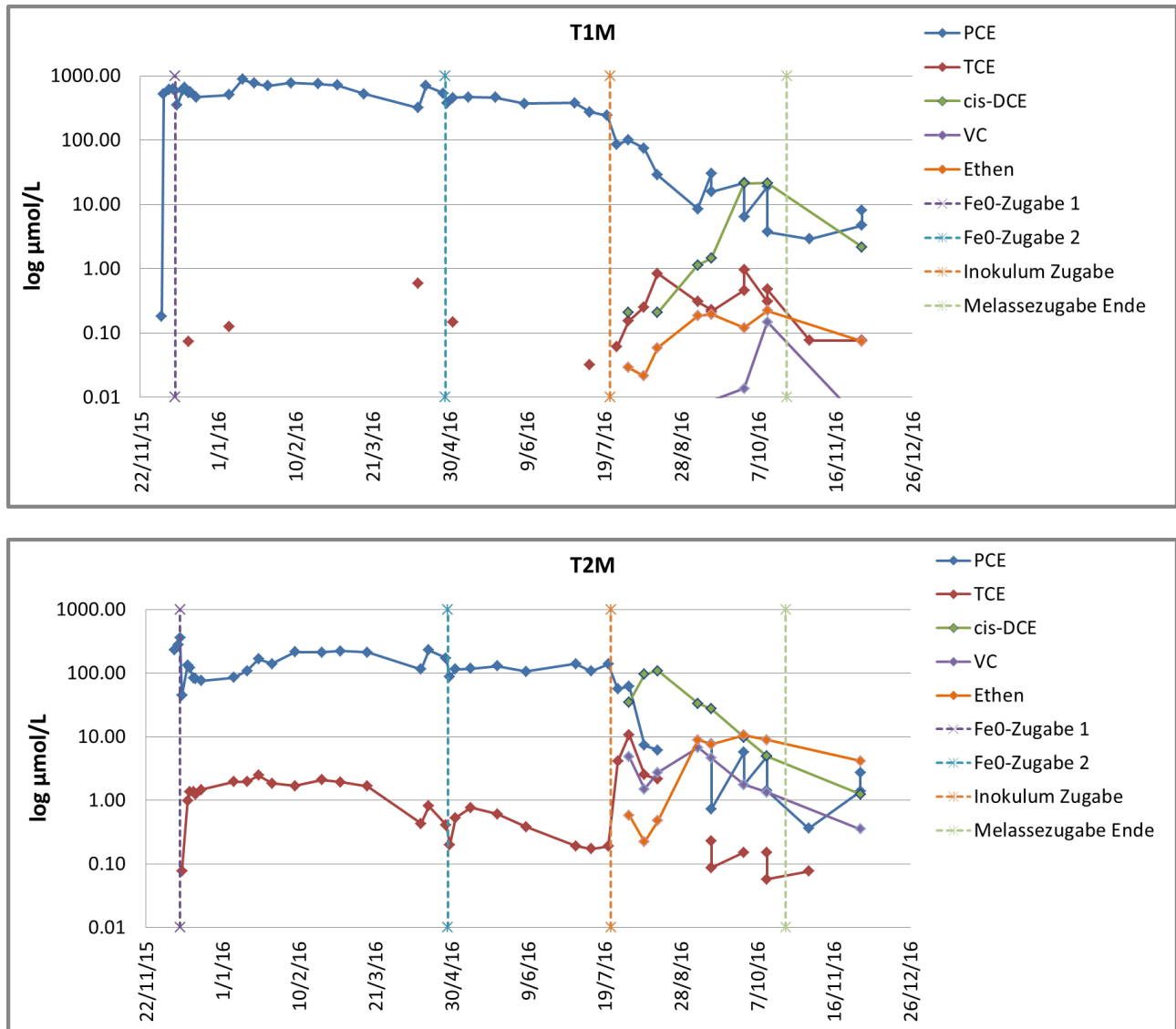


Abbildung 55: CKW Konzentrationen in den mittigen Transekten stromauf von der Injektionsstelle des Inokulums (T1M) sowie stromab der Injektionsstelle des Inokulums (T2M). Die Abbauprodukte cis-Dichlorethen (cis-DCE), Vinylchlorid (VC) und Ethen wurden erst nach Zugabe des Inokulums analysiert.

Mit dem EnzymeFast® Sucrose/D-Glucose/D-Fructose (Romer Labs) wurde der Glukosegehalt von reinen Melassen und Melasse-haltigen Lösungen in Kistenproben bestimmt. Mit diesem Kit wurden unterschiedliche Melassen (erhalten zu unterschiedlichen Zeitpunkten) bezüglich ihres Zuckergehalts verglichen und der Glukoseabbau während des Kistenversuchs untersucht. Zwischen den zwei eingesetzten Melassen bestand bezüglich ihres Glukosegehalts kein starker Unterschied (Abbildung 56). Die Melassen werden sich daher als Kohlenstoffquelle ähnlich verhalten.

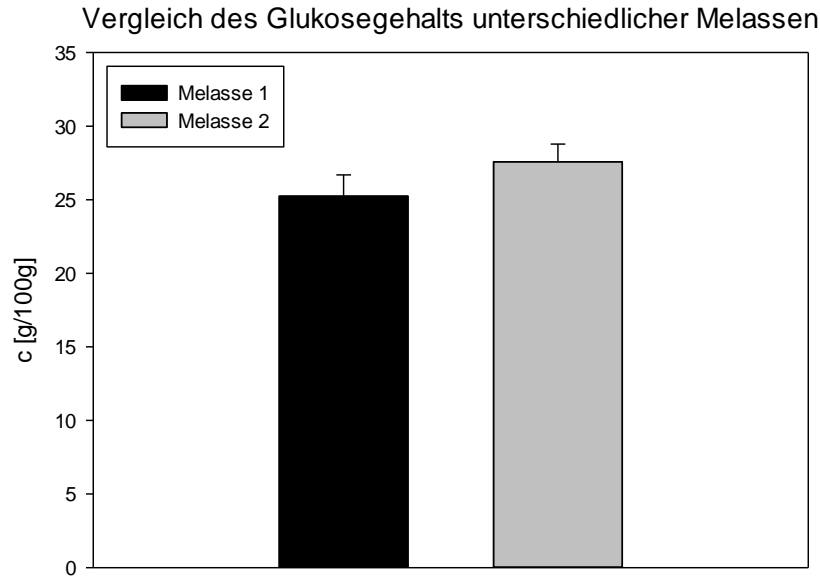


Abbildung 56: Vergleich des Glukosegehalts unterschiedlicher Melassen

Die Glukosewerte für Tank und Zufluss befanden sich im eingestellten Bereich (Abbildung 57), was darauf hindeutete, dass hier keine wesentliche mikrobiologischen, Melasse zehrenden Aktivitäten stattfanden. Der beobachtete Konzentrationsunterschied zwischen Vorratstank und Zufluss ist durch die Verdünnung der Tanklösung zu erklären. Die Melasselösung im Vorratstank diente als Stammlösung für den Zufluss. Der Unterschied im Glukosegehalt zwischen Kistenzufluss und Kistenabfluss deutet auf einen Zuckerabbau und mikrobielle Aktivität in der Kiste hin. Die Glukose wurde nicht völlig verbraucht, das bedeutet, dass es dadurch nicht zu einer Limitierung der mikrobiellen Aktivität kam. Im Lysimeterversuch wird die Überwachung der Melassekonzentration durchgeführt werden um eine solche potentielle Limitierung ausschließen zu können.

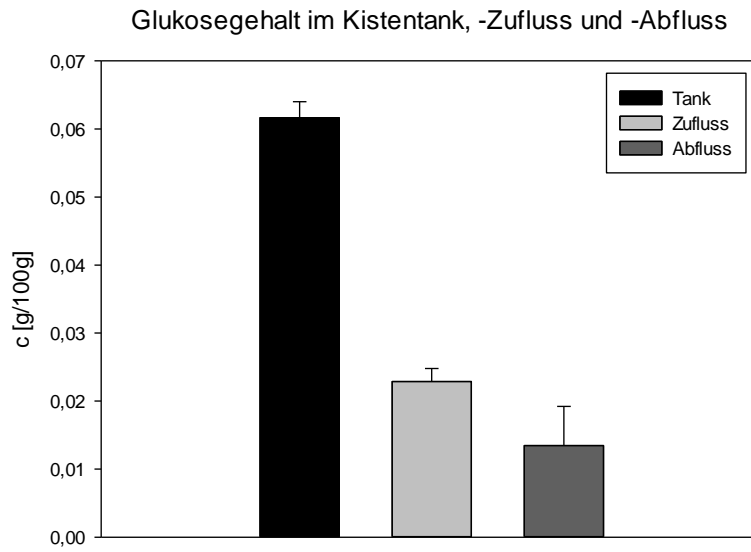


Abbildung 57: Glukosegehalt im Melasse Vorratstank, im Zufluss und im Abfluss der Kiste

4.2 Task 2.2 Konditionierung der Lysimeter

Das Altlastenlysimeter des AIT besteht aus einem überschütteten Stahlbetonbauwerk mit einem Kellerniveau 1,2 m unter dem Umgebungsniveau. Ein zentraler Kreuzgang trennt die vier Kammern der Lysimeteranlage voneinander (Abbildung 58) und ermöglicht die gezielte Einbringung diverser Sensoren und Probenahmestellen in unterschiedlichen Tiefenstufen. Die Kammern haben eine Grundfläche von jeweils 4 m² und sind 3 m hoch.

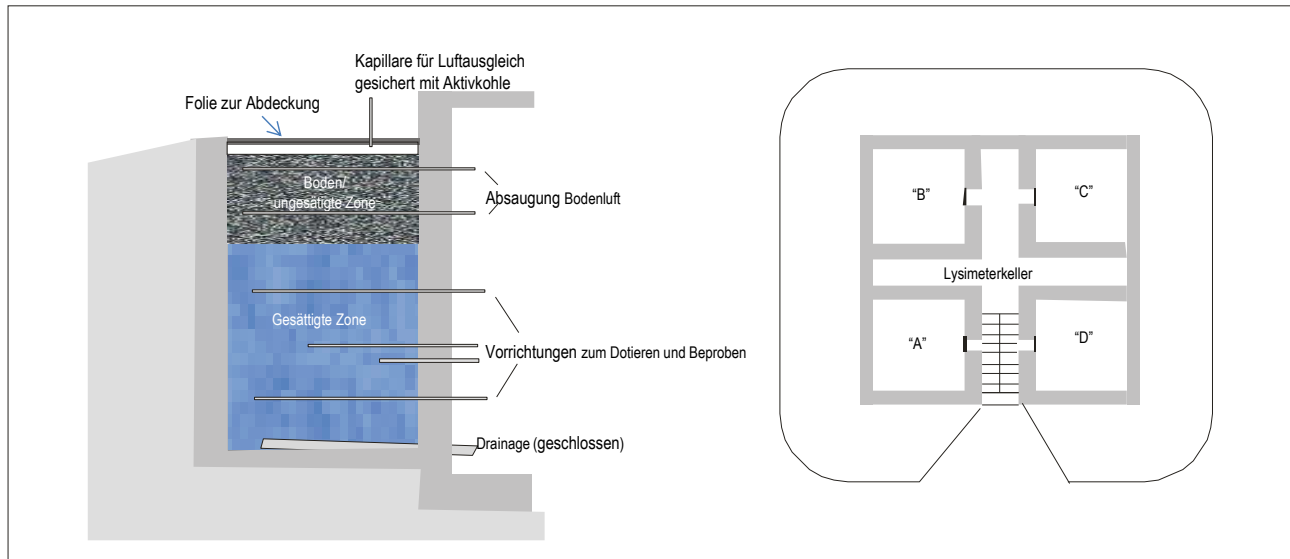


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Altlastenlysimeteranlage am Areal des AIT Austrian Institute of Technology in Seibersdorf

Da die Dehalogenierung von CKW durch Mikroorganismen nur unter anoxischen Bedingungen stattfindet, waren für den Lysimeterversuch in einem ersten Schritt umfangreiche vorbereitende Tätigkeiten notwendig, um für die Versuche die nötige Infrastruktur bereitstellen zu können. Die Entfernung des Sauerstoffs aus dem zufließenden Wasser, die systematische Befüllung der Lysimeterkammern, um anoxische Bedingungen zu garantieren, der kontinuierliche Zufluss über Pumpen, die Probenahmeports sowie die Sensorik inklusive Steuerung wurden entwickelt und vorab im Boxversuch getestet. Der Boxversuch diente vor allem auch dazu, um für den Lysimeter-Abbauversuch eine geeignete Positionierung der Injektionsstellen von PCE und den Eisenpartikeln festzulegen. Des Weiteren wurde die Einbringungsmethoden von PCE und Fe(0) im Boxversuch ausgetestet. Die Ergebnisse des Boxversuches hinsichtlich der gewählten Positionen und eingebrachten Mengen an PCE und Fe(0) ergaben, dass diese auch für die Anlage und den geplanten Variantenvergleich des Lysimeterexperiments eine geeignete Basis darstellen.

Die Befüllung der Lysimeterkammern erfolgte am 8. und 9. November 2016. Dazu wurden in einem ersten Schritt Probenahmeschläuche (Material: PTFE), Injektionsschläuche für PCE und Fe(0) sowie Temperatursensoren (Campbell Scientific in den Kammern installiert (Abbildung 60). Am Boden der

Lysimeterkammern wurde ein poröser Schlauch montiert, um vor der Füllung mit Wasser die gesamte Kammer mit Stickstoff spülen zu können (Abbildung 59a).



Abbildung 59: Positionierung eines porösen Schlauches am Boden der Lysimeterkammern zur Einbringung von Stickstoff und Wasser bei der Erstbefüllung (a), Probennahmeschläuche und perforierte Zu- und Abflussrohre (b) Verdichten des Sandes 0/4 mm beim Einbau (c), Abdichtung der Kammern an der Oberfläche mittels Folie (d)

Danach erfolgte die schichtweise Befüllung mit den unterschiedlichen Bodenmaterialien, um in den Kammern einen künstlichen Aquiferbereich herzustellen (Abbildung 59, Abbildung 60). Im Basisbereich wurde ein Drainagekies (Körnung 4/8 mm) in die Kammern eingebracht. Der Sand 0/4 überlagernd und unterlagernd zum Aquifer wurde mittels Stampfer (Bomag BT60/4) auf eine Rohdichte trocken von $1,64 \text{ g/cm}^3$ verdichtet (Abbildung 59c). Das Aquifermaterial selbst bestand aus einem Quarzsand mit der Körnung 0,5/2 mm (Quarzwerke Melk) und wurde in jede Kammer mit einer Schichthöhe von 20 cm eingebaut. Der dadurch erreichte Unterschied in der Durchlässigkeit zwischen Aquifer und stauenden Schichten betrug mehr als 3 Größenordnungen, wodurch ein möglichst horizontaler Fluss und somit auch ein

horizontaler Transport des Kontaminanten in der relevanten Untersuchungszone induziert wurde. Der Quarzsand 0,5/2 wurde für den Aquiferbereich gewählt, da dieses Material in hoher, gleichmäßiger Qualität lieferbar ist und somit möglichst homogene Bedingungen in den durchströmten Abschnitten der Kammern erreicht werden sollten.

Die Oberseiten der Kammern wurden nach Fertigstellung der Befüllung mit einer PVC Folie gasdicht abgeschlossen, um einen Zutritt von Sauerstoff aus der Atmosphäre zu vermeiden (Abbildung 59 d). Zusätzlich wurde der Raum der oberen Kiesschicht (Körnung 4/8 mm) während der gesamten Versuchsdauer mit Stickstoff gespült.

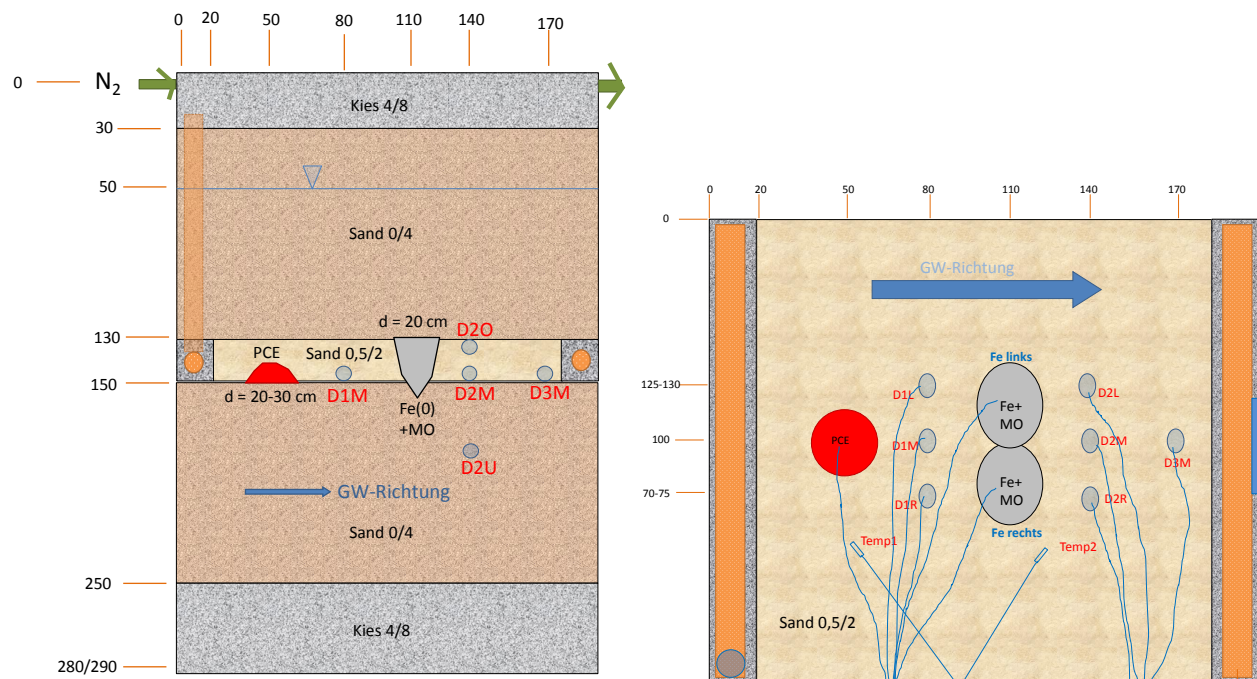


Abbildung 60: Horizontabfolge zur Etablierung eines künstlichen Aquifers (Tiefe 130 bis 150 cm) in den Lysimeterkammern (links, Aufriss) und Positionierung der Probenahmeschläuche, der Injektionsschläuche und der Temperatursensoren im Aquiferbereich. Die Bezeichnung der Beprobungspunkte ist beispielhaft für Kammer D (K-D) ausgeführt (PCE = Perchloroethen, Fe(0) +MO = Injektionsbereich für nullwertiges Eisen (Fe(0) und Mikroorganismen (MO), N₂ = Spülung mit gasförmigen Stickstoff zur Vermeidung von Sauerstoffeintritt).

Nach Spülen der mit Sand und Kies befüllten und abgedichteten Kammern mit Stickstoff von der Basis der Kammern her erfolgte die Befüllung mit sauerstofffreiem Wasser ebenfalls vom Kammerboden aus (Fluss ca. 100 ml/min), um Gase aus dem Porenraum der Bodenmaterialien möglichst vollständig zu verdrängen. Nach Erreichen des gewünschten Wasserspiegels (50 cm unter der Kammeroberfläche bzw. 80 cm über Oberkante des Aquifers) wurde ein Wasserfluss mit ca. 20 ml/min je Kammer eingestellt (dies entspricht einer Abstandsgeschwindigkeit von ca. 16,5 cm/Tag = 0,7 cm/h). Das sauerstofffreie Wasser wurde dabei

über ein perforiertes Rohr (Lochdurchmesser 2 mm) auf der einen Seite des Aquifers über die gesamte Breite eingebracht (Abbildung 59 b). Auf der gegenüberliegenden Seite erfolgte die Exfiltration ebenfalls über ein perforiertes Rohr, wobei der Abfluss durch Konstanthalten des Wasserspiegels in einem korrespondierenden Gefäß im Lysimeterkeller abflusssseitig geregelt wurde. Die perforierten Rohre wurden beim Einbau in Drainagekies (Körnung 3/5,6 mm) eingebettet, um ein Ausspülen von Feinmaterial zu vermeiden. Das zufließende Wasser wurde im Abstand von 1 Stunde auf den Gehalt an gelöstem Sauerstoff (Mettler Toledo InPro6860i) geprüft, um einem unerwünschten Einleiten von O₂ in die Kammern vorzubeugen.

Da durch das Austreiben von Sauerstoff mittels gasförmigen Stickstoff auch das Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht des zufließenden Wassers beeinflusst wurde, wurde in einem weiteren Prozessschritt durch Zufuhr von CO₂ der pH-Wert des Wassers auf pH 6,5-6,7 eingestellt.

An den Probenahmestellen 1M und 2M jeder Kammer wurde zur Messung des pH-Wertes und des Redoxpotentials (ORP) über ein automatisch gesteuertes Magnetventilsystem ein Mal pro Tag Wasser aus dem Aquifer zu einer Durchflussmesszelle ausgeleitet. Um einen etwaigen Einfluss der vorangegangenen Messung auf die aktuelle Messung zu minimieren, wurde die Durchflussmesszelle zuerst zwei Mal für 10 Minuten gespült. Am Ende einer dritten Durchflussphase mit Dauer von 15 Minuten wurde der ORP Messwert erfasst. Die Messung von pH und ORP erfolgte mittels einer Kombielektrode für pH und ORP (Mettler Toledo InPro®4800 SG).

4.3 Task 2.3 Abbauversuche in den Lysimetern

4.3.1 Versuchsdurchführung

Nach der Einstellung von konstanten Fließbedingungen und der Ausbildung eines sauerstofffreien Milieus in den Aquiferbereichen wurden folgende Behandlungen in den vier Kammern (4 Versuchsvarianten) etabliert und die Abbauleistungen sowie die Umweltbedingungen in den Lysimetern überwacht:

- **Kammer A (K-A):** Einbringung von Fe(0) ohne zusätzlicher Kohlenstoffquelle
- **Kammer B (K-B):** Kontrolle (keine Behandlung)
- **Kammer C (K-C):** Kombinierte Einbringung von Fe(0) und einer Kohlenstoffquelle (Melasse) + Mikroorganismen
- **Kammer D (K-D):** Einbringung einer Kohlenstoffquelle (Melasse) für mikrobiellen Abbau + Mikroorganismen

In Tabelle 17 ist ein Überblick über die durchgeführten Maßnahmen während des Versuchsverlaufes dargestellt.

Tabelle 17: Durchgeführte Injektionen des Schadstoffes, des nullwertigen Eisens sowie Einbringung von Melasse während des Versuchsverlaufes

| Datum | Tätigkeit | Durchführung |
|--------------------------|---|--|
| 22.3.2017 | Injektion von PCE | 100 ml PCE in Phase (entspricht 162 g) je Kammer |
| 5.5.2017 | Injektion von Fe(0) | Ca. 320 g Nanoeisen pro Kammer (K-A und K-C) |
| 24.5.2017- 26.9.2017 | Einbringung von Melasse in Kammer C und D | Zudotierung von Melasse in das anströmende Wasser von Kammer C und D (Melassekonzentration im zuströmenden Wasser: 0,6 g/l). |
| 2.6.2017 | Injektion Mikroorganismen | Mikroorganismenkultur SiREM: 500 ml Kultur in Kammer C und D aufgeteilt auf jeweils 2 Injektionsstellen pro Kammer ($1,8 \cdot 10^{11}$ Genecopies Dehalococcoides) |
| 20.10.2017- 19.1.2018 | Einbringung von Melasse in Kammer B | Zudotierung von Melasse in das anströmende Wasser von Kammer B (Melassekonzentration im zuströmenden Wasser: 0,7 g/l). |
| 19.1.2018- 28.2.2018 | Erneute Einbringung von Melasse in Kammer C und D | Zudotierung von Melasse in das anströmende Wasser von Kammer C und D (Melassekonzentration im zuströmenden Wasser: 0,5 g/l) |

Bei der Durchführung der Injektionen wurde vor allem darauf geachtet, keinen Sauerstoff in den Aquiferbereich miteinzubringen. Für die PCE-Injektion wurden die Injektionsschläuche zuerst mit Stickstoff gespült. Danach wurde aus den Kammern ca. 1 Liter sauerstofffreies Wasser in ein Glasgefäß gesaugt, das ständig mit N_2 gespült wurde. Das zu injizierende PCE wurde mittels Spritze durch ein Septum in den unteren Bereich des Glasgefäßes eingebracht (die Dichte von PCE beträgt $1,62 \text{ g/cm}^3$). Durch Öffnen eines Hahnes floss das PCE bei einem Druckunterschied von +1 m Wassersäule in den vorgesehenen Aquiferbereich (siehe Abbildung 60). Aus den Vorversuchen im Labor und den Erkenntnissen des Boxversuchs wurde abgeschätzt, dass der Schadstoffpool einen Durchmesser von ca. 30 cm bei einer Höhe von 2-3 cm über dem Stauer material aufweisen sollte, ohne dass bei den gegebenen gesättigten Bedingungen PCE in Phase in den Stauer infiltrieren kann.

Nach Ausbildung einer Kontaminationsfahne wurde in die Kammern A und C nullwertiges Nanoeisen (Nanofer Star) in jeweils 2 Injektionsstellen 60 cm im Abstrom des PCE Injektionspunktes eingebracht. Dazu

wurde pro Injektionspunkt zweimalig 100 g Eisenpartikel in 400 ml Wasser dispergiert, auf 2,4 l weiterverdünnt und bei einem hydrostatischen Druck von 2 m Wassersäule (~20 kPa) sauerstofffrei (Spülung des Vorratsgefäßes mit N₂) in die Kammern injiziert. Bei der jeweils zweiten Eiseninjektion jeder Injektionsstelle war eine deutliche Verlangsamung bis hin zu einem Stillstand der Infiltration zu beobachten. Insgesamt wurden daher in Kammer A 304 g und in Kammer C 336 g Eisenpartikel eingebracht (somit etwas weniger als die geplanten 400 g). Die Injektionen wurden wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben mit Hilfe von Packern durchgeführt, die ca. 1 cm in den Stauerbereich eingebunden waren. Aus den Ergebnissen der Vorversuche war anzunehmen, dass die laterale Ausdehnung der beiden Injektionsbereiche normal zur Strömungsrichtung ca. 40 cm betrug.

Neun Tage vor Injektion der Mikroorganismen wurde in Kammer C und D Melasse mittels Peristaltikpumpe zudosiert, um eine Ausgangskonzentration von Melasse im Aquiferbereich von 0,6 g/l zu erreichen. Die Einbringung der Mikroorganismen erfolgte in die gleichen Injektionsstellen wie für die Eisenpartikel unter Ausschluss von Sauerstoff (Überführen des Kulturmediums in Gasmäuse in der Glovebox, Spülen der Gefäße während der Injektion mit N₂) und einem hydrostatischen Druck von 10 kPa.

Die Melassedotation in K-C und K-D wurde nicht während der gesamten Versuchsdauer vorgenommen, um den Einfluss von Fe(0) bei Fehlen einer externen Kohlenstoffquelle erkennen zu können. Andererseits wurde während dieser Versuchsphase Melasse in die Kontrollvariante (Kammer B) eingeleitet, um den Effekt von Melasse auf den Abbau von PCE ohne zusätzliche Inokulation mit Mikroorganismen feststellen zu können. Kurz vor Versuchsende wurde die Melassezufuhr in den Kammern C und D erneut aktiviert, um dem Einfluss eines mehrmonatigen Aussetzens der C-Quellenzufuhr auf die PCE-Abbauleistungen nachgehen zu können.

Die Beprobung des Grundwasserbereichs der 4 Kammern erfolgte durch Ausleitung von Wasser mittels perforierter Teflonschläuche. Die angewandten analytischen Methoden (Ermittlung von PCE, Abbauprodukten, Wasserstoff sowie Anionen) sind in Kapitel 7.2 beschrieben. Um den Gehalt an PCE in dem mit N₂ gespülten Bereich oberhalb der gesättigten Zonen der Lysimeterkammern zu erfassen, wurde der Gasstrom mehrere Stunden bei einem Pumpfluss von 100 ml/min durch Aktivkohleröhrchen (ORBO 100 HBr on Carbotrap, Supelco) geleitet, um das vorhandene PCE zu adsorbieren. Die Aktivkohle wurde in weiterer Folge mittels MTBE extrahiert und der PCE-Gehalt mittels GC-ECD bestimmt.

Der Wasserfluss durch die Kammern wurde in ca. 1-wöchigen Intervallen erfasst, indem der Ausfluss über 24 Stunden gesammelt und ausgelitert wurde.

4.3.2 Fluss durch die Lysimeterkammern und Milieubedingungen

Der Fluss durch die Kammern während des Versuchsverlaufes konnte auf vergleichbaren Niveau gehalten werden, obwohl durch die Dotation mit Melasse eine Bildung von exopolymeren Substanzen in den Zuleitungssystemen hervorgerufen wurde, wodurch eine regelmäßige Reinigung der Schläuche notwendig war. Der kumulative Abfluss aus den Kammern ist in Abbildung 61 dargestellt. Lediglich in Kammer A bildete sich im Versuchsverlauf ein etwas höherer Abfluss aus.

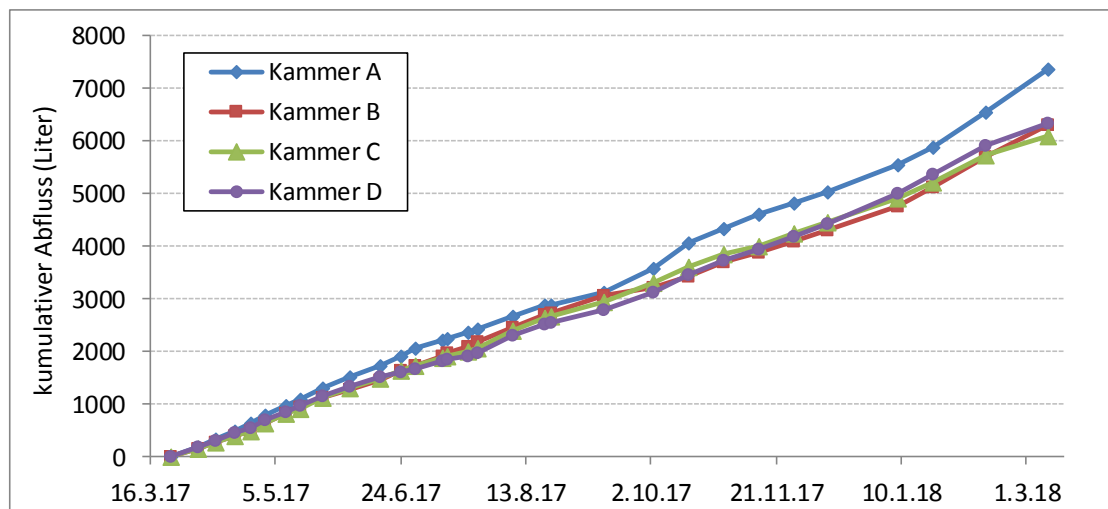


Abbildung 61: Kumulativer Abfluss aus den Lysimeterkammern ab Dotation mit PCE

Die mittlere Flussrate, die gesamte durch die Kammern geflossene Wassermenge, die Anzahl der durchströmten Porenvolumina (bezogen auf den 20 cm mächtigen Aquiferbereich) und die durchschnittliche Abstandsgeschwindigkeit in den Kammern sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Ausgewählte Durchflussparameter der Lysimeterkammern während der Versuchsdauer (ab Dotation mit PCE: 22.3.2017 bis 10.3.2018)

| Parameter | Kammer A | Kammer B | Kammer C | Kammer D |
|--|----------|----------|----------|----------|
| Mittlere Flussrate (ml/min) | 14,6 | 12,5 | 12,0 | 12,5 |
| Durchströmte Wassermenge (Liter) | 7383 | 6320 | 6084 | 6340 |
| Anzahl durchströmter Porenvolumina | 25,9 | 22,2 | 21,3 | 22,2 |
| Mittlere Abstandsgeschwindigkeit (m/d) | 0,13 | 0,11 | 0,11 | 0,11 |

Die Aquiferbereiche aller Kammern wiesen während des Versuchszeitraums vergleichbare Temperaturen auf, wobei diese zwischen 9°C (März 2017) und 21°C (August 2017) variierten. Ab Mitte Dezember 2017

wurde die Temperatur im Lysimeterkeller und somit auch die Temperatur des in die Kammern einströmenden Wassers auf ca. 15 bis 16°C temperiert, um ein weiteres Absinken der Temperaturen in den Kammern zu vermeiden. Die Aufspreizung der Temperaturwerte nach Beginn der Erwärmung des zuströmenden Wassers von ca. 1 bis 1,5°C zwischen dem oberstromig gelegenen Sensor 1 und dem abstromig gelegenen Sensor 2 (siehe Abbildung 60), dürfte darauf zurückzuführen sein, dass das erwärmte Wasser im Verlauf der Fließstrecke etwas abkühlte.

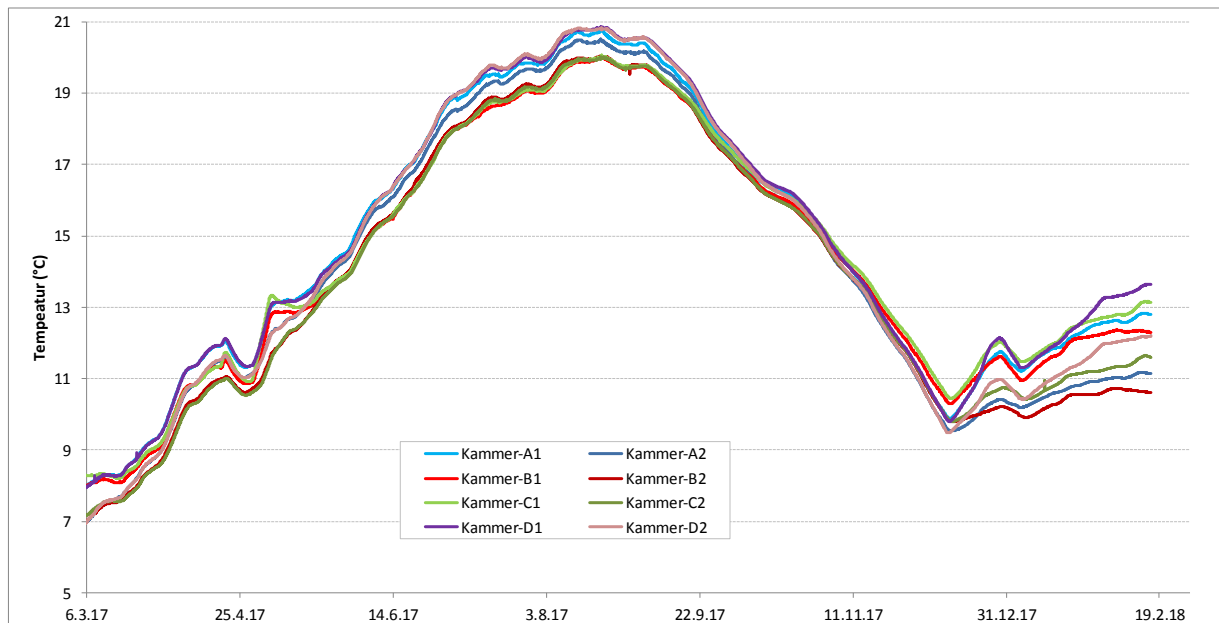


Abbildung 62: Temperaturverlauf in den Aquiferbereichen während des Versuchszeitraums (März 2017-Februar 2018)

Der Verlauf der pH-Werte wurde jeweils in den Beprobungspunkten 1 und 2 des mittleren Transsekt (1M, 2M: vor und nach dem Injektionsbereich von Fe(0) bzw. der Mikroorganismen) erfasst. Zu Beginn des Lysimeterexperiments war im Wasser der Aquiferbereiche bedingt durch die Produktion von sauerstofffreiem Wasser und der dadurch ebenfalls stattfindenden Abreicherung von CO₂ ein Anstieg des pH-Wertes über pH 7,5 zu beobachten (Abbildung 63). Durch Zudotieren von gasförmigen CO₂ in einem weiteren Prozessschritt wurde daher im zuströmenden Wasser eine Regulation des pH-Wertes vorgenommen. Nach einer zu hohen Zufuhr an CO₂ sank der pH-Wert im Verlauf des April 2017 bis unter pH 6. Ab Mai 2017 bis zum Versuchsende konnten die pH-Werte auf einem für die Mikroorganismen günstigen pH-Bereich zwischen pH 6,3 und 7,5 gehalten werden. Direkt nach der Melasseeinleitung in die Kammern kam es zu einer Absenkung des pH-Wertes um ca. eine halbe pH-Einheit. Die Oxidation des eingebrachten elementaren Eisens hingegen verursachte erwartungsgemäß durch Bildung von OH⁻ - Ionen eine pH-Erhöhung in den Messstellen A2M und C2M abstromig zu den jeweiligen Injektionsstellen. Trotz der Zufuhr von Melasse blieb der pH-Wert an der Beprobungsstelle C2M fast während der gesamten Versuchsdauer auf höherem Niveau im Vergleich zur äquivalenten Messstelle in K-D (Variante mit Melasse/Mikroorganismen ohne

Fe(0)). Erst nach der neuerlichen Zufuhr von Melasse im Jänner 2018 war eine beginnende pH-Wert Erniedrigung ebenfalls in K-C (Beprobungspunkt 2M) ab Mitte Februar 2018 zu beobachten. Die Absenkung des pH-Wertes durch das Einbringen von Melasse war über eine Dauer von ca. einem Monat zu beobachten. Danach pendelte sich der pH-Wert wiederum auf dem Ausgangsniveau ein.

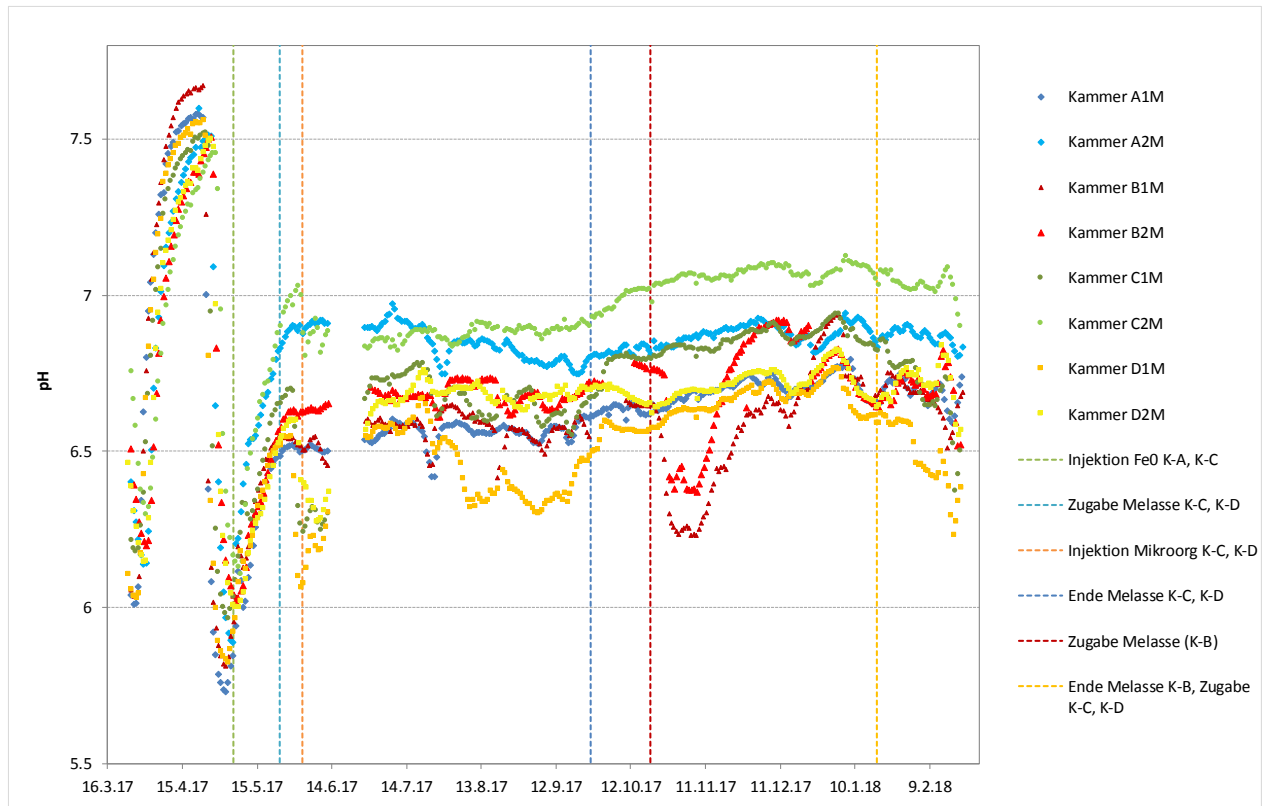


Abbildung 63: Verlauf der pH-Werte in den Aquiferbereichen der Lysimeterkammern jeweils in den Beprobungspunkten 1 und 2 des mittleren Transsekts

Der Verlauf des Redox-Potentials (ORP) in den einzelnen Kammern wurde ebenfalls in den Beprobungspunkten 1 und 2 der mittleren Transekte (vor und nach dem Injektionsbereich von Fe(0) bzw. der Mikroorganismen) erfasst. Da bekannter Maßen die Messung des ORP sensitiv hinsichtlich der Alterung des Sensors und auf Ablagerung auf der Elektrode ist, wurden zusätzlich in regelmäßigen Abständen Anionen und der Gehalt an Methan in ausgewählten Punkten der Aquiferbereiche analysiert, um die Plausibilität der ORP-Messungen zu erheben. Tabelle 19 gibt einen aus der Literatur übernommenen Überblick über Redoxpotentiale, die sich bei Ablauf verschiedener Redoxreaktionen einstellen. Wesentlich für den mikrobiellen Abbau von chlorierten Ethenen ist das Erreichen eines Redoxpotentials im Sulfat-Reduktionsbereich beginnend bei -50 mV bis zu einem ORP von -180 mV, bei dem Sulfat vollständig

reduziert sein sollte. Das in der Literatur gefundene ORP, welches sich bei den relevanten Redoxreaktionen einstellt, ist je nach Autor etwas unterschiedlich. Tabelle 19 inkludiert daher 2 Literaturquellen

Tabelle 19: Literaturangaben zu Bereichen von Redoxpotentialen für verschiedene Redoxreaktionen umgerechnet auf pH 7 bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode (aus: Scheffer/Schachtschabel, 2010 und Stumm&Morgan, 1996)

| Bereich der Redoxreaktion | Scheffer/Schachtschabel | Stumm&Morgan |
|--|-------------------------|---------------|
| | Eh (mV) | Eh (mV) |
| NO ₃ -Reduktion | 550 bis 220 | 400 bis 100 |
| Mn ²⁺ Bildung | <450 | 550 bis 100 |
| O ₂ Reduktion (Sauerstoffzehrung) | >330 | 800 bis 200 |
| Fe ²⁺ Bildung | <150 | 50 bis -500 |
| Sulfat-Reduktion | -50 bis -180 | -50 bis -650 |
| CH ₄ Bildung | <-120 | -180 bis -700 |
| Bildung H ₂ (g) | -400 | -400 bis -800 |

Zu Beginn weisen alle Kammern ein ORP zwischen 300 und 500 mV auf und liegen daher im Bereich von sauerstofffreiem Wasser mit beginnender Nitratreduktion. Die Injektion von nullwertigem Eisen verursachte in den Messpunkten A2M und C2M erwartungsgemäß ein Absinken des ORP (A2M auf <-100; C2M auf <0). Deutlich zu erkennen ist auch die Auswirkung der Melasseeinleitung in Kammer C und Kammer D beginnend ab Ende Mai 2017. Ab Mitte Juli 2017 wurde in diesen Aquiferbereichen ein stabiles ORP bei ca. -200 mV erreicht. Das ORP in der unbehandelten Variante K-B hingegen blieb während dieses Zeitraumes relativ konstant auf einem Niveau zwischen 150 mV und 200 mV, während es in K-A in einem Bereich zwischen +100 und -100 mV schwankte. Die Beendigung der Melassezufuhr in K-C und K-D bewirkte einen Anstieg des ORP auf ca. -50 mV. Klar ersichtlich ist auch das Absinken des ORP ab Ende Oktober 2017 in K-B hervorgerufen durch die Zufuhr von Melasse in diese Kammer. Da nach einer Reinigung des Redoxsensors Mitte November 2017 nicht mehr das Messniveau wie vor der Reinigung erreicht wurde, ist die Korrektheit der Absolutwerte des ORP im Herbst 2017 bis Mitte Dezember anzuzweifeln. Nach Einbau einer neuen Sonde Mitte Dezember 2017 konnte wiederum das Absinken des Redoxpotentials durch die wieder aufgenommene Einleitung von Melasse in K-C und K-D erfasst werden.

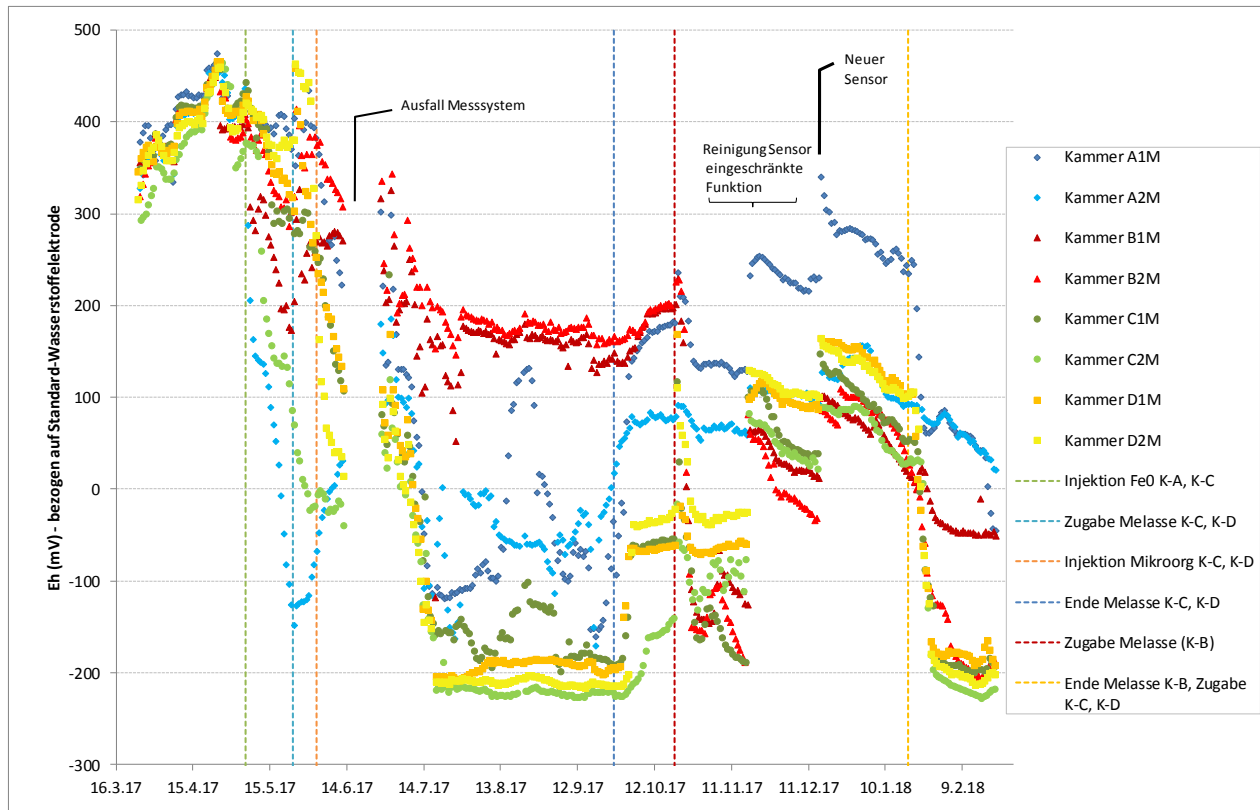


Abbildung 64: Verlauf der Redoxpotentiale in den Aquiferbereichen der Lysimeterkammern jeweils in den Beprobungspunkten 1 und 2 des mittleren Transsekt

Die Ausgangskonzentration an Nitrat des verwendeten Leitungswassers am Versuchsstandort lag im Untersuchungszeitraum in einem relativ niedrigen Bereich zwischen 2 und 4 mg/l. Nitrat kann daher bei vorliegenden reduzierenden Milieubedingungen rasch zur Gänze gezehrt werden. Insgesamt korrespondiert der Verlauf der Nitratkonzentrationen in den Aquiferbereichen (Abbildung 65) deutlich mit dem Verlauf des ORP. In den Messpunkten der Kontrollvariante K-B und im Messpunkt 1M der Kammer A (vor dem Bereich der Fe(0)-Injektion) wurde trotz Entfernung des Sauerstoffs aus dem Wasser das Nitrat kaum reduziert, da entweder das ORP nicht tief genug war, die Aufenthaltsdauer im Versuchsaquifer nicht ausreichend lang war oder nicht genug organische Substanz für die Oxidationsreaktion vorhanden war. Hingegen verursachte die Erniedrigung des ORP durch die Einleitung von Melasse in K-C und K-D eine fast vollständige Zehrung von Nitrat im Zeitraum Juni 2017 bis September 2017 (Ende der 1. Phase der Melasseeinleitung). Danach erfolgte ein geringer Anstieg der Nitratkonzentration in diesen Kammern bis die erneute Zufuhr von Melasse (Mitte Jänner 2018) wiederum ein Absinken des Nitratgehaltes bewirkte. Die Einleitung von Melasse in Kammer B ab Mitte Oktober 2017 zeigte den gleichen Effekt. Die Einbringung von Fe(0) in K-A bewirkte eine weitgehende Reduktion des Nitrats über 4 bis 5 Monaten. Ab Oktober 2017 war in weiterer Folge ein leichter Anstieg der Nitratkonzentration zu beobachten. Warum in K-D bereits zu Beginn und in den anderen

Kammern auch zum zweiten Messzeitpunkt niedrige Nitratwerte vorlagen ist unklar. Möglicherweise lagen zu Beginn geringe Mengen an organischer Substanz vor, die eine Nitratzehrung bewirkten.

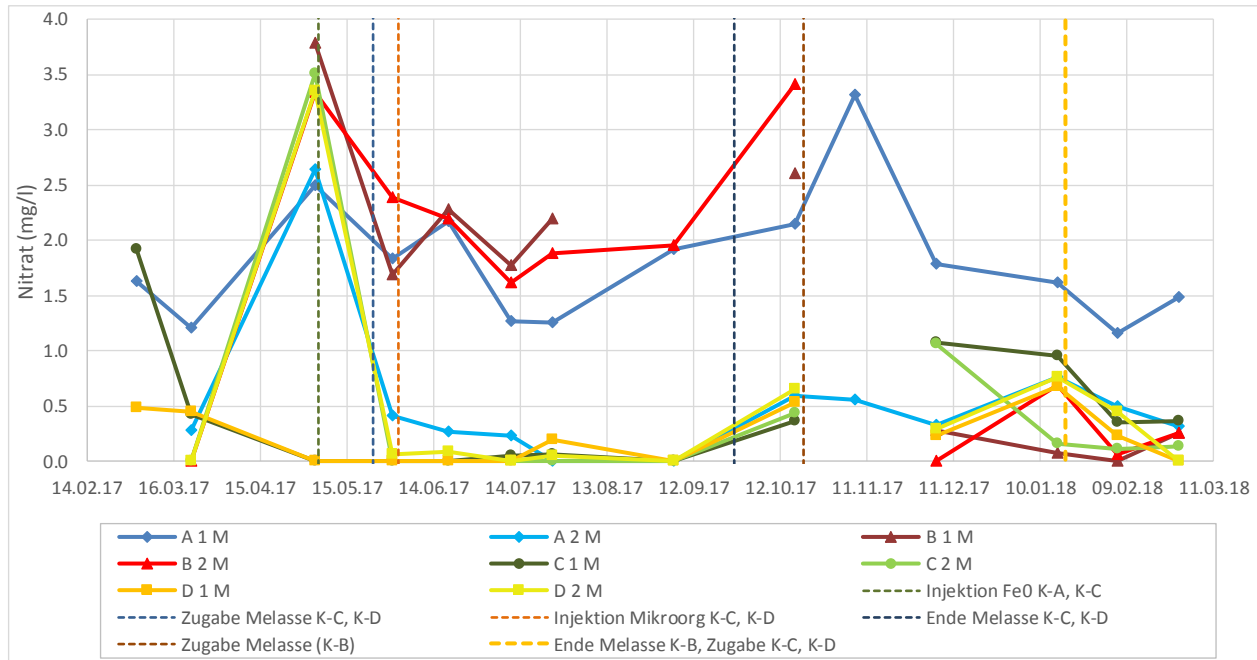


Abbildung 65: Verlauf der Nitratkonzentrationen in den Aquiferbereichen der Lysimeterkammern jeweils in den Beprobungspunkten 1 und 2 des mittleren Transsekt

Die Sulfatkonzentration korrespondierte ebenso deutlich mit dem gemessenen ORP in den Aquiferbereichen der Lysimeterkammern (Abbildung 66, sowie direkter Vergleich in Abbildung 67). So bewirkte die Einleitung von Melasse eine weitestgehende Reduktion von Sulfat in K-B, K-C und K-D (jeweils während der Dauer der Melasseeinleitung) während durch die Injektion von Fe(0) in Kammer A (Punkt A2M) keine deutliche Verringerung der Sulfatkonzentration festgestellt werden konnte. Der Ausgangsgehalt von Sulfat im Leitungswasser lag bei ca. 70 mg/l. Die Erhöhung der Sulfatkonzentration in K-C und K-D kurz nach Beginn der Melasseeinleitung ist höchstwahrscheinlich auf das durch die Melasse zugeführte Sulfat zurückzuführen. Keine Übereinstimmung zwischen Sulfatgehalt und ORP lag in K-B zu Versuchsende nach Beendigung der Melasseeinleitung vor. Während im Februar 2018 das Redoxpotential auf ca. -200 mV absank, stieg der Sulfatgehalt auf das Ausgangsniveau.

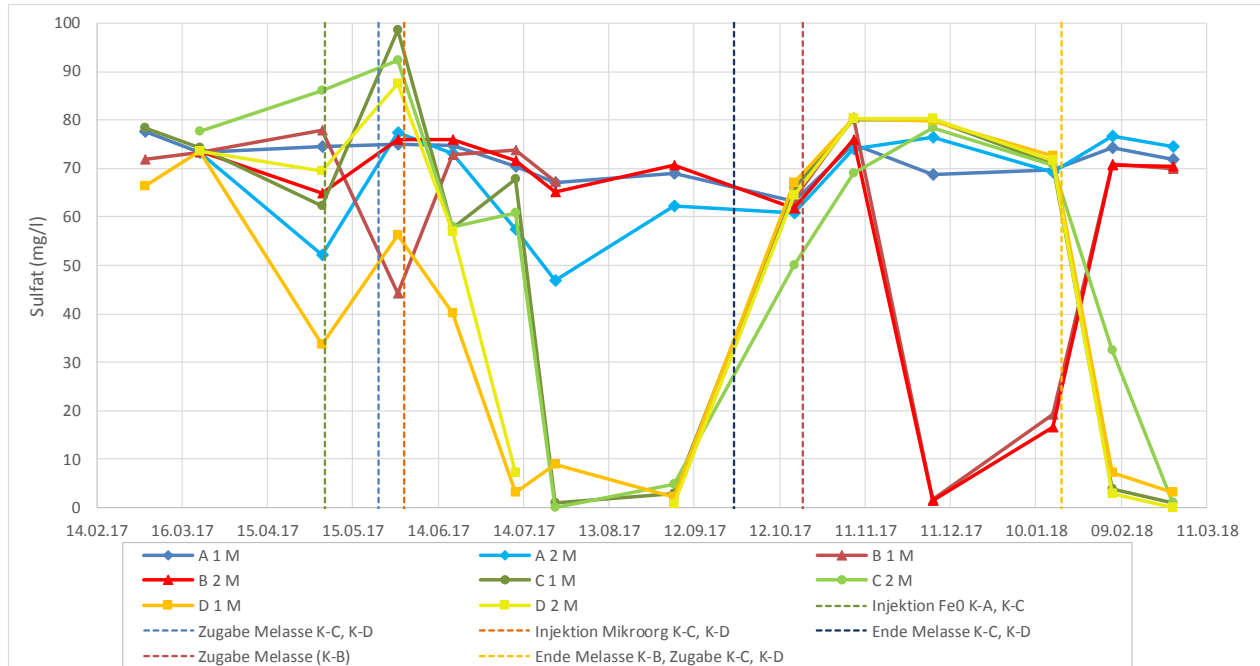


Abbildung 66: Verlauf der Sulfatkonzentrationen in den Aquiferbereichen der Lysimeterkammern jeweils in den Beprobungspunkten 1 und 2 des mittleren Transsektiv

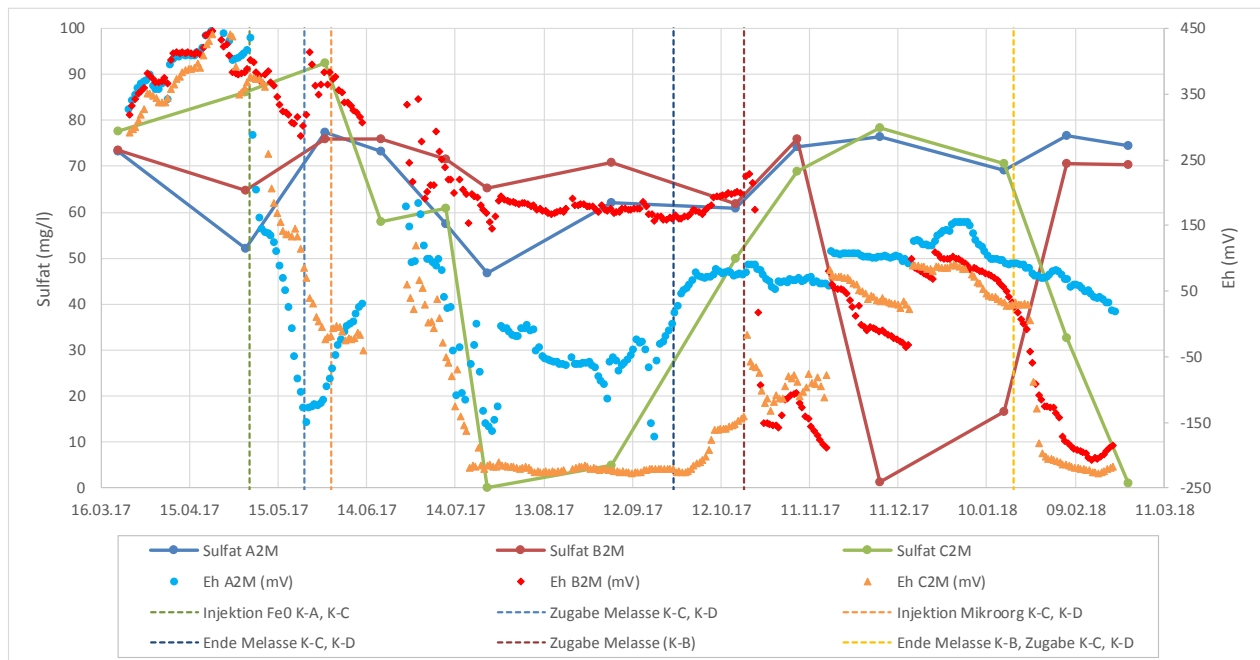


Abbildung 67: Vergleich der Sulfatkonzentrationen und des ORP in ausgewählten Beprobungspunkten

Erwartungsgemäß setzte ca. 1,5 Monate nach Beginn der Melasseeinleitung in K-C und K-D eine Produktion von Methan in den Aquiferbereichen ein (Abbildung 68). Nach Beendigung der Melassezufuhr kam es in den oberstromigen Bereichen dieser beiden Kammern zu einem relativ raschen Absinken der Methankonzentration, während im Abflussbereich noch deutlich länger höhere Konzentrationen erfasst werden konnten. In K-A konnte lediglich im Abfluss der Kammer höhere Konzentrationen an Methan gemessen werden. Auch in K-B wurde nach Beginn der Melassezufuhr eine Bildung von Methan beobachtet, allerdings nur in geringem Ausmaß (möglicher Weise bedingt durch die niedrigeren Temperaturen zu diesem Zeitpunkt).

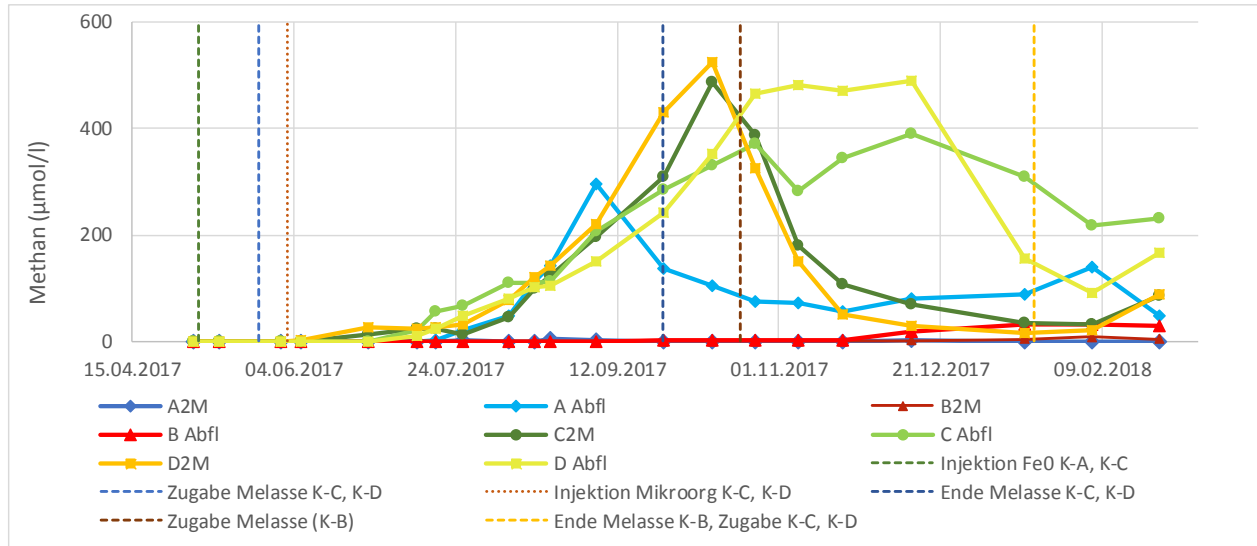


Abbildung 68: Verlauf der Methankonzentrationen in den Aquiferbereichen der Lysimeterkammern jeweils in den Beprobungspunkten 2 des mittleren Transsektts und im Abfluss.

4.3.3 Bildung von Wasserstoff

Durch die Injektion von Fe(0) erfolgte in den Lysimeterkammern A und C eine messbare Bildung von Wasserstoff. Gelöster Wasserstoff konnte in den abstromig gelegenen Messpunkten A2M und C2M ca. 10 bis 20 Tage nach der Injektion nachgewiesen werden (Abbildung 69). Das Maximum der Wasserstoffkonzentration wurde in diesen Punkten ca. ein Monat nach der Injektion erreicht. Während in Kammer C ab Anfang Juli (zwei Monate nach Injektion) kein Wasserstoff mehr nachgewiesen werden konnte (die Nachweisgrenze der Analytik lag bei 0,01 mg/l), trat in Kammer A bis Mitte August (3,5 Monate nach Injektion) noch Wasserstoff im Messpunkt direkt im Abstrom der Injektionsstelle auf. Analog zu den Beobachtungen in den Batchversuchen weisen diese Daten darauf hin, dass die hohe mikrobielle Aktivität im Aquifer der Kammer C (Variante mit injizierten Mikroorganismen und Kohlenstoffquelle) eine höhere Wasserstoffzehrung verursachte als in Kammer A (Variante ohne Mikroorganismen).

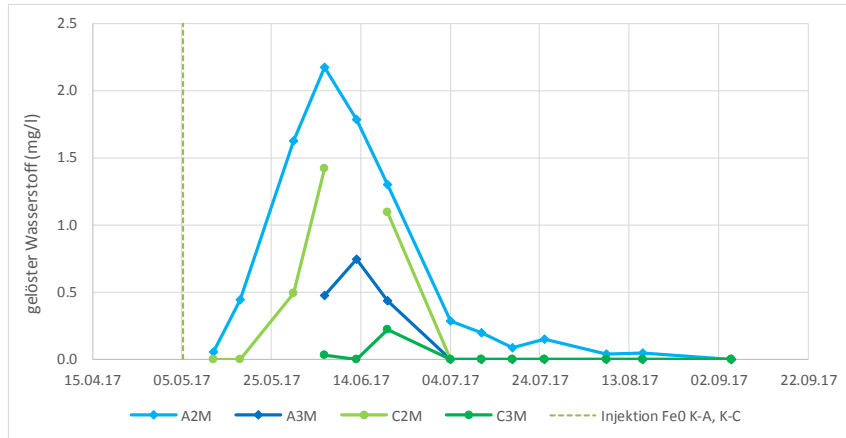


Abbildung 69: Verlauf der Konzentrationen an gelöstem Wasserstoff in den Aquiferbereichen abstromig zur Injektion von Fe(0) in den Kammern A und C.

In den oberstromig zu den Fe(0)-Injektionsstellen gelegenen Beprobungspunkten A1M und C1M sowie in den Beprobungspunkten der Kammern B und D (in die kein Fe(0) injiziert worden war) konnte zu keinem Messzeitpunkt eine Wasserstoffkonzentration über der Nachweisgrenze gefunden werden.

4.3.4 Verlauf der (C)KW-Konzentrationen und PCE-Abbau

Die Konzentrationsverläufe von PCE und den in den jeweiligen Kammern gebildeten Abbauprodukte (TCE, cis-DCE, Vinylchlorid, Ethen und Ethan) sind detailliert im Anhang Kapitel 7.6 dargestellt. Weitere in der GC-Analytik miterfasste chlorierte Ethene (1,1-DCE, Trans-1,2-DCE) sowie Ethin lagen während des gesamten Untersuchungszeitraumes unter der Bestimmungsgrenze.

Etwa ein Monat nach Dotation der PCE-Phase in den oberstromigen Bereichen der Kammern waren die Konzentrationen an gelöstem PCE in den Beprobungspunkten des mittleren Transsektts vor den jeweiligen Behandlungszonen („Ausgangskonzentrationen“) auf einem hohen, relativ stabilen Niveau, wobei es wahrscheinlich bedingt durch unvermeidbare Variabilitäten wie eine nicht vollkommen idente Ausführung der Einbauten und durch geringe Unterschiede beim Probenhandling zu einer gewissen zeitlichen Variabilität und zu Unterschieden zwischen den einzelnen Kammern kam (Abbildung 70).¹ In der Kontrollvariante K-B waren die Konzentrationen in diesem Bereich fast während des gesamten Untersuchungszeitraum geringer als in den übrigen Varianten. Bei den Varianten K-C (Mikroorganismen + Fe(0)) und K-D

¹ Solche unvermeidbaren Variabilitäten können im Laborexperiment relativ leicht durch die Durchführung desselben Ansatzes in mehreren Wiederholungen (Replikaten) ausgemittelt und statistisch erfasst werden. Im Lysimeter ist das auf Grund der Beschränkung der vier Kammern, aber auch auf Grund des bedeutend höheren Aufwandes bei der Durchführung des Versuches nicht notwendig. Die Lysimeter-Experimente haben vielmehr ihre Bedeutung durch ihre wesentlich größere Realitätsnähe und stellen somit ein wesentliches Verbindungselement zwischen Laboruntersuchungen und Pilotversuchen im Feld dar.

(Mikroorganismen) kam es tendenziell ab Ende Juli 2017 und klarer ersichtlich ab Februar 2018 zu einer Abnahme der PCE-Konzentration. Dies war darauf zurückzuführen, dass durch das Einleiten von Melassen bereits oberstromig zu den Behandlungszonen ein PCE-Abbau zu TCE sowie vor allem weiter zu cis-DCE einsetzte (Abbildung 71).

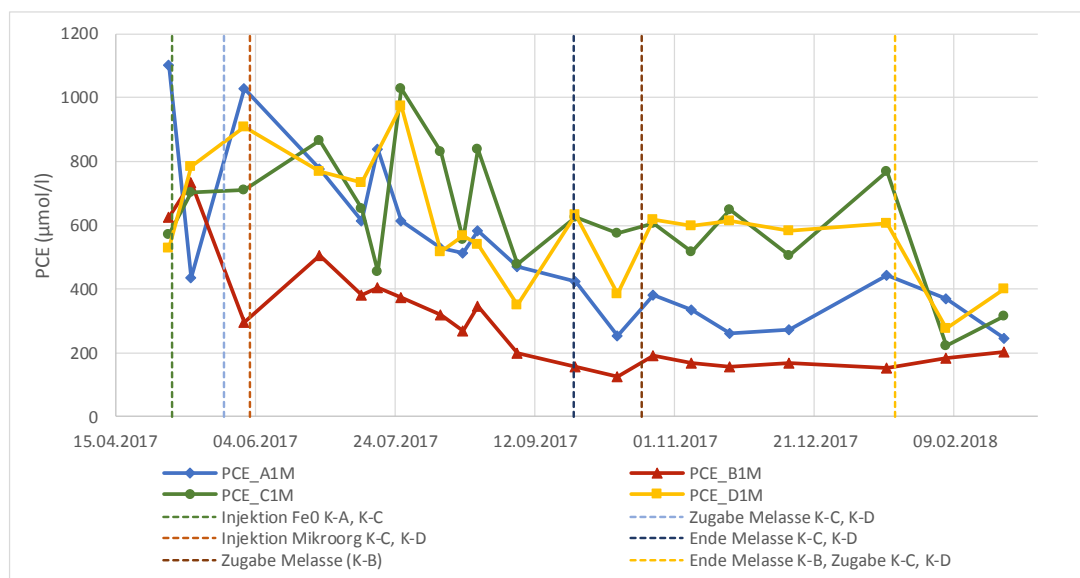


Abbildung 70: Verlauf der PCE-Konzentrationen in den Beprobungspunkten abstromig zur PCE-Quelle (1M) bzw. oberstromig zu den jeweiligen Behandlungszonen.

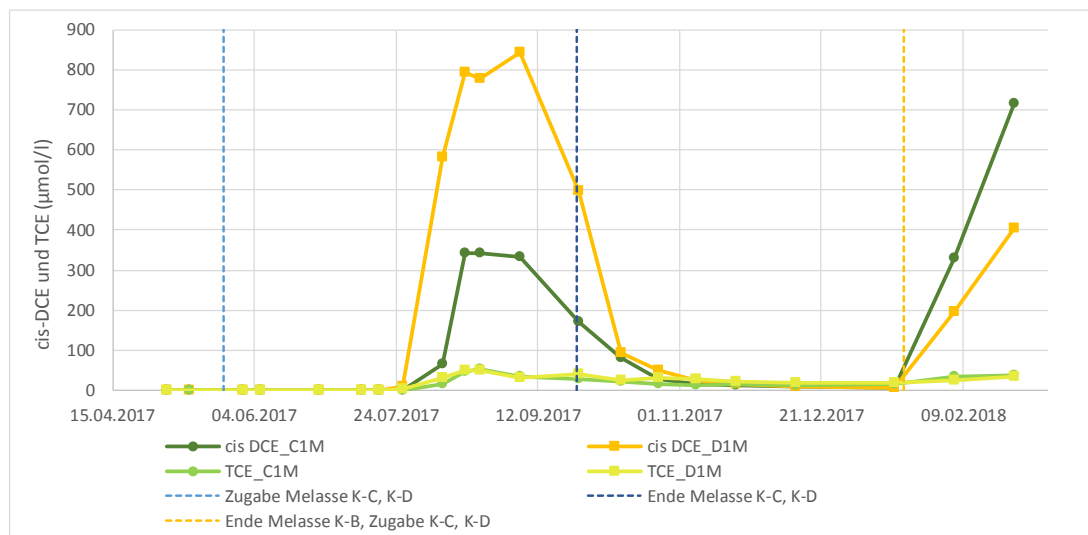


Abbildung 71: Verlauf der TCE- und der cis-DCE-Konzentrationen in den Beprobungspunkten in K-C und K-D abstromig zur PCE-Quelle (1M) vor den jeweiligen Behandlungszonen. In den Kammern A und B wurden in diesen Bereichen (1M) während des gesamten Versuchszeitraumes kein TCE und cis-DCE nachgewiesen.

In den Kammern A und B konnte hingegen über den gesamten Versuchszeitraum kein TCE und kein cis-DCE in diesem Bereich nachgewiesen werden. Der Abbau des PCE in K-C und K-D an dieser Stelle (C1M, D1M) erfolgte nur bis zum cis-DCE. Vinylchlorid (VC) und Ethen wurde nicht gebildet.

Nach der Injektion von Fe(0) Anfang Mai 2017 in K-A und K-C kam es in den jeweiligen abstromigen Beprobungspunkten dieser Kammern (2M) zu einer Abnahme der PCE-Konzentration, etwas stärker ausgeprägt in K-A im Vergleich zu K-C (Abbildung 72 links). Durch die Einleitung von Melasse und der Injektion von Mikroorganismen wurde innerhalb weniger Tage ein Abbau von PCE hervorgerufen, der konstant bis zur Beendigung der Melasseeinleitung Ende September 2017 anhielt (Abbildung 72 links). Nach Beendigung der Melassezufuhr stiegen in K-C und K-D die PCE-Konzentrationen wieder auf das ursprüngliche Ausgangsniveau (über 200 µmol/l) an, bis die neuerliche Einleitung von Melasse Mitte Jänner 2018 wiederum einen starken PCE-Abbau ebenfalls innerhalb weniger Tage induzierte. Die Beschickung von Kammer B mit Melasse ab Ende Oktober 2017 (Variante ohne zusätzliche Mikroorganismen und ohne Fe(0)) ließ nur im Abflussbereich eine geringe Abnahme an PCE erkennen, die durch die Bildung der Abbauprodukte TCE und cis-DCE bestätigt wurde (siehe Anhang 7.6). Im Bereich des Abflusses wurde Wasser, das zentral den PCE-Herd umströmte und damit hoch kontaminiert war und danach die ebenfalls mittig gelegenen Behandlungszonen durchströmte mit dem im gesamten Aquiferquerschnitt fließenden Wasser, das nur in geringerem Ausmaß (oder gar nicht) mit PCE beladen war, gemischt. Diese Vermischung bewirkte im Fall der Kammern A und B eine Konzentrationsabnahme von PCE um den Faktor 5 bis 10 (Abbildung 72 rechts). Die Konzentrationen an PCE in K-C und K-D im Abfluss blieben während der Dauer der Melasseeinleitung im Vergleich zu den Beprobungspunkten 2M und 3M auf einem vergleichbaren Niveau. Daraus kann geschlossen werden, dass das die Behandlungszonen seitlich umströmende Wasser im Durchschnitt eine ähnliche PCE-Konzentration aufwies wie der zentral abfließende Wasseranteil, der die Injektionszonen durchströmte, in denen PCE abgebaut wurde. Nach Beendigung der Melassezufuhr in K-C und K-D konnte im Abfluss von K-D eine leichte Zunahme der PCE-Konzentration beobachtet werden, während in K-C die PCE-Konzentrationen auf niedrigem Niveau konstant blieben. Zu Beginn der Messserie lagen die Gehalte an PCE im Abfluss in den einzelnen Kammern auf etwas unterschiedlichen Niveau (K-B>K-A>K-C>K-D). Dies kann wiederum nur durch eine unvermeidbare nicht vollkommen idente Ausführung der Einbauten und zufällige Unregelmäßigkeiten bei der Durchströmung der Kammern erklärt werden.

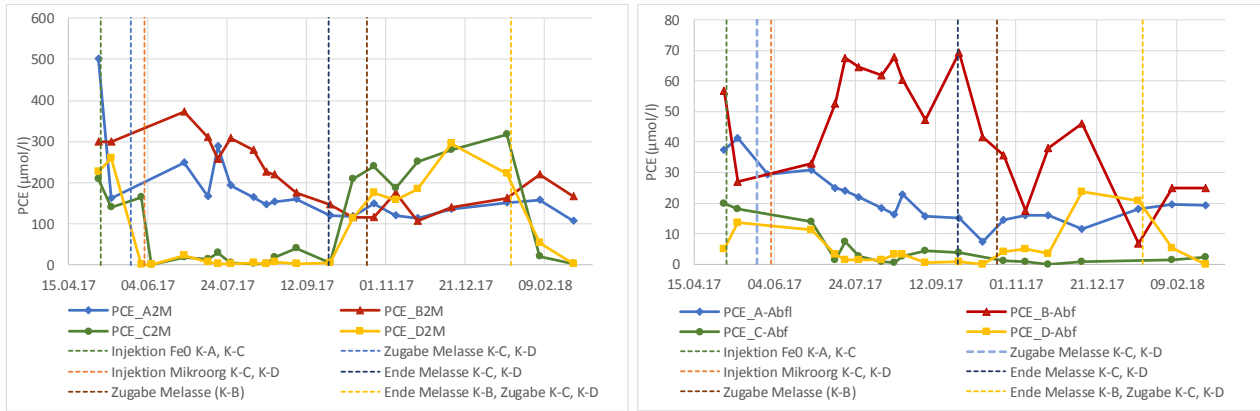


Abbildung 72: Verlauf der PCE-Konzentrationen in den Lysimeterkammern im Abstrom der jeweiligen Behandlungszonen (links: Beprobungspunkte 2M, rechts: Abflussbereiche).



Abbildung 73: Verlauf der TCE-Konzentrationen in den Beprobungspunkten der zentralen Transekte

Nach dem Beginn der Melasseeinleitung in K-C und K-D setzte bereits in der Zone oberstromig zu den Bereichen der Mikroorganismeninjektion ein Abbau von PCE zu TCE (und auch weiter zu cis-DCE, siehe auch Abbildung 71) ein. Während in diesem Bereich (C1M, D1M) die TCE-Bildung nach Beendigung der Melassezufuhr abnahm und bei Wiederbeginn der Einleitung (Mitte Jänner 2018) wieder zunahm, wurde das

gebildete TCE im Zeitraum der Melasseeinleitung (Juni-Sept 2017) in den Zonen abstromig zur Mikroorganismeninjektion fast vollständig wieder abgebaut (siehe Abbildung 73, Beprobungspunkte C3M und D3M). Nach Beendigung der Melasseeinleitung (Zeitraum Oktober 2017 bis Mitte Jänner 2018) stieg die Konzentration an TCE in diesen beiden Kammern wieder an. Der Faktor für die Verdünnung von PCE in den Abflüssen betrug wie oben beschrieben ca. 5 bis 10. Die Verdünnung mit diesem Faktor kann die Abnahme von TCE zwischen Punkt 3M und dem Abfluss im Zeitraum Oktober 2017 bis Mitte Jänner 2018 alleine nicht erklärt werden, sodass in diesen Aquiferbereichen ein TCE-Abbau stattgefunden haben muss. In K-C war dabei ein verhältnismäßig größerer Abbau zu beobachten (Abnahme ca. um den Faktor 20 bis 30) wie in K-D (Abnahme ca. um den Faktor 10 bis 20). Im Abfluss von K-A und ebenfalls im Abfluss von K-B nach Einleitung von Melasse (Oktober 2017) wurde eine geringe Konzentration von TCE gemessen.

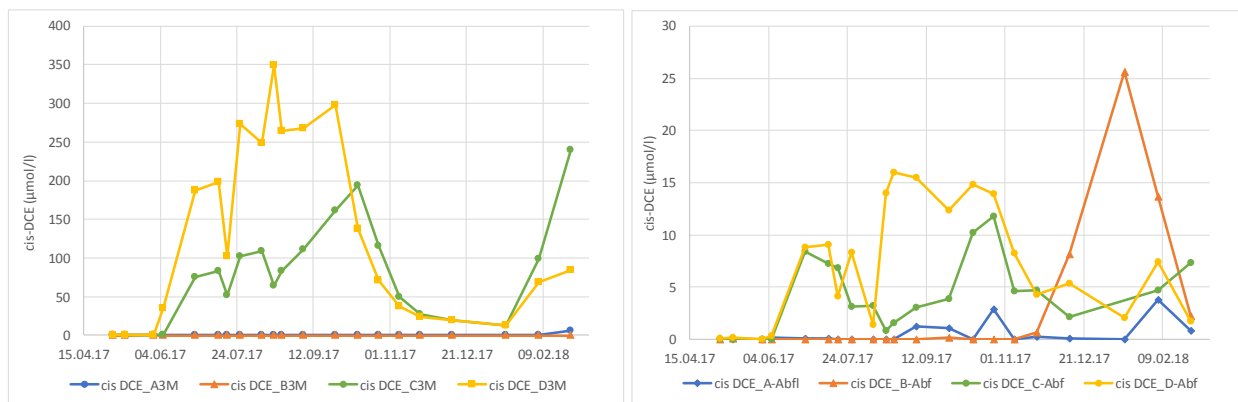


Abbildung 74: Verlauf der cis-DCE Konzentrationen in den Beprobungspunkten 3M und Abfluss

Nach Einleitung von Melasse in K-C und K-D setzte oberstromig zu den Injektionszonen die Bildung von cis-DCE ein (Abbildung 71). In den Beprobungspunkten 2M (siehe Anhang 7.6) und 3M (Abbildung 74) wurden ebenfalls hohe Gehalte an cis-DCE festgestellt. Die Abnahme der cis-DCE-Konzentration von C3M und D3M zu den jeweiligen Konzentrationen in den Abflüssen um ca. den Faktor 20 (ähnlich in beiden Kammern) zeigt, dass ein deutlicher mikrobieller Abbau von cis-DCE während dieser Fließstrecke vorhanden war. Nach Beendigung der Melasseeinleitung (Ende September 2017) nahm die Bildung von cis-DCE in den Beprobungspunkten 1M, 2M und 3M der Kammern C und D stark ab, während die Reduktion im Abfluss verhältnismäßig weniger betrug. Dies deutet darauf hin, dass bedingt durch das Fehlen der Kohlenstoffquelle der Abbau von cis-DCE in der Fließstrecke von 3M bis zum Abflussbereich nicht oder nur in geringem Ausmaß stattfand, wobei hier kein Unterschied zwischen K-C und K-D feststellbar war. Die Melasseeinleitung in K-B bewirkte ab Dezember 2017 eine Bildung von cis-DCE im Abflussbereich. Im Abfluss von Kammer A konnte nur zu wenigen Zeitpunkten eine geringe Bildung von cis-DCE beobachtet

werden. Nach dem neuerlichen Einleiten von Melasse in K-C und K-D ab Mitte Jänner 2018 war die Konzentration von cis-DCE in K-C deutlich höher als in K-D.

Vinylchlorid (VC) wurde in K-A und K-B (ohne Mikroorganismeninjektion) zu keinem Beprobungszeitpunkt detektiert. In K-C und K-D wurde im Abstrom der Injektionsstelle der Mikroorganismen (Beprobungspunkte 2M, 3M, Abfluss) VC gebildet, wobei dies vor allem während der Periode der Melasseinleitung stattfand (Abbildung 75). Nach Beendigung der Melassezufuhr nahmen die VC-Konzentrationen in K-C und K-D stark ab.

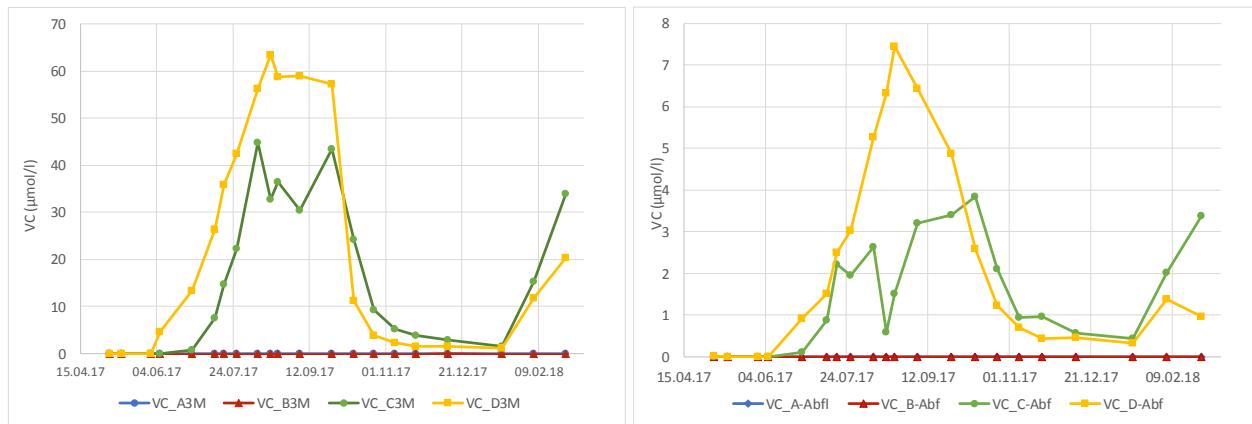


Abbildung 75: Verlauf der VC-Konzentrationen in den Beprobungspunkten 3M (rechts) und Abfluss (links) der Lysimeterkammern

Ähnlich wie für cis-DCE wurden auch bei VC unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse zwischen den Beprobungspunkten 3M und Abfluss während der Dauer der Melasseinleitung und nach deren Beendigung gefunden (Abbildung 76). Während der Zugabe von Melasse lag dieses Verhältnis bei oder über 10 (bei K-C zu 2 Zeitpunkten über 20) wogegen ohne Melasse dieses Verhältnis in beiden Kammern unter 5 sank. Somit fand bei Vorhandensein einer ausreichenden Kohlenstoffquelle offensichtlich ein Abbau von VC im Bereich zwischen diesen beiden Beprobungspunkten statt, während ohne Melassezufuhr lediglich eine Verdünnung im Abflussbereich erfolgte, das (auf niedrigem Konzentrationsniveau) neu gebildete VC wurde während dieser Versuchsperiode also nicht oder nur in sehr geringem Maße abgebaut. Bei der neuerlichen Einleitung von Melasse ab Mitte Jänner 2018 stieg dieses Verhältnis wieder deutlich an (stärker in K-D im Vergleich zu K-C).

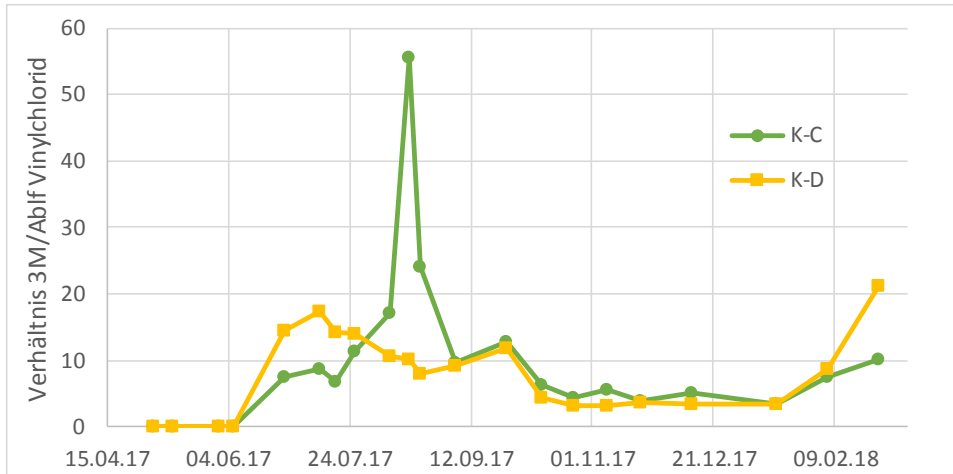


Abbildung 76: Verhältnis der VC-Konzentrationen zwischen den Punkten 3M und Abfluss zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten für Kammer C und D.

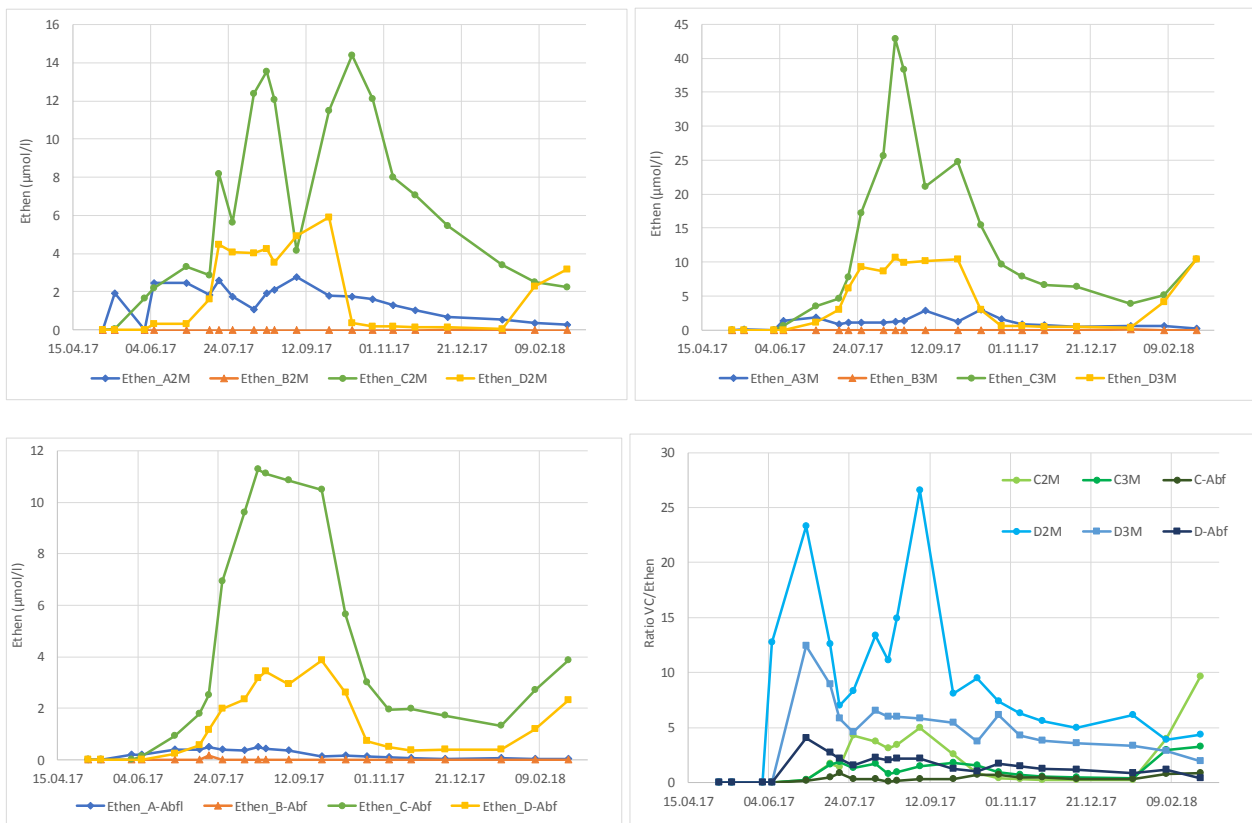


Abbildung 77: Verlauf der Ethenkonzentrationen in den Beprobungspunkten 2M (links oben), 3M (rechts oben), Abfluss (links unten) sowie die Verhältnisse zwischen den Konzentrationen Vinylchlorid und Ethen in den Beprobungspunkten von K-C und K-D (rechts unten)

Das nach einer vollständigen Dechlorierung von PCE gebildete Ethen wurde in den Beprobungspunkten abstromig zu den Injektionsstellen der Kammern A, C und D gefunden. Wie bereits beschrieben kann Ethen

entweder beim Abbau des PCE durch die Reaktion mit Fe(0) entstehen oder durch einen mikrobiellen Abbau. Da in Kammer A kein VC und cis-DCE nur zu wenigen Zeitpunkten in sehr niedrigen Konzentrationen gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass in dieser Kammer kein mikrobieller Abbau des PCE stattfand, bei dem Ethen gebildet wurde. Das in K-A gefundene Ethen ist daher rein auf die abiotische Reaktion mit Fe(0) zurückzuführen. Die Konzentrationen an Ethen in K-C und K-D nahmen im Verlauf der Fließstrecke zwischen 2M und 3M zu, während in K-A die Konzentrationen in diesem Bereich des Aquifers etwas abnahmen. Die Ethenkonzentrationen waren in allen Beprobungspunkten von K-C deutlich höher als in K-D, wobei die höchsten Werte wiederum mit der Periode der Melasseeinleitung zusammenfielen. Die in K-C gemessenen Werte sind höher als die Addition der Werte in K-A (nur Fe(0)) und K-D (nur Mikroorganismen). Wenn man davon ausgeht, dass in K-C durch die abiotische Reaktion mit Fe(0) Ethen in ähnlichem Ausmaß gebildet wurde wie in K-A, so ist der Konzentrationsunterschied zwischen K-C und K-D auf verstärkte mikrobielle Prozesse in K-C zurückzuführen. Lediglich in der Periode der zweiten Melasseeinleitung ab Mitte Jänner 2018 glichen sich die Ethenkonzentrationen in den Beprobungspunkten 2M und 3M von K-C und K-D in etwa an, wobei die Werte im Abfluss von K-C noch immer höher war, als im Abfluss von K-D.. In K-A wurden die höchsten Ethengehalte in einem ca. 6-monatigen Zeitraum zwischen der Fe(0)-Injektion (Anfang Mai 2017) und Ende Oktober 2017 gemessen. Danach nahmen die Ethenkonzentrationen im Aquifer dieser Kammer kontinuierlich ab. Zu Versuchsende (Februar 2018) lagen die Konzentrationen nur mehr knapp über der Nachweisgrenze.

4.3.5 PCE-Fracht im Gasraum über den Aquiferen und im Abfluss der Kammern

Nach Injektion des PCE in die Aquiferbereiche der Kammern wurde in ca. zweiwöchigen Abständen Luft aus dem mit gasförmigem Stickstoff durchspülten Gasraum der Lysimeterkammern (N₂-Fluss: 100 ml/min je Kammer) auf Aktivkohleröhrchen geleitet. Erst nachdem die Beladungsdauer der Aktivkohleröhrchen kontinuierlich auf über 3 Stunden gesteigert wurde, konnte Mitte Juli (3,5 Monate nach PCE-Injektion) geringe Mengen an PCE im Luftraum der Kammern nachgewiesen werden (K-A: 0,004 mg/m³, K-B und K-D: 0,001 mg/m³, K-C: kein PCE). Hochgerechnet auf die Versuchsdauer von ca. 11 Monaten bei einem Gasstrom von 144 l/Tag ergibt sich ein Gesamtaustrag von PCE unter 0,2 mg. Im Vergleich zur eingebrachten PCE-Menge von 162 g je Kammer ist diese Menge bilanzmäßig vernachlässigbar.

Die PCE-Frachten der einzelnen Lysimeterkammern errechnet aus den Konzentrationen im Abfluss und den abfließenden Wassermengen sind in Abbildung 78 dargestellt.

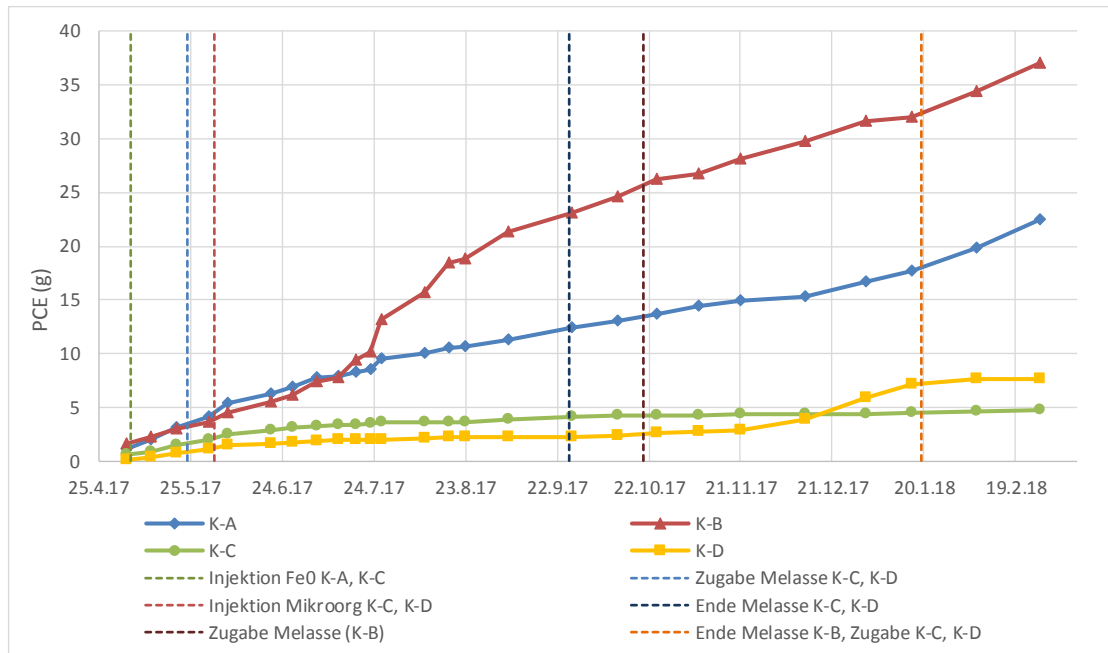


Abbildung 78: PCE-Fracht (kumuliert) im Abfluss der Lysimeterkammern während des Versuchsverlaufes.

In Kammer B fiel bis zum Versuchsende die höchste PCE-Fracht an. Knapp ein Viertel der ursprünglich eingebrachten PCE-Menge (37g von 162 g) wurde aus dieser Kammer während der Versuchsdauer ausgetragen. Obwohl Kammer B in dem oberstromig zu den Behandlungszonen gelegenen Beprobungspunkt 1M niedrigere PCE-Konzentrationen aufwies als die übrigen Kammern (siehe Abbildung 70), waren die PCE-Konzentrationen in den abstromig gelegenen Beprobungspunkten 2M, 3M und Abfluss vor allem in der Periode zwischen Juni 2017 und Oktober 2017 deutlich höher als in den Kammern mit einer Injektion mit Fe(0) bzw. Mikroorganismen. In Kammer A kam es zu einem relativ gleichmäßigem PCE-Austrag während der gesamten Versuchsperiode, wobei gegen Versuchsende ab Jänner 2018 etwas höhere PCE-Austragsraten erkennbar sind. Die PCE-Konzentrationen in K-C und K-D lagen bereits vor der Injektion von Fe(0) bzw. der Mikroorganismenkultur auf einem etwas niedrigerem Niveau als in Kammer A und B, was durch eine nicht vollkommen idente Ausführung der Einbauten und durch zufällige Unregelmäßigkeiten bei der Durchströmung begründet sein könnte (Abbildung 72, rechts). Durch den mikrobiellen Abbau in K-C und K-D kam es allerdings ab Juli 2017 zu einer deutlichen Abnahme des PCE-Austrags in diesen beiden Kammern. Durch den leichten Anstieg der PCE-Konzentration in K-D nach Beendigung der Melassezufuhr wurde die PCE-Austragsrate aus dieser Kammer ab Ende November 2017 im Vergleich zur Kammer C etwas erhöht. Dies ist allerdings nur durch wenige Messpunkte abgesichert.

4.4 Schlussfolgerungen AP2

Mit Hilfe des gewählten Versuchsdesigns konnte in den Lysimeterkammern die notwendigen Bedingungen geschaffen werden, um die geplanten Varianten entsprechend vergleichen zu können. Anaerobe Bedingungen und ein für die Mikroorganismen günstiger und in natürlichen Grundwassersystemen häufig anzutreffender pH-Bereich konnten über die gesamte Versuchsdauer hergestellt werden.

Entscheidend für einen weitestgehenden Abbau von PCE war der Einsatz der gewählten Mikroorganismenkultur (Sirem KB-1) bei gleichzeitiger Zudosierung einer Kohlenstoffquelle (Melasse). Unter diesen Bedingungen wurde in den entsprechenden Kammern C und D bereits wenige Tage nach der Injektion der Mikroorganismen und bereits 20 bis 30 cm im Abstrom des Injektionsbereiches (bei einer Abstandsgeschwindigkeit von 11 cm entspricht dies einer Aufenthaltsdauer von ca. 2 bis 3 Tagen) eine starke Abnahme der PCE-Konzentration beobachtet. Die Konzentrationen der Abbauprodukte cis-DCE, VC und Ethen zeigten, dass über den weiteren Verlauf der Fließstrecke eine weiterführende Dechlorierung bis zum Ethen erfolgte, wobei die niedrigeren Konzentrationen an cis-DCE und VC bei gleichzeitig höheren Gehalten an Ethen in Kammer C im Vergleich zu Kammer D den Schluss zulassen, dass die Kombination „Mikroorganismen + Fe(0), eine beschleunigte Dechlorierung bewirkte, die nicht einfach durch eine Addition der beobachteten Dechlorierung durch Fe(0), oder Mikroorganismen alleine erklärbar ist. Somit kann die Arbeitshypothese, dass der zusätzliche Wasserstoff, der durch die anaerobe Korrosion von Fe(0) gebildet wird den PCE-Abbau stimuliert aufrechterhalten werden. Allerdings lassen die Ergebnisse in Kammer D auch darauf schließen, dass in der weiteren Fließstrecke der weiterführende Abbau von cis-DCE und VC zu Ethen nicht zum Erliegen kommt, solange eine ausreichende Verfügbarkeit einer geeigneten Kohlenstoffquelle gegeben ist. Es ist anzunehmen, dass auch ohne zusätzliche Dosierung mit Fe(0) durch die eingebrachten Mikroorganismen eine vollständige Dechlorierung stattfindet, allerdings über eine längere Fließstrecke bzw. längere Aufenthaltsdauer. Ist keine ausreichende Kohlenstoffquelle im Aquifer vorhanden, verlangsamt sich der Abbau von PCE deutlich. So konnte im Beprobungspunkt 20 bis 30 cm abstromig zum Injektionsbereich kein PCE-Abbau mehr registriert werden. Die höheren Ethenkonzentrationen und das geringere Verhältnis VC/Ethen in Kammer C zeigte allerdings, dass das zusätzlich injizierte Fe(0) die vollständige Dechlorierung von PCE auch nach Beendigung der Melassezufuhr noch für einige Monate unterstützte.

Die erneute Einleitung von Melasse (ohne weitere Injektion von Mikroorganismen) vier Monate nach Beendigung der ersten Periode mit Melassezufuhr zeigte, dass die Abbaureaktionen wiederum innerhalb weniger Tage aktiviert werden konnten trotz der zu dieser Zeit vorherrschenden niedrigeren Temperaturen im Aquifer. Das Mikroorganismenkonsortium hat über diese Zeitdauer trotz Fehlen einer hohen

Konzentration an Melasse und trotz des Anstieges des Redoxpotentials in einen ungünstigen Bereich oberhalb der Sulfatreduktion ihr Potential für den vollkommenen PCE-Abbau nicht verloren.

An Hand der Ergebnisse von Kammer A zeigt sich, dass die Reaktivität des eingesetzten Fe(0) nach acht bis neun Monaten Versuchsdauer praktisch zum Erliegen kam. Dies ist auch an den Ergebnissen in Kammer C nachzuvollziehen. Die Gehalte an TCE, cis-DCE und VC waren ab Ende Jänner ähnlich oder sogar höher als im Vergleich zu den Gehalten in Kammer D. Ebenso wurden annähernd die gleichen Konzentrationen an Ethen ab diesem Zeitpunkt in diesen beiden Kammern gefunden.

Der etwas begünstigte Abbau von PCE in Kammer C durch das zusätzlich eingesetzte Fe(0) zeigte auch, dass das Einbringen der Mikroorganismen in den identen Injektionsbereich vier Wochen nach der Fe(0)-Injektion keine negativen, toxischen Auswirkungen auf das Mikroorganismenkonsortium hatte.

Die in Kammer A und Kammer C eingesetzte Menge an Fe(0) bewirkte, wie aus den Vorversuchen und theoretischen Überlegungen zu schließen war, keinen weitgehenden Abbau von PCE und konnte das Redoxpotential nur in eingeschränktem Maße senken. Dies war auch nicht das Ziel dieses Experiments, da bei einem vollständigen abiotischen Abbau durch den Einsatz einer wesentlich höheren Fe(0)-Menge ein Effekt durch die Kombination mit Mikroorganismen nicht mehr erkennbar gewesen wäre.

5. Zusammenschau und Empfehlungen

Die Ergebnisse dieses Projektes weisen darauf hin, dass durch die kombinierte Einbringung von Fe(0) und Mikroorganismen der Abbau von PCE zu Ethen im Vergleich zu Fe(0), oder Mikroorganismen alleine stimuliert werden kann. Im Experiment wurde eine geringe Fe(0)-Menge eingesetzt, die nur zu einem vergleichsweise geringen PCE-Abbau führte. Wollte man denselben Effekt durch eine Erhöhung der Menge an Fe(0) erreichen, dann würde das bei einer Anwendung in der Praxis zu deutlich höheren Kosten führen, da die Menge des benötigten Eisens einen wesentlichen Kostenfaktor darstellt. Insofern hat ein kombinierter Einsatz gegenüber dem Einsatz von Eisen alleine einen deutlichen Kostenvorteil. Der stimulierende Effekt verschwindet mit dem Verbrauch des Fe(0) wodurch auch hier (wie beim alleinigen Einsatz von Fe(0)) eine mehrmalige Injektion notwendig wäre.

Der Einsatz von Mikroorganismen (+ Melasse als Kohlenstoffquelle) alleine zeigte einen sehr effizienten Abbau von PCE, sofern ein geeignetes Konsortium (bzw. ein geeignetes Produkt) ausgewählt wurde. In den Batchversuchen wurden nämlich sehr große Unterschiede in der Abbaukapazität und der Abbaukinetik zwischen verschiedenen Mikroorganismenkulturen festgestellt. Für das Lysimeterexperiment wurde daher die Kultur SiREM ausgewählt, weil diese sich als am effizientesten in den Batchversuchen erwies. Im Lysimeterexperiment konnte der PCE-Abbau von SiREM durch eine Co-Injektion von Fe(0) beschleunigt werden, wodurch mehr PCE auf der relative kurzen Fließstrecke im Lysimeter dechloriert wurde. In einer Feldanwendung des kombinierten Einsatzes von Fe(0) und Mikroorganismen könnte somit PCE ebenfalls auf einer kürzeren Fließstrecke abgebaut werden, was vor allem bei eingeschränkten räumlichen Verhältnissen, bzw. Grundwasserentnahmestellen im nahen Abstrombereich des kontaminierten Standortes von Vorteil bzw. wünschenswert sein könnte.

Basierend auf den in diesem Projekt gewonnen Erkenntnissen halten wir als nächsten Schritt die Durchführung eines Pilotversuches an einem Standort mit PCE-Kontamination für sinnvoll. In diesem Pilotversuch sollte einerseits der Einsatz einer *Dehalococcoides*-Kultur sowie eine Kombination von Fe(0)-mit *Dehalococcoides* untersucht werden.

6. Literatur

- Amos, B.K., Ritalahti, K.M., Cruz-Garcia, C., Padilla-Crespo, E., Löffler, F.E., 2008. Oxygen effect on *Dehalococcoides* viability and biomarker quantification. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5718–5726.
- Bleyl, S., Kopinke, F.-D., Georgi, A., Mackenzie, K., 2013. Carbo-Iron - ein maßgeschneidertes Reagenz zur In-situ-Grundwassersanierung. *Chem. Ing. Tech.* 85, 1302–1311. doi:10.1002/cite.201300009
- BMLFUW, B. für L.F., Umwelt und Wasserwirtschaft, 2013. Sanierung von CKW Kontaminationen im Grundwasser unter Verwendung von nanopartikulärem Eisen (Endbericht Forschungsprojekt NanoSan). Wien.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. & Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17, 7843-7853.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.-L., Koenigsberg, S.S., Löffler, F.E., 2003. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* 424, 62–65. doi:10.1038/nature01717
- Krajmalnik-Brown, R., Hölscher, T., Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti, K.M. & Löffler, F.E. (2004) Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl Environ Microbiol* 70 (10), 6347–6351.
- Mackenzie, K., Bleyl, S., Georgi, A., Kopinke, F.-D., 2012. Carbo-Iron – An Fe/AC composite – As alternative to nano-iron for groundwater treatment. *Water Res.* 46, 3817–3826. doi:10.1016/j.watres.2012.04.013
- Massol-Deya, A. A., Odelson, D. A., Hickey, R. P. & Tiedje, J. M. (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16±23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In *Molecular Microbial Ecology Manual*, pp. 3.3.2, 1-8. Edited by A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas & F. J. de Bruijn. Dordrecht: Kluwer Academic.
- Maymo-Gatell, X., 1997. Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science* 276, 1568–1571. doi:10.1126/science.276.5318.1568
- McCarty, P.L., 1997. Breathing with Chlorinated Solvents. *Science* 276, 1521–1522. doi:10.1126/science.276.5318.1521
- Men, Y., Lee, P.K.H., Harding, K.C., Alvarez-Cohen, L., 2013. Characterization of four TCE-dechlorinating microbial enrichments grown with different cobalamin stress and methanogenic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6439–6450. doi:10.1007/s00253-013-4896-8
- Muller, J. A., Rosner, B. M., Abendroth, G. V., Meshulam-Simon, G., McCarty, P. & Spormann, A. M. (2004). Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4880–4888.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C. & Uitterlinden, A. G.. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695–700.
- Pérez-de-Mora, A., Zila, A., McMaster, M.L. & Edwards, E.A.(2014). Bioremediation of Chlorinated Ethenes in Fractured Bedrock and Associated Changes in Dechlorinating and Nondechlorinating Microbial Populations. *Environ. Sci. Technol.*, 48 (10), 5770–5779
- Schneidewind, U, Haest, P.J., Atashgahi, S., Paphosa, F., Hamonts, K., Maesen, M., Calderer, M., Seuntjens, P., Smidt, H., Springael, D., Dejonghe, W. (2014). Kinetics of dechlorination by *Dehalococcoides mccartyi* using different carbon sources. *Journal of Contaminant Hydrology.* 157, 25-36
- Scheffer / Schachtschabel (2010). *Lehrbuch der Bodenkunde*, 16. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010
- Schöftner, P., Waldner, G., Lottermoser, W., Stöger-Pollach, M., Freitag, P., Reichenauer, T.G., 2015. Electron efficiency of nZVI does not change with variation of environmental parameters. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.033
- Seshadri, R., 2005. Genome Sequence of the PCE-Dechlorinating Bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science* 307, 105–108. doi:10.1126/science.1102226
- Stumm W und Morgan J.J., 1996. *Aquatic Chemistry, Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, Wiley-Interscience Series of Texts and Monographs, John Wiley & Sons, New York.
- Sun, B., 2002. Microbial Dehalorespiration with 1,1,1-Trichloroethane. *Science* 298, 1023–1025. doi:10.1126/science.1074675

- Xiu, Z., Jin, Z., Li, T., Mahendra, S., Lowry, G.V., Alvarez, P.J.J., 2010. Effects of nano-scale zero-valent iron particles on a mixed culture dechlorinating trichloroethylene. *Bioresour. Technol.* 101, 1141–1146. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.057
- Yang, Y., McCarty, P.L., 1998. Competition for Hydrogen within a Chlorinated Solvent Dehalogenating Anaerobic Mixed Culture. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3591–3597. doi:10.1021/es980363n

7. Anhang

7.1 Zusammensetzung des Mediums und der verwendeten Lösungen der mikrobiellen Batch-Versuche

Tabelle 20: Medienzusammensetzung der Nährlösung der Batchversuche mit NTP-Kulturen

| Medienbestandteil | Konzentration (aq) |
|-------------------------------------|--------------------|
| Wasser | 78,85 % v/v |
| Spurenmittel-Lösung | 0,39 % v/v |
| HEPES | 5,64 mg/L |
| Resazurin | 0,47 mg/L |
| C-Quellen-Lösungen | 120 mg/L C |
| Hefeextrakt-Lösung (2%) | 0,1 % v/v |
| Vitamin-Lösung | 1 % v/v |
| Na ₂ S 9H ₂ O | 500 mg/L |
| Inokulum | 10 % v/v |
| PCE | 32 mg/L |

Tabelle 21: Zusammensetzung der Spurenmittel-Lösung

| Chemikalie | Konzentrationen [mg/L] |
|--|---------------------------|
| Nitrilotriacetic acid | 120 |
| MnCl ₂ * 4H ₂ O | 100 |
| CoCl ₂ * 6H ₂ O | 170 |
| ZnCl ₂ | 100 |
| CaCl ₂ | 216 |
| H ₃ BO ₃ | 19 |
| NiCl ₂ * 6H ₂ O | 50 |
| Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O | 20 |
| CuCl ₂ | 20 |

Tabelle 22: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung

| Chemikalie | Konzentration [mg/L] |
|------------------------|-------------------------|
| Biotin | 20 |
| Folsäure | 20 |
| Pyridoxin Hydrochlorid | 100 |
| Thiamin Hydrochlorid | 50 |
| Riboflavin | 50 |
| Nicotinsäure | 50 |
| DL-Kalzium Panthotenat | 50 |
| Vitamin B12 | 50 |
| p-Aminobenzoessäure | 50 |
| Liponsäure | 50 |

7.2 Analytik – Methodenetablierung und angewandte Methoden

(C)KW & H₂ Proben in Batchversuchen – Messung mittels FID und WLD

(C)KW und H₂ Konzentrationen in den Batches wurden mit Hilfe eines Fisons GC800Top gemessen. (C)KW wurden mit einer GS-Q, 30m, 0,53 mm plot Säule getrennt. H₂ wurde von O₂ und N₂ mit einer gepackten Molsieb Säule (5 Å) getrennt. Eine jede Säule war mit einem eigenen Injektorblock verbunden in die jeweils 100 µl Gasprobe manuell aufgegeben wurden. Für die Trennung von (C)KW wurde He (2,5 ml/min) als Trägergas eingesetzt. Für die Trennung von H₂ wurde Ar (16 ml/min) als Trägergas und Ar (17 ml/min) als Referenzgas im Detektor eingesetzt. Die Injektortemperatur betrug 110 °C und ein Ofenprogramm (40 °C für 3 min, Rampe 30 °C/min auf 180 °C für 4,8 min, Rampe 80 °C auf 200 °C für 5 min) wurde festgelegt um die verschiedenen Analyten zu trennen.

TCE und PCE Wasserproben – Messung mittels ECD

Zur Messung von PCE und TCE in Wasserproben durch den ECD (electron capture detector) wurde 1,0 ml MTBE in 1,7 ml Autosamplergefäße vorgelegt und 0,5 ml der jeweiligen Wasserprobe zugegeben. Im Autosamplergefäß wurde so die im Wasser gelösten CKW mit MTBE aus dem Wasser extrahiert. Der Autosampler wurde so programmiert, dass er die Probe nur aus dem MTBE Überstand zog. Hiervon wurden je nach Messbereich 1 oder 2 µl Probe mit einem Split von 0 bis 120 in einen Agilent 7890 GC mit HP VOC Säule (60 m 0,32 mm I.D., 1,8 µm film) injiziert, die mit 2 ml/min He durchspült wurde. Die Injektortemperatur war 200 °C. Unmittelbar nach der Injektion wurde der Ofen von 40 °C auf 100 °C erhitzt (40°C/min) und die 100 °C wurden für 2 min gehalten. Anschließend wurde der Ofen auf 200 °C erhitzt (10 °C/min) und die 200 °C wurden für 2 min gehalten. Anschließend wurde der Ofen auf 240 °C erhitzt (20 °C/min) und die 240 °C wurden für 2 min gehalten. Der ECD wurde mit einer Temperatur von 300 °C und einem N₂ Fluss von 60 ml/min betrieben

Im Wasser gelöster Wasserstoff (H₂) – Messung mittels WLD

Der in Wasser gelöste Wasserstoff wurde mittels GC-WLD (Wärmeleitfähigkeitsdetektor) gemessen. 1 ml Gasprobe (Headspace im mit Wasserprobe gefülltem Gefäß) wurde hierfür manuell mit einer gasdichten Spritze in den GC (Fisons GC 8000Top) injiziert, wobei die Injektortemperatur 110 °C betrug. Getrennt wurde der H₂ von O₂ und N₂ durch eine gepackte Molsieb-Säule (5 Å), die mit 16 ml/min Ar als Trägergas durchflossen wurde. Als Referenzgas wurde Ar mit 17 ml/min durch den Detektor gespült. Der Detektorblock wurde auf 50 °C geheizt, das Filament auf 190 °C. Der Wasserstoff wurde bei einer isothermen

Ofentemperatur von 40 °C gemessen, danach wurde der Ofen auf 180 °C aufgeheizt, um auch N₂ und O₂ aus der Säule auszutragen, bevor die nächste Probe injiziert wurde. Ein Aufheizen des Filaments auf Temperaturen über 190 °C soll vermieden werden, da in diesem Fall der in der Probe enthaltene Sauerstoff dazu führen kann, dass das Filament durchbrennt. Kalibriert wurde die Messung, indem eine H₂ gesättigte Lösung hergestellt wurde. 5 ml dieser gesättigten Lösung (wie bei den späteren Proben) wurde in ein Glasgefäß (Gesamtvolumen 12 ml) überführt (gleiche Volumsverhältnisse wie die gemessenen Proben). Die Sättigung von Wasser mit H₂ erfolgte, indem das Gas durch ein Septum in ein mit Wasser gefülltes Gefäß durchströmte. Um das so eingebrachte H₂ aus dem Gefäß zu führen, wurde das Septum mit einer Kapillare durchstoßen, durch die überschüssiges Gas wieder entweichen konnte (Abbildung 79).



Abbildung 79: Herstellung einer H₂ gesättigten Wasserprobe

Messung organischer Säuren & Vitamin B₁₂ - Messung mittels HPLC

Für die Messung der organischen Säuren Lactat und Acetat wurde eine HPLC (Agilent 1100 Series) mit DAD Detektor (Diodenarraydetektor; 210nm; BW8) verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe der Säule ZORBAX SB-Aq; StableBond Analytical 4.6x150mm 5µm getrennt.

Für die Messung von Vitamin B₁₂ wurde 0,025 % TFA (1 ml TFA auf 4 l deionisiertem Wasser) als Laufmittel A eingesetzt. Als Laufmittel B wurde Acetonitril eingesetzt. Der Säulenofen wurde auf 30 °C isotherm aufgeheizt. Leider war die Sensibilität des Detektors nicht fein genug, um die in den Batchversuchen eingesetzten Vitamin B₁₂Konzentrationen zu detektieren. Das Detektionslimit lag bei etwa 3 mg/l Vitamin B₁₂.

Für die Messung von Acetat und Lactate wurde 1% ACN/99% 20 mM Na₂HPO₄ mit einem pH von 2,0 (mittels H₃PO₄ eingestellt) als Laufmittel eingesetzt. Der Säulenofen wurde auf 35 °C aufgeheizt. Das Detektionslimit lag bei etwa 5 mg/l. Vor der Messung mittels HPLC mussten die Proben noch mittels einer Carrez Fällung aufbereitet werden. 200 µl der Probe werden hierfür in ein Eppendorf-Vial gegeben und mit

1220 µl destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden 40 µl der Carrez Lösungen I (150g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ in 1 l destilliertem Wasser) zugegeben und die Probe gevortext. Danach wurden 40 µl der Carrez Lösung II (300 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ in 1 l destilliertem Wasser) zugegeben und die Probe wieder gevortext. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (5 min, 13.200 U/min). Der Überstand (1 ml) wurde in die HPLC Autosamplergefäß überführt und mit 20 µl Salzsäure (2ml HCl 30 % in 78 ml destilliertem Wasser) angesäuert. Der pH-Wert sollte danach bei ca. 3 gelegen haben. Die derart aufbereitete Probe wurde anschließend, wie oben beschrieben, gemessen.

Methodenentwicklung - Messung von Gasproben mittels Headspace Autosampler (HS 500)

Bei hohen (C)KW Konzentrationen besteht die Möglichkeit die Proben nicht manuell aufzugeben, sondern die Gasproben durch ein gasdichtes Septum in ein Autosamplergefäß zu überführen und den Gasraum aus diesem Gefäß mit Hilfe eines Autosamplers zu injizieren. Die Probleme hierbei sind, dass die Probe im Autosamplergefäß verdünnt wird und, dass der Messfehler größer wird, da die Probe zweimal überführt wird. Einmal manuell in das Autosamplergefäß und einmal vom Autosampler in den GC.

Um auszutesten, ob es möglich ist unsere Proben auf diese Weise zu messen, wurden Vorversuche zum Einsatz des Autosamplers durchgeführt. Ein wesentlicher Aspekt ist, wie vorhin beschrieben, die Erreichung eines sinnvollen Detektionslimits. Daher wurde in einem ersten Schritt ausgetestet, welches Probenvolumen maximal aufgegeben werden kann. Hierfür wurden Standards in wässriger Lösung (55 mg/l TCE, 112 mg/l PCE) hergestellt und unterschiedliche Volumina des Headspaces dieser Proben mit dem Autosampler injiziert. Wie in Abbildung 80 dargestellt, war die Beziehung von Detektorsignal zu Injektionsvolumen in einem Bereich von 1000 – 2500 µl linear wobei bei 2500 µl bereits eine deutliche Peakverbreiterung auftrat, wodurch die Quantifizierung der Peaks etwas ungenauer wurde.

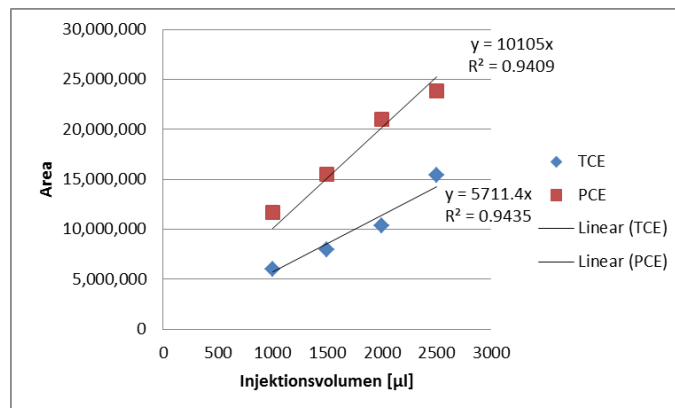


Abbildung 80: Austestung unterschiedlicher Injektionsvolumina bei der Injektion mit dem Autosampler

Als ideales Injektionsvolumen für diese Anwendung wurde daher 2000 µl festgelegt. Des Weiteren wurden die 10 ml Autosamplergefäße bis zur Injektionstiefe der Injektornadel mit Glasperlen ausgefüllt (10 g Perlen je Gefäß). Dadurch wird die in das Vial überführte Gasprobe weniger verdünnt, da weniger Gasphase im Gefäß vorhanden ist. Durch diese Maßnahme konnte das Detektionslimit um etwa ein Drittel verringert werden.

In einem weiteren Schritt wurde ausgetestet, ob die Autosamplergefäße nach einmaligem Durchstechen noch gasdicht sind. Hierbei wurden verschiedene Septen ausgetestet. Dies ist relevant, da die Gefäße bei der Überführung der Gasproben in die Autosamplergefäße durchstochen werden. Hierfür wurden Standards in wässriger Lösung (55 mg/l TCE, 112 mg/l PCE) hergestellt und 250 µl des Headspaces dieser Standards in sechs 10 ml Autosamplergefäße (mit 10 g Glasperlen gefüllt) überführt. Diese Gefäße wurden innerhalb von 6,5 h nacheinander mit dem Autosampler gemessen. Innerhalb dieser Messzeit können bis zu 13 Proben gemessen werden. Mit dem Einsatz von Butyl - cPharma-Fix" Septen wurden die besten Ergebnisse erzielt. Wie in Abbildung 81 dargestellt, ist die Konzentration innerhalb der 6,5 h, die die Gasprobe im Gefäß mit dem durchstochenen Septum war, nicht merklich gesunken. Um den Analytikfehler aufgrund der manuellen Probenüberführung in die Autosamplervials zu korrigieren, kann ein interner Standard (z.B. Methan oder Propan) in die Versuchsbatches zugegeben werden.

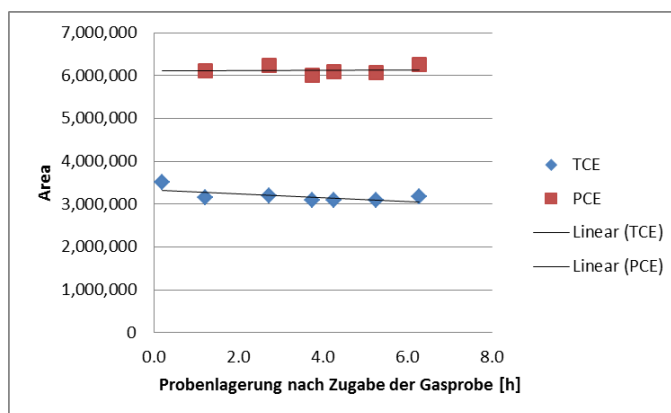


Abbildung 81: Austestung der Dichtheit der Autosamplergefäße (verschlossen mit "Pharma-Fix" Septen) nach Überführung der Gasproben (durchstochenes Septum)

Nachdem das maximale Injektionsvolumen sowie die Dichtheit der Autosamplervials nach einmaligem Durchstechen ausgetestet waren, wurde das Detektionslimit für PCE und TCE bestimmt. Sollte das Detektionslimit zu groß für unsere Fragestellungen sein, wäre diese Methode nicht adequat. Hierfür wurden verschiedene Standards mit 46; 25; 9; 6; 2,3; 1,4 und 0,6 mg/l PCE und 41; 25; 8; 5; 2,1; 1,0; 0,5 mg/l TCE in wässriger Lösung hergestellt. Die in diesem Abschnitt angeführten Konzentrationen beschreiben Konzentrationen im Wasser. Wird dieses Wasser in ein gasdicht verschlossenes Gefäß überführt (=Standard) so gehen ~1/3 der gelösten (C)KW in den Headspace über. Von diesen Standards wurden jeweils 250 µl

Gasprobe in ein Autosamplergefäß überführt, das mit 10 g Glasperlen gefüllt und mit einem "Pharma-Fix" Septum verschlossen war. Aus diesen Gefäßen wurden 2000 µl Probe bei Raumtemperatur (~22 °C) direkt injiziert. Wie in Abbildung 82 dargestellt, zeigten die Standardmessungen über den gesamten Bereich der Standards einen linearen Bezug zwischen Konzentration und Detektorsignal. Selbst die Proben mit rund 0,5 mg/l waren noch quantifizierbar. Konzentrationen <0,5 mg/l waren allerdings nicht mehr sinnvoll auswertbar. In diesem Projekt ist das maßgeblich Ziel zu zeigen, dass das Konzept des chemischen, des mikrobiellen und des kombinierten Abbaus funktioniert. Demnach sollte ein Detektionslimit von 0,5 mg/l für den Großteil der Fragestellungen ausreichen. Im Fall, dass man die Frage beantworten möchte, ob mit einer gewissen Methode ein Abbau bis unter die jeweiligen Grenzwerte von wenigen µg/l erreicht werden kann, ist diese Analytik nicht geeignet.

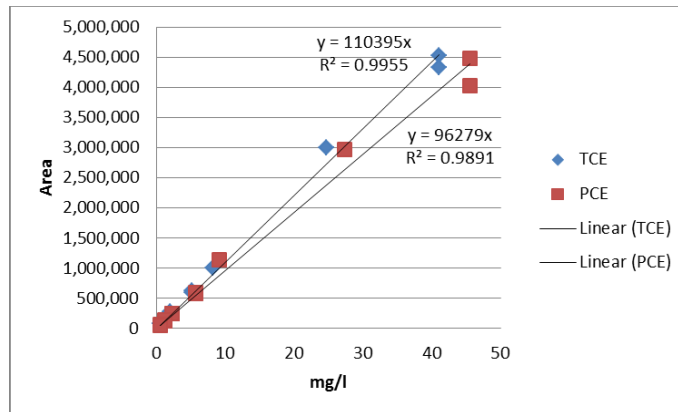


Abbildung 82: Bestimmung des Detektionslimits bei Überführung von Gasproben in Headspace-Autosamplergefäße.

7.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Tabelle 23: Identifizierung von RDH Sequenzen aus Probe UFZ A

| Clone ID | Length (nt) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----------|-------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| A17 | | failed | | | | | | |
| A2 | 1575 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2876 | 2876 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2760 | 2760 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_1836_ORF_1 putative reductive deha | 2158 | 2158 | 79% | 0.0 | 98% | KF139203.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 1491 | 1491 | 99% | 0.0 | 84% | CP013074.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG1, complete genome | 1491 | 1491 | 99% | 0.0 | 84% | CP006949.1 |
| A5 | 1599 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2902 | 2902 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2830 | 2830 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2819 | 2936 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1829 | 1952 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GY50, complete genome | 1823 | 1823 | 99% | 0.0 | 87% | CP006730.1 |
| A7 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2918 | 2918 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2846 | 2846 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2835 | 2947 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1823 | 1941 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1820 | 1820 | 64% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| A8 | 1586 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2883 | 2883 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2652 | 2805 | 99% | 0.0 | 97% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone LakeFaro_1853_ORF_6 putative reductive de | 2049 | 2049 | 72% | 0.0 | 99% | KF138922.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2358_ORF_2 putative reductive deha | 1999 | 1999 | 71% | 0.0 | 98% | KF139217.1 |
| | | Bacterium enrichment culture clone WBC-2_1966_ORF_7 putative reducti | 1949 | 1949 | 69% | 0.0 | 99% | KF139018.1 |
| A13 | 1885 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 3432 | 3432 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 3365 | 3365 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE3, complete genome | 2796 | 2796 | 83% | 0.0 | 99% | CP019866.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE2, complete genome | 2796 | 2796 | 83% | 0.0 | 99% | CP019865.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2139 | 2139 | 99% | 0.0 | 87% | AP014563.1 |
| A25 | 1586 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2868 | 2868 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2636 | 2788 | 99% | 0.0 | 97% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone LakeFaro_1853_ORF_6 putative reductive de | 2049 | 2049 | 72% | 0.0 | 99% | KF138922.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2358_ORF_2 putative reductive deha | 2004 | 2004 | 71% | 0.0 | 99% | KF139217.1 |
| | | Bacterium enrichment culture clone WBC-2_1966_ORF_7 putative reducti | 1954 | 1954 | 69% | 0.0 | 99% | KF139018.1 |
| A26 | 1601 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2931 | 2931 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2859 | 2859 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2848 | 2960 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1842 | 1959 | 99% | 0.0 | 88% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GY50, complete genome | 1836 | 1836 | 99% | 0.0 | 88% | CP006730.1 |
| A30 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2902 | 2902 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2830 | 2830 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2819 | 2943 | 99% | 0.0 | 98% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1825 | 1955 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1825 | 1825 | 64% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| A32 | 1575 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2885 | 2885 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2758 | 2758 | 99% | 0.0 | 98% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_1836_ORF_1 putative reductive deha | 2158 | 2158 | 79% | 0.0 | 98% | KF139203.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 1485 | 1485 | 99% | 0.0 | 84% | CP013074.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG1, complete genome | 1485 | 1485 | 99% | 0.0 | 84% | CP006949.1 |
| A33 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2913 | 2913 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2841 | 2841 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2830 | 2942 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1831 | 1831 | 64% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1829 | 1946 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| A37 | 1575 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2867 | 2867 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2750 | 2750 | 99% | 0.0 | 98% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_1836_ORF_1 putative reductive deha | 2152 | 2152 | 79% | 0.0 | 98% | KF139203.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1480 | 1480 | 99% | 0.0 | 84% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 1478 | 1478 | 99% | 0.0 | 84% | CP013074.1 |

Tabelle 24: Identifizierung von RDH Sequenzen aus Probe UFZ A

| Clone ID | Length (nt) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----------|-------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| B1 | 1575 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2876 | 2876 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2760 | 2760 | 99% | 0.0 | 98% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_1836_ORF_1 putative reductive deha | 2158 | 2158 | 79% | 0.0 | 98% | KF139203.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 1493 | 1493 | 99% | 0.0 | 84% | CP013074.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG1, complete genome | 1493 | 1493 | 99% | 0.0 | 84% | CP006949.1 |
| B2 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2909 | 2909 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2837 | 2837 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2826 | 2949 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1820 | 1820 | 64% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1814 | 1943 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| B8 | 989 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1554 | 1606 | 85% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1260 | 1260 | 72% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 891 | 891 | 85% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 885 | 885 | 85% | 0.0 | 85% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 885 | 885 | 85% | 0.0 | 85% | CP019969.1 |
| B9 | 983 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1552 | 1605 | 86% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1266 | 1266 | 73% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 896 | 896 | 80% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 891 | 891 | 85% | 0.0 | 86% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 891 | 891 | 85% | 0.0 | 86% | CP019969.1 |
| B10 | 1575 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2874 | 2874 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2747 | 2747 | 99% | 0.0 | 98% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_1836_ORF_1 putative reductive deha | 2158 | 2158 | 79% | 0.0 | 98% | KF139203.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1491 | 1491 | 99% | 0.0 | 84% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 1489 | 1489 | 99% | 0.0 | 84% | CP013074.1 |
| B11 | 1000 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1559 | 1612 | 85% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1266 | 1266 | 72% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 896 | 896 | 84% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 891 | 891 | 84% | 0.0 | 86% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 891 | 891 | 84% | 0.0 | 86% | CP019969.1 |
| B12 | 1043 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1559 | 1612 | 82% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1266 | 1266 | 69% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 891 | 891 | 81% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 885 | 885 | 81% | 0.0 | 85% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 885 | 885 | 81% | 0.0 | 85% | CP019969.1 |
| B13 | 1001 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1565 | 1618 | 85% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1271 | 1271 | 72% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 896 | 896 | 84% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 891 | 891 | 84% | 0.0 | 86% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 891 | 891 | 84% | 0.0 | 86% | CP019969.1 |
| B14 | 983 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1565 | 1618 | 87% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1271 | 1271 | 74% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 896 | 896 | 86% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 891 | 891 | 86% | 0.0 | 86% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 891 | 891 | 86% | 0.0 | 86% | CP019969.1 |
| B16 | 977 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1537 | 1590 | 87% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1266 | 1266 | 74% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 885 | 885 | 86% | 0.0 | 85% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 880 | 880 | 86% | 0.0 | 85% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 880 | 880 | 86% | 0.0 | 85% | CP019969.1 |
| B17 | 932 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1563 | 1616 | 91% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_2123_ORF_1 putative reductive deha | 1269 | 1269 | 78% | 0.0 | 98% | KF139214.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 902 | 902 | 90% | 0.0 | 86% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 896 | 896 | 90% | 0.0 | 86% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 896 | 896 | 90% | 0.0 | 86% | CP019969.1 |
| B20 | 1575 | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2876 | 2876 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2760 | 2760 | 99% | 0.0 | 98% | CP006950.1 |
| | | Uncultured bacterium clone WLSite_1836_ORF_1 putative reductive deha | 2158 | 2158 | 79% | 0.0 | 98% | KF139203.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 1493 | 1493 | 99% | 0.0 | 84% | CP013074.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG1, complete genome | 1493 | 1493 | 99% | 0.0 | 84% | CP006949.1 |

Tabelle 25: Identifizierung von RDH Sequenzen aus Probe Commercial culture 1

| Clone ID | Length (nt) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----------|-------------|--|-----------|-------------|-------------|----------|-------|------------|
| C23 | 1124 | [Clostridium] sphenoides JCM 1415 strain ATCC 19403 genome assembly, | 318 | 318 | 36% | 2,00E-82 | 81% | LT630003.1 |
| | | [Clostridium] saccharolyticum WM1, complete genome | 128 | 128 | 8% | 4,00E-25 | 90% | CP002109.1 |
| C28 | 1074 | NO hits in the NCBI DB | | | | | | |
| C32 | 949 | NO hits in the NCBI DB | | | | | | |
| C1 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2898 | 3027 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2820 | 2820 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2815 | 2815 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1814 | 1814 | 64% | 0.0 | 98% | EU625399.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1805 | 1937 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| C9 | 1638 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2963 | 3435 | 98% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi IBARAKI DNA, complete genome | 2918 | 2918 | 98% | 0.0 | 99% | AP014563.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2902 | 2902 | 98% | 0.0 | 99% | CP019968.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2902 | 2902 | 98% | 0.0 | 99% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2902 | 2902 | 98% | 0.0 | 99% | CP006951.1 |
| C10 | 1601 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2929 | 3051 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2852 | 2852 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2846 | 2846 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1834 | 1959 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1831 | 1831 | 64% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| C12 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2926 | 3038 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2848 | 2848 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2843 | 2843 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1820 | 1820 | 64% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1818 | 1933 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| C13 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2898 | 3027 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2820 | 2820 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2815 | 2815 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase g | 1814 | 1814 | 64% | 0.0 | 98% | EU625399.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1805 | 1937 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| C27 | 1523 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2771 | 2771 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2678 | 2678 | 99% | 0.0 | 99% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2678 | 2678 | 99% | 0.0 | 99% | CP006951.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTC1, complete genome | 2665 | 2665 | 99% | 0.0 | 99% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2665 | 2665 | 99% | 0.0 | 99% | CP019969.1 |
| C29 | 1551 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2811 | 2811 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| C31 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 2909 | 3025 | 99% | 0.0 | 99% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 2832 | 2832 | 99% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 2826 | 2826 | 99% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 1825 | 1944 | 99% | 0.0 | 87% | CP001827.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GY50, complete genome | 1820 | 1820 | 99% | 0.0 | 87% | CP006730.1 |
| C33 | 1671 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 3051 | 3661 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 2835 | 3309 | 99% | 0.0 | 98% | CP013074.1 |
| | | Dehalococcoides sp. UCH007 DNA, complete genome | 2835 | 3304 | 99% | 0.0 | 98% | AP014722.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG1, complete genome | 2835 | 3309 | 99% | 0.0 | 98% | CP006949.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GY50, complete genome | 2835 | 2835 | 99% | 0.0 | 98% | CP006730.1 |

Tabelle 26: Identifizierung von RDH Sequenzen aus Probe Commercial culture 2

| Clone ID | Length (nt) | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|----------|-------------|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| D25 | | failed | | | | | | |
| D1 | 877 | NO hits in the NCBI DB | | | | | | |
| D8 | 905 | NO hits in the NCBI DB | | | | | | |
| D9 | 859 | Pelosinus fermentans JBW45, complete genome | 876 | 876 | 71% | 0.0 | 92% | CP010978.1 |
| D21 | 1354 | NO hits in the NCBI DB | | | | | | |
| D3 | 1671 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 3051 | 3670 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain CG3, complete genome | 2835 | 3315 | 99% | 0.0 | 98% | CP013074.1 |
| | | Dehalococcoides sp. UCH007 DNA, complete genome | 2835 | 3309 | 99% | 0.0 | 98% | AP014722.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG1, complete genome | 2835 | 3315 | 99% | 0.0 | 98% | CP006949.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GY50, complete genome | 2835 | 2835 | 99% | 0.0 | 98% | CP006730.1 |
| D12 | 1524 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2715 | 2715 | 98% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2630 | 2630 | 98% | 0.0 | 98% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2630 | 2630 | 98% | 0.0 | 98% | CP006951.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2615 | 2615 | 98% | 0.0 | 98% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2615 | 2615 | 98% | 0.0 | 98% | CP019969.1 |
| D17 | 1589 | Dehalococcoides mccartyi DNA, complete genome | 1133 | 2367 | 76% | 0.0 | 100% | AP017649.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi 195, complete genome | 1110 | 2199 | 76% | 0.0 | 99% | CP000027.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG4, complete genome | 1099 | 2188 | 76% | 0.0 | 99% | CP006950.1 |
| | | Dehalococcoides sp. MB clone RdhA3 putative reductive dehalogenase gene | 913 | 1228 | 42% | 0.0 | 99% | EU625399.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi VS, complete genome | 752 | 1560 | 76% | 0.0 | 89% | CP001827.1 |
| D20 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2913 | 2913 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2891 | 2891 | 99% | 0.0 | 99% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2891 | 2891 | 99% | 0.0 | 99% | CP006951.1 |
| | | Dehalococcoides sp. FL2 reductive dehalogenase homologous protein Rd | 2852 | 2852 | 97% | 0.0 | 99% | AY374250.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GT, complete genome | 2741 | 2741 | 99% | 0.0 | 98% | CP001924.1 |
| D22 | 1600 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2922 | 2922 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi isolate WBC-2, complete genome | 2900 | 2900 | 99% | 0.0 | 99% | CP017572.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2900 | 2900 | 99% | 0.0 | 99% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2900 | 2900 | 99% | 0.0 | 99% | CP006951.1 |
| | | Dehalococcoides sp. FL2 reductive dehalogenase homologous protein Rd | 2852 | 2852 | 97% | 0.0 | 99% | AY374250.1 |
| D23 | 1590 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2898 | 2898 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2837 | 4949 | 99% | 0.0 | 99% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi CG5, complete genome | 2837 | 4949 | 99% | 0.0 | 99% | CP006951.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC1, complete genome | 2826 | 4971 | 99% | 0.0 | 99% | CP019968.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi GT, complete genome | 2826 | 4943 | 99% | 0.0 | 99% | CP001924.1 |
| D24 | 1574 | Dehalococcoides mccartyi BTF08, complete genome | 2854 | 2854 | 99% | 0.0 | 99% | CP004080.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBTCE1, complete genome | 2726 | 2726 | 99% | 0.0 | 98% | CP019999.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain KBVC2, complete genome | 2726 | 2726 | 99% | 0.0 | 98% | CP019969.1 |
| | | Dehalococcoides mccartyi strain 11a5, complete genome | 2726 | 2726 | 99% | 0.0 | 98% | CP011127.1 |
| | | Dehalococcoides sp. FL2 reductive dehalogenase homologous protein Rd | 2673 | 2673 | 97% | 0.0 | 98% | AY374253.1 |

Tabelle 27: Überblick über qPCR Ergebnisse von Lysimeter Proben. Codierung der Sample ID: 1. Buchstabe = Lysimeter (A, B, C, D), 1M = anstromig von Behandlungszone, Nr. 2M = abstromig der Behandlungszone

| Sample ID ERT | Sampling | qPCR Ergebniss |
|----------------|------------|-------------------|
| A 2 M_Replik 1 | 23.06.2017 | n.d. |
| A 2 M_Replik 2 | 23.06.2017 | n.d. |
| A 2 M_Replik 3 | 23.06.2017 | n.d. |
| A 1 M_Replik 1 | 23.06.2017 | n.d. |
| A 1 M_Replik 2 | 23.06.2017 | n.d. |
| A 1 M_Replik 3 | 23.06.2017 | n.d. |
| B 2 M_Replik 1 | 23.06.2017 | n.d. |
| B 2 M_Replik 2 | 23.06.2017 | n.d. |
| B 2 M_Replik 3 | 23.06.2017 | n.d. |
| B 1 M_Replik 1 | 23.06.2017 | n.d. |
| B 1 M_Replik 2 | 23.06.2017 | n.d. |
| B 1 M_Replik 3 | 23.06.2017 | n.d. |
| C 2 M_Replik 1 | 23.06.2017 | positiv |
| C 2 M_Replik 2 | 23.06.2017 | positiv |
| C 2 M_Replik 3 | 23.06.2017 | positiv |
| C 1 M_Replik 1 | 23.06.2017 | n.d. |
| C 1 M_Replik 2 | 23.06.2017 | n.d. |
| C 1 M_Replik 3 | 23.06.2017 | n.d. |
| D 2 M_Replik 1 | 23.06.2017 | positiv |
| D 2 M_Replik 2 | 23.06.2017 | positiv |
| D 2 M_Replik 3 | 23.06.2017 | positiv |
| D 1 M_Replik 1 | 23.06.2017 | n.d. |
| D 1 M_Replik 2 | 23.06.2017 | positiv |
| D 1 M_Replik 3 | 23.06.2017 | n.d. |
| A 2 M_Replik 1 | 12.09.2017 | n.d. |
| A 2 M_Replik 2 | 12.09.2017 | n.d. |
| A 2 M_Replik 3 | 12.09.2017 | n.d. |
| A 1 M_Replik 1 | 12.09.2017 | n.d. |
| A 1 M_Replik 2 | 12.09.2017 | n.d. |
| A 1 M_Replik 3 | 12.09.2017 | n.d. |
| B 2 M_Replik 1 | 12.09.2017 | n.d. |
| B 2 M_Replik 2 | 12.09.2017 | n.d. |
| B 2 M_Replik 3 | 12.09.2017 | n.d. |
| B 1 M_Replik 1 | 12.09.2017 | n.d. |
| B 1 M_Replik 2 | 12.09.2017 | n.d. |
| B 1 M_Replik 3 | 12.09.2017 | n.d. |
| C 2 M_Replik 1 | 12.09.2017 | positiv |
| C 2 M_Replik 2 | 12.09.2017 | positiv |
| C 2 M_Replik 3 | 12.09.2017 | positiv |
| C 1 M_Replik 1 | 12.09.2017 | n.d. |
| C 1 M_Replik 2 | 12.09.2017 | n.d. |
| C 1 M_Replik 3 | 12.09.2017 | n.d. |
| D 2 M_Replik 1 | 12.09.2017 | positiv |
| D 2 M_Replik 2 | 12.09.2017 | positiv |
| D 2 M_Replik 3 | 12.09.2017 | positiv |
| D 1 M_Replik 1 | 12.09.2017 | n.d. |
| D 1 M_Replik 2 | 12.09.2017 | n.d. |
| D 1 M_Replik 3 | 12.09.2017 | n.d. |

7.4 Herstellung von sauerstofffreiem Wasser zur Etablierung eines anoxischen Grundwasserleiters

In einem ersten Versuch wurde in ein PVC Kanalrohr (\varnothing 12,5 cm, Länge 110 cm) eine Trennplatte eingeklebt, sodass zwei Wasserreservoirs innerhalb des einen Rohrs bestanden (Abbildung 83a). Diese Trennplatte wurde innerhalb des Rohres überstaut, sodass Wasser aus dem ersten Reservoir, in welches das Wasser von unten zufließt, in das andere Reservoir weiter fließt. Beide Reservoirs wurden von unten durch eine Sinterplatte (Porosität 1) mit N_2 begast. Die Kontaktzeit der Gasblasen mit dem Wasser wird hierbei durch die Rohrlänge bestimmt. Der Restsauerstoff im Wasser, welches aus dem System fließt, wurde mit Hilfe einer O_2 -Sonde gemessen, welche gasdicht in den Abflussstrom installiert wurde. Die Anlage wurde mit einem Fluss von 20 ml/min mit Tullner Leitungswasser beschickt, was jenem Fluss entspricht, der für den Lysimeterversuch geplant ist. Unabhängig von der Menge des eingesetzten N_2 war es mit dieser Anlage nicht möglich, den Sauerstoffgehalt unter 0,20 mg/l zu verringern.

Aus diesem Grund wurde eine weitere Anlage gebaut, die von der Funktionsweise identisch mit der ersten war. Allerdings wurden die zwei Wasserreservoirs in zwei voneinander getrennten Reaktionsgefäßen implementiert (Abbildung 83b). Hierbei wurden Rohre mit einer Länge von 55 cm und einem Durchmesser von 3,2 cm eingesetzt. Die eingesetzten Sinterplatten (Porosität 1) hatten einen geringfügig geringeren Außendurchmesser als der Innendurchmesser der Leitungen. Auch in diesem System wurde ein Wasserfluss von 20 ml/min angelegt. Mit einem N_2 Fluss von 25 ml/min je Leitung konnte der gelöste Sauerstoff im gewünschten Ausmaß auf bis zu 0,03 mg/l (dies entspricht der Bestimmungsgrenze des Sauerstoffsensors) vermindert werden.

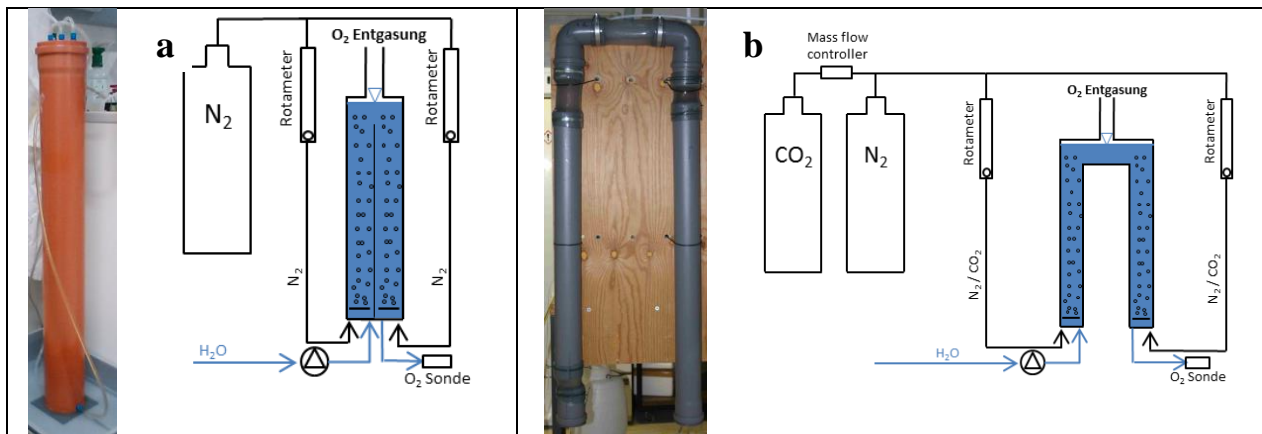


Abbildung 83: O_2 Elimination durch Einblasen von Inertgas a) Innerhalb eines PVC Rohres b) mit zwei Kanalrohren mit Sichtfenstern aus PVC Schläuchen.

Für die erstmalige Befüllung der Lysimeteranlage mit O_2 -freiem Wasser ist ein Fluss von 20 ml/min nicht ausreichend, da die Zeitdauer der Befüllung in diesem Fall mehrere Wochen betragen würde. Mit der eben beschriebenen Anlage war es allerdings nicht möglich den Fluss zu erhöhen und dabei eine zufriedenstellende

O₂-Elimination zu erreichen. Deshalb wurde eine weitere Anlage gebaut, die in ihrer Ausführung ident mit der ersten war. Es wurden allerdings Leitungen mit einer Länge von 110 cm und einem Durchmesser von 7,5 cm eingesetzt. Der Durchmesser der eingesetzten Sinterplatten wurde dementsprechend vergrößert und die Porosität der Sinterplatten wurde verfeinert, um noch kleinere Gasblasen zu generieren (Porosität 4). Dadurch war es möglich den Sauerstoffgehalt auch bei einem deutlich höherem Wasserfluss von ca. 400 ml/min und einem N₂ Fluss von 500 ml/min je Säule auf Werte < 0,05 mg/l zu verringern. Diese Anlage war demnach in der Lage O₂ sowohl bei geringem Fluss als auch bei erhöhtem Fluss effizient zu entfernen.

Neben dem Einsatz von Sinterplatten zur Einbringung von Gas in das Wasser wurde die Verwendung von Membran-Streifenbelüfter ausgetestet (Abbildung 84). Diese Art der Streifenbelüfter wird normaler Weise in Belebungsanlagen von Kläranlagen zur Einbringung von Luft eingesetzt, um den mikrobiellen Abbau zu fördern. Hierbei wird mit hohen Drücken und hohen Gasflüssen gearbeitet, da die Sauerstoffzehrung in solchen Belebungsbecken sehr hoch ist. Auch bei dieser Anwendung ist es wichtig, dass die Gasblasen möglichst fein eingebracht werden, damit die reaktive Oberfläche je eingesetzter Menge Gas hoch ist. Für unsere Anwendung wurde uns von der Firma Aquaconsult ein Membran-Streifenbelüfter zur Verfügung gestellt, der derart perforiert war, dass er auch mit geringerem Druck und geringem Gasfluss betrieben werden kann. Trotzdem war der für den Betrieb der Streifenbelüfter notwendige Gasfluss um ein vielfaches höher als in jenen Anlagen mit Sinterplatten. Der Einsatz von Membran-Streifenbelüfter wurde daher nicht weiter in Betracht gezogen.

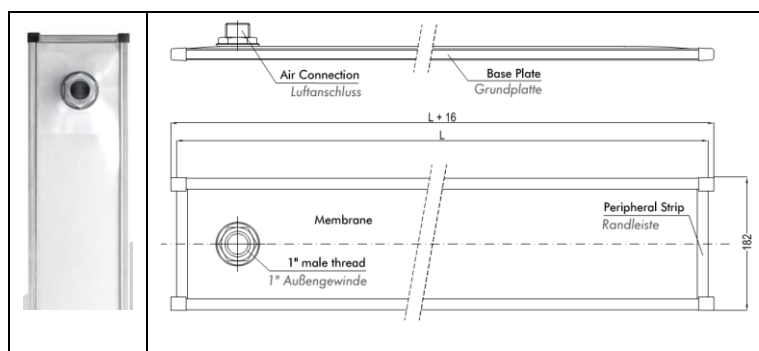
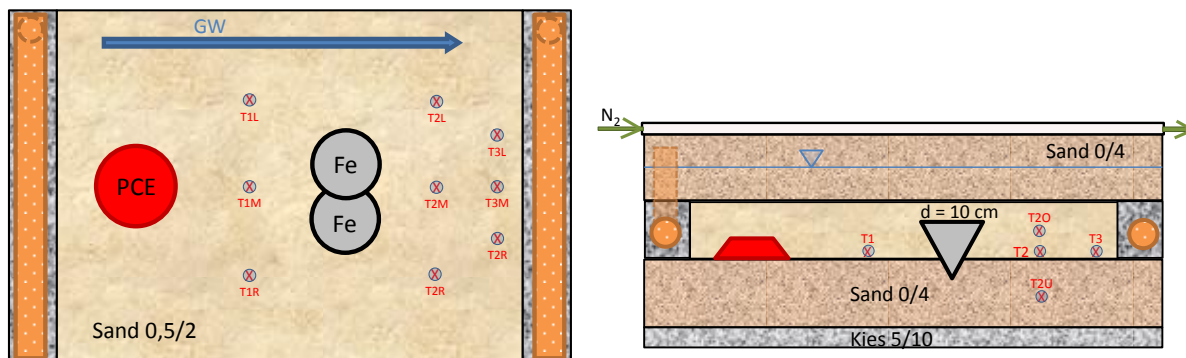


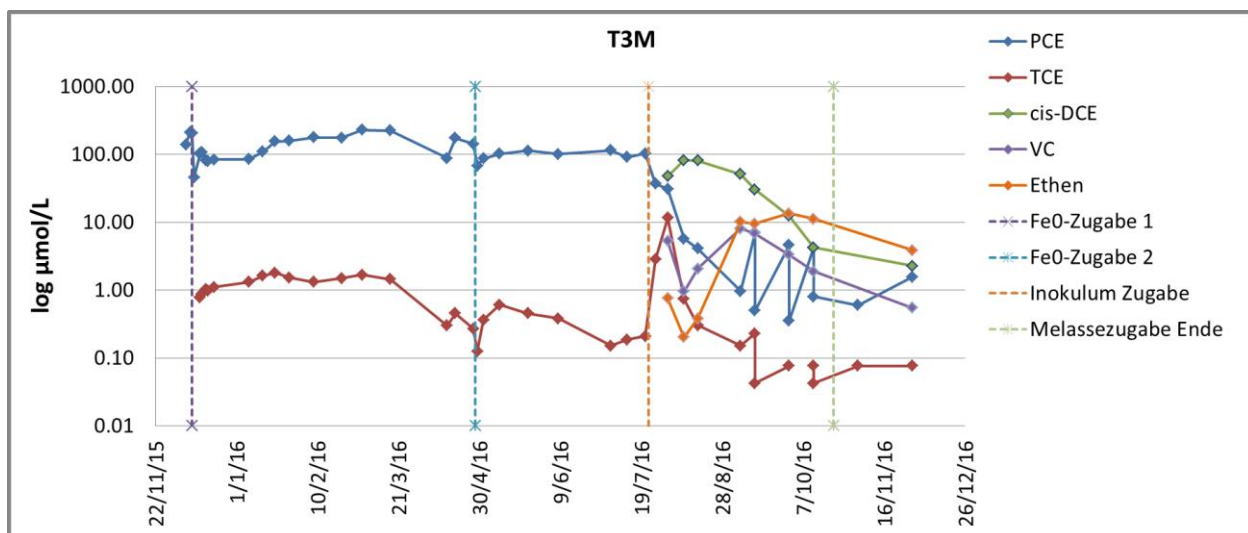
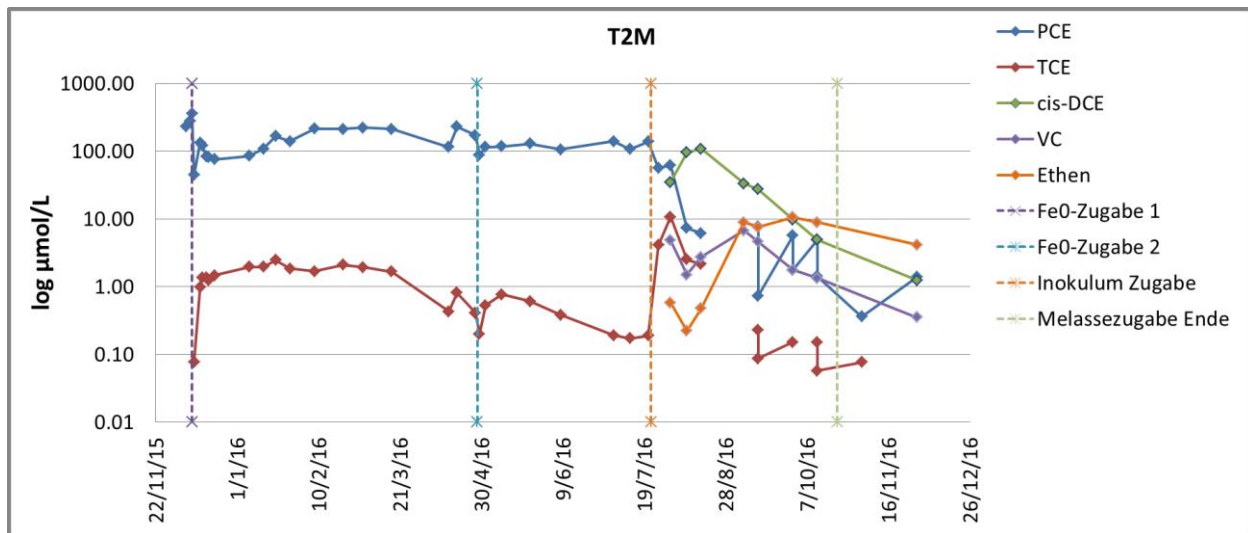
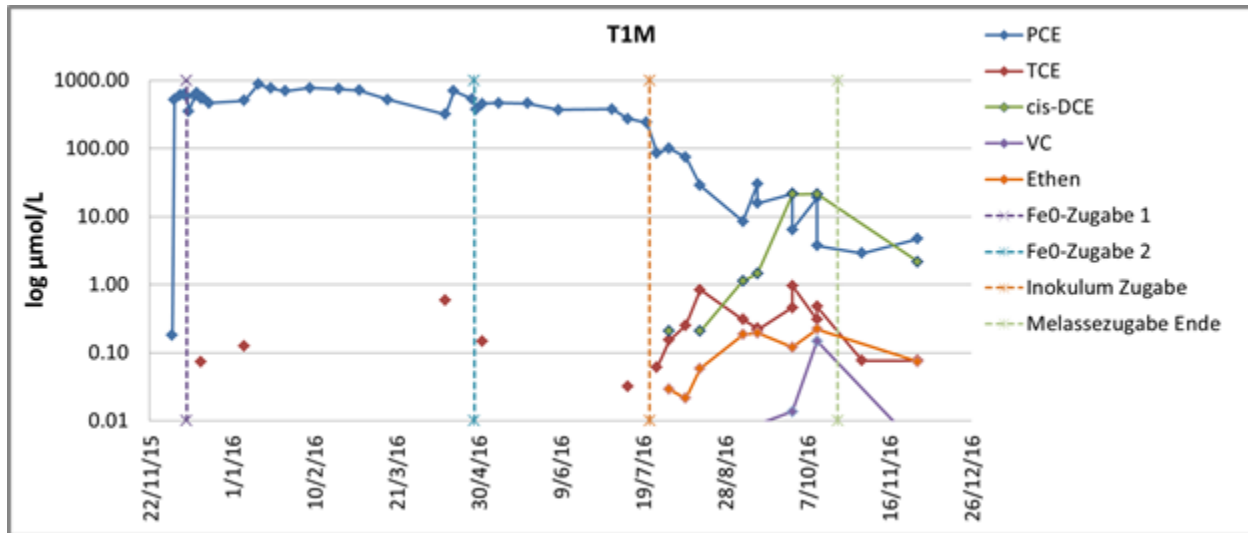
Abbildung 84: O₂ Elimination durch Einblasen von Inertgas durch Streifenbelüfter der Fa. Aquaconsult (Traiskirchen) <http://aquaconsult.at/>.

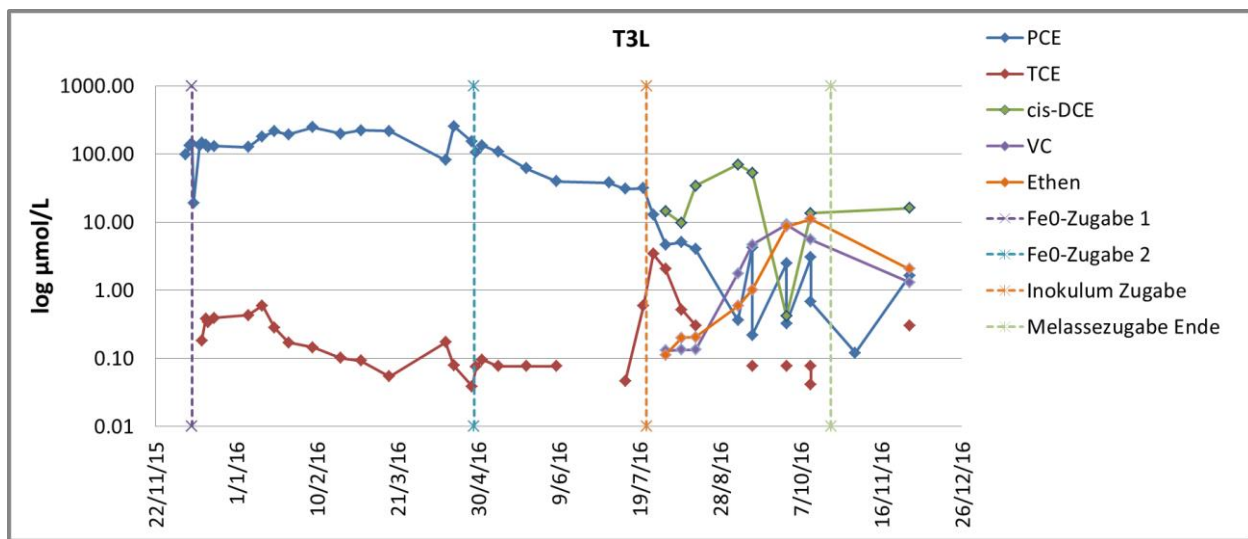
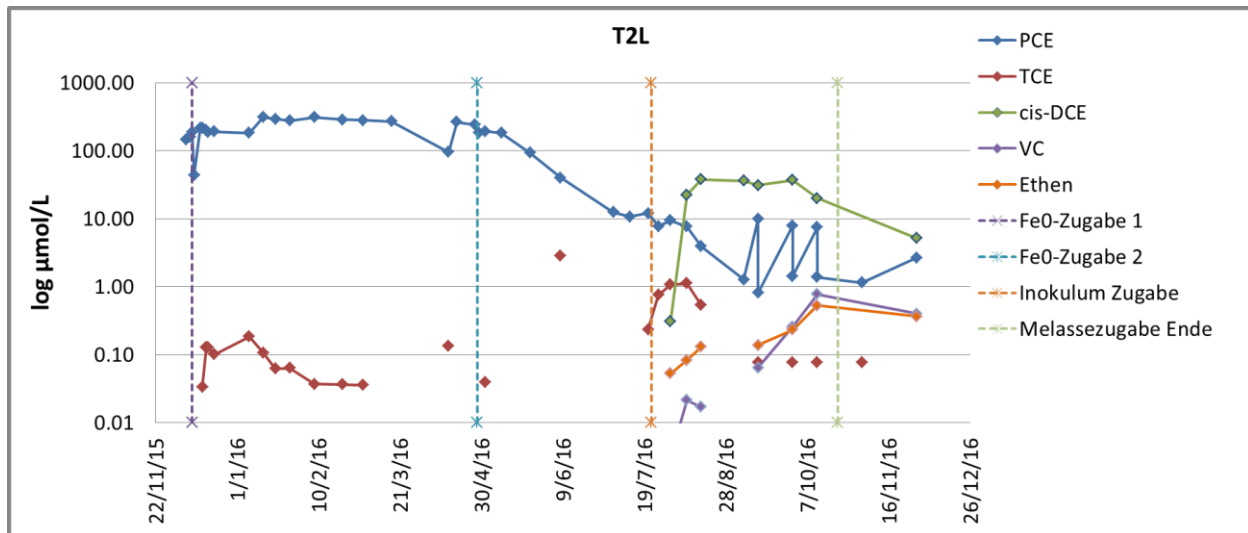
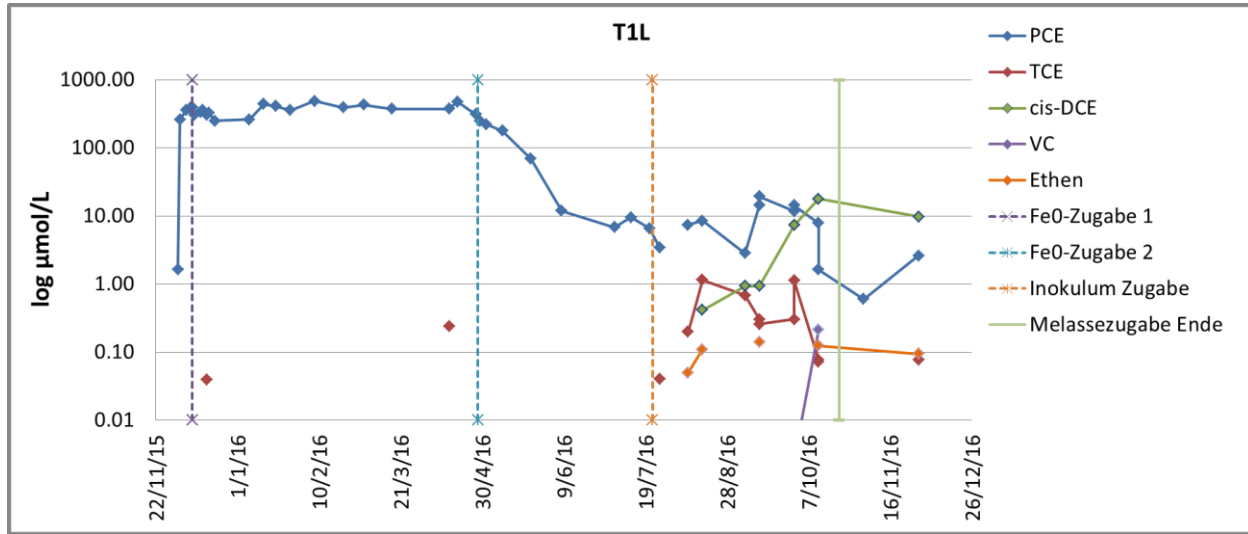
In jenen Lysimetern, in denen ein mikrobieller Abbau forciert werden soll, ist angedacht C-Quellen in den Grundwasserleiter einzubringen. Eine Einbringung solcher C-Quellen könnte idealerweise direkt über den Wasserzufluss erfolgen. Der Sauerstoff wird jedoch – wie oben beschrieben – durch Einperlen von Inertgas aus dem Wasser entfernt. Es ist bekannt, dass C-Quellen im Zuge einer derart turbulenten Einbringung von Gasen zu schäumen beginnen können. Dadurch könnte die Wasserversorgung der Lysimeter gestört werden. Deshalb wurde vorab getestet, ob die Einbringung der C-Quellen Ethyllaktat und Natriumacetat in die O₂-Elimination zu einer Schaumbildung und einer Störung des Systems führt. Hierfür wurden Ethyllaktat (250 g/l bzw. 2,2M) und Natriumacetat (46 g/l bzw. 0,6 M) vorab in 1 l Wasser gelöst. Diese Lösungen wurden

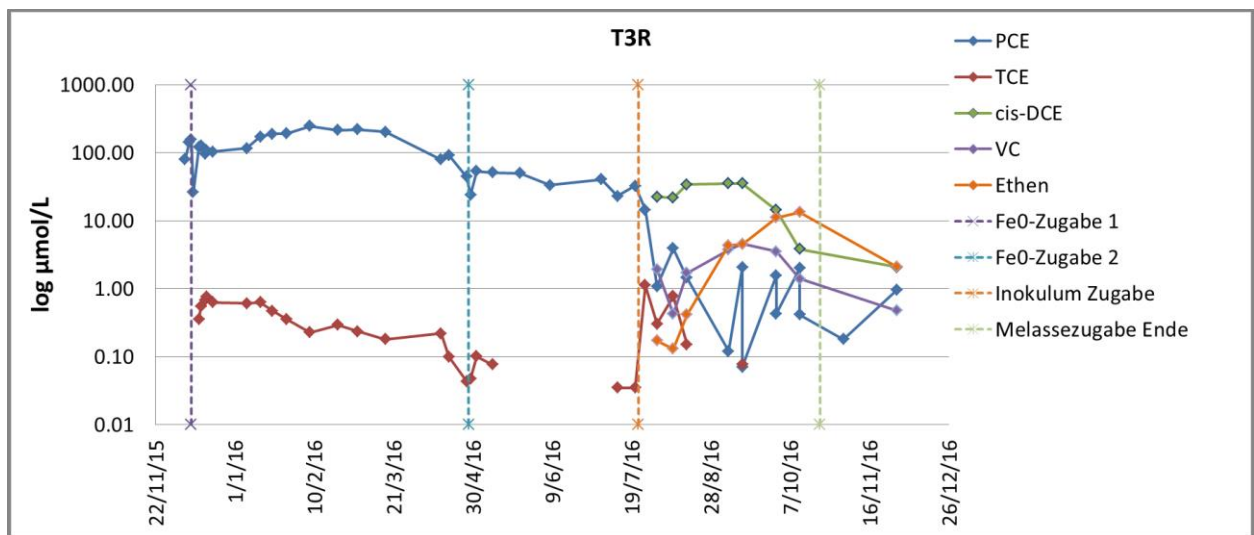
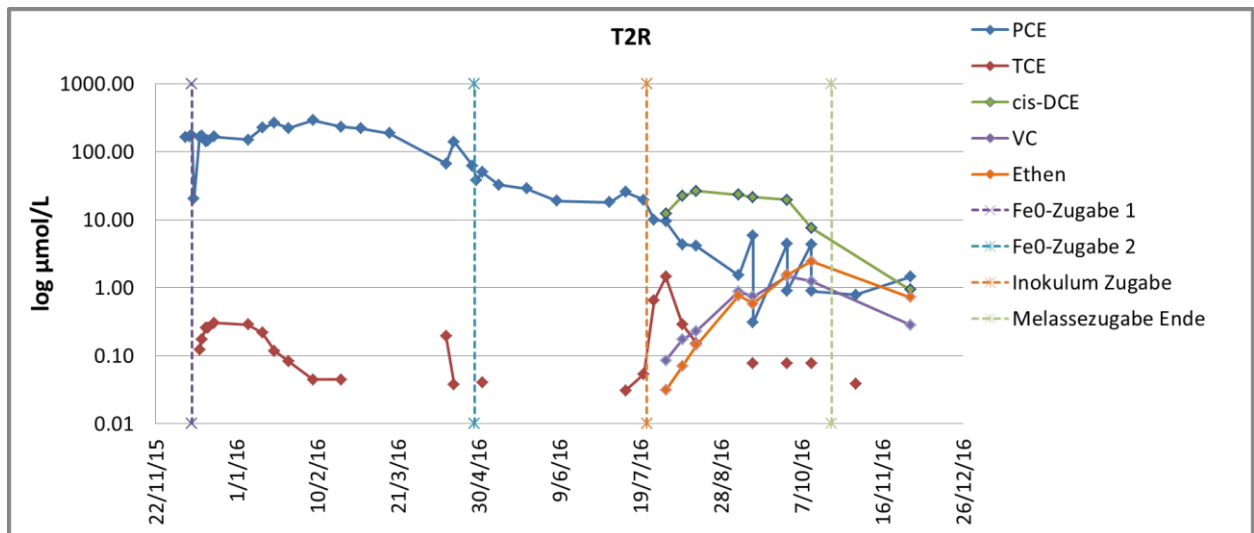
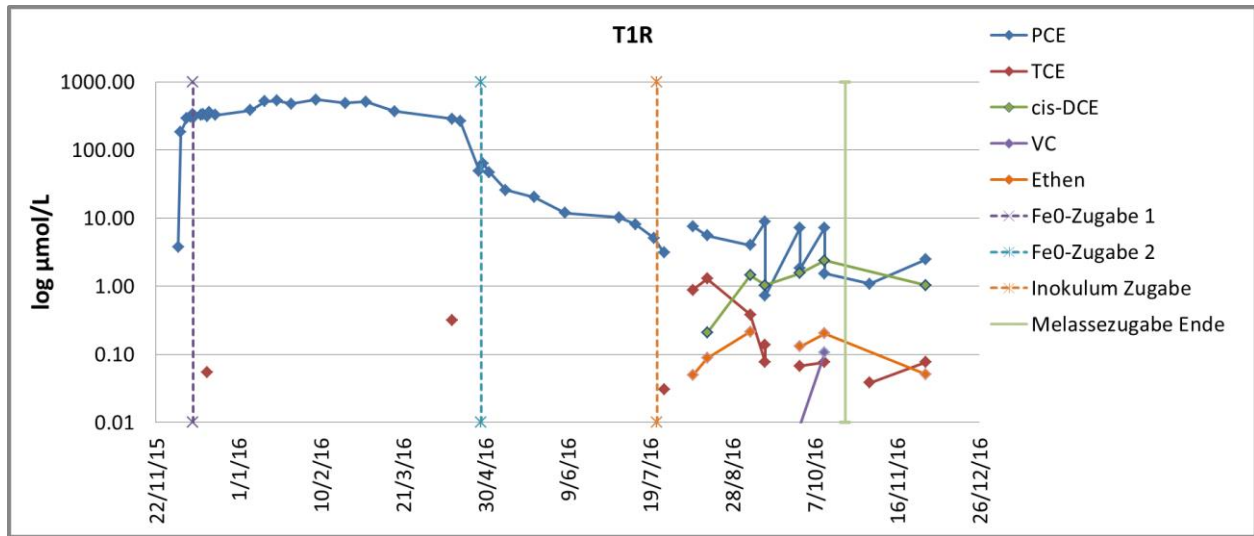
dann mit einem Fluss von 20 ml/min in die erste Leitung der O₂-Elimination (Abbildung 83b) gepumpt. Bezogen auf das Volumen in der ersten Leitung ergaben sich damit Konzentrationen von 500 mM Ethyllaktat oder 130 mM Natriumacetat. Diese Konzentrationen stellen sehr hohe Konzentrationen dar. In den Batchversuchen wurden vergleichsweise nur bis zu rund 3mM der verschiedenen C-Quellen zugeben, um den mikrobiellen Abbau zu fördern. Dennoch wurde bei keiner der beiden Varianten eine Schaumbildung beobachtet. Es ist daher nicht damit zu rechnen, dass die Dotation von C-Quellen eine Schaumbildung bewirkt, die die Funktionsfähigkeit des Entgasungssystems beeinträchtigt. Die Gasbläschen selbst wurden nach Zugabe der C-Quelle bedeutend kleiner, vermutlich durch die dabei entstandene Reduktion der Oberflächenspannung. Eine Zugabe von C-Quellen über den Wasserzufluss würde demnach die reaktive Oberfläche und damit die Effizienz der O₂-Elimination erhöhen.

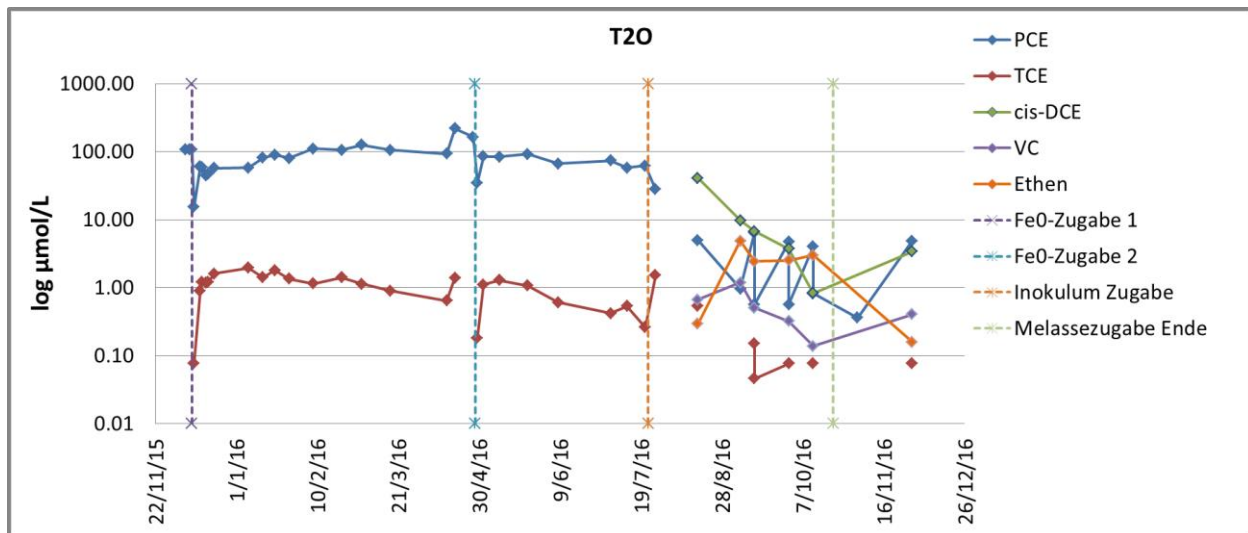
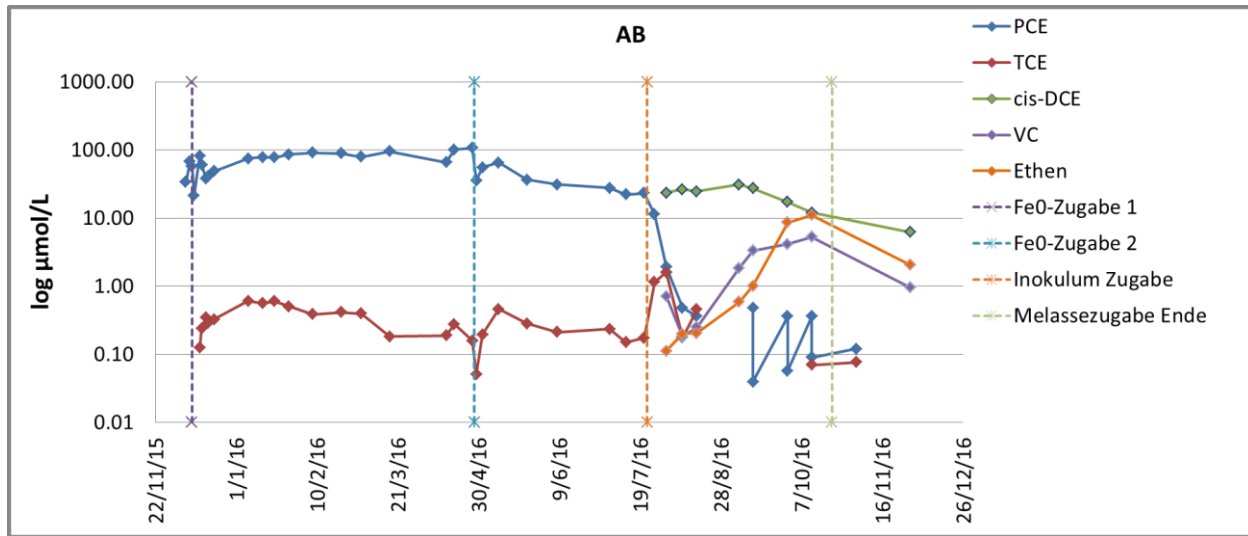
7.5 Kistenversuch – detaillierte Darstellung der (C)KW Konzentrationen in den verschiedenen Probenahmestellen über die Versuchsdauer





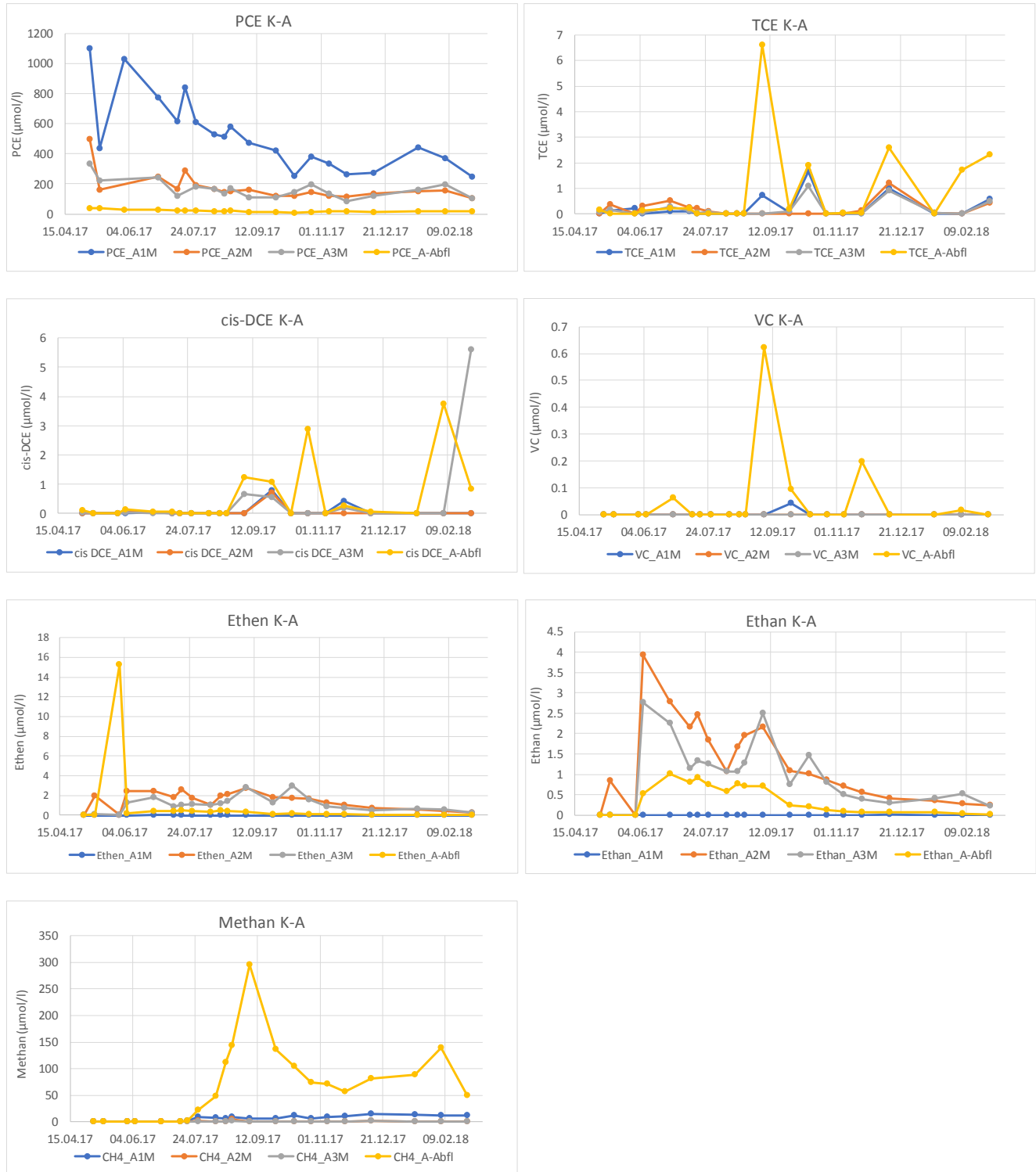




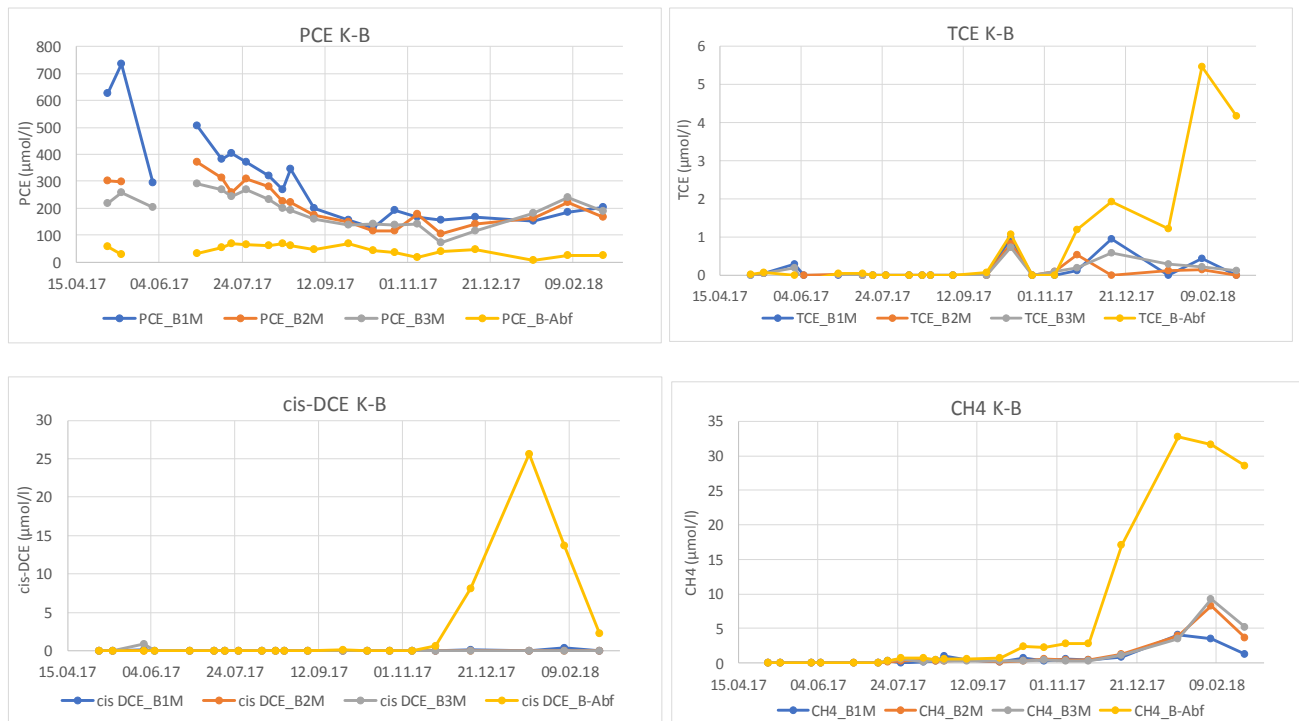


7.6 Lysimeterversuch: Darstellung der (C)KW-Konzentrationen in den einzelnen Kammern

Kammer A:

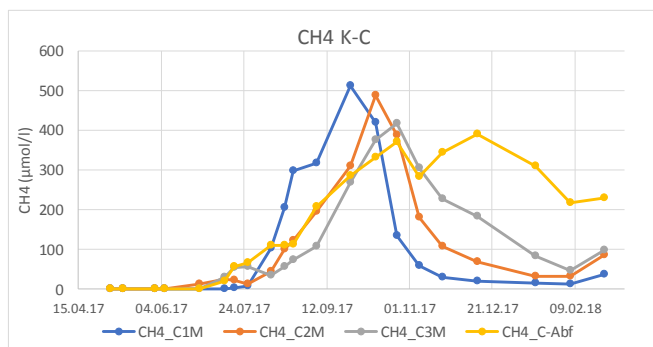
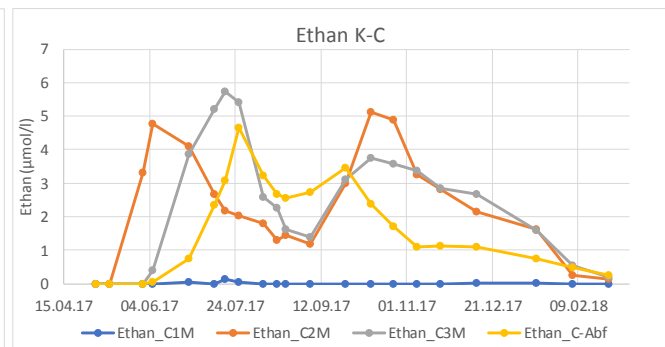
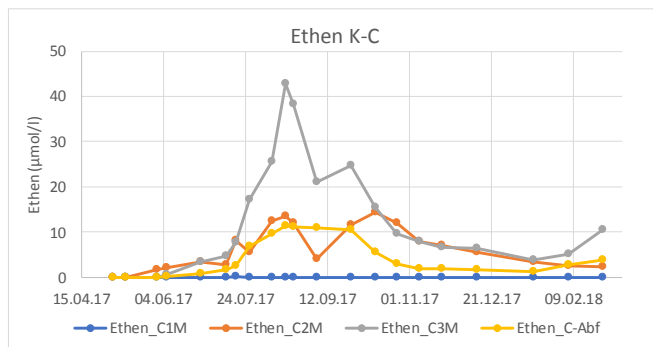
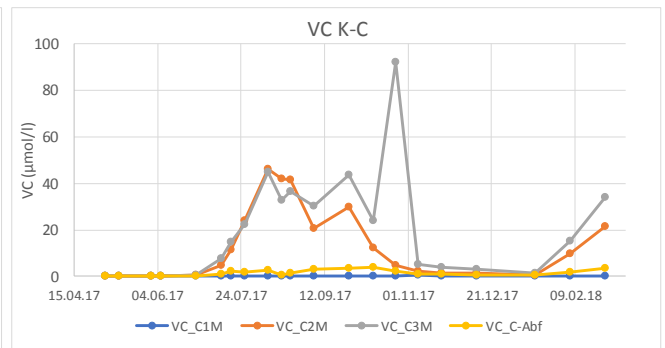
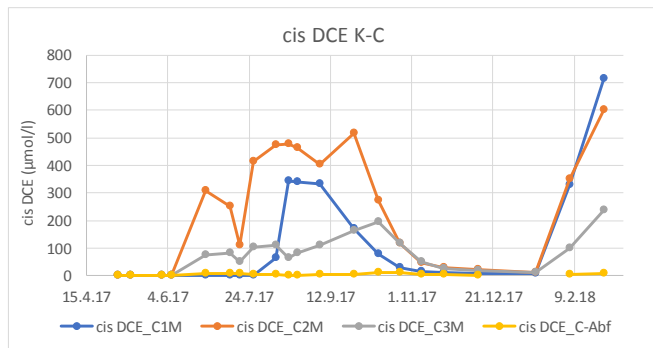
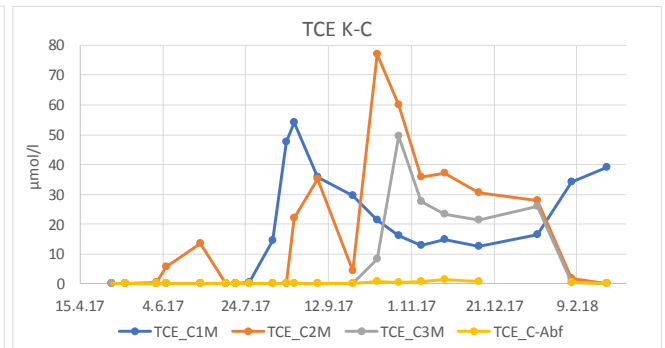
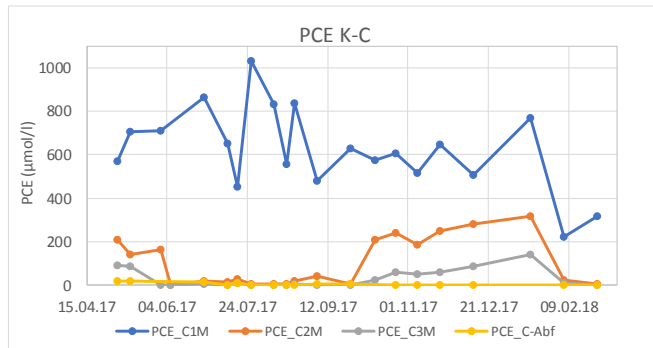


Kammer B:

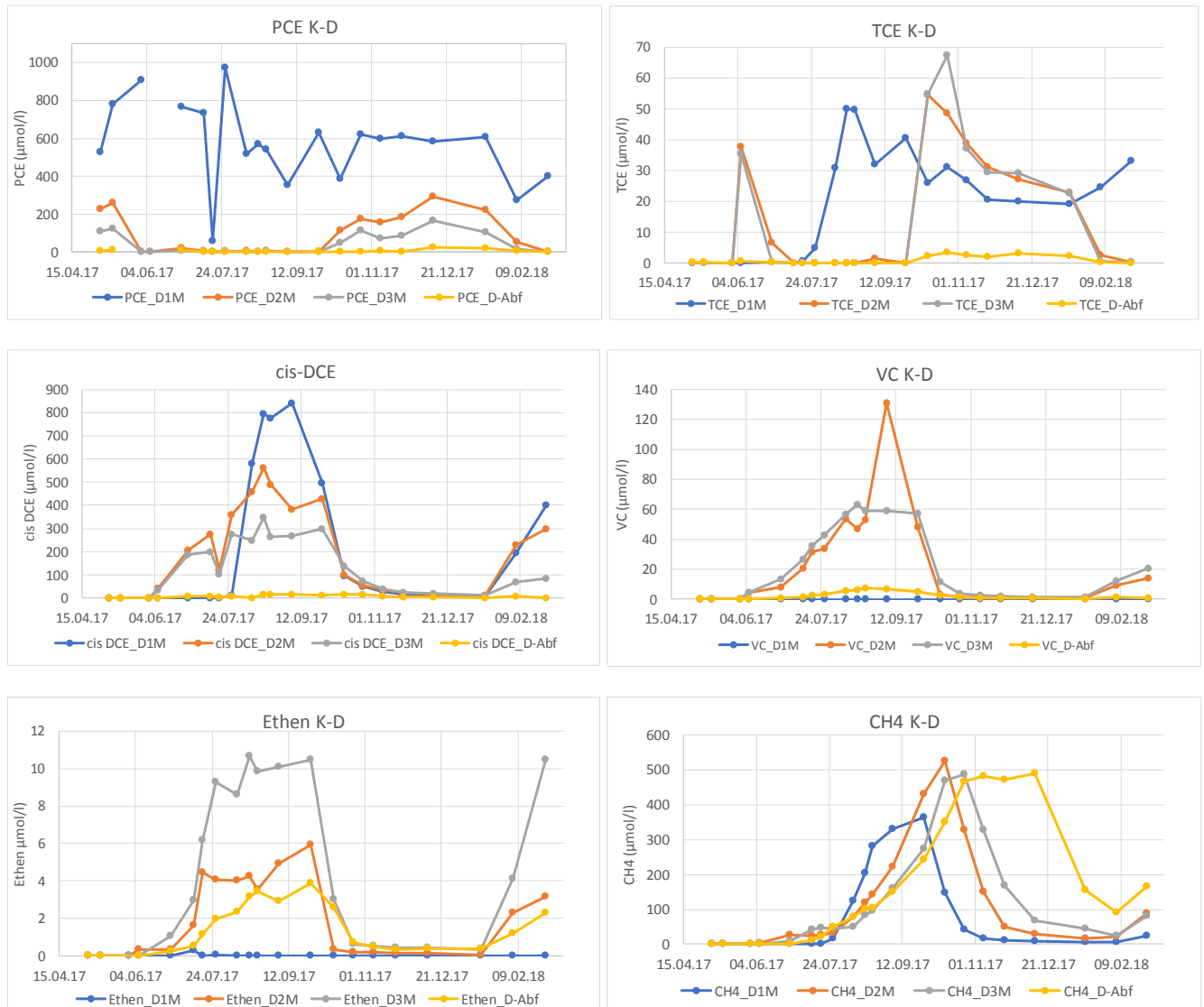


In Kammer B lagen die Konzentrationen an Vinylchlorid, Ethen und Ethan in allen Beprobungspunkten und zu allen Zeitpunkten unter der Nachweisgrenze

Kammer C:



Kammer D:



Die Konzentrationen an Ethen lagen in Kammer B in allen Beprobungspunkten und zu allen Zeitpunkten unter der Nachweisgrenze