

## *Dissertation 12/2009*

***In situ* Mikrokosmen zur Charakterisierung des mikrobiellen  
Schadstoffabbaus in einem BTEX kontaminierten Aquifer**

Petra Bombach

***In situ* Mikrokosmen zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in  
einem BTEX kontaminierten Aquifer**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Petra Bombach,  
geboren am 28.09.1979 in Dresden

Gutachter:

Prof. Dr. hab. I. Röske (TU Dresden)

Prof. Dr. hab. M. Kästner (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ)

Dr. habil. Ulrich Karlson (University of Aarhus)

Tag der Einreichung: 19.12.2008

Tag der Verteidigung: 27.05.2009



---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Kurzfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>12</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>12</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>15</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>21</b>
1.1 Sanierung von Grundwasserschadensfällen.....	22
1.2 Natural Attenuation .....	22
1.3 Mikrobieller Abbau von BTEX-Verbindungen .....	23
1.4 Redoxzonierung in kontaminierten Grundwasserleitern .....	24
1.5 Strategien zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus.....	26
1.6 Implementierung von Natural Attenuation als Sanierungsstrategie .....	29
<b>2 Konzeption der Dissertation</b> .....	<b>31</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.1 Chemikalien.....	34
3.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	34
3.2.1 Nährmedien .....	34
3.3 Mikroorganismen und Kultivierung.....	36
3.4 Standortbeschreibung.....	37
3.5 BACTRAPs.....	38
3.5.1 Herstellung der BACTRAPs.....	38
3.5.2 Beladung der BACTRAPs.....	39
3.5.3 Exposition der BACTRAPs.....	39
3.6 Feldexperimente .....	40
3.7 Laborexperimente.....	44
3.7.1 Desorptionskinetiken von Toluol und Benzol .....	44
3.7.2 Bestimmung von Ertragskoeffizienten .....	44
3.7.3 Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen in Labormikrokosmen	45

3.8	Chemische Analysemethoden.....	46
3.8.1	Toluol und Benzol .....	46
3.8.2	Anionen (Ionenchromatographie).....	47
3.8.3	Sulfid (Photometrisch) .....	47
3.8.4	Fettsäuren.....	48
3.8.5	Kohlenstoffisotopensignaturen.....	51
3.9	Molekularbiologische Methoden.....	54
3.9.1	Isolierung von RNA.....	54
3.9.2	Isolierung von DNA .....	55
3.9.3	DNase-Verdau.....	56
3.9.4	Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese.....	56
3.9.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	56
3.9.6	Dichtegradientenzentrifugation .....	57
3.9.7	cDNA-Synthese .....	58
3.9.8	PCR-Amplifikation.....	58
3.9.9	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) .....	60
3.9.10	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).....	62
3.9.11	Phylogenetische Analyse .....	62
3.10	Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung der Mikroorganismen .....	64
3.10.1	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	64
3.10.2	Rasterelektronenmikroskopie .....	65
3.11	Modellierung.....	66
3.12	Statistische Analysen.....	67
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>68</b>
4.1	Grundlagen der BACTRAPs .....	68
4.1.1	Desorptionskinetik von Toluol und Benzol .....	68
4.1.2	Mikrobielle Besiedlung der BACTRAPs .....	70
4.1.3	Charakteristische Morphotypen der mikrobiellen Gemeinschaft .....	73
4.1.4	Zeitabhängige <sup>13</sup> C-Assimilation in mikrobielle Fettsäuren.....	76
4.2	Mikrobielle Abbaupotentiale im Zeitzer Grundwasser.....	77

---

4.2.1	Einfluss der Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Gemeinschaft .....	77
4.2.2	Einfluss von Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Aktivität .....	85
4.3	Abschätzung des mikrobiellen <i>in situ</i> Schadstoffabbaus.....	92
4.4	Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen.....	95
4.4.1	Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen in Labormikrokosmen	95
4.4.2	Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen im Zeitzer Grundwasser .....	105
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>112</b>
5.1	BACTRAPs als <i>in situ</i> Methode für die Untersuchung des mikrobiellen Schadstoffabbaus.....	112
5.2	Beurteilung der mikrobiellen Abbaupotentiale.....	115
5.2.1	Einfluss der Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Gemeinschaft .....	116
5.2.2	Stimulation des biologischen Abbaus durch Zugabe von Elektronenakzeptoren.....	118
5.3	Abschätzung des mikrobiellen <i>in situ</i> Schadstoffabbaus mithilfe von BACTRAPs	121
5.4	Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen.....	122
5.4.1	Identifizierung der Toluolabbauer in Labormikrokosmen .....	122
5.4.2	Identifizierung der Toluolabbauer im Zeitzer Grundwasser .....	128
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>136</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>155</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>157</b>



## Kurzfassung

Mikrobieller Abbau ist die Schlüsselaktivität für eine nachhaltige Reduktion von organischen Schadstoffen in kontaminierten Grundwasserleitern (=Aquifer). Um dieses natürliche Selbstreinigungspotential für die Sanierung eines schadstoffbelasteten Grundwasserleiters zu nutzen, sind detaillierte Kenntnisse über die am jeweiligen Standort vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften und deren spezifischen Abbauleistungen essentiell. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass *in situ* Mikrokosmen (BACTRAPs), die mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Toluol oder Benzol beladen und direkt im Grundwasser inkubiert werden, eine viel versprechende Möglichkeit zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus im Grundwasser sind (Geyer et al., 2005). Der eindeutige und direkte Nachweis des mikrobiellen Abbaus erfolgt dabei über Analyse der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in mikrobiellen Biofilmen, die sich auf den BACTRAPs während der *in situ* Exposition ansiedeln.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die BACTRAPs erstmalig zur Untersuchung und zum Vergleich mikrobieller Abbaupotentialen bei verschiedenen terminalen Elektronenakzeptoren (TEA) verwendet. Dazu wurden BACTRAPs mit [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol sowie den potentiellen Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat oder Eisen(III) beladen und für 3 Monate in einem BTEX (Benzol-, Toluol-, Ethylbenzol- und o, m, p-Xylol) kontaminierten Grundwasserleiter exponiert. Die Analysen der Gesamtlipidfettsäuren (TLFA) in Kombination mit 16S rRNA-basierenden Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Profilen zeigten, dass komplexe mikrobielle Gemeinschaften auf den BACTRAPs siedelten, deren Zusammensetzungen deutlich von den verschiedenen Elektronenakzeptoren beeinflusst wurden. Die Transformation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes aus dem [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol in die mikrobielle Biomasse erbrachte den Nachweis für den mikrobiellen Toluolabbau und diente darüber hinaus zur Beurteilung der mikrobiellen Abbaupotentiale unter den jeweiligen geochemischen Bedingungen. Die höchsten Isotopenanreicherungen wurden in den von Eisen-BACTRAPs extrahierten Fettsäuren gemessen. Daraus konnte abgeleitet werden, dass Eisen unter den gegebenen Milieubedingungen den größten Effekt auf den mikrobiellen Toluolmetabolismus hatte.

Um die toluolabbauenden Mikroorganismen zu identifizieren, wurde die Inkorporation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die 16S rRNA mithilfe von Dichtegradientenzentrifugation (RNA-SIP)

verfolgt. Die für die  $^{13}\text{C}$ -RNA ermittelten Sequenzen zeigten eine Dominanz von unkultivierten Mikroorganismen der Gattungen *Herbaspirillum* und/oder *Janthinobacterium*. Spezies dieser Gattung sind bis dato nicht als anaerobe Toluolabbauer bekannt. Nur vereinzelte Sequenzen wiesen eine enge Verwandtschaft zu der Gattung *Azoarcus* auf, aus der bereits für mehrere Spezies der Toluolabbau unter nitratreduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden konnte.

Um für die indigenen Mikroorganismen des Standortes den eindeutigen Nachweis für einen anaeroben Toluolmetabolismus zu erbringen, wurde aus einem sulfatreduzierenden Grundwasserbereich mithilfe Toluol beladener BACTRAPs ein Konsortium angereichert, welches anschließend unter sulfatreduzierenden Bedingungen mit isotopisch-markiertem Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert wurde. Die Identifikation der isotopisch-markierten Mikroorganismen demonstrierte, dass der Großteil der Klone (89%) eine 99%ige Sequenzähnlichkeit zu einem unkultivierten Bakterium der Gattung *Desulfocapsa* innerhalb der *Deltaproteobacteria* aufwies. Dies verifiziert die Relevanz von *Desulfocapsa*-Spezies für den mikrobiellen Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen.

Um neben dem rein qualitativen Nachweis des *in situ* Abbaus auch quantitative Aussagen über mikrobielle Schadstoffumsätze auf den BACTRAPs treffen zu können, wurde ein Quantifizierungsmodell entwickelt. Demzufolge können die Schadstoffumsätze basierend auf der Menge  $^{13}\text{C}$ -angereicherter mikrobieller Fettsäuren, die sich während der *in situ* Inkubation auf den BACTRAPs entwickeln, und verschiedenen in Laborexperimenten bestimmten TLFA-basierenden Ertragskoeffizienten modelliert werden. Die Erprobung des Modells in einer Studie zur Untersuchung mikrobieller Abbaupotentiale demonstrierte, dass mithilfe des Modells erste Anhaltspunkte bezüglich der Schadstoffumsätze gewonnen werden können.

Im Hinblick auf die geringen Kenntnisse der für den anaeroben Abbau von BTEX-Verbindungen verantwortlichen Mikroorganismen und deren Abbauleistungen am Standort lieferte diese Arbeit einen umfangreichen Einblick in die Phylogenie als auch Physiologie dieser Spezialisten. Durch Weiterentwicklung des bisherigen BACTRAP-Systems wurde ein wertvolles Instrumentarium geschaffen, um spezifische Mikroorganismen, deren metabolische Fähigkeiten und Leistungen unter *in situ* Bedingungen zu untersuchen, sowie Konsortien für Labormikrokosmenstudien anzureichern.

**Abstract**

Biodegradation represents the most important mechanism of natural attenuation leading to destruction of contaminants in groundwater. For the successful application of Natural Attenuation processes as a remediation strategy, detailed knowledge about specific microbial community members and their metabolic activities at the given environmental conditions is essential. Recently, we have demonstrated that biofilms grown under aquifer conditions can be collected by using *in situ* microcosms (BACTRAPs). By amendment with  $^{13}\text{C}$ -labelled benzene or toluene and detection of  $^{13}\text{C}$  in microbial polar lipid fatty acids (PLFA), the system already provided evidence for biodegradation of toluene but also benzene under *in situ* conditions (Geyer et al., 2005)

Within this thesis, BACTRAPs were applied for monitoring of microbial activities under various electron acceptor processes. Therefore, BACTRAPs loaded with [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -toluene and the electron acceptors nitrate, sulphate or ferric iron were exposed in a BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and o, m, p-xylene) contaminated aquifer for 3 month. Quantitative fatty acid pattern combined with 16S rRNA-based T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) profiles verified the colonisation of the in BACTRAPs with complex microbial communities clearly influenced by the various electron acceptors supplied. The transformation of  $^{13}\text{C}$  from labelled substrate into microbial fatty acids provided evidence for the degradation of the pollutant with formation of biomass and can be used for assessment of biodegradation potentials under the respective geochemical conditions. Due to highest isotope enrichment into fatty acids in iron-amended BACTRAPs, ferric iron mostly influenced the metabolic activity of the specific toluene-degraders under the given *in situ* conditions.

In order to identify the toluene-assimilating bacteria, the incorporation of carbon from [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -toluene into rRNA was analysed using equilibrium density centrifugation (RNA-SIP). Sequences retrieved from the  $^{13}\text{C}$ -RNA indicated the dominance of not-yet cultivated bacteria of the *Herbaspirillum* and/or *Janthinobacterium* groups. Species of these genera are not known for the anaerobic toluene metabolism. Only few sequences were phylogenetically closely related to *Azoarcus*, a genus which is known to comprise nitrate-reducing toluene-degrading bacteria.

To verify the toluene metabolism of intrinsic microorganisms, a toluene-degrading microbial consortium was enriched in the BTEX contaminated aquifer under sulphate-reducing conditions by using toluene-loaded BACTRAPs. In the following, the consortium was physiologically and phylogenetically characterized by using isotopic-labelled toluene as energy and carbon source. The identification of the  $^{13}\text{C}$ -enriched microorganisms revealed that the majority of clones (89 %) were closely related to an uncultured bacterium (99% sequence similarity), clustering with the genus *Desulfocapsa* within the delta subclass of proteobacteria. This verified the relevance of *Desulfocapsa*-species for the toluene degradation under sulphate-reducing conditions.

Beside the qualitative proof of *in situ* biodegradation, the biodegradation rates on the BACTRAPs were estimated using a newly developed mathematical model. Hence, the biodegradation rates of toluene were calculated by the amount of labelled total lipid fatty acids (TLFA) produced during *in situ* exposure and TLFA-based yield coefficients determined in laboratory experiments.

With regard to the small knowledge of relevant anaerobic BTEX-degraders at the field site, this thesis gave a comprehensive insight into phylogeny and physiology of these key players under the given environmental conditions. Based on the modified BACTRAP-system, a valuable tool was developed for further investigations of specific microorganisms, their metabolic capabilities and degradation potentials under the given environmental conditions, as well as to enrich specific consortia from groundwater.

Teile dieser Dissertationsschrift sind bzw. werden in folgenden wissenschaftlichen Publikationen dargelegt:

- Kästner, M.; Fischer, A.; Nijenhuis, I.; Geyer, R.; Stelzer, N.; Bombach, P.; Tebbe, C. C.; Richnow, H. H. Assessment of microbial *in situ* activity in contaminated aquifers. Eng. Life Sci. 2006, 6, 234-251.
- Bombach, P.; Chatzinotas, A.; Neu, T.; Kästner, M.; Vogt, C. Enrichment and identification of a sulphate-reducing toluene-degrading consortium by combining *in situ* microcosms and stable isotope probing. Envir. Microbiol. (eingereicht)
- Bombach, P.; Bräunlich, L.; Chatzinotas, A.; Geyer, R.; Fetzer, I.; Lueders, T.; Kästner, M. Assessment of BTEX degradation potentials with various electron acceptors in a BTEX contaminated aquifer using *in situ* microcosms. (in Vorbereitung)
- Bombach, P.; Schmidt-Brücken, B.; Bräunlich, L., Chatzinotas, A., Kästner, M. Monitoring of toluene-degrading bacteria during *in situ* biostimulation. Envir. Microbiol. (in Vorbereitung)

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1-1</b>	Strukturformeln der BTEX-Verbindungen.....	21
<b>Abb. 1-2</b>	Hypothetische Verteilung von Redoxzonen mit Entfernung zu einer BTEX-Schadstoffquelle im Grundwasser. ....	25
<b>Abb. 1-3</b>	<i>In situ</i> Mikrokosmos (BACTRAP) gefüllt mit BioSep® Beads.....	28
<b>Abb. 1-4</b>	Konzept der BACTRAPs. ....	29
<b>Abb. 2-1</b>	Übersicht über die übergeordneten Ziele und Fragestellungen der Dissertation und den jeweiligen Strategien. ....	33
<b>Abb. 3-1</b>	Strukturformeln des [ <sup>13</sup> C]- $\alpha$ -Toluols und [ <sup>13</sup> C <sub>7</sub> ]-Toluols.....	34
<b>Abb. 3-2</b>	Technologien zur Exposition der BACTRAPs. ....	40
<b>Abb. 3-3</b>	Verteilung der BTEX-Konzentrationen im unteren (links) und oberen (rechts) Aquifer im Bereich des ehemaligen Hydrierwerkes (Zeititz, Sachsen-Anhalt).....	41
<b>Abb. 3-4</b>	Massenspektren der Fettsäure 16:0 nach Wachstum der Anreicherungskultur ZBT 1 mit [ <sup>12</sup> C]-Toluol und [ <sup>13</sup> C <sub>7</sub> ]-Toluol. ....	52
<b>Abb. 4-1</b>	Vergleich gemessener (■) und modellierter Desorptionskinetik (weiße Symbole) von Toluol (A) und Benzol (B) aus den Beads bei 12°C ( $\approx$ Grundwassertemperatur). ....	69
<b>Abb. 4-2</b>	Sukzession von Mikroorganismen in den verschiedenartig beladenen BACTRAPs reflektiert durch die Formation von Gesamtlipidfettsäuren (TLFAs). ....	71
<b>Abb. 4-3</b>	SSCP Profile amplifizierter 16S rDNA, welche von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit [ <sup>12</sup> C]-Toluol oder [ <sup>13</sup> C]- $\alpha$ -Toluol nach 8 (T1), 15 (T2), 29 (T3), 56 (T4) und 112 (T5) Tagen Exposition im niedrigkontaminierten Bereich des Grundwassers isoliert wurde. ....	73
<b>Abb. 4-4</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Bead-Ausschnitts vor (A) und nach 3-monatiger Exposition (B) im Grundwasser. ....	74
<b>Abb. 4-5</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mikrobieller Gemeinschaften, die sich auf den BACTRAPs während der Exposition im Grundwasser ansiedelten. ....	75

- Abb. 4-6** Clusteranalyse von PLFA-Profilen, die von unbeladenen BACTRAPs und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S) und Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser erstellt wurden..... 79
- Abb. 4-7** Clusteranalyse von Chinon-Profilen, die von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser erstellt wurden..... 81
- Abb. 4-8** Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (engl. CLSM) Aufnahmen der mikrobiellen Biofilme auf den Beads nach 6-wöchiger Inkubation der unbeladenen BACTRAPs (1) und BACTRAPs beladen mit Toluol (2), Toluol+Nitrat (3), Toluol+Sulfat (4), Toluol+niedriger Eisengehalt (5) oder Toluol+hoher Eisengehalt (6) im Grundwasser.83
- Abb. 4-9** Boxplotanalyse mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ermittelter Bakterienvolumina für unbeladene BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im mittelkontaminierten Grundwasserbereich..... 84
- Abb. 4-10** Clusteranalyse von TLFA-Profilen, die von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+E) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich erstellt wurden. .... 87
- Abb. 4-11** Korrelation zwischen Gesamtkohlenstoffgehalt in mikrobiellen Fettsäuren ( $C_{TLFA}$ ) und Gehalt an  $^{13}C$ -Kohlenstoff ( $^{13}C_{TLFA}$ ). Die Extraktion der Gesamtlipidfettsäuren (TLFA) erfolgte von BACTRAPs beladen mit Toluol (■), Toluol+Nitrat (●), Toluol+Sulfat (□) oder Toluol+Eisen (○)..... 90
- Abb. 4-12** T-RFLP Profile, die von unbeladenen BACTRAPs (A) und BACTRAPs beladen mit Toluol (B), Toluol+Nitrat (C), Toluol+Sulfat (D) und Toluol+Eisen (E) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich erstellt wurden. .... 91
- Abb. 4-13** Sulfidproduktion der Anreicherungskultur ZBT 1 über die Zeit. .... 97

<b>Abb. 4-14</b> Exemplarische Konfokal Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der mikrobiellen Biofilme auf den Beads nach 60-tägiger Kultivierung von ZBT 1 mit Toluol. ....	98
<b>Abb. 4-15</b> Konzentration der jeweiligen Fettsäuren (unten) und prozentuale Inkorporation des toluolbürtigen <sup>13</sup> C-Kohlenstoffes in die mikrobiellen Fettsäuren (oben) nach 60-tägiger Inkubation der Anreicherungskultur ZBT 1 mit [ <sup>12</sup> C]-Toluol (□), [ <sup>13</sup> C]-α-Toluol (▣) oder [ <sup>13</sup> C <sub>7</sub> ]-Toluol (■) als Kohlenstoff- und Energiequelle.....	99
<b>Abb. 4-16</b> Quantitative Verteilung der RNA nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die Isolierung der RNA erfolgte direkt von den Beads, die aus den Labormikrokosmen versetzt mit [ <sup>12</sup> C]-Toluol (○), [ <sup>13</sup> C]-α-Toluol (⊕) oder [ <sup>13</sup> C <sub>7</sub> ]-Toluol (●) nach 20, 48 und 60 Tagen Inkubation entnommen wurden. ....	100
<b>Abb. 4-17</b> Mikrobielle Besiedlung der Beads während der Kultivierung der Anreicherungskultur ZBT 1. ....	101
<b>Abb. 4-18</b> Phylogenetische Verwandtschaft der dominanten Klonsequenzen in der Klonbibliothek der Anreicherungskultur ZBT 1.....	104
<b>Abb. 4-19</b> Quantitative Verteilung der RNA nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die Isolierung der RNA erfolgte von BACTRAPs beladen mit Toluol (A), Toluol+Nitrat (B), Toluol+Sulfat (C), Toluol+Eisen (D) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich.....	106
<b>Abb. 4-20</b> Phylogenetische Verwandtschaft der aus den BACTRAPs Toluol+Sulfat gewonnenen Klonsequenzen innerhalb der <i>Alphaproteobacteria</i> . ....	109
<b>Abb. 4-21</b> Phylogenetische Verwandtschaft der aus den BACTRAPs Toluol+Sulfat gewonnenen Klonsequenzen innerhalb der <i>Betaproteobacteria</i> . ....	110
<b>Abb. 4-22</b> Prozentuale Verteilung der Organismen in den BACTRAPs beladen mit Toluol (A), Toluol+Nitrat (B), Toluol+Sulfat (C), Toluol+Eisen (D) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich.....	111

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 3-1</b>	Medium zur Kultivierung von <i>Azoarcus</i> sp. ....	35
<b>Tab. 3-2</b>	Medium zur Kultivierung von <i>Desulfobacterium cetonicum</i> und ZBT 1 .....	36
<b>Tab. 3-3</b>	Verteilung der Benzol-, Toluol-, Nitrat-, Mangan-, Eisen-, Sulfat- und Hydrogencarbonat-Konzentrationen in den verschiedenen Grundwassermessstellen. ....	41
<b>Tab. 3-4</b>	Übersicht über die verschiedenen Feldversuche einschließlich Zielstellung, Versuchsdesign und -durchführung sowie verwendeter Analyseverfahren. ....	42
<b>Tab. 3-5</b>	Gaschromatographische Messbedingungen zur Quantifizierung des Toluols und Benzols.....	47
<b>Tab. 3-6</b>	Temperaturprogramm und Geräteeinstellungen für die Analytik der FAMES ....	51
<b>Tab. 3-7</b>	Bezeichnung, Sequenz, Zielgruppe, Verwendung und Quelle der verwendeten Oligonukleotid-Primer. ....	59
<b>Tab. 3-8</b>	Zusammensetzung der PCR-Reaktion für ein Reaktionsvolumen von 25 µl.....	59
<b>Tab. 3-9</b>	PCR-Thermocyclerprogramm zur Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene und der Vektorinserts von Klonen.....	60
<b>Tab. 3-10</b>	Verwendete Lösungen und Volumina für einen 10 µl Sequenzieransatz. ....	63
<b>Tab. 3-11</b>	Temperaturprogramm für die Sequenzierreaktion.....	63
<b>Tab. 4-1</b>	Relative Abundanzen der Phospholipidfettsäuren, die von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser extrahiert wurden. ....	78
<b>Tab. 4-2</b>	Relative Abundanzen der respiratorischen Chinone, die von unbeladenen BACTRAPs und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S) und Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser extrahiert wurden. ....	80

<b>Tab. 4-3</b>	Relative Abundanzen der Gesamtlipidfettsäuren (TLFA) und <sup>13</sup> C-Anreicherungen in den mikrobiellen Fettsäuren, die von unbeladenen und BACTRAPs beladen mit Toluol, Toluol+Nitrat, Toluol+Sulfat oder Toluol+Eisen nach 3-monatiger Exposition im Grundwasser extrahiert wurden.....	88
<b>Tab. 4-4</b>	Berechnung des biotischen Substratumsatzes für BACTRAPs beladen mit <sup>13</sup> C-Toluol, <sup>13</sup> C-Toluol+Nitrat, <sup>13</sup> C-Toluol+Sulfat und <sup>13</sup> C-Toluol+Eisen nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich. ....	94
<b>Tab. 4-5</b>	Phylogenetische Zuordnung, Anzahl der Klonsequenzen und charakteristische T-RFs der Klonsequenzen in der Klonbibliothek generiert für die Anreicherungskultur ZBT 1. ....	102
<b>Tab. 4-6</b>	Phylogenetische Zuordnung, Anzahl der Klonsequenzen und charakteristische T-RFs der Klonsequenzen in der Klonbibliothek generiert für die mit Toluol+Nitrat beladenen BACTRAPs. ....	107

**Abkürzungsverzeichnis**

a	vor Fettsäuren: anteiso
Abb.	Abbildung
AD	Außendurchmesser
AluI	Restriktionsenzym
Area	Peakfläche
at%	Atomprozent
Bead	BioSep® Bead
bp	Basenpaar
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
c	Konzentration
c	vor Fettsäuren: cis
<sup>12</sup> C	<sup>12</sup> C-Kohlenstoff
<sup>13</sup> C	<sup>13</sup> C-Kohlenstoff
C21:0	Fettsäure-Standard 21:0
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> ; Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CsTFA	Caesiumtrifluoracetat
cy	vor Fettsäuren: cyclo
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMK	Dimethylnachinon
DMPD	N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> ; extrazelluläre polymere Substanzen
et. al.	und andere
f	<i>forward</i> ; vorwärts
FAM	6-Carboxy-Fluorescein-Markierung
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i> ; Fettsäuremethylester

g <sub>AV</sub>	relative Zentrifugalkraft
GC-C-IRMS	<i>Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> ; Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnis- Massenspektrometrie
GC-FID	<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i> ; Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> ; Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GOK	Geländeoberkante
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i	vor Fettsäuren: iso
IPTG-Lösung	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ; Internationale Union für reine und angewandte Chemie
Kap.	Kapitel
LB	Luria-Bertani-Agar
LC/MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> ; Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie- Tandemmassenspektrometrie
Log K <sub>ow</sub>	Oktanol-Wasserverteilungskoeffizient
M <sup>+</sup>	Molekularion
Me	vor Fettsäuren: Methylverzweigung
MK	Menachinon
MTBE	Methyltertiärbutylether
MW	Mittelwert
n	Stichprobenanzahl
NA	<i>Natural Attenuation</i> ; Natürliche Selbstreinigung
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OTU	<i>operationale taxonomic unite</i> ; operative taxonomische Einheit

---

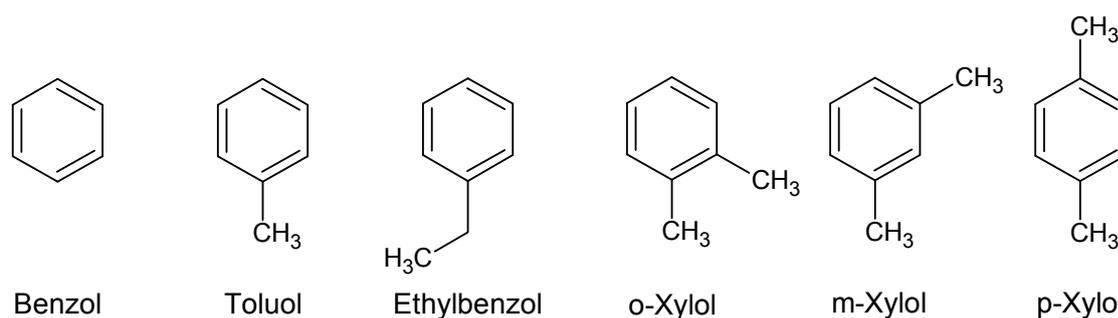
$\bar{p}$	mittlere Irrtumswahrscheinlichkeit
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PLFA	<i>Phospholipid Fatty Acid</i> ; Phospholidfettsäuren
r	<i>revers</i> ; rückwärts
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R-FLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal RNA</i> ; ribosomale RNA
S	Substratumsatz
SAFIRA	Sanierungs-Forschung in Regional kontaminierten Aquiferen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIP	<i>Stable Isotope Probing</i> ; Stabile Isotopenbeprobung
sp.	<i>species</i> ; Art
spp.	verschiedene Arten innerhalb der Gattung
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> ; Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus
t	vor Fettsäuren: trans
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
TEA	terminaler Elektronenakzeptor
TLFA	<i>total lipid fatty acids</i> ; Gesamtlipidfettsäuren
Tol	Toluol
Tol+E	Toluol+Eisen
Tol+N	Toluol+Nitrat

Tol+n.E.	Toluol+niedriger Eisengehalt
Tol+S	Toluol+Sulfat
T-RF	<i>Terminal Restriction Fragment</i> ; Terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; Terminaler Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
U min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
U.S.-EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> ; Umweltbehörde USA
UFZ	Umweltforschungszentrum
UQ	Ubichinon
UV/VIS	<i>ultraviolett/visible</i>
V	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumen pro Volumen
V-PDB	Vienna-PeeDee-Belemnite-Standard
w/v	<i>weight per volume</i> ; Masse pro Volumen
WD	Wanddicke
X-Gal	5-Brom-4-chlorindol-3-yl-β-D-galactopyranosid
Y <sub>TLFA/S</sub>	Zunahme Gesamtlipidfettsäure-Gehalt je Substratverbrauch
Y <sub>X/S</sub>	Zunahme Trockenmasse je Substratverbrauch
Zz	Grundwassermessstelle Zeitz
δ <sup>13</sup> C	Kohlenstoffisotopenverhältnis, angegeben auf Grundlage der Delta-Notation

## 1 Einleitung

Schätzungen zufolge leben derzeit 6,7 Milliarden Menschen auf der Erde, und jährlich wächst die Weltbevölkerung um mehr als 70 Millionen Menschen (Johnson, 2008). Diese Entwicklung führt zu einem steigenden Bedarf an Trinkwasser. Die weltweite Trinkwasserversorgung stützt sich derzeit größtenteils auf die Verwendung von Grundwasser, das naturbelassen frei von pathogenen Keimen und Schadstoffen ist (Griebler and Mösslacher, 2003). Allerdings lassen extensive industrielle Aktivitäten seit Mitte des 19. Jahrhunderts die Zahl der Schadstoffe in der Umwelt rapide ansteigen. Durch infiltrierendes Oberflächenwasser können diese Schadstoffe von der Oberfläche in das Grundwasser weitergeleitet werden (Wiedemeier et al., 1999), so dass die zukünftige Nutzung der unterirdischen Trinkwasserressourcen und das Ökosystem Grundwasser gefährdet sind.

Neben aktuellen Kontaminationen gilt die größte Aufmerksamkeit den Altlasten, bei denen der Schadstoffeintrag oft Jahre oder Jahrzehnte zurückliegt. Allein in Deutschland waren im Oktober 2006 über 272000 altlastenverdächtige Flächen erfasst (Labo, 2006). Dabei zählen in Deutschland chlorierte und monoaromatische Kohlenwasserstoffe wie z.B. Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylole (BTEX) zu den häufigsten Kontaminanten (Abb.1-1) (Arneth et al., 1989), verursacht durch den Eintrag von Mineralölen ins Grundwasser.



**Abb. 1-1** Strukturformeln der BTEX-Verbindungen

Die Gründe für die Schadstoffeinträge sind vielfältig und reichen von unsachgemäßen Produktionstechnologien über Unfälle beim Transport bis hin zu Leckagen der Lagertanks (Wiedemeier et al., 1999). Da für BTEX-Verbindungen toxische und kanzerogene Wirkungen

bekannt sind (Dean, 1985; Sittig, 1985; Snyder, 2004), stellen diese eine Gefährdung für den Menschen und das Ökosystem dar. Hinzu kommen deren relativ hohe Wasserlöslichkeit im Vergleich zu anderen Schadstoffen, die eine Migration der Schadstoffe in den Untergrund und folglich ins Grundwasser begünstigen (Coleman et al., 1984; Wiedemeier et al., 1999).

## 1.1 Sanierung von Grundwasserschadensfällen

Weltweit müssen derzeit hunderttausende schadstoffkontaminierte Areale saniert werden, was jedoch sowohl in technischer als auch ökonomischer Hinsicht nur begrenzt möglich ist (Travis and Doty, 1990). Die geschätzten Kosten solcher Maßnahmen belaufen sich auf mehrere Billionen Euro für einen Sanierungszeitraum von Jahrzehnten (Griebler and Mösslacher, 2003). Obendrein können mithilfe von konventionellen *ex situ* Sanierungsverfahren, die die Entnahme von verunreinigtem Grundwasser mit einer entsprechenden Weiterbehandlung wie z.B. Aktivkohleverfahren oder Aerobe Bioreaktoren kombinieren, die Schadstoffe meist nicht vollständig entfernt werden. Vor diesem Hintergrund haben in den letzten Jahren *in situ* Sanierungsverfahren stark an Bedeutung gewonnen. Diese beinhalten neben chemisch-physikalischen Technologien, wie z.B. dem Einbringen von reaktiven Wänden oder einer Schadstoffelimination durch Einblasen von Luft (=Air Sparging), den natürlichen Abbau, der als Natural Attenuation bezeichnet wird (Griebler and Mösslacher, 2003; HydroServices, 2008).

## 1.2 Natural Attenuation

Die Diskussion, ob und inwieweit natürliche Abbau- und Rückhalteprozesse als Alternative oder Ergänzung zu aktiven Grundwassersanierungsmaßnahmen zugelassen werden können, wird zurzeit sowohl national als auch international geführt (Wiedemeier et al., 1999; Chapelle et al., 2001; DECHEMA, 2008). Erfahrungen mit natürlichen Abbau- und Rückhalteprozessen von Altlasten wurden bereits in den 90iger Jahren in den USA gewonnen und von der amerikanischen Umweltbehörde U.S.-EPA unter dem Begriff Natural Attenuation (NA) wie folgt definiert (U.S.-EPA, 1999; Übersetzung nach Griebler and Mösslacher, 2003):

---

*Der Begriff „Natural Attenuation“ bezeichnet die Eigenschaft eines Aquifers, durch Prozesse wie biologischen Abbau, Dispersion, Verdünnung, Sorption, Verflüchtigung und/oder chemischen Stabilisierung von Schadstoffen die Masse, Toxizität, Mobilität oder das Volumen der Schadstoffe so weit zu reduzieren, dass die menschliche Gesundheit und das Ökosystem nicht weiter gefährdet sind.*

Der wichtigste Prozess im Zusammenhang mit NA ist der mikrobiologische Abbau, denn nur dieser führt aufgrund der Metabolisierungsprozesse zu einer nachhaltigen Reduktion der Schadstoffmasse. Deshalb sind der Nachweis und die Quantifizierung des mikrobiellen Abbauvermögens am konkreten Standort essentiell, um Entscheidungen treffen zu können, ob das natürliche Selbstreinigungspotential für Sanierungszwecke gezielt genutzt werden kann.

### **1.3 Mikrobieller Abbau von BTEX-Verbindungen**

Zahlreiche Forschungsarbeiten belegten in den letzten Jahren, dass Mikroorganismen BTEX-Verbindungen sowohl unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen metabolisieren können. Ist Sauerstoff vorhanden, erfolgt die Mineralisation über eine initiale Oxygenase-Reaktion (Dagley, 1971). Die Fähigkeit, aerob mit BTEX-Verbindungen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, wurde für verschiedene Mikroorganismen, wie z.B. Spezies der Gattungen *Pseudomonas*, gezeigt (Whited and Gibson, 1991; Fang et al., 2004; Andreoni and Gianfreda, 2007).

Der anaerobe Abbau von BTEX-Verbindungen wurde erstmalig Ende der 80iger in einem methanogenen Konsortium nachgewiesen (Vogel and Grbic-Galic, 1986; Grbic-Galic and Vogel, 1987). Seitdem folgten zahlreiche Studien, welche die Oxidation der organischen Verbindungen mit Nitrat, Sulfat, Mangan (IV) oder Eisen (III) als terminalen Elektronenakzeptor für eine Vielzahl von Mikroorganismen belegten (Überblick: Heider et al., 1998; Spormann and Widdel, 2001; Widdel and Rabus, 2001; Boll et al., 2002; Chakraborty and Coates, 2004; Heider, 2007). Generell verläuft der mikrobielle Abbau jedoch unter anoxischen Bedingungen langsamer als unter oxischen (Wiedemeier et al., 1999).

Im Falle von Toluol, der am intensivsten studierten BTEX-Verbindung, wird der Abbau unabhängig von dem verwendeten Elektronenakzeptor durch Addition von Fumarat an die Me-

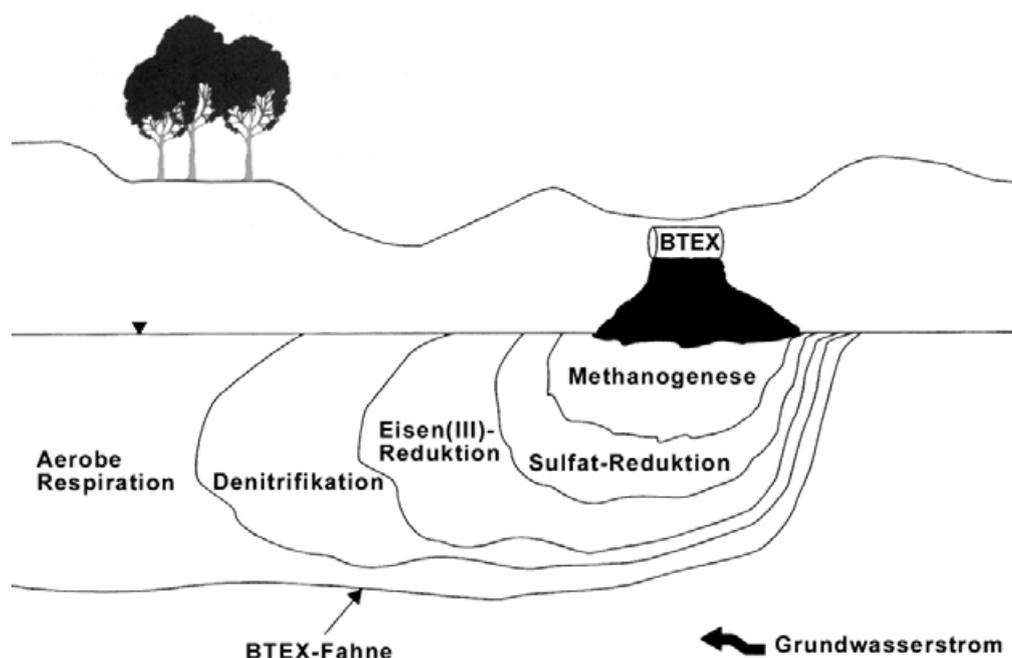
thylgruppe des Toluols initiiert, was zur Bildung des Intermediats Benzylsuccinat führt (Biegert et al., 1996; Leuthner et al., 1998; Beller and Spormann, 1999). Im weiteren Reaktionsverlauf wird dieses Intermediat zu Succinyl-CoA und Benzoyl-CoA oxidiert (Leuthner and Heider, 2000; Leutwein and Heider, 2001, 2002; Kube et al., 2004). Bisherige in Reinkultur vorhandene Toluolabbauer zeigen eine große phylogenetische Diversität innerhalb des Phylums *Proteobacteria* und der Klasse *Clostridia* auf. So sind derzeit für Spezies der Gattungen *Azoarcus* (Dolfing et al., 1990; Fries et al., 1994; Rabus and Widdel, 1995; Zhou et al., 1995; Kube et al., 2004), *Thauera* (Anders et al., 1995; Coschigano et al., 1998; Leuthner et al., 1998), *Desulfobacterium* (Harms et al., 1999), *Desulfobacula* (Rabus et al., 1993), *Desulfocapsa* (Meckenstock, 1999), *Dechloromonas* (Coates et al., 2001), *Geobacter* (Kane et al., 2002), *Magnetospirillum* (Shinoda et al., 2005) und *Desulfotomaculum* (Morasch et al., 2004) die Fähigkeit zum anaeroben Abbau von Toluol dargelegt worden. Außerdem wurde für *Blastochloris sulfovirdis*, einem phototrophen Bakterium, der Toluolabbau unter anoxischen Bedingungen demonstriert (Zengler et al., 1999).

Für die anaerobe Metabolisierung von Benzol, der toxischsten und persistentesten BTEX-Verbindung, ist der Stoffwechselweg bis heute nicht geklärt (Johnson et al., 2003; Chakraborty and Coates, 2005; Ulrich et al., 2005). Trotz vielfachen Nachweis des anaeroben Benzolabbaus (Johnson et al., 2003; Ulrich et al., 2005; Vogt et al., 2007; Herrmann et al., 2008) konnten bisher lediglich zwei Organismen der Gattung *Dechloromonas* (Coates et al., 2001) und ein Organismus der Gattung *Azoarcus* (Kasai et al., 2006) isoliert werden.

#### **1.4 Redoxzonierung in kontaminierten Grundwasserleitern**

Infolge der mikrobiellen sauerstoffzehrenden Prozesse stellen sich in einem BTEX-kontaminierten Aquifer schnell anoxische Verhältnisse ein (Anderson and Lovley, 1997). Als alternative Elektronenakzeptoren fungieren dann Nitrat, Sulfat, Mangan (IV), Eisen (III) oder Kohlenstoffdioxid. Da aus thermodynamischer Sicht der Elektronenakzeptor favorisiert wird, welcher den höchsten Energieertrag liefert (Christensen et al., 2000), erfolgt die Reduktion der Elektronenakzeptoren entsprechend der aufgeführten Reihenfolge, beginnend mit einer Nitratreduktion (Stumm and Morgan, 1996).

Die verschiedenen anaeroben Prozesse verlaufen in kontaminierten Aquiferen nicht nur in einer zeitlichen Abfolge, sondern auch räumlich nebeneinander, was im Umfeld einer Schadstofffahne zur Ausbildung charakteristischer Redoxzonen führt (Lovley et al., 1994b; Vroblesky and Chapelle, 1994; Christensen et al., 2000). Abb. 1-2 zeigt die hypothetische Verteilung dieser Redoxzonen. Die räumliche Verteilung der Redoxzonen variiert in Abhängigkeit von Parametern wie Menge der Schadstofffracht, Fließgeschwindigkeit und Geochemie des Grundwassers (Wiedemeier et al., 1999; Christensen et al., 2000). Da Mikroorganismen auf bestimmte Redoxreaktionen spezialisiert sind (Lin et al., 2002; Schink, 2006), werden deren metabolische Aktivitäten maßgeblich von der unterschiedlichen Verfügbarkeit der Elektronenakzeptoren bestimmt (Wiedemeier et al., 1999).



**Abb. 1-2** Hypothetische Verteilung von Redoxzonen mit Entfernung zu einer BTEX-Schadstoffquelle im Grundwasser (aus Lovley et al., 1994b).

## 1.5 Strategien zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus

Zur Charakterisierung des geochemischen Abbaumilieus können Elektronendonoren-Elektronenakzeptor-Bilanzierungen verwendet werden. Eine verminderte Konzentration an Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff, Nitrat, Mangan(IV), Eisen(III), Sulfat und Kohlenstoffdioxid in den schadstoffbelasteten Arealen des Grundwasserleiters im Vergleich zu den unbelasteten kann wertvolle Hinweise zum Abbauverhalten von Schadstoffen liefern (Borden et al., 1995; Wachter et al., 2004). Erste Abschätzungen des mikrobiellen Schadstoffumsatzes können mithilfe der ermittelten Elektronenakzeptor-Differenzen und dem theoretisch mittleren Verbrauch an Elektronenakzeptoren während des Umsatzes der verfügbaren Elektronendonoren vorgenommen werden (Wiedemeier et al., 1999). Der mikrobielle Abbau einzelner Schadstoffe kann jedoch auf dieser Basis meist nicht erfasst werden. Allerdings können durch Prüfung der langfristigen Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren wertvolle Informationen zur Nachhaltigkeit der Abbauprozesse gewonnen werden.

Eine weitere Strategie ist die gezielte Detektion von Metaboliten. Dafür muss der Abbauweg bekannt und der gesuchte Metabolit spezifisch für den Abbau des jeweiligen Schadstoffes sein. Des Weiteren muss der Metabolit sich in detektierbaren Konzentrationen anreichern (Griebler and Mösslacher, 2003). Für Toluol konnte der biologische Abbau durch Detektion von Benzylsuccinat nachgewiesen werden (Stelzer et al., 2006b), welches das charakteristische Intermediat des anaeroben Toluol- aber auch Xylol-Metabolismus darstellt. Im Falle von Benzol ist der Abbauweg unter anoxischen Bedingungen jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt.

Große Bedeutung für den Nachweis des mikrobiellen *in situ* Abbaus erlangte in den letzten Jahren die Isotopenanalyse. Diese Methode basiert darauf, dass sich im Zuge des mikrobiellen Abbaus das natürliche Isotopenverhältnis (z.B.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) des Schadstoffes ändern kann, bedingt durch die bevorzugte Verwertung der leichten Isotopen  $^{12}\text{C}$  gegenüber den schweren Isotopen  $^{13}\text{C}$  (Morasch et al., 2002; Meckenstock et al., 2004). Steht für den einzelnen Schadstoff zusätzlich ein im Labor ermittelter Fraktionierungsfaktor zur Verfügung, kann der *in situ* Schadstoffabbau quantifiziert werden. Für BTEX-Verbindungen wurde die Isotopenfraktionierungs-Analytik bereits mehrfach zur Quantifizierung mikrobieller Schadstoffumsätze an Feldstand-

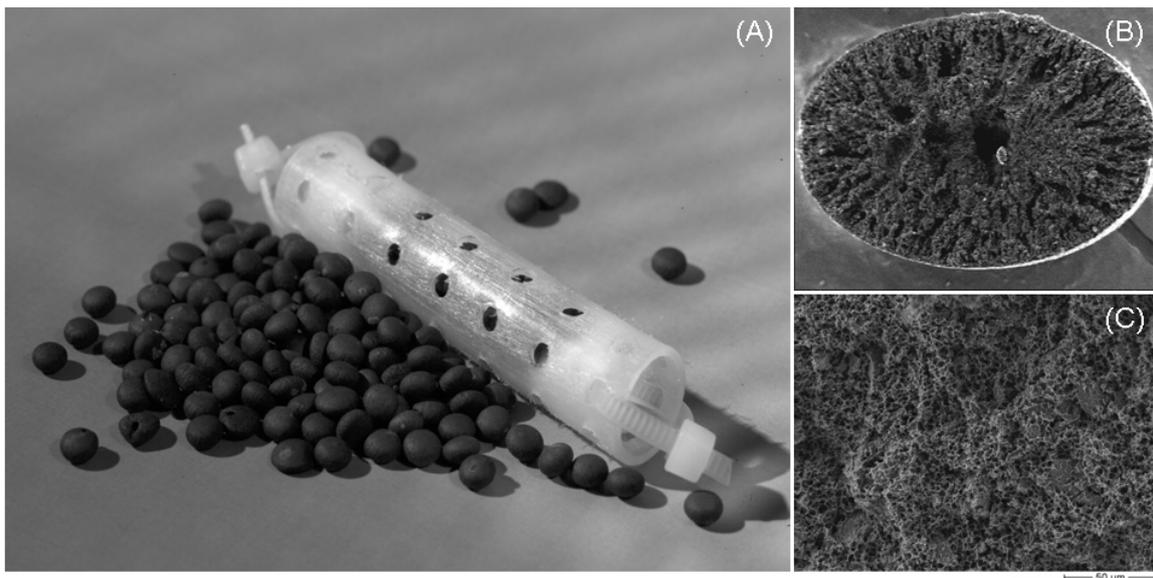
orten verwendet (Meckenstock et al., 1999; Richnow et al., 2003; Griebler et al., 2004; Fischer et al., 2007).

Andere Verfahren zielen auf die Untersuchung schadstoffabbauender Mikroorganismen. In konventionellen Mikrokosmenversuchen mit kontaminierten Grundwasserproben (Harms et al., 1999; Kasai et al., 2006) oder Sedimentmaterial (Beller et al., 1996; Kleikemper et al., 2002; Jahn et al., 2005) wird versucht, schadstoffabbauende Mikroorganismen anzureichern. Da jedoch bis heute nur wenige Mikroorganismen erfolgreich kultiviert werden konnten (Amann et al., 1995) und diese Methode keine Aussage über die mikrobiellen Schadstoffumsätze unter *in situ* Bedingungen zulässt, erlangten in den letzten Jahren kultivierungsunabhängige Methoden zunehmend an Bedeutung.

So kann die Detektion funktioneller Gene, die spezifische Enzyme des Schadstoffabbaus codieren, zum Nachweis der Mikroorganismen verwendet werden (Braker et al., 2000; Wagner et al., 2005). Das Schlüsselenzym des anaeroben Toluol- und Xylol-Abbauweges stellt die Benzylsuccinatsynthase dar (Biegert et al., 1996). Durch Detektion der für die Untereinheiten des Enzyms codierenden Gene konnte die Anwesenheit toluol- und xylolabbauender Mikroorganismen am Standort nachgewiesen werden (Winderl et al., 2007). Voraussetzung für diese Methode ist jedoch die Kenntnis des Abbauweges. Universeller erweist sich die Stable Isotope Probing (SIP) Technologie:  $^{13}\text{C}$ -markierte Substrate werden zu Labormikrokosmen oder Umweltproben gegeben, um anhand der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in mikrobieller Biomasse deren Metabolisierung nachzuweisen. Als Biomassemarker dienen mikrobielle Phospholipid- (PLFA) und Gesamtlipidfettsäuren (TLFA), genomische DNA sowie rRNA (Überblick: Radajewski et al., 2003; Whitby et al., 2005; Evershed et al., 2006; Whiteley et al., 2006; Neufeld et al., 2007a). Das Potential dieser Methode wurde bereits mehrfach in Studien zur Untersuchung des mikrobiellen Schadstoffabbaus von Toluol (Pelz et al., 2001a; Pelz et al., 2001b), Benzol (Kasai et al., 2006; Liou et al., 2008) aber auch von Phenol (Manefield et al., 2002a) und Naphthalen (Jeon et al., 2003) demonstriert. Allerdings wurden SIP-Versuche bisher nur selten direkt am Feldstandort durchgeführt (Jeon et al., 2003; Pombo et al., 2005; Liou et al., 2008), bedingt durch die hohen Kosten von  $^{13}\text{C}$ -Substraten und der Verdünnung dieser im Grundwasser.

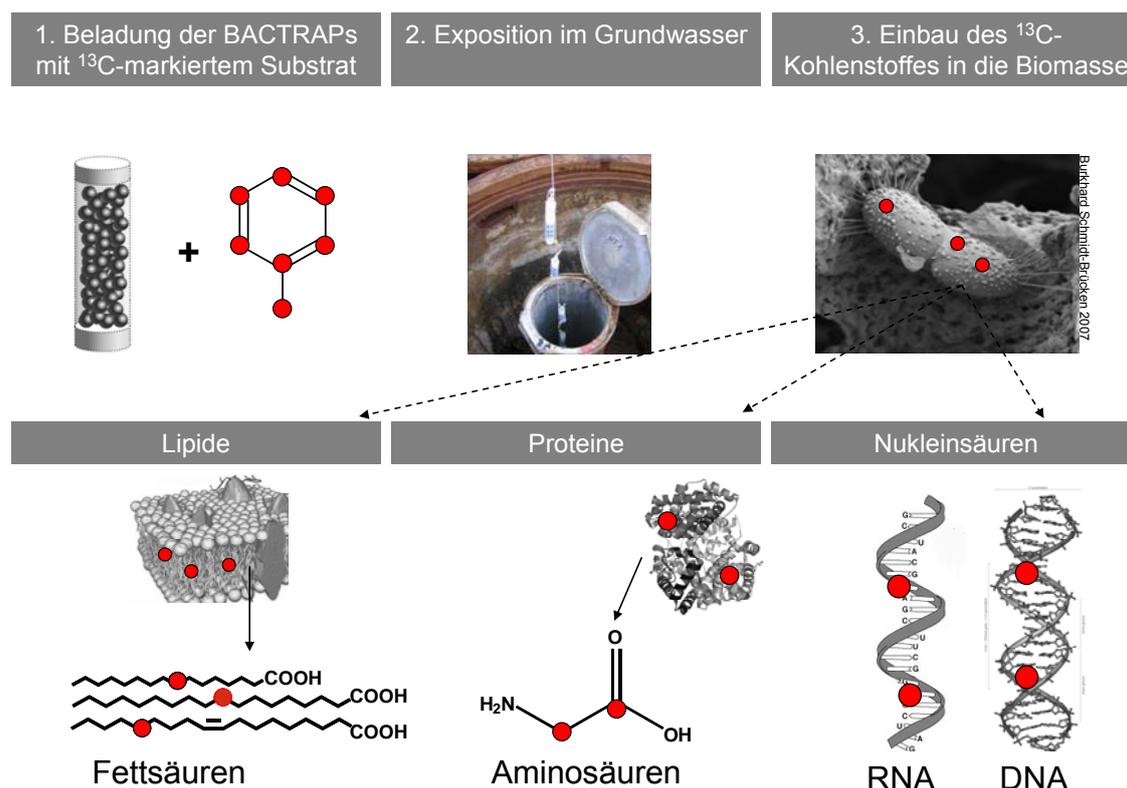
Wesentlich geringere Mengen an  $^{13}\text{C}$  sind erforderlich, wenn eine vorherige Sorption an ein Trägermaterial erfolgt, dass in Form eines *in situ* Mikrokosmos in den Grundwasserbrunnen eingebracht werden kann. Bewährt haben sich dafür sogenannte BACTRAPs (Biotraps)

(Peacock et al., 2004). Diese *in situ* Mikrokosmen bestehen aus einer perforierten Membranhülle, gefüllt mit Pellets (Bio-Sep® Beads) eines Gemisches aus Aktivkohle (75%) und Nomex (25%) (Abb. 1-3). Aufgrund der feinporösen Struktur (75%) mit einer inneren Oberfläche von mehr als  $600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  Bead sowie dem hohen Adsorptionsvermögen dienen die Bio-Sep® Beads gleichzeitig als besiedelbare Oberfläche und als Sorptionsmittel für die zu analysierenden Substanzen (Peacock et al., 2004).



**Abb. 1-3** *In situ* Mikrokosmos (BACTRAP) gefüllt mit BioSep® Beads (A). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) der porösen Innenstruktur von BioSep® Beads mit unterschiedlichen Vergrößerungen (B+C). Fotografie: André Künzelmann. REM: Burkhard Schmidt-Brücken.

Zum Nachweis des mikrobiellen Abbaus wird die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der mikrobiellen Biomasse verwendet, die sich auf den BACTRAPs während der Exposition im Grundwasser ansiedelt (siehe Abb. 1-4). Die BACTRAPs wurden bisher erfolgreich zum Nachweis des mikrobiellen Abbaus von Benzol, Toluol, Methyltertiärbutylether (MTBE) und Chlorbenzol eingesetzt (Büning et al., 2005; Geyer et al., 2005; Rückert et al., 2005; Kästner et al., 2006; Stelzer et al., 2006a; Stelzer et al., 2006b).



**Abb. 1-4** Konzept der BACTRAPs. (1.) Die BACTRAPs werden mit einem  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat beladen und (2.) für mehrere Wochen im Grundwasser exponiert. Während der Exposition siedeln sich verschiedene Grundwasserbakterien auf den BACTRAPs an. (3.) Können die Bakterien das  $^{13}\text{C}$ -markierte Substrat verwerten, erfolgt ein Einbau des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobielle Biomasse (Lipide, Proteine, Nucleinsäuren) (verändert nach Stelzer, 2008).

## 1.6 Implementierung von Natural Attenuation als Sanierungsstrategie

Eine entscheidende Rolle für den mikrobiellen Schadstoffabbau am Feldstandort spielt die Anwesenheit entsprechender zum Schadstoffabbau befähigter Mikroorganismen sowie die Bioverfügbarkeit terminaler Elektronenakzeptoren (TEAs). Vor diesem Hintergrund kann im Zuge einer biologischen Sanierung versucht werden, dass vorhandene Abbauvermögen eines Aquifers künstlich zu steigern (Enhanced Natural Attenuation). Die als Bioaugmentation bezeichnete Einbringung von schadstoffabbauenden Mikroorganismen in den kontaminierten Aquifer konnte erfolgreich für chlorierte und aromatische Kohlenwasserstoffe gezeigt werden (Duba et al., 1996; Ellis et al., 2000; Da Silva and Alvarez, 2004). Vielfach blieb der Erfolg der Methode jedoch auch aus, da sich die Laborkulturen im Aquifer aufgrund der dort vorherr-

schen Umweltbedingungen oft nicht etablieren konnten (Mandelbaum et al., 1997; Wenderoth et al., 2003).

Eine weitere Sanierungsstrategie zielt auf die Steigerung des natürlichen Abbaupotentiales durch Einleitung von im Grundwasser limitierten TEAs. Verschiedene Labormikrosomenstudien zeigten, dass durch Zugabe von Nitrat (Ball and Reinhard, 1996; Burland and Edwards, 1999; Coates et al., 2001), Sulfat (Lovley et al., 1995; Weiner et al., 1998) oder Eisen (Lovley et al., 1994a) die mikrobielle Aktivität schadstoffabbauender Bakterien stimuliert und damit der Abbau von BTEX-Verbindungen beschleunigt werden kann. An Feldstandorten konnte eine Steigerung des natürlichen Abbauvermögens durch direkte Einleitung von Sulfat (Anderson and Lovley, 2000; Schroth et al., 2001; Sublette et al., 2006), Nitrat (Pombo et al., 2002) oder einer Kombination beider Elektronenakzeptoren (Cunningham et al., 2001) in den kontaminierten Grundwasserleiter erzielt werden. Dieses material- und kostenintensive Verfahren ist aber nur dann von Erfolg gekrönt, wenn die entsprechenden zum Abbau befähigten Bakterien vorhanden sind (Weiner and Lovley, 1998). Hieraus resultiert ein großer Bedarf an neuen *in situ* Methoden, die es erlauben, den mikrobiellen Schadstoffabbau am jeweiligen Standort mit geringem Zeit- und Kostenaufwand nachzuweisen, wie auch mikrobielle Abbaupotentiale zu untersuchen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kann zum einen die Eignung natürlicher Selbstreinigungsprozesse zur Sanierung schadstoffbelasteter Grundwasserleiter bewertet werden. Andererseits lassen sich gegebenenfalls resultierende Limitationen des mikrobiellen Abbaus erkennen, die mithilfe geeigneter Maßnahmen beseitigt werden können.

## 2 Konzeption der Dissertation

Mikrobielle Abbauprozesse können die Schadstoffmenge in Grundwasserleitern nachhaltig verringern und stellen somit ein vielversprechendes Sanierungskonzept dar. Um die natürlichen Selbstreinigungsprozesse als Sanierungsstrategie zu bewerten, sind detaillierte Kenntnisse der am Standort vorkommenden schadstoffabbauenden Mikroorganismen und deren spezifischer Abbauleistungen unabdingbar. Hieraus resultiert ein großer Bedarf an der Entwicklung geeigneter *in situ* Methoden, mit denen mikrobielle Abbauprozesse am jeweiligen Feldstandort untersucht werden können.

Gegenstand der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, ein in der Vergangenheit bereits mehrfach erfolgreich verwendetes *in situ* Mikrokosmen-System (BACTRAPs) als *in situ* Methode zum Nachweis mikrobiellen Schadstoffabbaus zu verifizieren und im Hinblick auf weiterführende Zielsetzungen zu modifizieren und erproben. Dabei galt es, folgende Fragestellungen am BTEX-kontaminierten Standort Zeitz zu klären, wobei Toluol zur Evaluierung der jeweiligen Strategie im Vordergrund der Untersuchungen stand:

- I. Welche Vor- und Nachteile weisen BACTRAPs zum Monitoring mikrobieller Gemeinschaften sowie zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus auf?
  - II. Eignen sich BACTRAPs, um das vorhandene Abbaupotential am Standort zu ermitteln? Wenn ja, in welchem Maße führt die Zugabe von Nitrat, Sulfat oder Eisen zu einer Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft und zu einer Beschleunigung des Schadstoffabbaus?
  - III. Wie kann der Substratumsatz auf den BACTRAPs während der Untersuchung mikrobieller Abbaupotentiale am Standort abgeschätzt werden?
  - IV. Welche Mikroorganismen sind am Abbau des Toluols beteiligt?
- (I.)** Dass BACTRAPs beladen mit isotopisch-markiertem Substrat zum Nachweis mikrobiellen Abbaus geeignet sind, wurde bereits mehrfach in der Vergangenheit gezeigt (Büning et al., 2005; Geyer et al., 2005; Rückert et al., 2005; Kästner et al., 2006; Stelzer et al., 2006a; Stelzer et al., 2006b). Ausreichende Kenntnisse über die Desorption des Toluols und Benzols von den

Beads und damit verbunden der Bioverfügbarkeit dieser Substrate über die Zeit fehlten jedoch bis jetzt. Um diese Kenntnisse zu gewinnen, sollten in Laborversuchen Desorptionskinetiken ermittelt und diese modelliert werden. Auf der Basis der ermittelten Kinetiken sollte dann die Bioverfügbarkeit der Substrate beurteilt werden. Um den Einfluss verschiedener Elektronenakzeptoren auf die mikrobielle Gemeinschaft zu ermitteln (II.), sollten die BACTRAPs zunächst hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der mikrobiellen Besiedlung getestet werden. Des Weiteren sollten unter Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -Toluol beladenen BACTRAPs die a) Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften und b) Inkorporation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes aus dem Toluol in die mikrobiellen Fettsäuren über die Zeit ermittelt werden. Daraus sollte die Expositionszeit für die konzipierten Stable Isotope Probing Experimente zur Identifizierung toluolabbauender Mikroorganismen abgeleitet werden (IV). Anhand dieser grundlegenden Versuche sollten die Eignung des BACTRAP-Systems zum Monitoring mikrobieller Gemeinschaften und zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus beurteilt werden.

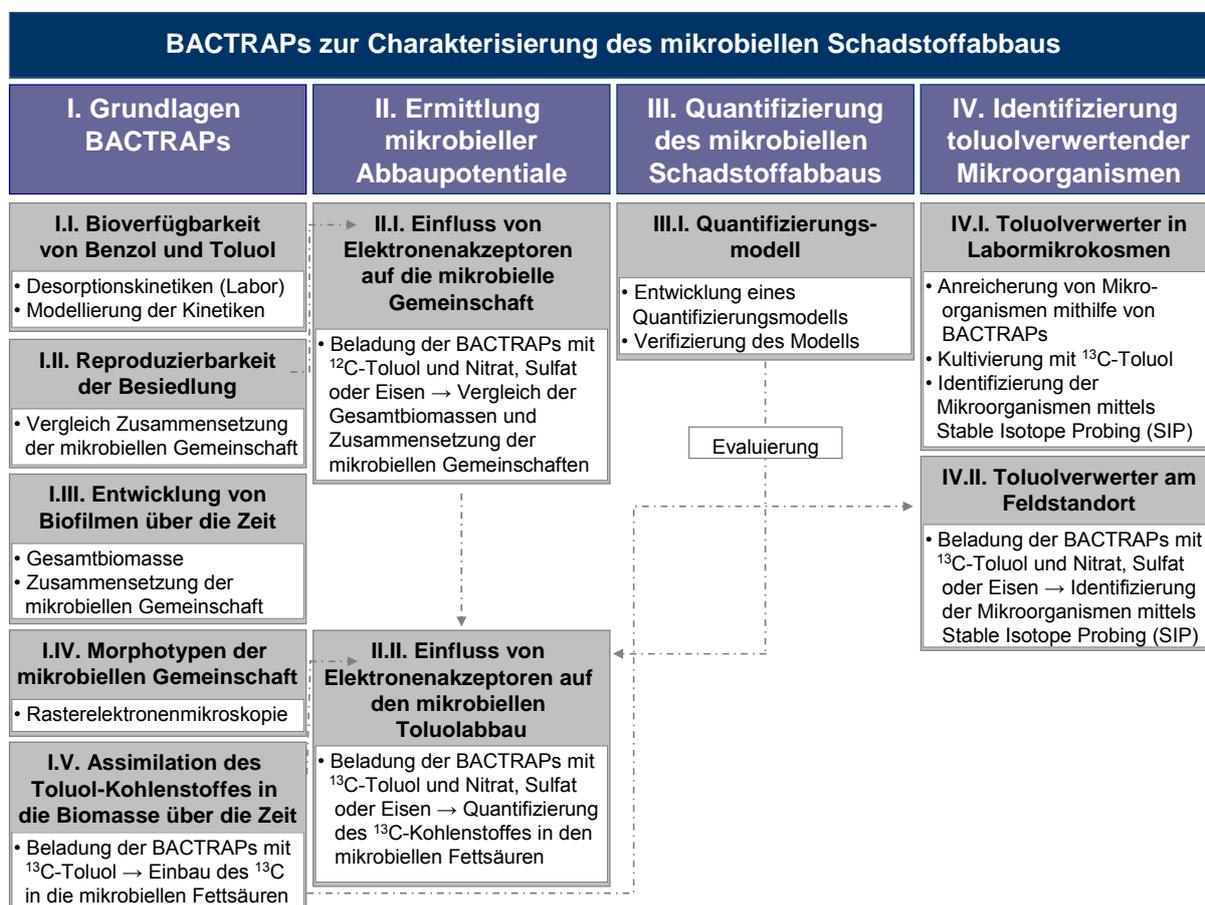
**(II.)** Da für den mikrobiellen Abbau in schadstoffbelasteten Habitaten die Verfügbarkeit terminaler Elektronenakzeptoren häufig limitiert ist, sollten BACTRAPs im Grundwasser exponiert werden, die zusätzlich zu Toluol als Kohlenstoff- und Energiequelle die am Standort relevanten Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat oder Eisen enthielten. Sowohl die Gesamtbiomasse als auch die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft sollten Aufschluss über den Einfluss der Elektronenakzeptoren auf die mikrobielle Gemeinschaft geben. Zur Verifizierung der Ergebnisse sollte der Versuch unter veränderten hydrogeochemischen Bedingungen sowie unter Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -Toluol wiederholt werden. Die Intensitäten der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in der mikrobiellen Biomasse sollten Aufschluss über die jeweiligen Substratumsätze liefern (III). Für die unter den Fragestellungen (I) und (II) aufgeführten Besiedlungsexperimente sollten jeweils Lipidanalysen (Fettsäuren, Chinone), molekularbiologische Analysen (T-RFLP, SSCP) und mikroskopische Methoden (Konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie) zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften verwendet werden.

**(III.)** Um den Übergang von einem rein qualitativen Beweis des *in situ* Abbaus zu einer Abschätzung potentieller Stoffumsätze auf den BACTRAPs zu ermöglichen, sollte ein mathema-

tisches Modell entwickelt werden. Basierend auf diesem sollten die mikrobiellen Abbaupotentiale am Feldstandort abgeschätzt werden (II).

**(IV.)** Um für spezifische Abbauleistungen verantwortliche Mikroorganismen selektiv zu identifizieren, können entweder konventionelle Isolationstechniken als auch Stable Isotope Probing verwendet werden. Beide Methoden sollten im Rahmen der Dissertation zur Identifizierung toluolabbauender Mikroorganismen verwendet und deren jeweilige Vor- und Nachteile aufgezeigt werden.

Abb. 2-1 gibt zusammenfassend einen Überblick über die Ziele der Dissertation und die entsprechenden Strategien. Die methodischen Ansätze sind Tab. 3-4 (S. 42) zu entnehmen.



**Abb. 2-1** Übersicht über die übergeordneten Ziele und Fragestellungen der Dissertation und den jeweiligen Strategien. Pfeile kennzeichnen Versuche, die aufeinander aufbauen. Details sind dem Text zu entnehmen.

### 3 Methoden

#### 3.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad (zur Analyse) von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Isotopisch markierte Substanzen ( $[^{13}\text{C}]$ - $\alpha$ -Toluol und  $[^{13}\text{C}_7]$ -Toluol) wurde von Sigma-Aldrich (St.Louis, USA) mit einer isotopischen Reinheit von  $\geq 99\text{atom}\%$  bezogen. Die Positionen der  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffe in den jeweiligen Toluolmolekülen sind in Abb. 3-1 dargestellt.

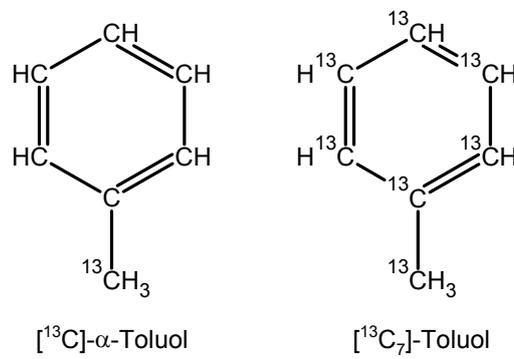


Abb. 3-1 Strukturformeln des  $[^{13}\text{C}]$ - $\alpha$ -Toluols und  $[^{13}\text{C}_7]$ -Toluols

#### 3.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren bei  $121^\circ\text{C}$  und 1 bar für 30 min sterilisiert. Nicht autoklavierbare Bestandteile wurden unter aseptischen Bedingungen sterilfiltriert (Sterilfilter  $0,2\ \mu\text{m}$  Porengröße; Sartorius, Göttingen, Deutschland).

##### 3.2.1 Nährmedien

Die Herstellung der anaeroben Medien (Tab. 3-1; Tab. 3-2) erfolgte nach der Hungate-Technik unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre. Zum Entfernen des im Stickstoff enthaltenen Restsauerstoffs wurde das Gas über einen auf ca.  $400^\circ\text{C}$  erhitzten Kupferkatalysator (Glasgerätebau Ochs GmbH, Bovenden) geleitet.

**Tab. 3-1** Medium zur Kultivierung von *Azoarcus* sp. (modifiziert nach Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

Lösung 1 (Medium 586)	0,816 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	5,920 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	ad 500 ml	H <sub>2</sub> O
Lösung 2 (Medium 586)	35 g	NH <sub>4</sub> Cl
	13,2 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	1,6 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	ad 400 ml	H <sub>2</sub> O
Vitaminlösung (Medium 461)	50 mg	Vitamin B12
	50 mg	Pantothensäure
	50 mg	Riboflavin
	10 mg	Pyridoxamin-HCl
	20 mg	Biotin
	20 mg	Folsäure
	25 mg	Nikotinsäure
	25 mg	Nicotinamid
	50 mg	α-Liponsäure
	50 mg	p-Aminobenzoessäure
	50 mg	Thiamin-HCl x 2 H <sub>2</sub> O
ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O	
Spurenelementlösung SL-10 (Medium 320)	10 ml	HCl (25 %, 7 M)
	1,5 g	FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
	70 mg	ZnCl <sub>2</sub>
	100 mg	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
	6 mg	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	190 mg	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	2 mg	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	24 mg	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
	36 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	ad 990 ml	H <sub>2</sub> O

Zur Herstellung des anoxischen Mediums jeweils 50 ml Lösung 1 und 0,3 ml Lösung 2 vereinen und auf pH 7,2 einstellen. Anschließend 0,5 ml Spurenelementlösung, 0,25 ml Vitaminlösung, 1 ml 1 M NaHCO<sub>3</sub> und 1 ml 1 M KNO<sub>3</sub> zugeben.

**Tab. 3-2** Medium zur Kultivierung von *Desulfobacterium cetonicum* und ZBT 1 (modifiziert nach Vogt et al., 2007)

Mineralsalzmedium	0,5 g (ZBT 1)	NaCl
	10 g (D.cetonicum)	
	0,5 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,4 g	NH <sub>4</sub> Cl
	0,4 g	KCl
	0,2 g	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,1 g	CaCl <sub>2</sub>
	0,5 g	MgCl <sub>2</sub>
	ad 945 ml	H <sub>2</sub> O
Selenit-Wolframat-Lösung	0,5 g	NaOH
	3 mg	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
	4 mg	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O

Zur Herstellung des Mediums 1000 ml Medium mit 30 ml 1 M NaHCO<sub>3</sub>, 5 ml Vitaminlösung (Tab. 3-1), 1 ml Spurenelementlösung SL-10 (Tab. 3-1), 1 ml Selenit-Wolframatlösung und 20 ml 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzen, pH auf 7 einstellen und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit reduzieren.

### 3.3 Mikroorganismen und Kultivierung

Die Referenzorganismen *Desulfobacterium cetonicum* (DSM 7267) und ZBT 1, deren Ertragsausbeuten für die *in situ* Quantifizierung des mikrobiellen Toluolabbaus dienen, wurden von Carsten Vogt (Department für Isotopenbiogeochemie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Nitratreduzierer *Azoarcus* sp. (DSM 9506) wurde von der Deutschen Stammsammlung bezogen.

Alle Kultivierungen erfolgten mittels Flüssignährmedien in 118ml-Serumflaschen mit teflonbeschichteten Crimpverschluss. Für Kulturen und Inkubationen verwendete Glasmaterialien und Verschlüsse wurden vor Benutzung autoklaviert (30 min bei 121°C und 1 bar). Die Komplettierung der Mineralmedien sowie das anschließenden Inokulieren der Laboransätze erfolgten entweder in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., USA) oder mit stickstoffgespülten Einwegspritzen. Das Volumen des Inokulats entsprach bei nitratreduzierenden Kulturen 5% und bei sulfatreduzierenden Kulturen 10% des Nährmedienvolumens. Die Kultivierung erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, statisch bei 30°C im Dunkeln.

### 3.4 Standortbeschreibung

#### Historischer Überblick des Standortes Zeitz

Der Forschungsstandort SAFIRA (SAnierungs-Forschung In Reional kontaminierten Aquifere(n)) Zeitz befindet sich auf dem Areal des ehemaligen Hydrierwerkes in Zeitz, 40 km südwestlich von Leipzig. Dieser Industriestandort wurde im Jahre 1939 gegründet, um Treib- und Schmierstoffe, Paraffin sowie Benzen für die Kriegsindustrie zu produzieren. Infolge der nahezu vollständigen Zerstörung des Altwerkes bei Luftangriffen in den Jahren 1944/45 kam die komplette Produktion zum Stillstand. Durch beschädigte Rohrleitungen und Tanks konnten große Mengen meist flüssiger Kohlenwasserstoffe im Untergrund versickern. Die Benzolproduktion wurde von 1963 bis 1990 in der dafür eigens konstruierten Benzolanlage fortgesetzt. Bewiesenermaßen gelangten nicht nur in Folge der kriegsbedingten Havarien, sondern über den gesamten Produktionszeitraum Kontaminationen in den Untergrund (Gödeke et al., 2004; Schirmer et al., 2006).

#### Hydrogeologischer und hydrochemischer Überblick

Das Einzugsgebiet des Testfeldes ist hydrogeologisch durch zwei Aquifersysteme gekennzeichnet, welche durch Ton und Braunkohleschichten voneinander getrennt sind. Die Mächtigkeit der aus quartären und tertiären Kiesen und Sanden bestehenden Aquifere variiert zwischen 2 und 10 m für den oberen und 12 und 20 m für den unteren Aquifer. Der Grundwasserstand liegt bei 8 - 10 m unter der Geländeoberkante. Der Grundwasserstrom des oberen Aquifers ist mit Abstandsgeschwindigkeiten von 1 - 2 m d<sup>-1</sup> nördlich gerichtet, der des unteren mit Abstandsgeschwindigkeiten von 0,5 m d<sup>-1</sup> südwestlich (Gödeke et al., 2004; Schirmer et al., 2006).

Die Begutachtung des Schadensfalls am SAFIRA-Standort offenbarte BTEX-Verbindungen als Hauptkontaminanten des Grundwassers, wobei sich sowohl im oberen als auch im unteren Aquifer eine Schadstofffahne gebildet hat. Generell dominiert im oberen Aquifer Benzol mit maximalen Konzentrationen von 1000 mg l<sup>-1</sup>, gefolgt von Toluol (max. 50 mg l<sup>-1</sup>), Ethylbenzol und Xylolen (zusammen max. 30 mg l<sup>-1</sup>) (Wachter et al., 2004; Vieth et al., 2005). Im unteren Aquifer ist der Schadstoffeintrag mit maximalen Benzolkonzentrationen von 30 mg l<sup>-1</sup> deutlich niedriger (Gödeke et al., 2006). Beide Grundwasserleiter sind anoxisch. Der mikrobielle

BTEX-Abbau ist im Wesentlichen durch anaerobe Prozesse wie Sulfatreduktion geprägt (Fischer et al., 2004; Vieth et al., 2005). Zudem konnte am Standort methanogener Schadstoffabbau nachgewiesen werden (Fischer et al., 2004).

### 3.5 BACTRAPs

Mikrobielle Grundwasser-Populationen wurden, basierend auf der bereits von Peacock et al. (2004) angewendeten *in situ* Mikrokosmen-Technologie, angereichert und hinsichtlich ihrer Biomarker wie z.B. Fettsäuren und Nukleinsäuren analysiert. Die in den BACTRAPs enthaltenen 2 – 3 mm großen Bio-Sep® Beads, welche im weiteren Text vereinfacht als Beads bezeichnet werden, dienten gleichzeitig als Besiedlungsfläche und als Sorptionsmittel für die zu analysierenden Substanzen Toluol und Benzol. Die thermische Stabilität der Beads ermöglichte eine Sterilisation wie auch eine Elimination von organischen Rückständen. Zur Ummantelung der Beads wurden entweder perforierte Teflonschläuche oder Edelstahlkäfige verwendet. Die Größe der Perforation ( $\varnothing$  2 mm) wurde so gewählt, dass die BACTRAPs während der Exposition im Grundwasser gut durchströmt wurden und infolgedessen ansässige Organismen den neuen Lebensraum besiedeln konnten. Zum Nachweis des mikrobiellen *in situ* Schadstoffabbaus wurden die Beads mit isotopisch markierten Substraten ( $^{13}\text{C}$ ) beladen und nach deren Exposition im Grundwasser die Inkorporation der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in den mikrobiellen Biomarkern untersucht. Wurden mithilfe der BACTRAPs mikrobielle Abbaupotentiale am Feldstandort untersucht, erfolgte eine zusätzliche Beladung der Beads mit den potentiellen Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat oder Eisen.

#### 3.5.1 Herstellung der BACTRAPs

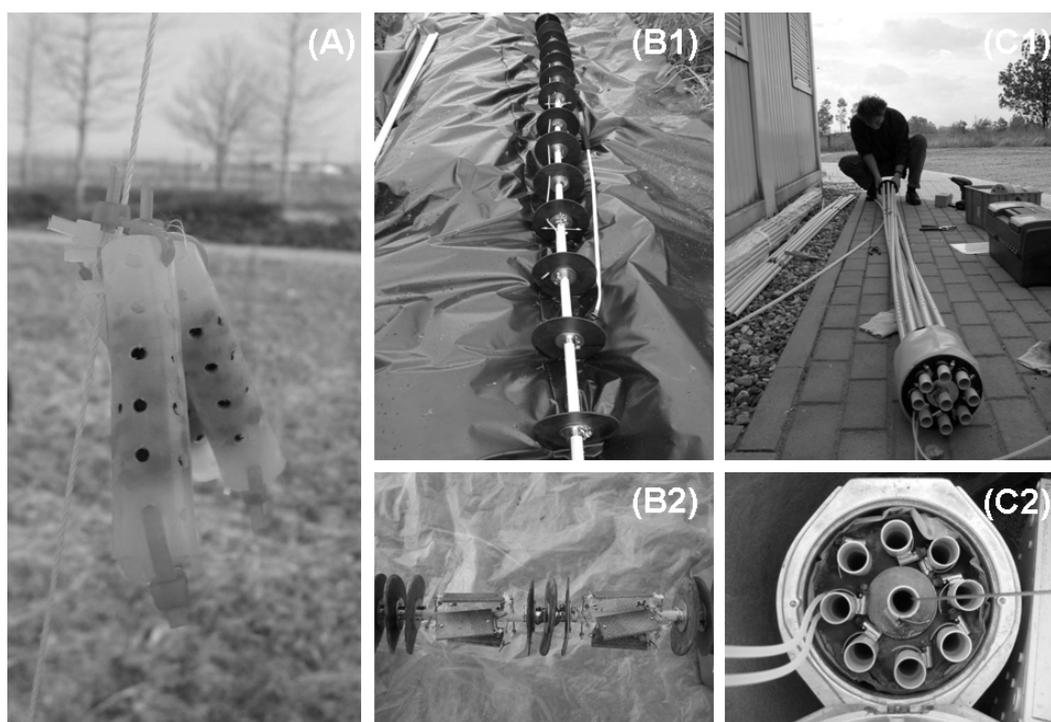
Entsprechend der für die jeweilige Analyse erforderlichen Biomasse wurden perforierte Teflonschläuche oder Edelstahlkäfige mit 0,5 g bzw. 2,5 g Beads gefüllt. Zur Elimination von organischen Rückständen wurden die Beads (mit oder ohne Elektronenakzeptoren) für 4 h bei 300°C ausgeheizt und die Teflonschläuche bzw. Edelstahlkäfige mit Aceton gespült. Das anschließende Autoklavieren der BACTRAPs bei 121°C diente der Sterilisation sowie Rehydatisierung der Beads.

### 3.5.2 Beladung der BACTRAPs

Die Beladung der BACTRAPs mit Toluol oder Benzol als Kohlenstoff- und Energiequelle erfolgte in einem evakuierten Exsikkator über die Gasphase. Unmittelbar vor Beladung wurde der Sauerstoff in den Poren der Beads durch dreimaliges Evakuieren bei einem Unterdruck von 50 mbar im Wechsel mit Stickstoffbegasung eliminiert. Um eine gleichmäßige Beladung zu erzielen, wurden die BACTRAPs zusammen mit dem Substrat (50 mg pro 0,5 g Beads) für mindestens 48 h unter Vakuum bei 50 mbar sowie Raumtemperatur inkubiert. In den Feldversuchen zur Abschätzung der mikrobiellen Abbaupotentiale wurden die BACTRAPs zusätzlich mit den Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat oder Eisen beaufschlagt. In dem ersten Feldversuch (Tab. 3-4; S. 42) erfolgte die Beladung der Beads durch Autoklavieren in einer 7 mM, 12 mM oder 6 mM Natriumsulfat-, Natriumnitrat- oder Eisen(III)chlorid-Lösung. Da sich die Beladungsmassen als sehr niedrig erwiesen, wurden die Beads im zweiten Feldversuch mit höheren Konzentrationen beladen. Für die Beladung mit Nitrat wurden Beads in einer 3,6 M Natriumnitrat-Lösung autoklaviert. Beads, welche mit Sulfat oder Eisen beladen waren, wurden freundlicherweise von Kerry Sublette (Universität Tulsa, USA) zur Verfügung gestellt. Die Beladung dieser Beads erfolgte mit Natriumsulfat bzw. Eisen(III)chlorid während des Herstellungsprozesses.

### 3.5.3 Exposition der BACTRAPs

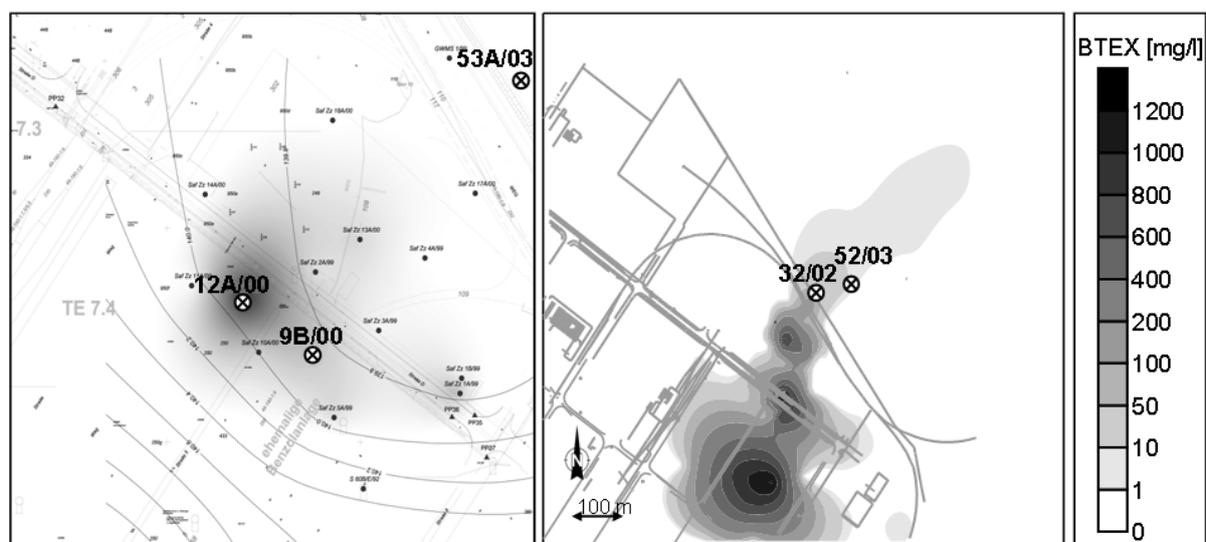
Unmittelbar vor Proben transport wurde das Vakuum in den Exsikkatoren durch Stickstoff ersetzt. BACTRAPs ohne Elektronenakzeptoren wurden bis zur Exposition im Grundwasser in anoxischem, destillierten Wasser gelagert, um eine mikrobielle Besiedlung zu begünstigen. BACTRAPs mit beaufschlagten Elektronenakzeptoren wurden dagegen in den stickstoffbegas- ten Exsikkatoren zum Feldstandort transportiert, um eine maximale Beladung mit den Elektronenakzeptoren zu gewährleisten. Der Proben transport erfolgte in Kühlboxen bei 4°C. Entsprechend dem Versuchsdesign wurden die BACTRAPs mit Kabelbindern an einer Polyamid schnur befestigt und auf diese Art und Weise im Grundwasser exponiert oder die Exposition erfolgte mit Packersystemen (Abb. 3-2). Die Anfertigung der Packer erfolgte durch IMW-Innovative Messtechnik Weiss (Tübingen) mit ausschließlich lösungsmittelresistenten Materialien. Das jeweilige Versuchsdesign einschließlich der verwendeten Packersysteme sowie Expositionszeiten sind Tab. 3-4 (S. 42) zu entnehmen.



**Abb. 3-2** Technologien zur Exposition der BACTRAPs. (A) Befestigung der BACTRAPs mit Kabelbindern an einer Polyamidschnur. Die BACTRAPs bestehen aus einer perforierten Teflonmembran gefüllt mit BioSep® Beads. (B1) Multilevel-Scheibenpacker mit befestigten BACTRAPs (B2). Die BACTRAPs bestehen aus perforierten Edelstahlkäfigen gefüllt mit Beads. (C1) Scheibenpacker bestehend aus perforierten Rohren. (C2) Scheibenpacker nach Einbringung in die Grundwassermessstelle. In den jeweiligen Rohren wurden zeitgleich BACTRAP-Serien exponiert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen werden konnten.

### 3.6 Feldexperimente

Eine Übersicht über die Feldexperimente einschließlich des Versuchsdesigns und der analytischen Methoden ist in Tab. 3-4 (S. 42) gegeben. Die Feldversuche wurden entsprechend der Zielstellung im Zentrum oder am Rande der Schadstofffahne durchgeführt. Die Lage der verwendeten Grundwassermessstellen ist Abb. 3-3 zu entnehmen, die entsprechenden geochemischen Bedingungen der Tab. 3-3.



**Abb. 3-3** Verteilung der BTEX-Konzentrationen im unteren (links) und oberen (rechts) Aquifer im Bereich des ehemaligen Hydrierwerkes (Zeit, Sachsen-Anhalt). (⊗) markieren die Lage der Grundwassermessstellen.

**Tab. 3-3** Verteilung der Benzol-, Toluol-, Nitrat-, Mangan-, Eisen-, Sulfat- und Hydrogencarbonat-Konzentrationen in den verschiedenen Grundwassermessstellen.

Brunnen	Tiefe (m u. GOK)	Benzol (mg l <sup>-1</sup> )	Toluol (mg l <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	Mn (mg l <sup>-1</sup> )	Fe <sup>3+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )
Zz 9B/00 <sup>a</sup>	25	31	n.n.	<0,3	0,4	0,6	213	506
Zz 32/02 <sup>a</sup>	12	66	n.n.	274	2	<0,05	1001	122
	13	16	n.n.	223	3	<0,05	943	159
Zz 12A/00 <sup>a</sup>	18	90	0,02	131	5	223	42	985
Zz 52/03 <sup>b</sup>	12	8	n.n.	24	3	<0,05	512	744
	13	8	n.n.	27	3	<0,05	588	695
Zz 53A/03 <sup>a</sup>	30	7	0,006	-	-	-	-	-

GOK: Geländeoberkante; n.n. = nicht nachweisbar; - Daten wurden nicht erhoben

<sup>a</sup> Geochemische Daten wurden im März 2005 im Rahmen routinemäßiger Messkampagnen zum Monitoring der Grundwasserqualität erhoben.

<sup>b</sup> Geochemische Messdaten wurden im November 2005 im Rahmen eines Feldversuches in Kooperation mit dem Department für Isotopenbiogeochemie erhoben. Die Analytik erfolgte durch das Handelschemische Prüfinstitut (Zeit, Deutschland).

**Tab. 3-4** Übersicht über die verschiedenen Feldversuche einschließlich Zielstellung, Versuchsdesign und -durchführung sowie verwendeter Analyseverfahren. Die Nummerierungen der Versuche entsprechenden der in Abb. 2-1 (S. 33) aufgezeigten Dissertationsgliederung.

Zielstellung	Versuchsdesign	Design BACTRAPs	Brunnen	Brunnen-tiefe (m)	Dauer (d)	Analyse
I.II. Reproduzierbarkeit der Besiedlung	<p><u>Exposition von:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 unbeladenen BACTRAPs</li> <li>• 10 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAPs</li> </ul> <p><u>Einbau in die Grundwasserstelle:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Befestigung der BACTRAPs an Polyamid-Schnur</li> <li>• gleichartige BACTRAPs wurden in einer Tiefe und verschiedenartige BACTRAPs im vertikalen Abstand von 12 cm exponiert</li> </ul>	perforierter Teflonschlauch (6 cm x 1 cm AD <sup>a</sup> x 0,1 mm WD <sup>b</sup> ) gefüllt mit 0,5 g Beads	Zz 9B/00	25	42	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gesamtlipidfettsäuren</li> <li>• Phospholipidfettsäuren</li> </ul>
I.III. Entwicklung von Biofilmen über die Zeit	<p><u>Exposition von 6 BACTRAP-Serien ä:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 unbeladene BACTRAPs</li> <li>• 3 [<sup>12</sup>C]-Toluol- BACTRAPs</li> <li>• 3 [<sup>13</sup>C]-α-Toluol- BACTRAPs</li> </ul> <p><u>Versuchs-anordnung:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exposition mit Multilevelpackersystem</li> </ul>	perforierter Teflonschlauch (9 cm x 0,8 cm AD <sup>a</sup> x 0,1 mm WD <sup>b</sup> ) gefüllt mit 0,5 g Beads	Zz 32/02	12-13	8, 15, 29, 56, 112	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gesamtlipidfettsäuren</li> <li>• Kohlenstoffisotopenverhältnis in den Gesamtlipidfettsäuren</li> </ul>
II. Mikrobielle Abbaupotentiale	<p><u>Exposition von:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 unbeladenen BACTRAPs</li> <li>• 3 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAPs</li> <li>• 3 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAPs + Nitrat</li> <li>• 3 [<sup>12</sup>C]-ToluolBACTRAPs + Sulfat</li> <li>• 3 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAPs + Eisen</li> </ul> <p><u>Versuchs-anordnung:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• siehe Versuch I.II.</li> </ul>	perforierter Teflonschlauch (5 cm x 1 cm AD <sup>a</sup> x 0,1 mm WD <sup>b</sup> ) gefüllt mit 0,4 g Beads	Zz 12A/00	18	42	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phospholipidfettsäuren</li> <li>• Respiratorische Chinone</li> <li>• Konfokale Laser Scanning Mikroskopie</li> </ul>
II.I. Einfluss von Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Gemeinschaft in einem mittelkontaminierten Grundwasserareal						

<p>II.II. Einfluss von Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Gemeinschaft in einem niedrig-kontaminierten Grundwasserareal</p> <p>II.III. Einfluss von Nitrat, Sulfat und Eisen auf den mikrobiellen Toluolabbau</p> <p>III. Quantifizierung des mikrobiellen Toluolumsatzes</p> <p>IV.II. Identifizierung toluolverwertender Mikroorganismen am Feldstandort</p>	<p><u>Exposition von:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 unbeladenen BACTRAPs</li> <li>• 1 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAP</li> <li>• 1 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAP + Nitrat</li> <li>• 1 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAP + Sulfat</li> <li>• 1 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAP + Eisen</li> <li>• 1 [<sup>13</sup>C]-Toluol-BACTRAP</li> <li>• 1 [<sup>13</sup>C]-α-Toluol-BACTRAP + Nitrat</li> <li>• 1 [<sup>13</sup>C]-α-Toluol-BACTRAP + Sulfat</li> <li>• 1 [<sup>13</sup>C]-α-Toluol-BACTRAP + Eisen</li> </ul> <p><u>Versuchsanordnung:</u></p> <p>Exposition der <sup>12</sup>C-, <sup>13</sup>C- und Blank-BACTRAPs mit Multilevel-Scheibenpacker im vertikalen Abstand von je 10 cm</p>	<p>perforierte Edelstahlkäfige (10 cm x 5 cm x 0,5 cm) gefüllt mit 2,5 g Beads</p>	<p>Zz 52/03</p> <p>12-13</p> <p>95</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rasterelektronenmikroskopie</li> <li>• Gesamtlipidfettsäuren</li> <li>• Kohlenstoffisotopenverhältnis in den Gesamtlipidfettsäuren</li> <li>• Stable Isotope Probing (RNA)</li> <li>• Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</li> <li>• Klonbibliothek</li> </ul>
<p>IV.I. Identifizierung toluolverwertender Mikroorganismen in Labormikrokosmen</p>	<p><u>Exposition von:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 unbeladenen BACTRAPs</li> <li>• 2 [<sup>12</sup>C]-Toluol-BACTRAPs</li> </ul>	<p>perforierter Teflonschlauch (6 cm x 1 cm AD<sup>a</sup> x 0,1 mm WD<sup>b</sup>) gefüllt mit 0,5 g Beads</p>	<p>Zz 53A/03</p> <p>30</p> <p>70</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konfokale Laser Scanning Mikroskopie</li> <li>• Analyse von Sulfid und Toluol</li> <li>• Kohlenstoffisotopenverhältnis in den Gesamtlipidfettsäuren</li> <li>• Stable Isotope Probing (RNA)</li> <li>• T-RFLP</li> <li>• Klonbibliothek</li> </ul>

<sup>a</sup>AD=Außendurchmesser, <sup>b</sup>WD=Wanddicke

## 3.7 Laborexperimente

### 3.7.1 Desorptionskinetiken von Toluol und Benzol

In Dreifachansätzen wurden 20ml-Headspace-Röhrchen mit 20 ml sterilem bidestillierten Wasser und 10 Toluol oder Benzol beladenen Beads (3.5.2) befüllt und sofort mit teflonbeschichteten Crimpkappen verschlossen. Die Inkubation erfolgte für 28 d über Kopf bei 12°C ( $\approx$  Grundwassertemperatur) und 100 U min<sup>-1</sup>. Das Schütteln verhinderte die Entstehung von Gradienten. Nach Einstellung des Gleichgewichtes von Toluol und Benzol zwischen den Beads und der umgebenden Wasserphase wurde jeweils die Aromatenkonzentration in der wässrigen Phase mittels GC-FID-Analyse bestimmt (3.8.1) und anschließend das komplette Wasservolumen ausgetauscht. Die Gleichgewichtseinstellung von Toluol und Benzol wurde zuvor in analoger Art und Weise ermittelt, wobei die wässrige Phase während der 96-stündigen Inkubation regelmäßig beprobt jedoch aber nicht ausgetauscht wurde.

### 3.7.2 Bestimmung von Ertragskoeffizienten

Sterile 118ml-Serumflaschen wurden jeweils mit 50 ml anoxischem Mineralmedium (3.2.1) und 0,5 g Toluol beladenen Beads (3.5.2) gefüllt. Die Beads dienten dabei einerseits als Adsorbtionsmittel, um toxische Effekte des Toluols zu minimieren, und andererseits als Besiedlungsoberfläche. Zur Gleichgewichtseinstellung des Toluols zwischen Beads und dem Mineralmedium wurden die Ansätze für 24 h bei 150 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Residuales Toluol in den Vorkulturen wurde vor dem Inokulieren mittels Stickstoffbegasung entfernt. Die Kultivierung erfolgte entsprechend den in Kap. 3.3 aufgeführten Bedingungen. Zur Bestimmung des Fettsäureertrages pro mg metabolisierten Toluols ( $Y_{TLFA/S}$ ) wurden je Kultur in Dreifachansätzen die Toluol- und Fettsäurekonzentrationen in der Flüssigphase sowie auf den Beads direkt nach dem Animpfen und nach Erreichen der stationären Phase bestimmt (3.8.1). Als Wachstumskontrolle diente ein Ansatz mit unbeladenen Beads (ohne Toluol). Zur Evaluierung abiotischer Toluolverluste während der Beprobung und Kultivierung wurde ein Kontrollansatz mit Toluol beladenen Beads aber ohne Inokulum mitgeführt.

### 3.7.3 Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen in Labormikrokosmen

#### Anreicherung und Kultivierung der toluolabbauenden Mikroorganismen

Die Anreicherung des sulfatreduzierenden Konsortiums aus dem Grundwasser zeitlich erfolgte unter Verwendung von Toluol beladenen BACTRAPs (3.5) wie in Tab. 3-4 (S.42) beschrieben. Als Wachstumskontrolle dienten unbeladene BACTRAPs. Umgehend nach Entnahme der BACTRAPs aus dem Grundwasserbrunnen wurden die BACTRAPs in mit anoxischem Mineralmedium (Tab. 3-2) gefüllte Serumflaschen überführt, wobei Natriumdithionit als Reduktionsmittel diente. Die Beads jedes Mikrokosmos wurden am gleichen Tag in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., USA) in mit 100 ml anoxischem Mineralmedium (Tab. 3-2) gefüllte 118ml-Serumflaschen überführt. Serumflaschen, welche die Toluol beladenen Beads enthielten, wurden mit 2 µl Toluol versetzt. Die Serumflaschen mit unbeladenen Beads hingegen wurden ohne Substrat angesetzt. Die Inkubation der Labormikrokosmen erfolgte statisch bei 22°C im Dunkeln. Zur Kontrolle des Wachstums wurden die Ansätze monatlich hinsichtlich der produzierten Sulfidkonzentration analysiert (3.8.3). Nach 265-tägiger Kultivierung wurde der auf den Beads angesiedelte Biofilm durch vorsichtiges Schütteln abgelöst. Die resultierende Zellsuspension diente als Inokulum für Laboransätze mit Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle, aber ohne Beads. Aliquots dieser Anreicherungskultur, welche mit ‚ZBT 1‘ bezeichnet wurde, dienten als Inokulum für das nachfolgend beschriebene Stable Isotope Probing Experiment zur Charakterisierung der Anreicherungskultur.

#### Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen

118ml-Serumflaschen wurden jeweils mit 90 ml anoxischem Mineralmedium (Tab. 3-2) und 1 g Beadmaterial (~110 Beads) gefüllt. [<sup>12</sup>C]-Toluol, [<sup>13</sup>C]-α-Toluol oder [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>]-Toluol wurde in einer Endkonzentration von 4,6 mM zugesetzt. Als Wachstumskontrolle diente ein Ansatz ohne Toluol. Um eine Gleichgewichtseinstellung des Toluols zwischen Beads und Mineralmedium zu gewährleisten, wurden die Labormikrokosmen vor dem Inokulieren für 24 h bei 150 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Die Kultivierung erfolgte für 60 d statisch bei 20°C im Dunkeln. Zur Erfassung des mikrobiellen Toluolabbaus wurden die Toluolkonzentrationen in der Flüssigkultur und auf den Beads nach 0 und 60 Tagen Inkubation bestimmt (3.8.1). Die Konzen-

tration des bei der Sulfatreduktion entstehenden Sulfids wurde 14-tägig in der Flüssigkultur jedes Labormikrokosmos analysiert (3.8.3). Um die toluolabbauenden Mikroorganismen zu identifizieren, wurden nach 20, 48 und 60 Tagen Inkubation jeweils 25 Beads aus den Labormikrokosmen entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den mikrobiellen Fettsäuren wurden nach 60 Tagen Inkubation 10 ml der Vorkultur ZBT 1 und 10 ml Flüssigkultur sowie 25 Beads je Labormikrokosmos entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Laser Scanning Mikroskopie wurden nach 60-tägiger Inkubation jeweils 5 Beads entnommen und entsprechend Kap. 3.10.1 aufgearbeitet.

### **3.8 Chemische Analysemethoden**

Chemische Analysen unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln erfolgten in Glasgefäßen mit teflonbeschichteten Butylsepten oder teflonbeschichteten Polypropylen-Kappen.

#### **3.8.1 Toluol und Benzol**

Zur Bestimmung der adsorbierten Masse an Toluol oder Benzol wurden 0,5 g Beads mit 5 ml Dichlormethan extrahiert. Die Extraktion erfolgte über Nacht bei  $20^{\circ}\text{C}$  in 10ml-Headspace-Röhrchen, welche kopfüber bei  $140\text{ U min}^{-1}$  geschüttelt wurden. Anschließend wurden  $10\ \mu\text{l}$  des Extraktes mit einer Hamiltonspritze in gekühlte 20ml-Headspace-Röhrchen überführt und nach Verschluss mit magnetischen Bördelkappen gaschromatographisch analysiert. Der restliche Extrakt wurde in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und für die Fettsäureanalytik verwendet. Zur quantitativen Untersuchung von Benzol und Toluol in den Zellsuspensionen wurde in 20ml-Headspace-Röhrchen schwefelsaures, bidestilliertes Wasser (pH 2,5) vorgelegt und mit 1 - 5 ml Probe zu 10 ml ergänzt. Die Messungen erfolgten an einem Varian 3800 Headspace Gaschromatographen mit gekoppeltem Flammenionendetektor (Varian, Walnut Creek, USA) entsprechend den in Tab. 3-5 aufgeführten Parametern.

**Tab. 3-5** Gaschromatographische Messbedingungen zur Quantifizierung des Toluols und Benzols

Säule	CP SIL 5 CB (25 m x 0,12 mm ID x 0,12 µm FD; Varian, Darmstadt, Deutschland)		
Agitator	Inkubation: 20 min bei 70°C Rotation: 250 U min <sup>-1</sup> für 5 s, Rotationsstopp für 2 s		
Injektionsvolumen	1 ml		
Split	1:100 (Extrakte der Beads) 1:2 (Zellsuspension)		
Injektortemperatur	250°C		
Detektortemperatur	260°C		
Temperaturprogramm	70°C	2 min	
	10°C min <sup>-1</sup>	90°C	4 min
	60°C min <sup>-1</sup>	220°C	6,17 min
Heliumfluss	1 ml min <sup>-1</sup>		

Zur Bestimmung der Aromatenkonzentrationen wurden für die Extrakte der Beads Eichgeraden im Bereich von 0 - 1760 mg l<sup>-1</sup> und für die Zellsuspensionen im Bereich von 0 - 4,3 mg l<sup>-1</sup> erstellt.

### 3.8.2 Anionen (Ionenchromatographie)

Die Bestimmung der Sulfat- und Nitratkonzentration in den Beads und Zellsuspensionen erfolgte durch Ines Mäusezahl (Department Bioremediation, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig) unter Verwendung eines Ionenchromatographen (Dionex 100, Idstein Deutschland). Für die Analytik der beaufschlagten Anionen wurden 0,1 g Beads mit 15 ml bidestilliertem Wasser unter kräftigem Schütteln extrahiert und 3 ml des Extraktes bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Für die Trennung der Anionen wurde eine AS4A-SC Säule mit Karbonatpuffer (1,8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 1,7 mM NaHCO<sub>3</sub>) als mobile Phase verwendet. Die Detektion erfolgte mittels einer Leitfähigkeitszelle und für Nitrat zusätzlich mit einem UV/VIS Detektor bei 215 nm.

### 3.8.3 Sulfid (Photometrisch)

Die Bestimmung der Sulfidkonzentration in den Zellsuspensionen erfolgte photometrisch nach Cline (1969). Entsprechend der Sulfidkonzentration wurden 40-100 µl Aliquots unmittelbar nach der Probenentnahme mit 1 ml Zinkacetat (3%, w/v) fixiert und bis zur weiteren

Aufarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Vor Testbeginn wurden die Proben mit 4 ml destilliertem Wasser und 0,4 ml N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD) versetzt. Nach frühestens 20 min erfolgte die Extinktionsmessung des Reaktionsproduktes Methylenblau bei 670 nm gegen einen Ansatz ohne Sulfid. Zur Bestimmung der Sulfidkonzentration wurde eine Eichgerade im Bereich von 0-250 nmol erstellt.

### **3.8.4 Fettsäuren**

Zur Quantifizierung mikrobieller Biomasse und zum Nachweis der Inkorporation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobiellen Fettsäuren wurden die Gesamtlipidfettsäuren der mikrobiellen Gemeinschaften untersucht. Um die lebende Biomasse phylogenetisch zu charakterisieren, wurden Phospholipidfettsäuren und respiratorische Chinone analysiert. Die verwendeten Glasmaterialien wurden mit Aceton gespült und in Alufolie gewickelt für 4 h bei  $450^{\circ}\text{C}$  ausgeheizt, um eine Kontamination der Proben mit Fremdlipiden zu vermeiden. Nicht hitzestabile, teflonbeschichtete Deckel wurden nur mit Aceton gereinigt. Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad (für die Gaschromatographie; Merck, Darmstadt, Deutschland).

#### Extraktion der Gesamtlipide

In Anlehnung an die von White and Ringelberg (1998) modifizierte Methode nach Bligh and Dyer (1959) erfolgte die Extraktion der mikrobiellen Gesamtfettsäuren (TLFA) aus 0,5 g Beads oder 10-50 ml lyophilisierter bzw. abzentrifugierter Kultursuspension mittels eines Einphasen-Gemisches aus 4 ml Phosphatpuffer, 10 ml Methanol und 5 ml Chloroform über Nacht bei  $20^{\circ}\text{C}$  und  $160\text{ U min}^{-1}$ . Die Zellen wurden durch eine 6-minütige Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Zur Phasentrennung wurden die Proben mit 5 ml Nanopur-Wasser (bidestilliertes Wasser versetzt mit Chloroform 20:1 [v/v]) und 5 ml Chloroform versetzt und für 20 min bei  $2000\text{ U min}^{-1}$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit der Dichlormethanphase vereinigt und die Lipidextrakte in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt.

#### Säulenchromatographie

Für die Isolation der Phospholipide wurden die Gesamtlipidextrakte in 0,5 ml Chloroform re-suspendiert und chromatographisch über eine mit jeweils 5 ml Aceton und Chloroform equi-

librierte Silikasäule mit 5 ml Chloroform, 5 ml Aceton und 10 ml Methanol in Neutral-, Glyco- und Phospholipide aufgetrennt. Alle Fraktionen wurden in einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt.

### Entschwefelung

Da hohe Schwefelkonzentrationen die chromatographische Auftrennung der Fettsäuren störten, wurden Lipidextrakte aus stark schwefelhaltigen Habitaten mit Hilfe einer Oxidation von Kupfer und Schwefel zu Kupfersulfid entschwefelt. Dazu wurden die eingengten Lipidextrakte in 1 ml n-Hexan resuspendiert und über Nacht mit 2-3 aktivierten Kupferspänen inkubiert. Die Aktivierung der Kupferspäne erfolgte mit 6 N Salzsäure unmittelbar vor der Entschwefelung für 1 h bei 80°C. Zur Entfernung der Säure wurden die Späne viermal mit destilliertem Wasser, dreimal mit Aceton und zweimal mit Hexan gewaschen und in Hexan aufgenommen.

### Methylierung der Fettsäuren

Für die gaschromatographische Analyse wurden die Lipidextrakte mittels einer milden, alkalischen Methanolyse (Guckert et al., 1985) in Fettsäuremethylester (FAMES) überführt. Dazu wurden die eingengten Lipidextrakte mit 2 ml des Derivatisierungsreagenz Kaliumhydroxid/Methanol (0,2 M, [w/v]) versetzt, für 1 h bei 37°C inkubiert und nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur mit 200 µl Methanol/Essigsäure (9:1 [v/v]) neutralisiert. Die resultierenden FAMES wurden anschließend durch dreimalige Phasentrennung mit 3 ml Hexan und darauf folgender 10-minütiger Zentrifugation bei 2000 U min<sup>-1</sup> und 4°C von nicht methylierten Zellkompartimenten separiert. Die oberen FAME-haltigen Phasen wurden in einem 15-ml Schraubreagenzglas gesammelt und das Lösungsmittel mit einem Stickstoffstrom bis zur vollständigen Trockene der FAMES verdampft.

Die FAMES beider Fraktionen wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) identifiziert und quantifiziert. Vor der Injektion wurden die Proben in 100 µl Hexan resuspendiert und zur Quantifizierung mit einem internen Standard (FAME von C21:0; 20,06 ng µl<sup>-1</sup>) versetzt. Die Trennung der FAMES erfolgte über eine HP5-5MSI Säule (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) an einem HP 6890 Gaschromatographen mit gekoppeltem Mas-

senspektrometer (HP 5973; Agilent/Hewlett Packard, Alto, USA). Das Temperaturprogramm und die entsprechenden Geräteeinstellung sind Tab. 3-6 zu entnehmen.

Die FAMES wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit denen bekannter Standards (Bacterial Acid Methyl Ester; Supelco, München, Deutschland) identifiziert. Entsprechend der IUPAC- Nomenklatur sind die Fettsäuren in der Form A:B $\omega$ C bezeichnet, wobei A die Anzahl der Kohlenstoffatome, B die Anzahl der Doppelbindungen und C die Position der Doppelbindung ausgehend vom aliphatischen Ende kennzeichnet. Die Konfiguration der Fettsäuren sind mit den Präfixen „c“ (cis) bzw. „t“ (trans) gekennzeichnet. Die Präfixe „i“ (iso) und „a“ (anteiso) zeigen eine endständige Methylverzweigung am aliphatischen Ende an. Methylverzweigungen an anderen Positionen sind in der Form DMeA:B, wobei D die Position der Methylgruppe ausgehend von der Carboxylgruppe angibt. Cyclopropan-Fettsäuren sind durch das Präfix „cy“ gekennzeichnet. Die Quantifizierung der FAMES ( $c_{FAME}$ ) erfolgte entsprechend der Gleichung von Findlay (2004).

$$c_{FAME} = \left( \frac{Area_{FAME}}{Area_{C_{21:0}}} \right) \times c_{C_{21:0}} \times V_{C_{21:0}} / (g \text{ bead}) \quad [ 1 ]$$

wobei  $Area_{FAME}$  und  $Area_{C_{21:0}}$  die Peakflächen der Probe bzw. des Standards und  $c_{C_{21:0}}$  und  $V_{C_{21:0}}$  die Konzentration (20,06 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ ) bzw. das Volumen des verwendeten Standards beschreiben. Die so ermittelten Konzentrationen wurden um die Methylgruppe der FAMES korrigiert, die sich während der Derivatisierung angelagert hat.

### Respiratorische Chinone

Die Analytik der Chinone erfolgte durch Roland Geyer (im Department Umweltmikrobiologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig). Unmittelbar vor Messung wurden die trockenen Neutrallipid-Extrakte in 100  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Die chromatographische Auftrennung der Chinone erfolgte über eine Dash-8 high performance liquid chromatography Säule (20 mm  $\times$  2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Thermo Electron Corp.) an einem liquid chromatography tandem mass spectrometry System (LC/MS/MS Applied Biosystems/MDS SCIEX 4000 QTrap™, Darmstadt, Deutschland) entsprechend den von Geyer et al. (2004) publizierten Einstellungen. Die Zuordnung und Quantifizierung der Chinone erfolgte mithilfe von Chinonstandards (Geyer et al., 2004).

### 3.8.5 Kohlenstoffisotopensignaturen

Zur Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse in den einzelnen FAMES wurde ein GC-C-IRMS-System verwendet. Das System besteht aus einem Gaschromatographen (Pal Systems; CTC Analytics, Zwingen, Schweiz), der über einen Conflow III interface Verbrennungsofen (ThermoFinnigan, Bremen, Deutschland) mit einem Massenspektrometer (MAT 253; ThermoFinnigan) verbunden ist (Richnow et al., 2003). 3-5 µl Aliquots wurden nach manueller Injektion entsprechend den in Tab. 3-6 aufgeführten Geräteparametern aufgetrennt.

**Tab. 3-6** Temperaturprogramm und Geräteeinstellungen für die Analytik der FAMES

	GC/MS			GC-C-IRMS			
Säule	HP5-5MSI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)			DP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)			
Temperaturprogramm		50°C	1 min		70°C	1 min	
		50°C min <sup>-1</sup>	170°C	0 min	20°C min <sup>-1</sup>	130°C	0 min
		4°C min <sup>-1</sup>	300°C	0 min	2°C min <sup>-1</sup>	150°C	5 min
		40°C min <sup>-1</sup>	320°C	10 min	2°C min <sup>-1</sup>	165°C	5 min
					2°C min <sup>-1</sup>	230°C	5 min
				20°C min <sup>-1</sup>	300°C	5 min	
Split	splitless			1:3			
Heliumfluss	1,2 ml min <sup>-1</sup>			1,2 ml min <sup>-1</sup>			
Injektortemperatur	250°C			250°C			

Das Isotopenverhältnis in den FAMES, wie es mittels GC-C-IRMS analysiert wird, ist entsprechend der  $\delta$ -Notation als

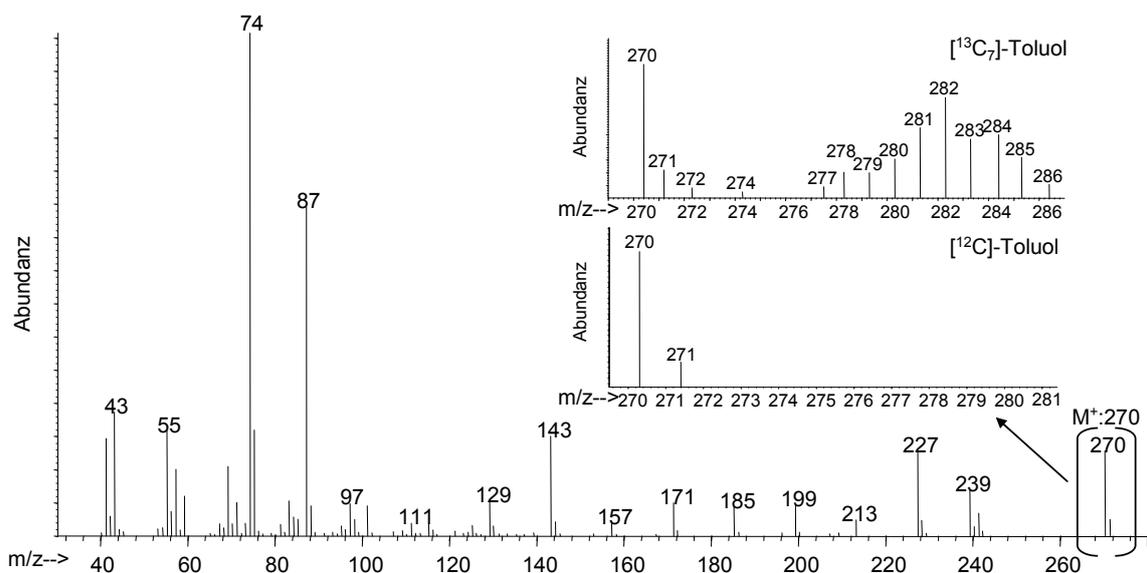
$$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}] = \left( \frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{V-PDB}}} - 1 \right) \times 1000 \quad [ 2 ]$$

definiert. Dabei beschreibt  $\delta^{13}\text{C}$  die Abweichung des Isotopenverhältnisses  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  in einer Probe ( $R_{\text{Probe}}$ ) zu demjenigen des internationalen Standards Vienna PeeDeeBelemnite ( $R_{\text{V-PDB}}$ ). Um die tatsächlichen Kohlenstoffisotopenverhältnisse in den TLFA's ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TLFA}}$ ) zu ermitteln, wurden die gemessenen Kohlenstoffisotopenverhältnisse der FAMES ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TLFAME}}$ ) um das während der Derivatisierung angelagerte Kohlenstoffatom korrigiert:

$$\delta^{13}\text{C}_{TLFA} = \left( (N + 1) \times \delta^{13}\text{C}_{TLFAME} \right) / N \quad [3]$$

wobei N die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäure ausdrückt. Im Gegensatz zur Berechnung von Boschker (2004) wurde das Isotopenverhältnis des Derivatisierungsreagenz aufgrund der hohen Isotopenanreicherungen in den Fettsäuren vernachlässigt. Die absoluten Mengen des inkorporierten  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes wurden aus dem Produkt des Gesamtkohlenstoffes und der Zunahme der  $^{13}\text{C}$ -Fraktion in der jeweiligen Fettsäure gegenüber dem Standard berechnet (Boschker, 2004).

Da hohe Isotopenanreicherungen, wie sie nach Inkubation der Mikroorganismen mit [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol erzielt wurden (3.7.3), mit dem vorhandenen GC-C-IRMS-System nicht analysiert werden konnten, wurde in Kooperation mit Hans Richnow und Anja Miltner (Department Isotopenbiogeochemie bzw. Bioremediation, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig) ein auf der Analyse von Massenspektren basierender Algorithmus entwickelt. Generell führt die Inkorporation von  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff in mikrobielle Fettsäuren zur Detektion von verschiedenen Isotopomeren neben dem natürlichen Molekularion  $\text{M}^+$  (Abb. 3-4) (Annweiler et al., 2000; Fang et al., 2004).



**Abb. 3-4** Massenspektren der Fettsäure 16:0 nach Wachstum der Anreicherungskultur ZBT 1 mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol und [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol.

Entsprechend der Verteilung der Isotopomeren kann der prozentuale Anteil des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in den mikrobiellen Fettsäuren folgendermaßen beschrieben werden:

$$at\% = \sum \left( {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ im jeweiligen Isotopomer} \right) \times \left( \text{rel. Häufigkeit des Isotopomers} \right) \quad [4]$$

Die Faktoren der Gleichung [ 4 ] lassen sich mithilfe der Gleichungen [ 5 ] und [ 6 ] ausdrücken:

$$\text{Verhältnis } {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \text{ im Isotopomer} = \frac{J}{N} \quad [5]$$

und

$$\text{rel. Häufigkeit des Isotopomer} = \frac{A_{M+J}}{A_T} \quad [6]$$

wobei J die Anzahl der  $^{13}\text{C}$ -Isotope im jeweiligen Isotopomer und N die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäure bezeichnet. Die relative Häufigkeit des Isotopomeres ergibt sich aus dessen Abundanz  $A_{M+J}$  im Verhältnis zur Summe aller Abundanzen  $A_T$ :

$$A_T = \sum_{J=0}^N A_{M+J} \quad [7]$$

Somit gilt für die Berechnung der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in mikrobiellen Fettsäuren:

$$at\% = \sum_{J=1}^N \frac{J}{N} \times \frac{A_{M+J}}{A_T} \quad [8]$$

### 3.9 Molekularbiologische Methoden

#### 3.9.1 Isolierung von RNA

Aufgrund des starken Adsorptionsvermögens der Beadmatrix in Kombination mit den geringen Biomassen in dem untersuchten anoxischen Habitat erwies sich die RNA-Extraktion aus den Beads als schwierig. Keine oder nur unzureichende Mengen an RNA wurden mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), FastRNA<sup>®</sup> BLUE-Kit (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland), RNA Power Soil<sup>™</sup>-Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA) und dem von Griffiths et al. (2000) beschriebenen Protokoll isoliert. Dagegen konnten ausreichende RNA-Mengen für die SIP-Versuche mit dem folgenden Protokoll isoliert werden, welches Tillmann Lüders (Institut für Grundwasserökologie, Helmholtz Zentrum München) auf Grundlage des Protokolls von Schmitt et al. (1990) speziell für Grundwassersedimente entwickelte:

1. 0,5 g Beads jeweils in vier mit 0,2 ml Zirkoniumpartikeln ( $\varnothing$  0,1 mm und 1,0 mm im Verhältnis 1:1; Biospec Products Inc., Bartlesville, Oklahoma, USA) gefüllte 2ml-Schraubverschlussröhrchen überführen
2. Beads mit sterilem Spatel zerkleinern
3. 300  $\mu$ L Na-Acetat-Puffer (50 mM Na-Acetat pH 5,3, 10 mM Na-EDTA) und 200  $\mu$ L 200 mM NaPO<sub>4</sub> je 2ml-Schraubverschlussröhrchen zugeben
4. 50  $\mu$ L 20%ige [v/v] SDS-Lösung und 450  $\mu$ L auf 65°C temperiertes Phenol zugeben
5. vorsichtig vortexen
6. für 10 min bei 65°C inkubieren
7. Zellen für 30 s bei 6,5 m s<sup>-1</sup> in einem Bead Beater (Modell: Thermo Savant Fast Prep FP120; Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) lysieren
8. Ansatz für 5 min bei -80°C frieren
9. Ansatz für 5 min bei 14000 U min<sup>-1</sup> und 4°C zentrifugieren
10. 400  $\mu$ L des wässrigen Überstandes in ein 2ml-Phase Lock Gel Heavy Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführen
11. untere Phase (sedimentierte Beads) erneut in 200  $\mu$ L Na-Acetat-Puffer resuspendieren
12. Ansatz für 5 min bei 14000 U min<sup>-1</sup> und 4°C zentrifugieren

13. 400  $\mu\text{l}$  des wässrigen Überstandes mit dem zuvor gewonnenen Überstand vereinigen und mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 [v/v/v]; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzen
14. Ansatz für 5 min bei 14000  $\text{U min}^{-1}$  und 4°C zentrifugieren
15. wässrigen Überstand in ein neues 2ml-Reaktionsgefäß überführen und mit 2 Volumina PEG-Lösung (30% [w/v] Polyethylenglycol 6000 gelöst in 1,6 M NaCl; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 2  $\mu\text{l}$  Glycogen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) versetzen
16. Ansatz für 30 min bei 14000  $\text{U min}^{-1}$  und 4°C zentrifugieren
17. Präzipitate mit 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem 70%igen [v/v] Ethanol waschen und für 5 min bei 14000  $\text{U min}^{-1}$  und 4°C zentrifugieren
18. luftgetrocknete RNA-Pellets in 40  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser resuspendieren und Aliquots vereinigen
19. RNA bei -80°C lagern

Zur Gewährleistung RNase freier Arbeitsbedingungen wurden die verwendeten Glasmaterialien sowie Zirkoniumpartikel für 4 h bei 180°C sterilisiert, Plastikmaterialien ausschließlich in RNase-freier Qualität verwendet und alle Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt (Schrimpf, 2002).

### 3.9.2 Isolierung von DNA

Die den SSCP-Profilen der mikrobiellen Gemeinschaften (Abb. 4-3, S.73) zu Grunde liegenden DNA-Isolate wurde seitens der Arbeitsgruppe von Chris Tebbe (Johann Heinrich von Thünen-Institut, FAL Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) gewonnen. Die Extraktion erfolgte mit einer Phenol-Chloroform-Fällung nach vorangegangener freeze-and-thaw-Lyse der Zellen (Stelzer et al., 2006b). Eine effizientere DNA-Extraktion wurde in nachfolgenden, jedoch im Rahmen dieser Dissertationsschrift nicht vorgestellten Experimenten, mit dem Protokoll von Winderl et al. (2008) erzielt.

### **3.9.3 DNase-Verdau**

Die Eliminierung der mitextrahierten DNA erfolgte unter Verwendung des DNA-free™ Kit (Ambion, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die verwendete Menge an rDNase I wurde entsprechend der mittels Agarosegel ermittelten DNA-Konzentration variiert (3.9.4). Der vollständige Verdau der DNA wurde neben der Agarosegelelektrophese durch eine PCR überprüft (3.9.8).

### **3.9.4 Analyse von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese**

Aliquots extrahierter RNA sowie erzeugter PCR-Amplifikate wurden zur Abschätzung der Nukleinsäurekonzentration bzw. der Fragmentlänge auf ein 1,5 %iges [w/v] TAE-Agarosegel (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) aufgetragen. Jeweils 1-5 µl Probe wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Volumen des Auftragspuffers (RNA- bzw. DNA Loading Dye Solution, Fermentas, Leon-Rot, Deutschland) gemischt. Als Längen- und Mengenstandard wurde der RNA-ladder high range (Fermentas, Leon-Rot, Deutschland) oder der 100 bp DNA-ladder (New England BioLab GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 0,5 × TAE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer bei 100 V und einer Laufzeit von ca. 25 min. Das Gel wurde anschließend in einer 0,001%igen [v/v] Ethidiumbromidlösung gefärbt, unter UV-Licht visualisiert und mit Hilfe der Software GeneSnap 6.05 ausgewertet.

### **3.9.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Quantifizierung der RNA-Extrakte erfolgte unter Verwendung des Quant-iT™ Ribogreen® RNA Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), basierend auf der Fluoreszenz-Messung von RNA bindenden Farbstoffen. Hohe RNA-Konzentrationen (vor Dichtegradientenzentrifugation) wurden nach dem Protokoll „high range assay“ und niedrige Konzentrationen (nach Dichtegradientenzentrifugation) nach dem „low range assay“ entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Fluoreszenzmessung der Proben sowie mitgelieferter Standards erfolgte in schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten an einem Spektralfluorometer (Modell: Gemini EM, Molecular Devices, München, Deutschland). Die Fluoreszenzwerte der vor jeder Messung hergestellten RNA-Mengenstandards wurden gegen ihre Menge (ng) aufgetragen und durch lineare Regression interpoliert. Mittels der resultierenden Gera-

dengleichung konnte aus den Fluoreszenzwerten der RNA-Extrakte die Konzentration der RNA ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) bestimmt werden.

### 3.9.6 Dichtegradientenzentrifugation

Die selektive Isolierung leichter, nicht-markierter und schwerer,  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA erfolgte mit Hilfe isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation in Anlehnung an das Protokoll von Lueders et al. (2003). Für die Zentrifugation wurden jeweils 4,65 ml Caesiumtrifluoracetat (CsTFA; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) mit 175  $\mu\text{l}$  Formamid gemischt und anschließend mit 750 ng rRNA versetzt, die mit dem entsprechenden Volumen an Gradientenpuffer auf 850  $\mu\text{l}$  aufgefüllt worden war. Um eine optimale isopyknische Trennung der RNA zu gewährleisten, wurde in jedem Gradienten eine mittlere Dichte von  $1,79 \text{ g ml}^{-1}$  eingestellt, welche gegebenenfalls durch Zugabe von geringen Volumina CsTFA oder Gradientenpuffer erreicht wurde. Die Bestimmung der Dichte erfolgte empirisch durch Bestimmung des temperaturkorrigierten Brechungsindex in 50  $\mu\text{l}$  Aliquots des Gradientenmediums unter Verwendung eines Refraktometers (Modell: AR 200; Reichert, Wolfratshausen, Deutschland) (Neufeld et al., 2007b). Das Gemisch wurde anschließend mit einer Spritze in 6ml-Polyallomer Quick-Seal™ Gefäß luftblasenfrei überführt und verschweißt (Beckmann Cordless Tube Topper®, Krefeld, Deutschland). Die Zentrifugation erfolgte in einer OPTIMA™L-90K Ultrazentrifuge, ausgestattet mit einem NVT 65.2 near-vertical Rotor (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) für 65–69 h bei  $39000 \text{ U min}^{-1}$  ( $125000 \text{ g}_{\text{AV}}$ ),  $20^\circ\text{C}$  und ohne Abbremsfunktion.

#### Fraktionierung der Gradienten

Zum Ernten der Dichtefraktionen wurde die Gradientenlösung mit DEPC-behandeltem Wasser aus den Quick-Seal™ Gefäßen gedrückt. Hierfür wurde eine 10ml-Hamiltonspritze luftblasenfrei mit dem Wasser gefüllt, in die entsprechende Halterung einer Schlauchpumpe (KD Scientific, Holliston, USA) eingespannt und über einen Schlauch mit einer sterilen Kanüle ( $\text{Ø } 0,4 \text{ mm}$ ) verbunden. Die Kanüle wurde anschließend am oberen Ende des Zentrifugengefäßes eingestochen und auf der gegenüberliegenden Seite innen in der Gefäßwand fixiert. Mit einer zweiten Kanüle wurde am Boden des Gefäßes ein Loch eingestochen, unter dem dann die jeweiligen 2ml-Reaktionsgefäße zum Sammeln der Fraktionen platziert wurden. Mit

einer Flussrate von 60 ml h<sup>-1</sup> und manuellem Ersetzen der jeweiligen Sammelgefäße alle 25 s wurden 13 Fraktionen pro Gradient gewonnen. Im Anschluss an die Fraktionierung wurde beginnend mit der leichtesten Fraktion der Brechungsindex jeder Fraktion bestimmt und in die Dichte umgerechnet (Whiteley et al., 2007).

#### Ausfällen der RNA

Jede Dichtefraktion wurde mit einem äquivalenten Volumen PEG (30% [w/v] Polyethylenglycol 6000 gelöst in 1,6 M NaCl; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und die RNA durch 30-minütige Zentrifugation bei 15000 U min<sup>-1</sup> und 4°C präzipitiert. Die Reinigung der RNA-Pellets erfolgte mit 150 µl 70%igem [v/v] Ethanol. Die luftgetrockneten RNA-Pellets wurden in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

#### **3.9.7 cDNA-Synthese**

Da die RNA nicht direkt für eine PCR-Amplifikation eingesetzt werden konnte, wurde die von den Umweltproben, Anreicherungskulturen und Gradientenfraktionen isolierte RNA mit dem RevertAid™ H Minus cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) in einen komplementären DNA-Strang transkribiert. Die reverse Transkription wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von 11 µl RNA-Extrakt und Random-Hexamer Primern durchgeführt.

#### **3.9.8 PCR-Amplifikation**

Für die T-RFLP- und Sequenzanalyse der jeweiligen mikrobiellen Populationen wurden die bakteriellen 16S rRNA-Gene mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte sowohl für die T-RFLP- als auch Sequenzanalyse mit universellen Bakterienprimern der Firma MWG Biotech (München, Deutschland), welche Tab. 3-7 zu entnehmen sind.

**Tab. 3-7** Bezeichnung, Sequenz, Zielgruppe, Verwendung und Quelle der verwendeten Oligonukleotid-Primer.

Primer	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Zielgruppe	Verwendung	Quelle
Ba27f*	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Bacteria	T-RFLP, Klonierung, Sequenzierung	Lane, 1991
Ba907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Bacteria	T-RFLP, Klonierung	Lane, 1991
Ba1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Bacteria	T-RFLP, Klonierung	Lane, 1991
M13f	GTA AAA CGA CGG CCA G	Vektorinsert	Klonierung	TA Cloning® Kit
M13r	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Vektorinsert	Klonierung	TA Cloning® Kit
Ba519r	GWATTACCGCGGCKGCTG	Vektorinsert	Sequenzierung	Lane, 1991

\*Primer wurde mit einer am 5'-Ende versehenen Carboxy-Fluorescein (FAM)-Markierung in die T-RFLP-Analyse eingesetzt. IUPAC-Code: A=Adenin; C=Cytosin; G=Guanin; K=Guanin/Thymin; M=Adenin/Cytosin; R=Adenin/Guanin; T=Thymin; W=Adenin/Thymin; Y=Cytosin/Thymin

PCR-Reaktionen für T-RFLP-Analysen und Klonierungen wurden mit dem Taq Master Mix Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das verwendete PCR-Programm sind Tab. 3-8 und Tab. 3-9 zu entnehmen. Die M13-PCR wurde in analoger Art und Weise durchgeführt, jedoch unter Verwendung des PCR Master Mix von Promega (Mannheim, Deutschland). Die Sequenzier-PCR ist Kap. 3.9.11 zu entnehmen.

**Tab. 3-8** Zusammensetzung der PCR-Reaktion für ein Reaktionsvolumen von 25 µl.

Lösung	Volumen (µl)	Endkonzentration
Taq Master Mix	12,5	2,5 units Taq DNA Polymerase 1x PCR Puffer 200 µM dNTP-Mix
Vorwärts-Primer	0,5	0,4 µM
Rückwärts-Primer	0,5	0,4 µM
Template	0,5-1	0,1-20 ng/Reaktion
Wasser (PCR-Qualität)	ad 25	

**Tab. 3-9** PCR-Thermocyclerprogramm zur Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene und der Vektorinserts von Klonen.

Primerkombination	27f/1492r <sup>a</sup>	27f/907r <sup>b</sup>	M13f/M13r
Initiale Denaturierung	3 min bei 94°C	3 min bei 94°C	5 min bei 95°C
Denaturierung	45 s bei 94°C	45 s bei 94°C	45 s bei 95°C
Primer-Hybridisierung	60 s bei 58°C	30 s bei 52°C	45 s bei 55°C
Polymerisation	2 min bei 72°C	1 min bei 72°C	2 min bei 72°C
abschließende Polymerisation	10 min bei 72°C	10 min bei 72°C	5 min bei 72°C
Zyklenanzahl	30-35	28-30	25

Primer wurden für die Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene aus den Umweltproben <sup>a</sup> und aus der Anreicherungskultur ZBT 1 <sup>b</sup> verwendet, da diese 16S rRNA-Gene mit den universellen bakteriellen Primern 27f/1492r nicht amplifizierbar waren.

Als Negativkontrolle wurde in jeder PCR ein Ansatz mit sterilem PCR-H<sub>2</sub>O ohne Zielmolekül mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten DNA-Extrakte der Reinkultur *Azoarcus* sp. (DSM 9506). Alle DNA-Amplifikationen wurden in einem Multicycler PTC-200 (Biozym, Hess, Deutschland) durchgeführt.

Nach der PCR wurden Aliquots der erhaltenen Amplifikate durch Agarosegelelektrophorese (3.9.4) überprüft. Zur Entfernung von Nukleotiden, Enzymen, Salzen und nicht gebundenen Primern wurden die PCR-Produkte mit dem Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean up Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 30 µl DNase-freiem Wasser eluiert.

### 3.9.9 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Mit Hilfe von T-RFLP können genetische Fingerabdrücke komplexer mikrobieller Populationen gewonnen werden, welche Aussagen hinsichtlich der Diversität, Struktur und Dynamik in den unterschiedlichen Ökosystemen zulassen (Marsh, 1999; Osborn et al., 2000; Kitts, 2001; Fahy et al., 2005a). Da die 16S rRNA-basierende T-RFLP-Analyse für die Untersuchung aktiver mikrobieller Gemeinschaften geeigneter ist als die 16S rRNA-Gen-basierende (Lueders and Friedrich, 2002; Bordenave et al., 2007), wurden die T-RFLP-Profile auf Grundlage von 16S rRNA erstellt.

Für die T-RFLP-Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in den Umweltproben, der Anreicherungskultur ZBT 1 sowie in den nach der isopyknischen Zentrifugation erhaltenen Dichtefraktionen wurde das Restriktionsenzym AluI verwendet. Dieses Enzym wies im Vergleich zu anderen Restriktionsenzymen (MspI, Rsa) die höchste Auflösung der mikrobiellen Gemeinschaft (definiert als höchste Anzahl an verschiedenen T-RFs innerhalb des Profils) auf. Ein Restriktionsansatz setzte sich aus einer 10 ng entsprechenden Menge cDNA-PCR-Produkt, 1 µl AluI (10 U µl<sup>-1</sup>; New England BioLab GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 1 µl des mitgelieferten NE-Puffers 2 zusammen. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen des Verdauens wurden die Proben für 20 min bei 65°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden mit 26 µl Fällungsreagenz (25 µl Ethanol absolut, 1 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8) versetzt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min bei 14000 U min<sup>-1</sup> präzipitiert. Die Reinigung der Präzipitate erfolgte mit 300 µl 70%igem [v/v] Ethanol und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 14000 U min<sup>-1</sup>.

Die Analyse der verdauten PCR-Produkte erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung an einem ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Hierfür wurden die verdauten Amplifikate mit 20 µl Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems) und 0,4 µl des internen Längenstandards (GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard; Applied Biosystems) versetzt, für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Die Längen der fluoreszenzmarkierten terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) wurden durch Vergleich mit dem internen Standard unter Verwendung der Genemapper 3.7 Software (Applied Biosystems) bestimmt. Um die relativen Häufigkeiten der detektierten T-RFs in den verschiedenen T-RFLP-Profilen miteinander vergleichen zu können, wurde entsprechend dem Algorithmus von Abdo et al. (2006) zunächst der Grenzwert definiert, unterhalb dessen die Peaks als Hintergrundrauschen angesehen werden. T-RFs kleiner 50 bp wurden generell von der Analyse ausgeschlossen, da diese vorrangig auf Primerreste zurückzuführen sind. Der verwendete Algorithmus legt die Variabilität des Datensets zu Grunde, wobei die relativen Peakflächen der jeweiligen T-RFs verwendet werden. Die Gleichungen zur Implementierung des Algorithmus sind Joyce (2008) zu entnehmen.

### **3.9.10 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

Das in Abb. 4-3 (S.73) dargestellte SSCP-Gel wurde seitens der Arbeitsgruppe von Chris Tebbe (Johann Heinrich von Thünen-Institut, FAL Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig) erstellt. Die Amplifikation der 16S rRNA Gene erfolgte mit den universellen Bakterienprimern Com1 und Com2ph, wie von Schmalenberger et al. (2001) beschrieben. Die Amplifikate wurden anschließend mit einer  $\lambda$ -Exonuklease in Einzelstränge überführt (Schwieger and Tebbe, 1998). Entsprechend dem Protokoll von Tebbe et al. (2001) und Dohrmann and Tebbe (2004) wurden die unterschiedlich konformierten Einzelstränge in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### **3.9.11 Phylogenetische Analyse**

Um phylogenetische Informationen über die mit Hilfe der T-RFLP-Analyse gewonnenen T-RFs zu erhalten, wurden für die Umweltproben und die Anreicherungskultur ZBT 1 Klonbibliotheken, basierend auf der revers transkribierten 16S rRNA, erstellt.

#### Klonierung der 16s rRNA-Amplifikate

Die Klonierung erfolgte mit dem TA Cloning Kit® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden jeweils 3  $\mu$ l des aufgereinigten Amplifikates in einem pCR®2.1-Vektor kloniert und in kompetenten Escherichia coli DH5 $\alpha$ -Zellen vermehrt. Erfolgreich rekombinant transformierte Klone wurden unter Verwendung eines mit Kanamycin, X-Gal und IPTG ergänztem LB-Agar (Luria-Bertani-Agar) nach dem Blue/White-Screening-Verfahren identifiziert. Die Inserts von 96 zufällig selektierten Klonen wurden mittels M13-PCR amplifiziert (3.9.8) und anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel hinsichtlich ihrer Fragmentlänge überprüft. Amplifikate mit einer Fragmentlänge von ca. 1100 bp wurden als positiv bewertet und für die anschließende Restriktionsfragmentanalyse verwendet.

#### Restriktionsfragmentanalyse (ARDRA)

Zur Genotypisierung der Klon-Inserts wurden die M13-Amplifikate einer Restriktionsfragmentanalyse unterzogen. Dazu wurde jeweils 1  $\mu$ l Amplifikat mit 1  $\mu$ l Puffer 2, 0,25  $\mu$ l AluI (beides New England BioLab GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 7,75  $\mu$ l destilliertem Wasser versetzt und über Nacht bei 37°C verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden

nach Abstoppen der Restriktion für 20 min bei 65°C in einem 2%igen Agarosegel für 16 h bei 30 V aufgetrennt. Die jeweiligen Bandenmuster wurden miteinander verglichen und OTUs (operationale taxonomic unite) zugeordnet. Klone mit gleichem Bandenmuster wurden zu einem OTU zusammengefasst. Entsprechend der Häufigkeit des Bandenmusters wurden von jedem OTU 1-5 M13-Amplifikate für die nachfolgende Sequenzierung mit dem peqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgereinigt.

### Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem BigDye™ Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie das verwendete Temperaturprogramm sind Tab. 3-10 und Tab. 3-11 zu entnehmen.

**Tab. 3-10** Verwendete Lösungen und Volumina für einen 10 µl Sequenzieransatz.

Lösung	Volumen (µl)
Reaction Premix	1
BigDye Sequencing buffer	1
Primer (27f oder 519r)	1
Template	2
Wasser (PCR-Qualität)	ad 10

**Tab. 3-11** Temperaturprogramm für die Sequenzierreaktion.

Primerkombination	27f oder 519r
Initiale Denaturierung	30 s bei 96°C
Primer-Hybridisierung	15 s bei 60°C
Polymerisation	4 min bei 60°C
Zyklenanzahl	25

Vor elektrophoretischer Auftrennung der Syntheseprodukte auf einem ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wurden die Proben mittels Ethanol-fällung aufgereinigt. Dazu wurden die mit 80 µl HPLC-Wasser, 10 µl Natriumacetat

(3 M, pH 4,8) und 250 µl 70%igem Ethanol versetzten Syntheseprodukte durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 U min<sup>-1</sup> präzipitiert und das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol [v/v] aufgereinigt. Die unter Vakuum getrockneten Pellets wurden zur Elektrophorese in 20 µl Hi-Di-Formamid resuspendiert.

### Phylogenetische Analyse der Klonsequenzen

Die Rohsequenzen wurden mittels der Software Auto Assembler 2.0 (Applied Biosystem) kontrolliert und editiert. Chimäre Sequenzen wurden mit Hilfe der Software BioEdit Sequence Alignment Editor identifiziert. Für eine erste phylogenetische Zuordnung wurden die bearbeiteten Sequenzen mit Sequenzeinträgen der Datenbanken GENE BANK des NCBI und RDP-II verglichen. Die phylogenetische Einordnung und Verrechnung der partiellen 16S rRNA-Gensequenzen wurde mit Hilfe des ARB Programm-Pakets durchgeführt (Version Linux Beta030822; <http://www.arb-home.de>; Ludwig et al., 2004). Neu importierte Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe des automatischen Fast Aligners (Version 1.03) mit nah verwandten Sequenzen in ein Alignment gebracht und anschließend manuell überprüft. Die phylogenetische Zuordnung der neu importierten Sequenzen in einen bereits bestehenden Stammbaum der ARB-Datenbank erfolgte unter Anwendung der Quick Add Parsimony Kriterien. Wenn erforderlich, wurden Referenzsequenzen, welche in der ARB Datenbank nicht vorhanden waren, von der GENE BANK eingefügt.

## **3.10 Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung der Mikroorganismen**

### **3.10.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie**

Die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zur 3D-Visualisierung der mikrobiellen Biofilme auf und in den Beads erfolgte in Kooperation mit Thomas R. Neu (Department Fließgewässerökologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Magdeburg).

Beads aus den Feld- und Labormikrokosmenversuchen wurden bis zur mikroskopischen Untersuchung, jedoch für maximal 24 h, im Grundwasser oder im Mineralmedium gelagert. Die Färbung der Mikroorganismen erfolgte mit dem nukleinsäurespezifischen Fluorochrom SYTO 60 (Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA). Dieses emittiert in einem Wellenbereich,

der von der Autofluoreszenz des Beadmaterials abweicht. Zur Färbung der Biofilme wurden die Beads vorsichtig mit einem Skalpell halbiert, in einer Petrischale fixiert und mit einigen Tropfen des Fluorochromes versetzt. Die Untersuchung der mit Leitungswasser bedeckten Präparate erfolgte an einem aufrechten Konfokalmikroskop, verbunden mit einem Spektrophotometer TCS SP1 (Leica, Heidelberg, Deutschland). Das System wurde mithilfe der Leica Confocal Software Version 2.61 Build 1537174191 gesteuert. Die Biofilme wurden mit einem Wasserimmersionsobjektiv (63× 0.9 NA) betrachtet. Die Anregung erfolgte bei 488nm (Reflexion) und 633nm (SYTO 60) mit einem Argon- bzw. Helium-Neon-Laser. Das Fluoreszenzlicht emittierte bei 480-500nm (Reflexion) und 650-750nm (SYTO60). Die jeweiligen Bildserien wurden mit Hilfe der Software IMARIS Version 6.0 (Bitplane, Zürich, Schweiz) zu dreidimensionalen Bildstapeln zusammengesetzt. Gefärbten Bakterienzellen wurde die Farbe grün, Reflektionssignalen der Beads die Farbe weiß zugeordnet.

### **3.10.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Um die auf Beads siedelnden Mikroorganismen morphologisch zu charakterisieren, wurden in Kooperation mit Burkhard Schmidt-Brücken (ehemals: Institut für Werkstoffwissenschaften, TU Dresden; aktuell: Papiertechnische Stiftung, Heidenau) rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mikrobiellen Spezies erstellt. Dazu wurden umgehend nach Entnahme der BACTRAPs aus dem Grundwasserbrunnen jeweils 6 Beads aus den verschiedenen beladenen Mikrokosmen entnommen (Tab. 3-4, S.42; II.II) und in 10 ml Mineralsalzmedium (Tab. 3-2), versetzt mit 2,5% Glutaraldehyd [v/v], für 4 h bei 4°C fixiert. Eine Nachfixierung erfolgte in gleicher Art und Weise über Nacht bei 4°C. Die Verwendung des Mineralmediums gewährleistete eine dem Grundwasser ähnliche Ionenstärke, so dass osmotische Prozesse während der Fixierung verhindert wurden. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Mineralsalzmedium gewaschen, indem die Proben jeweils für 1 h bei 4°C in der Lösung inkubiert wurden. Nach letztmaligem Waschen wurden die Proben mit Mineralsalzmedium versetzt und bei 4°C gelagert. Die anschließende Entwässerung der fixierten biologischen Proben in einer aufsteigender Acetonreihe (30-minütige Inkubation in jeweils 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% Aceton; danach dreimalige Inkubation in absolutem, über dem Molekularsieb getrocknetem Aceton), kritische Punkt-Trocknung (CPD 030 Critical Point Dryer; BAL-TEC AG, Witten, Deutschland) und das Bedampfen der Proben mit Kohlenstoff (Klein-

Beschichtungsanlage MED 010; Balzers, Deutschland) wurden von Burkhard Schmidt-Brücken durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem DSM 982 Gemini Rasterelektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) mit folgenden Einstellungen vorgenommen: Schottky-Feldemissionskathode (Fei Company, Kassel, Deutschland); Blendendurchmesser: 30  $\mu\text{m}$ ; Everhart-Thornley-Kammer-Detektor mit leicht negativer Vorspannung; Arbeitsabstände: 4 und 10 mm bei Beschleunigungsspannungen zwischen 1 und 10 kV.

### 3.11 Modellierung

Um die im Labor für Toluol und Benzol ermittelten Desorptionskinetiken (3.7.1) mathematisch zu beschreiben und daraus ableitend die Bioverfügbarkeit der Substrate während der Exposition der BACTRAPs zu beurteilen, wurden die im Labor gewonnenen Daten modelliert. Die Simulationen wurden von Martin Thullner (Department Umweltmikrobiologie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ) unter Verwendung des Modells BRNS (Biogeochemical Reaction Network Simulator; Regnier et al., 2002; Aguilera et al., 2005) durchgeführt. BRNS ist eine flexible Simulationsplattform für die Beschreibung einer beliebigen Anzahl kinetisch und/oder thermodynamisch kontrollierten Reaktionen, gekoppelt mit dem 1D-Transport der reaktiven Stoffe (Jourabchi et al., 2005; Thullner et al., 2005). Für die Simulation der Desorptionsexperimente wurden folgende Prozesse berücksichtigt: (I) Diffusion des gelösten Benzol bzw. Toluol entlang des Radius der Beads. Hierfür wurden die Beads als Kugeln idealisiert und der radiale 1D-Transport entsprechend der Kugelgeometrie adaptiert. (II) Reversible Sorption von Benzol bzw. Toluol an der Matrix der Beads. Hierfür wurden verschiedene Sorptionsisothermen getestet. In allen Fällen wurde die Sorptionskinetik als nichtlimitierend angenommen. Der Simulation wurden folgende Parameter zu Grunde gelegt: Radius Beads: 1 mm; Porosität: 0,74; Anfangskonzentration sorbierte Phase: aus Beladungsgewicht abgeleitet; Anfangskonzentration gelöste Phase in den Beads: Approximierung an die experimentell bestimmten Konzentrationen; Sorptionsparameter ( $k_D$ ): Berechnung aus der Annahme, dass zu Beginn sorbierte und gelöste Phase im Gleichgewicht sind. Die Diffusionskonstanten wurden Weaver (2008) entnommen.

### **3.12 Statistische Analysen**

Die Clusteranalysen wurden mit der Software Past Version 3.5 durchgeführt. Als Ähnlichkeitsmaß wurde der Bray-Curtis-Index gewählt. Die Korrelationsanalysen erfolgten mit den Statistikprogrammen R (<http://www.r-project.org>) und Origin Version 7.5G.

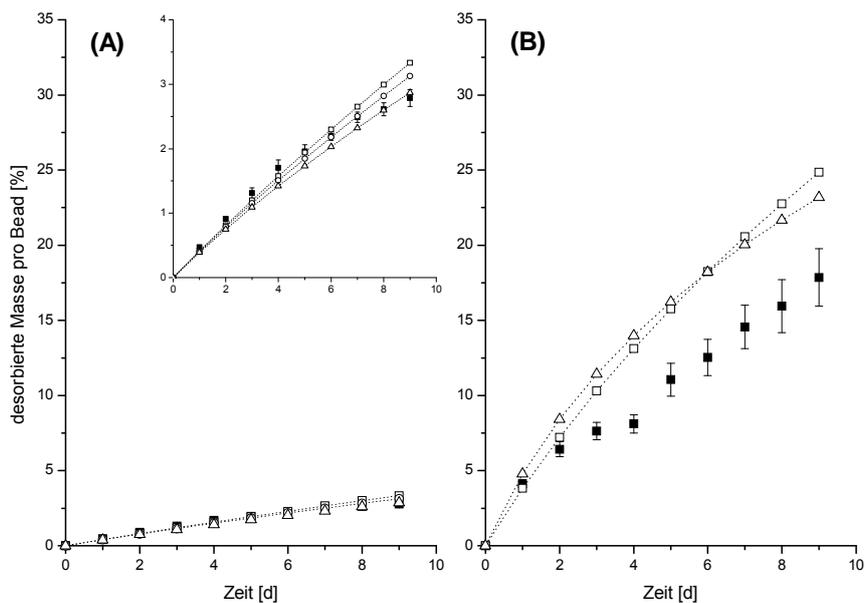
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Grundlagen der BACTRAPs

#### 4.1.1 Desorptionskinetik von Toluol und Benzol

In Mikrokosmenversuchen mit Toluol bzw. Benzol beladenen Beads wurde, jeweils nach Einstellung des Gleichgewichtes von Toluol bzw. Benzol zwischen Beads und umgebender Wasserphase, die Aromatenkonzentration in der wässrigen Phase analysiert und anschließend das komplette Wasservolumen ausgetauscht (3.7.1). Zur mathematischen Beschreibung der Desorptionskinetiken wurden die im Labor gewonnenen Daten modelliert (3.11). Auf Grundlage der Modellierungen konnte die Bioverfügbarkeit der Aromaten während der Exposition der BACTRAPs beurteilt werden.

Nach 9-tägiger Inkubation betrug der desorbierte Anteil für Benzol 17% ( $16 \text{ mg g}^{-1} \text{ Bead}$ ) und für Toluol 3% ( $3 \text{ mg g}^{-1} \text{ Bead}$ ) (Abb. 4-1). Generell konnte mit diesem Versuchsdesign die Desorptionskinetik der Aromaten nur annähernd bestimmt werden, da der desorbierte Anteil nicht wie unter *in situ* Bedingungen mit dem Grundwasserstrom abtransportiert, sondern die Wasserphase in regelmäßigen Abständen ausgetauscht wurde. Die höheren Desorptionsraten des Benzols gegenüber dem Toluol sind auf die verschiedenen Oktanol/Wasserverteilungskoeffizienten  $\log K_{ow}$  zurückzuführen, welche für Benzol 2,13 und für Toluol 2,69 betragen (Grathwohl, 1997). Zur mathematischen Beschreibung der Desorptionskinetiken wurde eine lineare Isotherme und verschiedene Freundlich-Isothermen ( $n=2$ ,  $n=4$ ) gewählt. Abb. 4-1 verdeutlicht, dass die im Labor ermittelte Desorption für Benzol wie auch Toluol mit der linearen Isotherme wie auch den verwendeten Freundlich-Isothermen überschätzt werden würde. Die vergleichsweise beste Beschreibung der Desorption wurde mit der Freundlich-Isotherme  $n=4$  erzielt, welche zu einer weitaus geringeren Überschätzung der Desorptionsgeschwindigkeit führte als die Verwendung der linearen Sorptionsisotherme und Freundlich-Isotherme  $n=2$ . Aus diesem Grund wurde für die Simulation der Desorptionskinetik von Benzol nur die Freundlich-Isotherme  $n=4$  und zum Vergleich die lineare Sorptionsisotherme verwendet.



**Abb. 4-1** Vergleich gemessener (■) und modellierter Desorptionskinetik (weiße Symbole) von Toluol (A) und Benzol (B) aus den Beads bei 12°C ( $\approx$  Grundwassertemperatur). Zur Modellierung wurden die lineare Sorptionsisotherme (□) und verschiedene Freundlich-Isothermen ( $n=2$  bzw.  $4$ ; ○ bzw. △) verwendet. Den gemessenen Konzentrationen des Sorbats in der wässrigen Lösung, welche zur Berechnung der desorbierten Masse pro Bead dienen, liegen Dreifachbestimmungen zu Grunde.

Um die Bioverfügbarkeit der auf den BACTRAPs sorbierten Schadstoffe während einer 3-monatigen Exposition im Grundwasser zu überprüfen, wurde für das schneller desorbierende Benzol die Desorptionskinetik unter Verwendung der Freundlich-Isotherme  $n=4$  über einen Zeitraum von 90 d simuliert: Demnach wären nach 90-tägiger Inkubation der BACTRAPs noch 40% ( $39 \text{ mg g}^{-1} \text{ Bead}$ ) des initialen Benzols auf den Beads sorbiert, wobei weiterhin eine Desorption des Benzols stattfindet. Infolgedessen ist die Bioverfügbarkeit des Benzols, aber auch des deutlich langsamer desorbierenden Toluols, während der *in situ* Inkubation der BACTRAPs gewährleistet. Diese Simulationsdaten decken sich mit analytisch bestimmten residualen Benzol- bzw. Toluolkonzentrationen. Bei allen bisher durchgeführten BACTRAP-Experimenten wurden auf den Beads nach Exposition im Grundwasser zwischen 20 und 80% der initialen Benzol- bzw. Toluolgehalte wiedergefunden, wobei auch eine mögliche Adsorption der Schadstoffe aus dem Grundwasser berücksichtigt werden muss.

#### 4.1.2 Mikrobielle Besiedlung der BACTRAPs

##### Reproduzierbarkeit der mikrobiellen Besiedlung

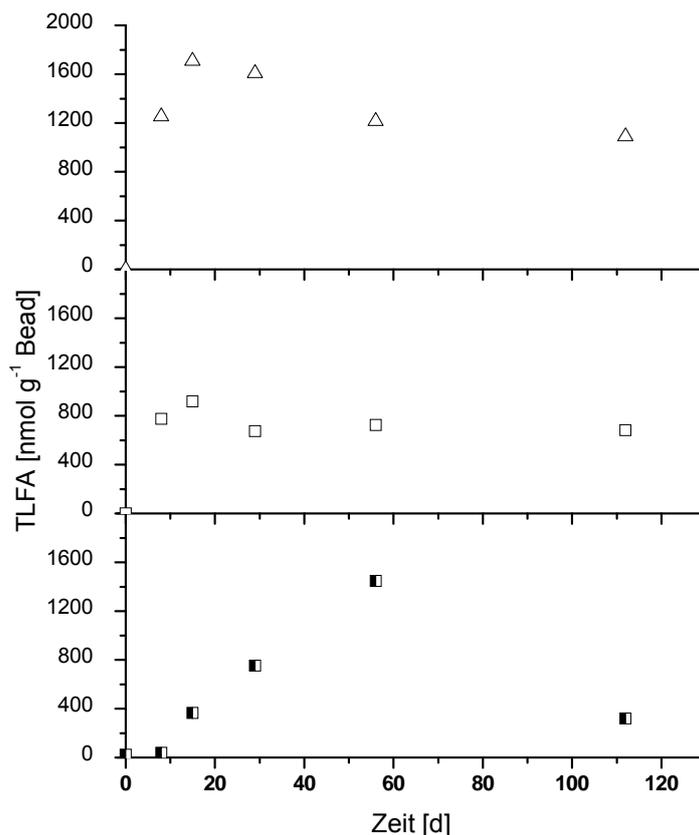
Jeweils 10 unbeladene und 10 Toluol beladene BACTRAPs wurden in einem niedrigkontaminierten Bereich des unteren Grundwasserleiters für 6 Wochen exponiert und die angesiedelten mikrobiellen Gemeinschaften durch Analytik der mikrobiellen Fettsäuren und Chinone charakterisiert. Um Aussagen über die Ähnlichkeiten der mikrobiellen Gemeinschaften zu treffen, wurden die Konzentrationen der jeweiligen Fettsäuren und Chinone nach der Rangkorrelation von Spearman mit einander verglichen. Korrelationskoeffizienten im Bereich von 0,7 – 0,9 wurden als hohe Korrelation und im Bereich von 0,9 – 1,0 als sehr hohe Korrelation angesehen.

Die Fettsäure- und Chinonkonzentrationen unbeladener BACTRAPs korrelierten miteinander mit Koeffizienten im Bereich von 0,62 – 0,93 ( $\bar{p} = 0,05$ ;  $n=5$ ) und 0,88 – 0,97 ( $\bar{p} = 0,001$ ;  $n=5$ ). Annähernd gleich hohe Korrelationen mit Koeffizienten im Bereich von 0,60 – 1,00 (Fettsäuren;  $\bar{p} = 0,1$ ;  $n=5$ ) und 0,88 – 0,95 (Chinone;  $\bar{p} = 0,001$ ;  $n=5$ ) lagen für die Toluol beladenen BACTRAPs vor. Demnach ähnelten sich die mikrobiellen Gemeinschaften parallel exponierter BACTRAPs mit wenigen Ausnahmen im starken Maße. Basierend auf dieser Erkenntnis konnte in den in Kap. 4.2 beschriebenen Studien der Einfluss potentieller Elektronenakzeptoren auf die mikrobielle Gemeinschaft erfasst und interpretiert werden.

##### Mikrobielle Besiedlung über die Zeit

Am Rande der Schadstofffahne wurden über einen Zeitraum von 112 Tagen BACTRAP-Serien bestehend aus unbeladenen und mit [ $^{12}\text{C}$ ]- oder [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladenen BACTRAPs exponiert. Diese konnten mithilfe des verwendeten Scheibenpackers (siehe Abb. 3-2, S.40) zu unterschiedlichen Expositionszeiten entnommen werden, um die Sukzession von Mikroorganismen in den BACTRAPs zu untersuchen. Neben einer Quantifizierung der Biomassen auf Grundlage mikrobieller Fettsäuren wurden die mikrobiellen Gemeinschaften durch Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) charakterisiert und miteinander verglichen. Die Transformation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes aus dem Toluol in die mikrobiellen Fettsäuren diente zur Evaluierung des zeitabhängigen *in situ* Abbaus (4.1.4).

Sowohl auf den unbeladenen wie auch mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladenen BACTRAPs wurden nach 15-tägiger Exposition im Grundwasserleiter die höchsten Biomassen detektiert (Abb. 4-2). Eine längere Exposition der BACTRAPs führte zu einer Abnahme der Biomasse. Dahingegen stieg die Biomasse auf den mit [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladenen BACTRAPs bis zum Erreichen eines Maxima nach 56 Tagen an, welche jedoch homolog zu den anderen BACTRAP-Ansätzen während der weiteren Exposition absank.



**Abb. 4-2** Sukzession von Mikroorganismen in den verschiedenartig beladenen BACTRAPs reflektiert durch die Formation von Gesamtlipidfettsäuren (TLFAs). Unbeladene (Blanks ( $\Delta$ )) und mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladene BACTRAPs ( $\square$ ) wiesen während der 112-tägigen Exposition im Grundwasser eine übereinstimmende Sukzessionsabfolge auf, während sich die auf den [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol ( $\blacksquare$ ) BACTRAPs aufgrund verschiedenartiger Milieubedingungen deutlich unterschied. Die dargestellten Fettsäurekonzentrationen sind Mittelwerte von Zweifachextraktionen.

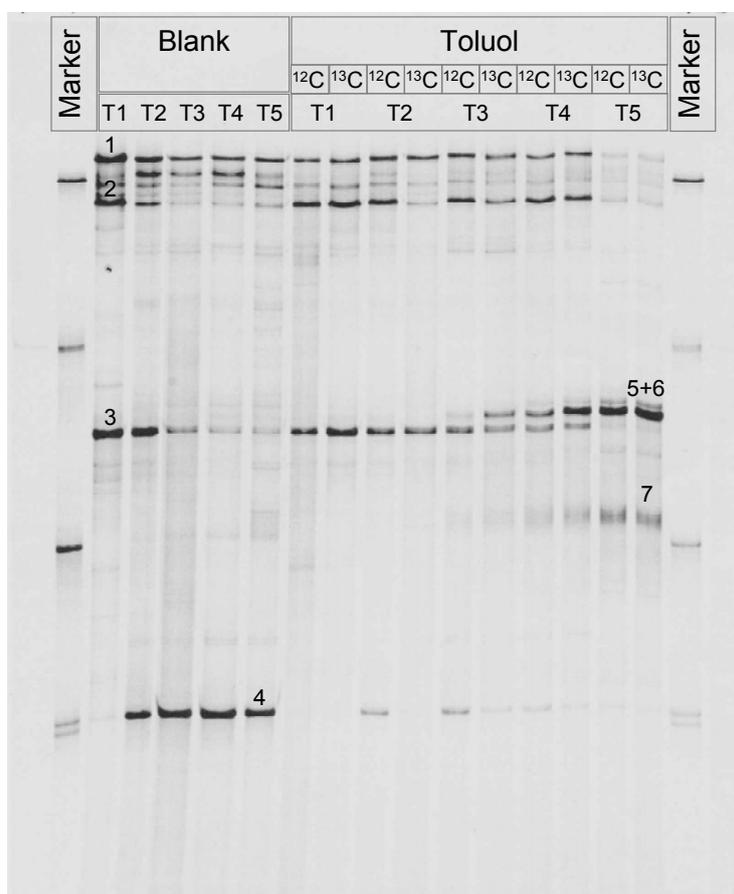
Diese Lag-Phase bei den [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladenen BACTRAPs im Vergleich zu den [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladenen ist auf unterschiedliche Milieubedingungen während der *in situ* Exposition zurückzuführen. Obwohl vor der Exposition der BACTRAPs relevante hydrogeochemische

Parameter des Grundwasserbrunnens tiefenorientiert analysiert wurden, wiesen die mit [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladenen BACTRAPs nach 112-tägiger Exposition eine höhere aus dem Aquifer adsorbierte Benzolmasse ( $6,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ Bead}$ ) als die unbeladenen und mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladenen BACTRAPs ( $5,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ Bead}$ ) auf. Folglich wurden die mit [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladenen BACTRAPs in einem Grundwasserbereich mit höherer Benzolkonzentration als die unbeladenen und mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladenen BACTRAPs exponiert. Aus diesem Grund muss erwogen werden, dass sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft entsprechend den verschiedenen Milieubedingungen unterschied. Der Beweis dafür konnte allerdings mittels vergleichender SSCP-Profile nicht erbracht werden. Während der 112-tägigen Exposition entwickelten sich auf den [ $^{12}\text{C}$ ]- und [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladenen BACTRAPs mikrobielle Gemeinschaften, die sich untereinander sehr ähnlich waren. In beiden BACTRAP-Ansätzen dominierten nach 8- und 15-tägiger Exposition drei Banden (Abb. 4-3; Banden 1-3), deren Intensitäten im weiteren Verlauf der Exposition abnahmen, wohingegen nach 29-tägiger Exposition drei neue Banden auftraten (Banden 5-7), deren Intensitäten bis zum Versuchsende zunahmen.

Der Vergleich zwischen den mikrobiellen Gemeinschaften von unbeladenen und mit Toluol beladenen BACTRAPs zeigte, dass sich die strukturelle Zusammensetzung während der initialen Exposition stark ähnelte (Abb. 4-3; Banden 1-3), sich jedoch im weiteren Verlauf Unterschiede entwickelten. Nach 15-tägiger Exposition wurde die mikrobielle Gemeinschaft der unbeladenen BACTRAPs von einer neuen Bande dominiert (Abb. 4-3; Bande 4), die auf den Toluol-BACTRAPs nur sehr schwach erkennbar war. Die Bande 7 wies hingegen bei den unbeladenen BACTRAPs eine deutlich geringere Intensität als bei den Toluol beladenen BACTRAPs auf.

Diese Unterschiede in der mikrobiellen Gemeinschaft zwischen unbeladenen und beladenen BACTRAPs indizieren, dass die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft maßgeblich von der BACTRAP-Beladung beeinflusst wurde. Möglicherweise wurden die Toluol beladenen BACTRAPs von spezifischen toluolabbauenden Gemeinschaften besiedelt, indessen auf den unbeladenen BACTRAPs auch nicht zum Toluolabbau befähigte Grundwasserbakterien siedelten. Generell verdeutlicht die beobachtete Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaften, dass die Sukzessionsdauer und -abfolge maßgeblich von den Ausgangsbedingungen, und zwar der BACTRAP-Beladung und den hydrogeochemischen

Grundwasserbedingungen, abhängt. Dementsprechend spiegelt die mikrobielle Gemeinschaft auf den BACTRAPs immer ein bestimmtes Sukzessionsstadium wider.

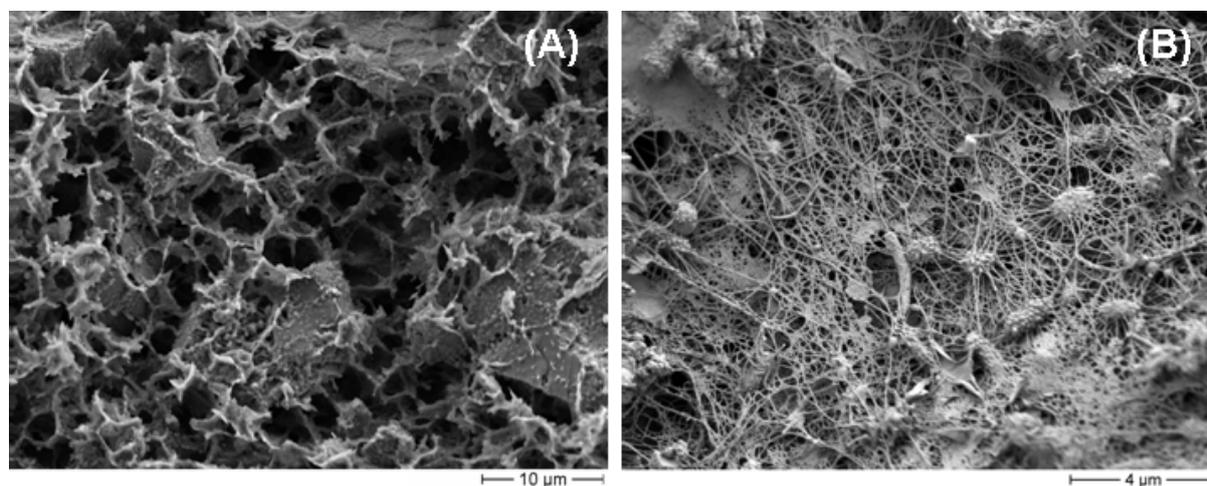


**Abb. 4-3** SSCP Profile amplifizierter 16S rDNA, welche von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit [<sup>12</sup>C]-Toluol oder [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ -Toluol nach 8 (T1), 15 (T2), 29 (T3), 56 (T4) und 112 (T5) Tagen Exposition im niedrigkontaminierten Bereich des Grundwassers isoliert wurde. Die Nummerierungen markieren Banden mit deutlicher Dynamik während der *in situ* Inkubation. Details sind dem Text zu entnehmen.

#### 4.1.3 Charakteristische Morphotypen der mikrobiellen Gemeinschaft

Zur Visualisierung der mikrobiellen Gemeinschaften, die sich während der *in situ* Exposition auf den BACTRAPs ansiedeln, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Beadoberflächen und -innenräume angefertigt. Die besiedelten BACTRAPs stammten aus dem Versuch zur Untersuchung mikrobieller Abbaupotentiale (3.6).

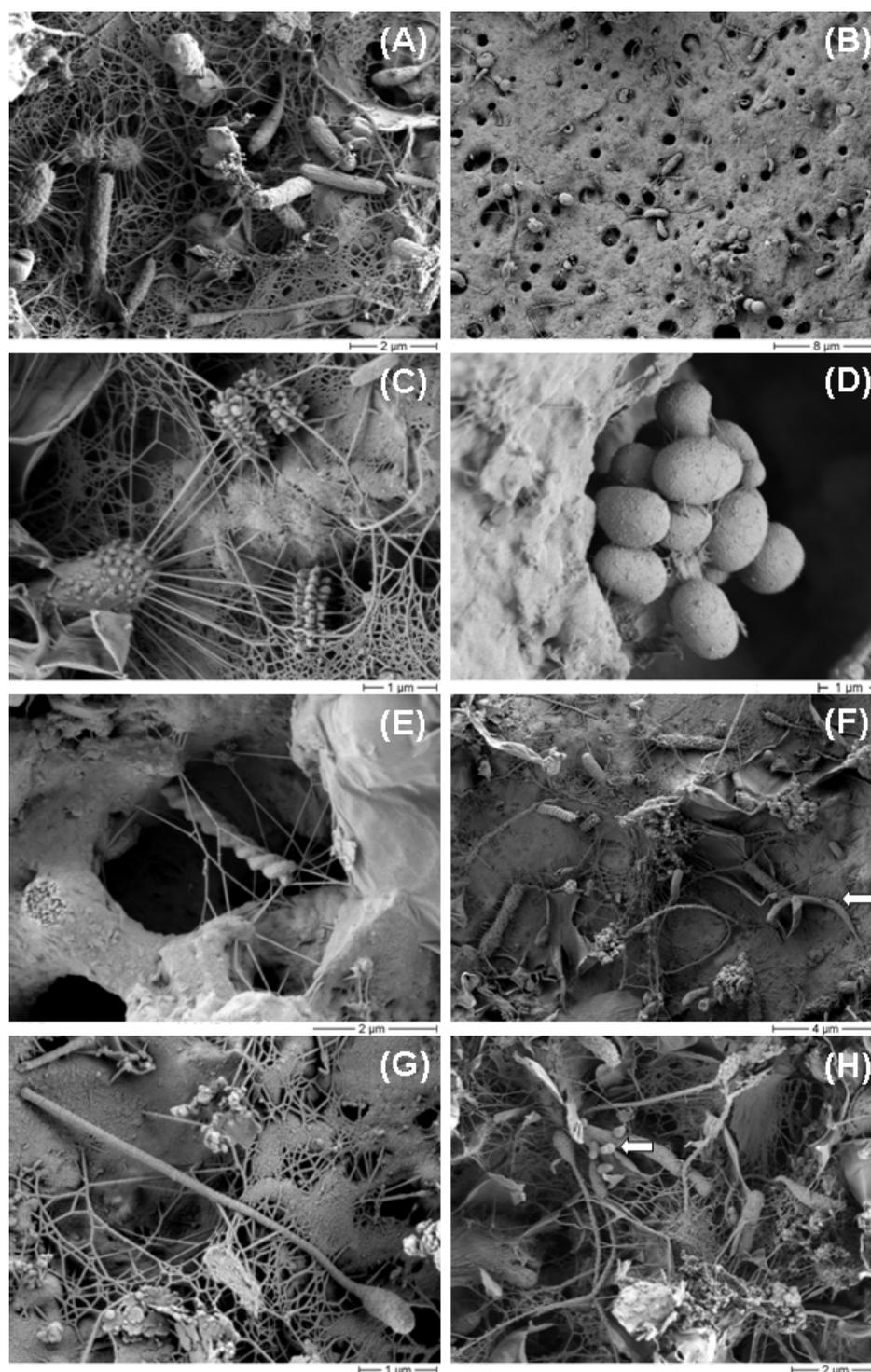
Generell siedelten die Mikroorganismen vorwiegend im äußeren Beadbereich. Auf der Oberfläche und im Zentrum der Beads wurde dahingegen nur vereinzelt Mikroorganismen gefunden. Abb. 4-4 zeigt den Ausschnitt eines Beads vor und nach Exposition im Grundwasser. Nach 3-monatiger Exposition der BACTRAPs waren die Beads sowohl von einzelnen Bakterien besiedelt, als auch zum Teil großflächig von Biofilmen überzogen. Bild B in Abb. 4-4 zeigt Ausschnitte eines Biofilms auf den Beads, welcher aus sessilen Bakterien besteht, die sich in einer von ihnen selbst produzierten Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) einbetten. Diese Lebensweise erlaubt sessilen Bakterien synergistische Wechselwirkungen aufzubauen, Nährstoffe zu akkumulieren und sich gegen äußere Einflüsse wie z.B. Schadstofftoxizität zu schützen (Griessler and Mösslacher, 2003).



**Abb. 4-4** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Bead-Ausschnitts vor (A) und nach 3-monatiger Exposition (B) im Grundwasser. Aufnahmen: Burkhard Schmidt-Brücken.

Die mikrobiellen Gemeinschaften zeigten eine morphologische Vielfalt, die neben verschiedenen stäbchenförmige Bakterien und Kokken auch Morphotypen vom *Caulobacter*-, *Seliberia*- und *Hyphomicrobium*-Typus beinhalteten (Abb. 4-5). Des Weiteren wurden vereinzelt Bakterien gefunden, die in der Literatur aufgrund ihrer geringen Zellgröße als Ultramikrobakterien bezeichnet werden.

In Anbetracht der dichten Besiedlung der BACTRAPs durch verschiedene Morphotypen eignete sich das Bead-Material sehr gut als Besiedlungsfläche und damit zum Studium sessiler mikrobieller Gemeinschaften in Grundwasser-Ökosystemen.



**Abb. 4-5** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mikrobieller Gemeinschaften, die sich auf den BACTRAPs während der Exposition im Grundwasser ansiedelten. Ein Großteil der Spezies heftete sich mithilfe von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) an der Beadmatrix an (A+C). Häufige Morphotypen der mikrobiellen Gemeinschaften: verschiedene stäbchenförmige Bakterien (A-C), einzelne und aggregierte Kokken (D), Seliberia-Typus (E), Caulobacter-Typus (F; →), Hyphomicrobium-Typus (G) und Ultramikrobakterien (H; →). Aufnahmen: Burkhard Schmidt-Brücken.

#### 4.1.4 Zeitabhängige $^{13}\text{C}$ -Assimilation in mikrobielle Fettsäuren

Natürliche Kohlenstoffverhältnisse in mikrobiellen Fettsäuren variieren zwischen -10 und -36‰ (Abraham et al., 1998; Pombo et al., 2002). Fettsäuren mit Isotopensignaturen größer als 0‰ resultieren aus der Metabolisierung des  $^{13}\text{C}$ -Toluols auf den BACTRAPs und belegen eindeutig den mikrobiellen Schadstoffabbau.

In den BACTRAPs, in denen  $^{13}\text{C}$ -markiertes Toluol angeboten wurde, zeigte sich erstmalig nach 56-tägiger Inkubation ein geringer Einbau des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobiellen Fettsäuren mit  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von maximal 250‰. Nach 112-tägiger Exposition wurden stärkere Anreicherungen mit  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von maximal 1930‰ detektiert. In den unbeladenen und mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladenen BACTRAPs konnte kein Einbau des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobiellen Fettsäuren nachgewiesen werden, so dass eine Crosskontamination der Blanks und [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladenen BACTRAPs mit isotopisch-markiertem Toluol ausgeschlossen werden konnte. Die ermittelte Kinetik der  $^{13}\text{C}$ -Assimilation in die mikrobiellen Fettsäuren wurde der Versuchsplanung für das nachfolgend beschriebene Stable Isotope Probing Experiment (4.4.2) zu Grunde gelegt.

## 4.2 Mikrobielle Abbaupotentiale im Zeitzer Grundwasser

Um mikrobielle Abbaupotentiale im Zeitzer Grundwasser zu eruieren, wurden BACTRAPs im Grundwasser exponiert, die zusätzlich zu Toluol als Kohlenstoff- und Energiequelle die am Standort relevanten terminalen Elektronenakzeptoren (TEA) Nitrat, Sulfat oder Eisen enthielten. Unbeladene (Blank) und alleinig mit Toluol beladene BACTRAPs dienten als Kontrollen. In einer ersten Untersuchung wurde zunächst der Einfluss der TEAs auf die mikrobielle Gemeinschaft ermittelt (4.2.1). Zu diesem Zweck wurden mikrobielle Phospholipidfettsäuren (PLFA) und respiratorische Chinone (RQ) von den BACTRAPs extrahiert und miteinander verglichen. Dies ermöglichte einerseits eine Quantifizierung der Biomasse und andererseits eine Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft. Zusätzlich wurden die mikrobiellen Biomassen mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (engl. CLSM) quantifiziert. Die Untersuchung erfolgte in einem mittelkontaminierten Grundwasserbereich, in dem eine starke Zehrung der TEAs nachweisbar war. Anhand von BACTRAPs, die mit niedrigen oder hohen Eisenkonzentrationen beladen wurden, konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt der TEAs untersucht werden.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde der Versuch wiederholt, jedoch unter veränderten hydrogeochemischen Bedingungen (4.2.2). Mit dem Ziel einer höheren Biomasseausbeute wurde ein Grundwasserbrunnen im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich gewählt. Zusätzlich zu den  $^{12}\text{C}$ -Toluol beladenen BACTRAPs wurden  $^{13}\text{C}$ -Toluol beladene BACTRAPs exponiert, um anhand der Intensitäten der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der mikrobiellen Biomasse die jeweiligen Substratumsätze in Abhängigkeit der TEAs zu ermitteln. Anhand von Fettsäure- und auf 16S rRNA basierender Terminal Restriction Fragment Length Polymorphismus (T-RFLP) Analyse wurde der Einfluss der verschiedenen TEAs auf die mikrobielle Gemeinschaft ermittelt.

### 4.2.1 Einfluss der Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Gemeinschaft

#### Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft

Phospholipide sind wesentliche Komponenten mikrobieller Zellmembranen, die sich, aufgrund eines schnellen Abbaus nach dem Zelltod, als Biomarker für lebende Zellen eignen

(White et al., 1979). Anhand der Analyse von Phospholipidfettsäuren kann demnach die lebende Biomasse quantifiziert werden. Darüber hinaus besitzen bestimmte Mikroorganismengruppen spezifische Phospholipidfettsäuren, die für die Identifizierung dieser Mikroorganismen in Umweltproben genutzt werden können (Kaur et al., 2005).

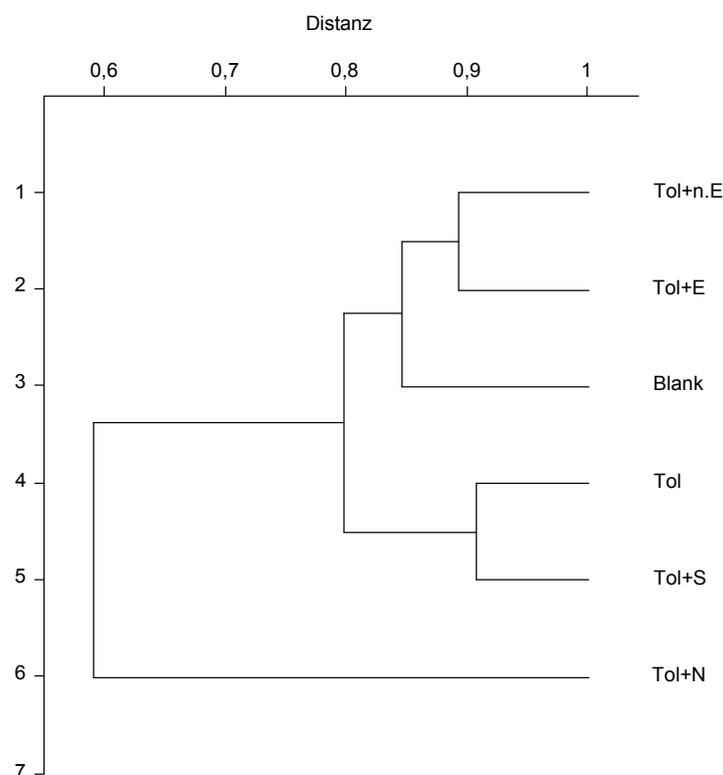
Nach 6-wöchiger Exposition der BACTRAPs im mittelkontaminierten Grundwasserbereich wiesen die Fettsäureprofile für alle Beladungsvariationen ein vergleichbares Muster auf (Tab. 4-1). Signifikante Unterschiede wurden jedoch für die absoluten und relativen Häufigkeiten der Fettsäuren festgestellt. Bemerkenswerterweise wurden lediglich vier verschiedene Fettsäuren identifiziert, die ausschließlich gesättigt waren. Mit prozentualen Anteilen von 72-96% bzw. 3-25% dominierten die Fettsäuren 18:0 und 16:0. Die Fettsäuren 17:0 und 20:0 waren nur in geringen Konzentrationen (<1%) vertreten.

**Tab. 4-1** Relative Abundanzen der Phospholipidfettsäuren, die von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser extrahiert wurden. Die Daten sind Mittelwerte von Zweifachextraktionen. n.d. = nicht detektierbar

Fettsäure	Relative Abundanz (%)					
	Blank	Tol	Tol+N	Tol+S	Tol+n.E.	Tol+E
16:0	20,4	21,5	25,2	10,4	20,2	2,8
17:0	n.d.	n.d.	1,2	n.d.	n.d.	n.d.
18:0	78,7	77,1	72,2	89,6	78,8	96,0
20:0	0,8	1,4	1,4	n.d.	1,1	1,2
PLFA (nmol g <sup>-1</sup> )	8,0	13,7	24,2	11,4	10,2	8,2

Um die Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften zu visualisieren, wurde eine Clusteranalyse der Fettsäuredaten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Nitrat den größten Effekt auf die Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft ausübte (Abb. 4-6). Im Wesentlichen beruhte dieser Effekt auf der Tatsache, dass sich auf den Nitrat-BACTRAPs nahezu doppelt soviel lebende Biomasse wie auf den Kontroll-BACTRAPs ohne TEAs entwickelt hatte. Für Sulfat und Eisen konnten dahingegen im Vergleich zu den Kon-

trollen keine signifikanten strukturellen Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt werden.



**Abb. 4-6** Clusteranalyse von PLFA-Profilen, die von unbeladenen BACTRAPs und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S) und Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser erstellt wurden. Die Daten sind Mittelwerte von Zweifachextraktionen.

Respiratorische Chinone haben eine elementare Funktion als Elektronenüberträger in Atmungsketten und photosynthetischen Elektronentransportsystemen. Da im Allgemeinen eine Chinonspezies innerhalb einer Mikroorganismen-Gruppe dominiert, werden Chinone zur physiologischen und taxonomischen Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften herangezogen (Hiraishi, 1999; Hiraishi and Kato, 1999; Villanueva et al., 2007). So weisen gram-positive und anaerobe gram-negative Bakterien ausschließlich Menachinone auf, wobei die überwiegende Mehrheit der strikt aeroben gram-negativen Bakterien nur über Ubichinone verfügt. Beide Chinonespezies treten nur vereinzelt in fakultativ-anaeroben gram-negativen Bakterien auf. Dimethylmenachinone sind als charakteristische Elektronenüberträger in gram-negativen Bakterien mit Nitratatmung nachgewiesen worden (Collins and Jones, 1981).

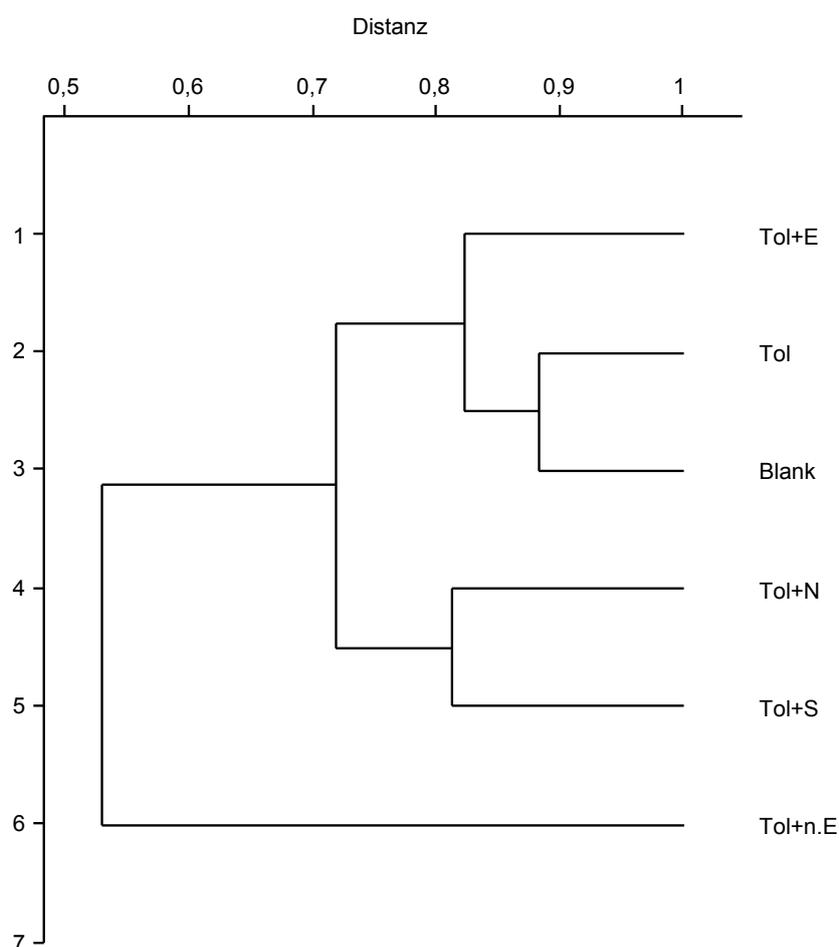
Analog zur Phospholipidfettsäureanalyse zeigten die Chinonprofile, dass alle BACTRAP-Varianten die gleichen Chinonspezies enthielten, jedoch deren relative und absolute Abundanzen in Abhängigkeit von den verschiedenen Elektronenakzeptoren divergierten. Mit prozentualen Anteilen >83% dominierten Menachinone (Tab. 4-2). Dies deutete auf die Dominanz anaerober gram-negativer Bakterien hin. Innerhalb von den Menachinonen wurden überwiegend das Menachinon 9 und 10 nachgewiesen. Ubichinone und Dimethylmenachinone waren mit prozentualen Anteilen von <13% bzw. <6% nur vereinzelt vorhanden.

**Tab. 4-2** Relative Abundanzen der respiratorischen Chinone, die von unbeladenen BACTRAPs und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S) und Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser extrahiert wurden. Die Daten sind Mittelwerte von Zweifachextraktionen. n.d. = nicht detektierbar

Chinon	Relative Abundanz (%)					
	Blank	Tol	Tol+N	Tol+S	Tol+n.E.	Tol+E
UQ6	1,9	1,9	2,0	2,2	3,0	2,2
UQ7	1,1	0,5	0,3	n.d.	n.d.	n.d.
UQ8	1,8	1,3	3,7	n.d.	n.d.	0,1
UQ9	4,8	3,9	3,1	5,6	0,4	3,2
UQ10	2,7	1,9	1,8	2,3	0,8	1,9
MK4	4,1	3,6	2,0	2,2	n.d.	1,2
MK5	2,8	3,2	3,9	4,4	2,0	2,4
MK6	7,7	8,0	14,0	9,3	13,9	5,2
MK7	6,0	8,0	11,8	7,7	24,0	4,2
MK8	12,2	7,2	7,6	2,1	3,3	8,3
MK9	19,0	16,5	12,2	23,5	25,7	18,0
MK10	30,9	39,8	32,4	34,2	22,0	48,3
DMK8	1,9	1,8	1,5	2,5	0,6	1,7
DMK9	3,3	2,3	3,7	3,9	4,4	3,1
Chinone (nmol g <sup>-1</sup> )	1,6	1,6	1,1	0,9	0,5	1,9

UQ=Ubichinon, MK=Menachinon, DMK=Dimethylmenachinon

Um analog zu den Fettsäureprofilen die Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften zu visualisieren, wurde eine Clusteranalyse der Chinondaten durchgeführt. Wie Abb. 4-7 verdeutlicht, übten die geringen Eisenkonzentrationen den größten Effekt auf die strukturelle Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft aus. Verglichen mit den Fettsäureprofilen ist dies ein gegensätzliches Ergebnis. Nitrat-, Sulfat- und Blank-BACTRAPs zeigten sowohl im Hinblick auf die Häufigkeitsverteilung der Chinone als auch absoluten Abundanzen ein den Toluol-BACTRAPs vergleichbares Resultat.



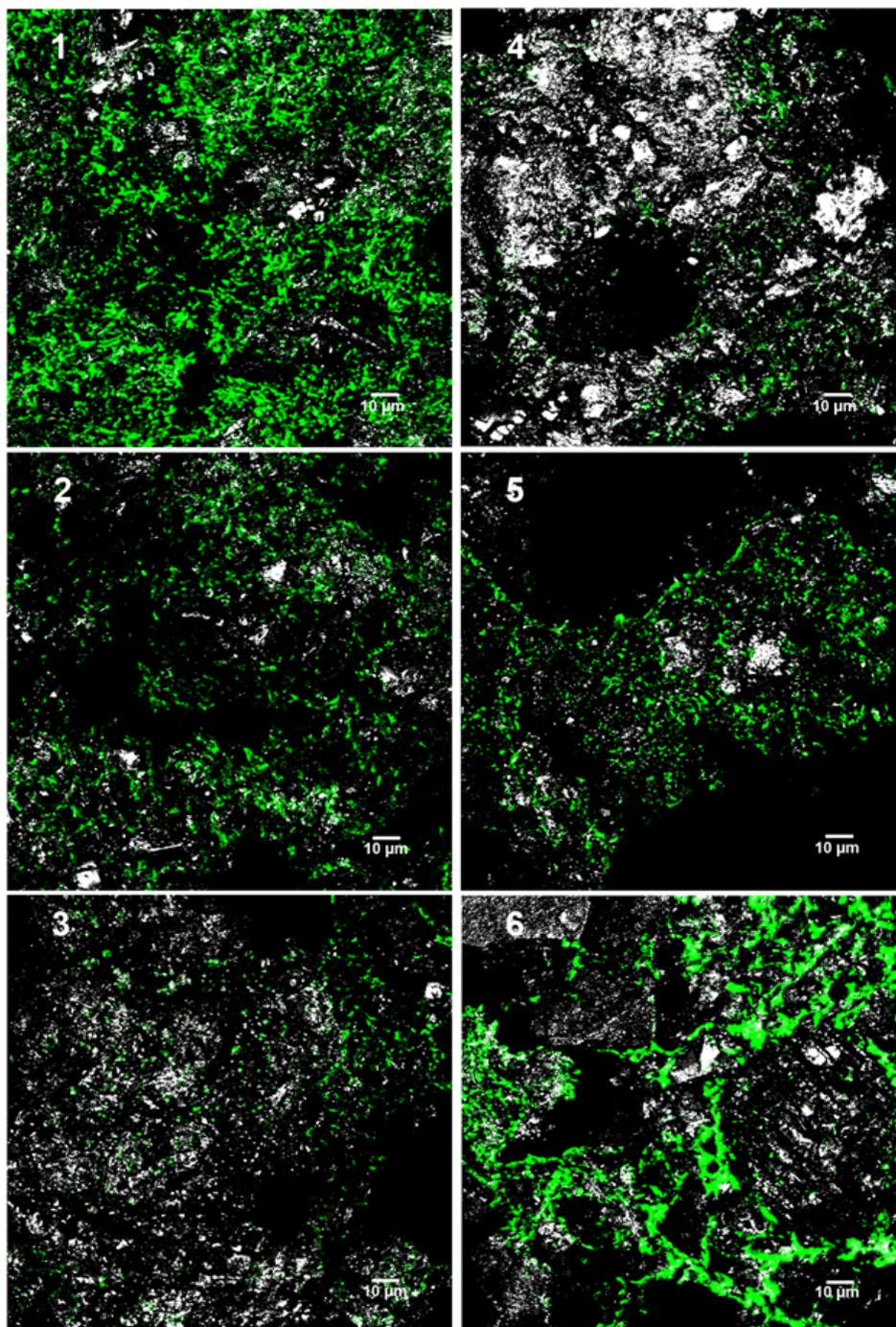
**Abb. 4-7** Clusteranalyse von Chinon-Profilen, die von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im Grundwasser erstellt wurden. Die Daten sind Mittelwerte von Zweifachextraktionen.

### Energiestoffwechsel der mikrobiellen Gemeinschaft

Das Verhältnis von Ubichinonen (UQ) zu Menachinonen (MQ) wird als proportional zum Verhältnis aerober zu anaerober Atmung erachtet (Hedrick and White, 1986). Angesichts der ermittelten UQ/MQ-Verhältnisse kleiner 0,15 kann von ausschließlich anaeroben Prozessen am Feldstandort ausgegangen werden. Aerobe Prozesse spielten währenddessen keine Rolle. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweilig ermittelten UQ/MQ-Verhältnissen wurden nicht festgestellt.

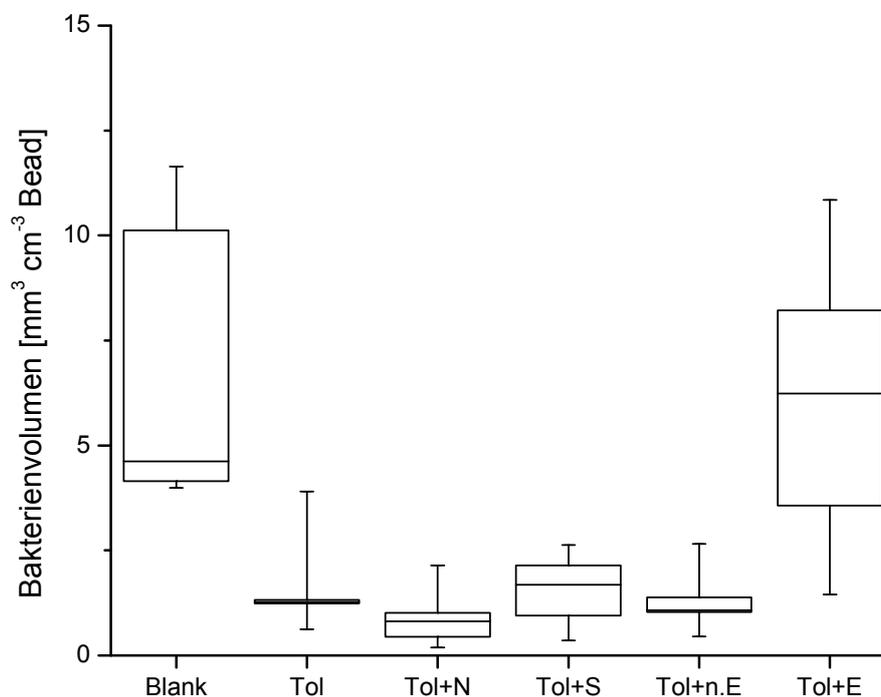
### Vergleich mikrobieller Biomassen

Die Volumina der den Beads anhaftenden Bakterien wurden mittels CLSM ermittelt. Dazu wurden die Bakterien mit einem nukleinsäure-spezifischen Fluorochrom gefärbt und die Fluoreszenzsignale mithilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgezeichnet. Auf subjektiver Entscheidungsgrundlage wurden anschließend von jedem Ansatz fünf repräsentative Ausschnitte ausgewählt und davon vertikale Bildserien aufgenommen (Abb. 4-8). Unter Verwendung einer CLSM Bildanalyse-Software wurden die Signale in Volumeneinheiten umgerechnet. Die Grundlage dieses Analyseverfahrens war eine Studie von Staudt et al. (2004). Diese demonstrierte für langsam wachsende Biofilme die Vergleichbarkeit von Biovolumina und -massen, welche sowohl mit CLSM als auch Gewichtsbestimmungen ermittelt wurden.



**Abb. 4-8** Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (engl. CLSM) Aufnahmen der mikrobiellen Biofilme auf den Beads nach 6-wöchiger Inkubation der unbeladenen BACTRAPs (1) und BACTRAPs beladen mit Toluol (2), Toluol+Nitrat (3), Toluol+Sulfat (4), Toluol+niedriger Eisengehalt (5) oder Toluol+hoher Eisengehalt (6) im Grundwasser. Den mit SYTO 60 gefärbten Zellen ist die Farbe grün und den Reflektionssignalen des Beadmaterials die Farbe weiß zugeordnet.

Die Boxplotanalyse (Abb. 4-9) stellt die Verteilung der volumetrischen Daten dar. Die für BACTRAPs mit hohen Eisenkonzentrationen wie auch Blanks ermittelten Biovolumina (MW: 6,1 bzw. 6,9  $\text{mm}^3 \text{cm}^{-3} \text{Bead}$ ) waren gegenüber sämtlich anderen Ansätzen signifikant höher (MW < 1,7  $\text{mm}^3 \text{cm}^{-3} \text{Bead}$ ), auch wenn beide Ansätze eine große Varianz der Bakterienvolumina aufzeigten. Da die Biovolumina der BACTRAPs mit Nitrat-, Sulfat- oder geringer Eisenbeladung im starken Maße denen der Toluol-BACTRAPs ohne Elektronenakzeptoren ähnelten, konnte also nur ein Stimulationseffekt für die hohen Eisenkonzentrationen festgestellt werden.



**Abb. 4-9** Boxplotanalyse mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ermittelter Bakterienvolumina für unbeladene BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+n.E; niedriger Eisengehalt) oder Toluol+Eisen (Tol+E; hoher Eisengehalt) nach 6-wöchiger Exposition im mittelkontaminierten Grundwasserbereich. Der Boxplot besteht aus dem Median umgeben vom 0,25- und 0,75-Quartil und dem kleinsten bzw. größten Wert (-) der Messdaten. Der Stichprobenumfang beträgt jeweils 5.

Die auf Grundlage von Chinonen ermittelten Biomassen zeigten einen ähnlichen Trend wie die CLSM-Daten. Die höchsten Chinonmengen traten auf den mit hohen Eisenkonzentrationen beaufschlagten BACTRAPs (1,9 nmol g<sup>-1</sup> Bead) und den Blanks (1,6 nmol g<sup>-1</sup> Bead) auf. Die geringsten Mengen wurden auf den mit niedrigen Eisenkonzentrationen beaufschlagten BACTRAPs (0,5 nmol g<sup>-1</sup> Bead) detektiert. Folglich führten höhere Eisenkonzentrationen zu einem Anstieg des Chinongehaltes. Wurden dahingegen Phospholipidfettsäuren der Quantifizierung mikrobieller Biomassen zu Grunde gelegt, zeigten die Nitrat-BACTRAPs ein Biomassemaxima (24,2 nmol g<sup>-1</sup> Bead) auf, während das Minimum auf den mit niedrigen Eisenkonzentrationen beaufschlagten BACTRAPs (8,0 nmol g<sup>-1</sup> Bead) detektiert wurde.

Die Analytik mikrobieller Phospholipidfettsäuren und respiratorischer Chinone in Kombination mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie belegten übereinstimmend, dass sowohl die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften als auch die mikrobiellen Biomassen von dem jeweilig angebotenen Elektronenakzeptor beeinflusst wurden. Schwierigkeiten zeigten sich jedoch bei der Eruiierung des für die Biostimulation bedeutendsten Elektronenakzeptors, da die unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden zu verschiedenen Schlussfolgerungen führten. Vor diesem Hintergrund wurde der nachfolgend beschriebene Versuch mit <sup>13</sup>C-Toluol durchgeführt. Dies ermöglichte es, anhand der Intensität der <sup>13</sup>C-Anreicherung in den mikrobiellen Fettsäuren die Substratumsätze zu quantifizieren und demzufolge den für den mikrobiellen Schadstoffabbau bedeutendsten TEA zu ermitteln.

#### **4.2.2 Einfluss von Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Aktivität**

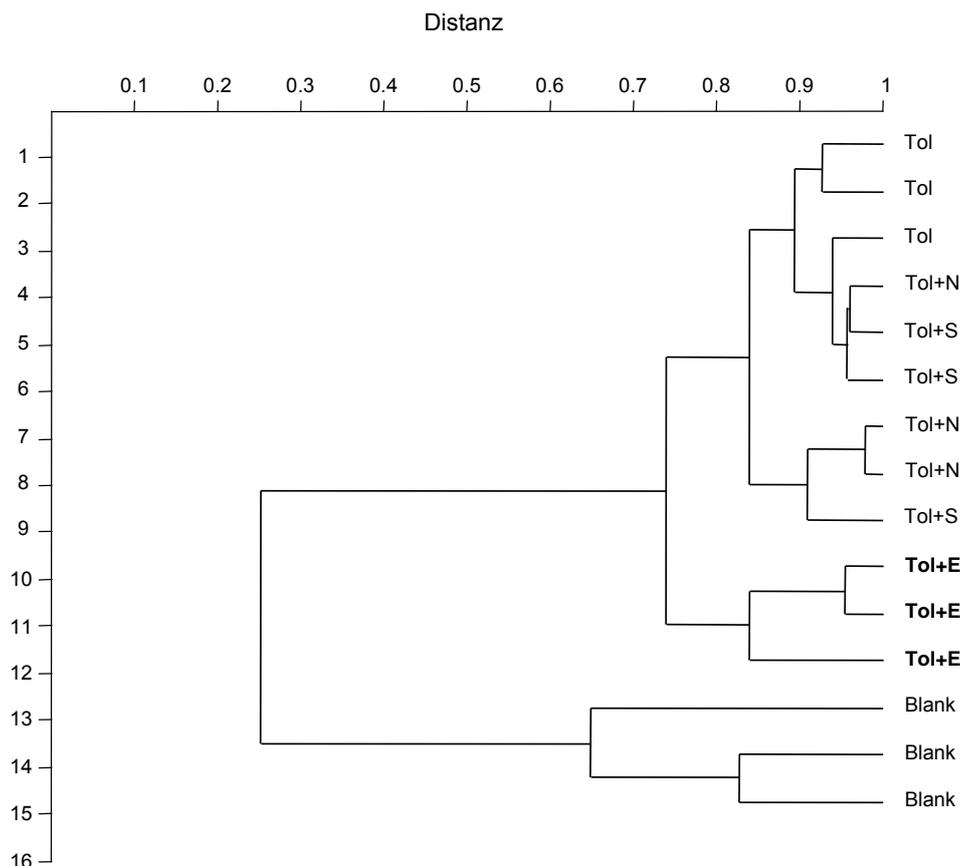
##### Mikrobielle Fettsäureprofile

Unabhängig von der Beladung mit [<sup>12</sup>C]- oder [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ -Toluol zeigten die parallelen BACTRAP-Varianten nach 3-monatiger Exposition im Grundwasser vergleichbare Fettsäuremuster wie auch -konzentrationen. Daher werden in diesem Kapitel nur die Ergebnisse der <sup>13</sup>C-Toluol beladenen und unbeladenen BACTRAPs aufgeführt.

Die höchsten mittleren Fettsäurekonzentrationen mit 194 nmol TLFA g<sup>-1</sup> Bead wurde auf den Eisen-BACTRAPs detektiert, gefolgt von den BACTRAPs ohne Elektronenakzeptor (147 nmol TLFA g<sup>-1</sup> Bead) und denen mit Sulfat- (131 nmol TLFA g<sup>-1</sup> Bead) sowie Nitrat-Beladung (112 nmol TLFA g<sup>-1</sup> Bead) (Tab. 4-3, S.88). Die unbeladenen BACTRAPs (Blanks)

wiesen im Vergleich dazu fünffach geringere Biomassekonzentrationen (22 nmol TLFA g<sup>-1</sup> Bead) auf. In allen mit Toluol beladenen BACTRAPs dominierten die Fettsäuren 16:0, 16:1 $\omega$ 7, cy17:0 und 18:1 $\omega$ 7 mit prozentualen Anteilen >5%. In geringeren Konzentrationen konnten die gesättigten Fettsäuren 14:0, 15:0, 17:0, 18:0 und 20:0, die verzweigten Fettsäuren i15:0, a15:0, a16:0, a17:0 und 10Me16:0 sowie cy19:0 detektiert werden. Cyclopropan- (cy17:0, cy19:0) und einfach ungesättigte Fettsäuren (16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 7) sind Biomarker für gram-negative Bakterien (Kaur et al., 2005). Die Dominanz dieser Fettsäuren deutet auf die Relevanz von gram-negativen Bakterien für den anaeroben Toluolabbau hin. Da TLFA, wie sie im Rahmen dieser Studie analysiert wurden, sämtliche Fettsäure-Pools wie z.B. Phospholipidfettsäuren, freie Fettsäuren und Speicherlipid-Fettsäuren umfassen (White et al., 1996), können die Fettsäuren jedoch auch von abgestorbenem Zellmaterial stammen. Daher wurde zur Spezifizierung der aktiven Mikroorganismen eine auf 16S rRNA basierende Analytik herangezogen.

Obleich in allen Toluol-BACTRAPs die gleichen Fettsäuren gefunden wurden, variierten die Abundanzen der jeweiligen Fettsäuren in Abhängigkeit von den Elektronenakzeptoren. Wie anhand der Clusteranalyse ersichtlich wurde (Abb. 4-10), wiesen die Eisen-BACTRAPs eine im Vergleich zu den anderen Toluol-BACTRAPs stark differierende Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auf. Die Fettsäuremuster auf den Sulfat- und Nitrat-BACTRAPs variierten dahingegen im Vergleich zur Kontrolle nur geringfügig. Das lässt darauf schließen, dass ähnliche mikrobielle Gemeinschaften die BACTRAPs besiedelten, jedoch die relative Abundanz spezifischer Bakterien durch Zugabe der Elektronenakzeptoren beeinflusst wurde. Außerdem zeigte die Verschiedenartigkeit der mikrobiellen Gemeinschaften auf den Toluol-BACTRAPs im Vergleich zu den Blanks, dass das Substrat einen starken Einfluss auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft hat.



**Abb. 4-10** Clusteranalyse von TLFA-Profilen, die von unbeladenen BACTRAPs (Blank) und BACTRAPs beladen mit Toluol (Tol; Kontrolle), Toluol+Nitrat (Tol+N), Toluol+Sulfat (Tol+S), Toluol+Eisen (Tol+E) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich erstellt wurden. BACTRAPs beladen mit Toluol+Eisen wiesen gegenüber den anderen mit Toluol beladenen BACTRAPs eine deutlich verschiedenartige Fettsäurezusammensetzung auf. Die Daten sind Mittelwerte von Dreifachextraktionen.

### <sup>13</sup>C-Anreicherung in mikrobiellen Fettsäuren

In den BACTRAPs, in denen <sup>13</sup>C-markiertes Toluol über einen Expositionszeitraum von 3 Monaten angeboten wurde, variierten die Kohlenstoffisotopensignaturen ( $\delta^{13}\text{C}$ ) der Fettsäuren zwischen 10 und 17700‰ (Tab. 4-3). Da für Fettsäuren natürliche Kohlenstoffverhältnisse von -10 und -36‰ repräsentativ sind (Abraham et al., 1998; Pombo et al., 2002), kann auf eine Transformation der <sup>13</sup>C-Atome aus dem Toluol in alle Fettsäuren geschlossen werden. Obendrein reflektieren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von ca. 13800‰ die Kohlenstoffisotopensignatur des verwendeten [<sup>13</sup>C]- $\alpha$ -Toluols, so dass diese Fettsäuren von Mikroorganismen produziert wur-

den, die ausschließlich das [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol verwerteten. Allerdings liegen diese hohen Isotopenanreicherungen außerhalb des Kalibrierbereiches und unterliegen demzufolge starken Messungenauigkeiten wie anhand der maximal ermittelten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von 17700‰ ersichtlich ist. Isotopensignaturen kleiner als 13800‰ deuten darauf hin, dass diese Fettsäuren von

**Tab. 4-3** Relative Abundanzen der Gesamtlipidfettsäuren (TLFA) und  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in den mikrobiellen Fettsäuren, die von unbeladenen und BACTRAPs beladen mit Toluol, Toluol+Nitrat, Toluol+Sulfat oder Toluol+Eisen nach 3-monatiger Exposition im Grundwasser extrahiert wurden. Die Daten sind Mittelwerte von Dreifachextraktionen. n.d. = nicht detektierbar

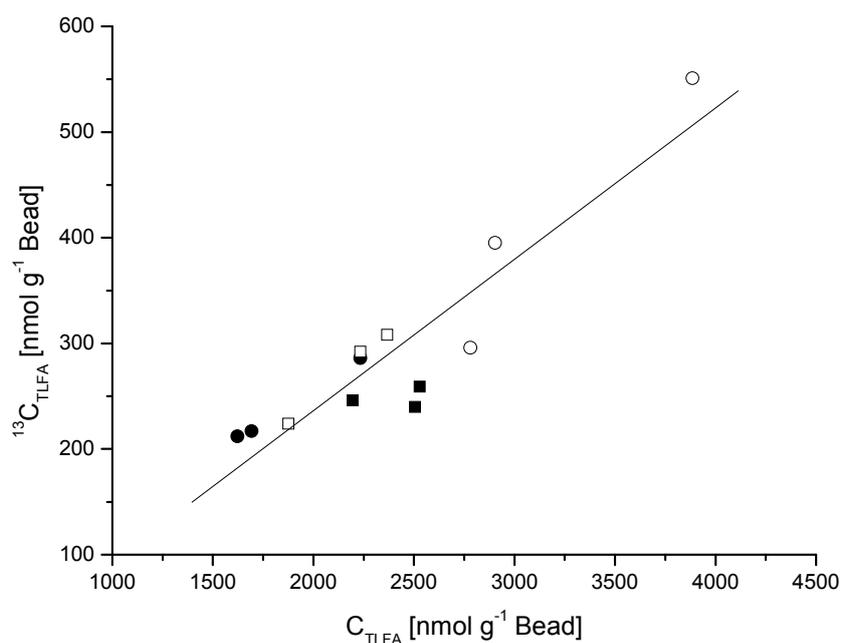
Fettsäure	Blank	Toluol		Toluol+Nitrat		Toluol+Sulfat		Toluol+Eisen	
	TLFA (%)	TLFA (%)	$\delta(^{13}\text{C})$ (‰)	TLFA (%)	$\delta(^{13}\text{C})$ (‰)	TLFA (%)	$\delta(^{13}\text{C})$ (‰)	TLFA (%)	$\delta(^{13}\text{C})$ (‰)
14:0	2,4	1,7	4900	1,0	6400	1,4	7000	1,0	14000
i15:0	0,9	0,4	n.d.	0,2	1700	0,7	3000	0,2	n.d.
a15:0	2,1	0,9	1900	0,5	1000	0,8	2300	0,2	n.d.
15:0	4,4	1,4	230	0,8	450	1,2	500	0,5	n.d.
a16:0	0,3	0,8	190	0,7	140	0,7	360	0,2	10
16:1 $\omega$ 7cis	22,2	27,4	15300	32,6	15600	28,2	15800	28,9	16100
16:1 $\omega$ 7trans	n.d.	0,8	11800	0,7	12000	1,0	14400	0,4	16700
16:0	34,1	32,6	8800	27,5	13200	27,6	13500	29,6	15200
10Me16:0	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	4500	n.d.	n.d.
a17:0	2,4	0,6	n.d.	0,4	n.d.	0,5	120	0,1	n.d.
cy17:0	2,8	17,1	15900	23,4	16300	21,9	16100	31,7	15200
17:0	2,2	0,8	n.d.	0,2	n.d.	0,4	n.d.	0,1	n.d.
18:1 $\omega$ 9	4,8	2,4	320	1,6	310	1,4	1400	0,4	2000
18:1 $\omega$ 7	4,5	6,9	11800	7,2	14000	9,8	14000	5,6	17700
18:0	16,1	4,5	100	2,4	160	2,3	250	0,8	490
cy19:0	n.d.	1,0	5100	0,6	3000	1,1	5900	0,3	7000
20:0	0,7	0,3	n.d.	0,1	n.d.	0,4	n.d.	n.d.	n.d.
TLFA (nmol g $^{-1}$ )	22 $\pm$ 4	147 $\pm$ 12		112 $\pm$ 20		131 $\pm$ 16		194 $\pm$ 37	
$^{13}\text{C}_{\text{TLFA}}$ (nmol g $^{-1}$ )		249 $\pm$ 10		239 $\pm$ 41		275 $\pm$ 44		414 $\pm$ 128	

Mikroorganismen produziert wurden, die neben dem  $^{13}\text{C}$ -Toluol weitere Kohlenstoffquellen aus dem Grundwasserleiter verwerteten.

In allen BACTRAP-Varianten wurden die höchsten  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in den Fettsäuren 16:0, 16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 7 und cy17:0 mit  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten  $>8800\text{‰}$  gefunden. Diese Fettsäuren dominierten zugleich mit prozentualen Anteilen von  $>5\%$ . Nur geringfügige  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen lagen in den Fettsäuren 15:0, a16:0 und 18:0 vor, wobei diese Fettsäuren mit prozentualen Anteilen von  $<5\%$  nur untergeordnet eine Rolle spielten. In den mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol beladenen BACTRAPs variierten die Isotopensignaturen zwischen  $-12$  und  $-36\text{‰}$ . Folglich dienten auf diesen BACTRAPs das angebotene  $^{12}\text{C}$ -Toluol sowie aus dem Grundwasser akkumulierte Kohlenstoffquellen als Wachstumssubstrat.

Anhand der Intensitäten der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in den Fettsäuren konnten unterschiedliche mikrobielle Aktivitäten in Abhängigkeit von den verschiedenen Elektronenakzeptoren identifiziert werden. So wiesen die Fettsäuren 14:0, 16:1 $\omega$ 7t, 16:0, 18:1 $\omega$ 9 und 18:1 $\omega$ 7 die höchsten  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen und demzufolge die höchsten mikrobiellen Aktivitäten auf den Eisen-BACTRAPs auf, gefolgt von den Sulfat- und Nitrat-BACTRAPs. Die Fettsäuren a15:0, 16:1 $\omega$ 7c, cy17:0 und cy19:0 zeigten im Vergleich dazu relative gleichmäßige  $^{13}\text{C}$ -Gehalte in allen BACTRAP-Varianten.

Basierend auf einer Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden (Abb. 4-11), dass der Gesamtkohlenstoffgehalt der mikrobiellen Fettsäuren im starken Maße mit dem  $^{13}\text{C}$ -markierten Kohlenstoffgehalt ( $R^2=0,92$ ,  $p<0,001$ ) korrelierte. Demnach wurde die mikrobielle Abbauproduktion zusammen mit der Biomassebildung im starken Maße von den angebotenen Elektronenakzeptoren beeinflusst. Die höchsten Abbauraten wie auch höchsten Biomassen zeigten die Eisen-BACTRAPs. Wurden Nitrat oder Sulfat angeboten, konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Beschleunigung des Toluolabbaus im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Offensichtlich führte die Zugabe von Eisen zu einer Stimulation indigener Eisenbakterien und damit zu einem erhöhten Katabolismus des Toluols.



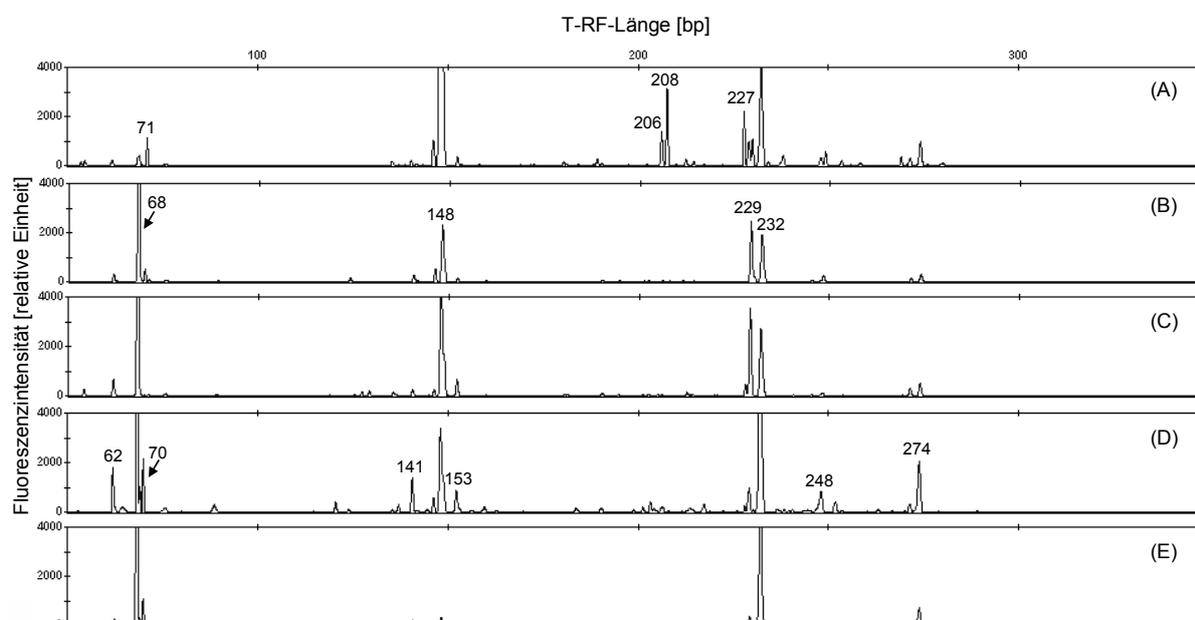
**Abb. 4-11** Korrelation zwischen Gesamtkohlenstoffgehalt in mikrobiellen Fettsäuren ( $C_{TLFA}$ ) und Gehalt an  $^{13}C$ -Kohlenstoff ( $^{13}C_{TLFA}$ ). Die Extraktion der Gesamtlipidfettsäuren (TLFA) erfolgte von BACTRAPs beladen mit Toluol (■), Toluol+Nitrat (●), Toluol+Sulfat (□) oder Toluol+Eisen (○). Die Daten sind Mittelwerte von Dreifachextraktionen.  $R^2=0,92$ ;  $p=0,001$ .

### 16S rRNA-basierende Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft

Um TEA bedingte Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften aufzuzeigen, wurden für alle BACTRAPs T-RFLP Profile auf 16S rRNA-Basis erstellt und diese miteinander verglichen. Die Analyse bakterieller rRNA zielte dabei auf die Erfassung der aktiven, toluolabbauenden Bakterien. Analog zur Fettsäureanalyse ähnelten sich die T-RFLP-Profile der parallelen  $^{12}C$ - und  $^{13}C$ - BACTRAPs, so dass in diesem Kapitel ebenfalls nur die Ergebnisse der  $^{13}C$ -BACTRAPs und des Blanks aufgezeigt werden. Die Gleichartigkeit der Profile bekräftigt die reproduzierbare Besiedlung der BACTRAPs.

In den T-RFLP-Profilen der Blanks wurden neben den T-RFs mit 148 und 232 bp, welche ebenso auf allen BACTRAPs mit Toluolbeladung vorhanden waren, zusätzlich drei weitere T-RFs (206, 208, 227 bp) detektiert (Abb. 4-12). Diese Verschiedenartigkeit der Profile deutet darauf hin, dass die mikrobielle Gemeinschaft auf den Blanks auch nicht zum Toluolabbau

befähigte Grundwasserbakterien beinhaltet, hingegen sich eine spezifische toluolabbauende Gemeinschaft auf den Toluol-BACTRAPs ansiedelte. Generell dominierten in den Profilen sämtlicher Toluol-BACTRAPs die T-RFs 68 und 232 bp. Deutliche strukturelle Unterschiede der mikrobiellen Gemeinschaft in Abhängigkeit von den verschiedenen Elektronenakzeptoren zeigten sich jedoch anhand weiterer T-RFs: Die Profile der Kontroll- und Nitrat-BACTRAPs waren mit den zusätzlich dominierenden T-RFs 148 und 229 bp einander sehr ähnlich. Diese T-RFs waren ebenfalls auf den Sulfat-BACTRAPs vorhanden, doch dominierten zudem vier weitere T-RFs (141, 153, 248 und 274 bp). Im Gegensatz dazu wiesen die Eisen-BACTRAPs die geringste Diversität auf, so wurden die Profile lediglich durch die dominierenden T-RFs 68 und 232 bp geprägt.



**Abb. 4-12** T-RFLP Profile, die von unbeladenen BACTRAPs (A) und BACTRAPs beladen mit Toluol (B), Toluol+Nitrat (C), Toluol+Sulfat (D) und Toluol+Eisen (E) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich erstellt wurden.

Demzufolge änderte sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft infolge der Zugabe von Sulfat und Eisen. Für Nitrat konnte kein Einfluss festgestellt werden. Da mithilfe der T-RFLP-Analyse hauptsächlich die dominanten Bakterien innerhalb der Gemeinschaft erfasst werden (Osborn et al., 2000; Lueders and Friedrich, 2003), ist es bemerkenswert, dass die

für die Eisen-BACTRAPs ermittelte höchste mikrobielle Aktivität der geringsten mikrobiellen Diversität zuzuordnen ist. Die von den jeweiligen T-RFs repräsentierten physiologischen Gruppen sind im Kap. 4.4.2 dargestellt.

### 4.3 Abschätzung des mikrobiellen *in situ* Schadstoffabbaus

Um den Übergang von einem rein qualitativen Beweis des *in situ* Abbaus zu einer Abschätzung der Stoffumsätze auf den BACTRAPs zu ermöglichen, wurde ein Quantifizierungsmodell entwickelt, welches alle für die Substratabnahme auf den BACTRAPs relevanten Parameter berücksichtigt. In der Studie zur Untersuchung mikrobieller Abbaupotentiale (Tab. 3-4, S.42) wurde dieses Modell hinsichtlich der Anwendbarkeit getestet.

#### Entwicklung des Quantifizierungsmodells

Generell setzt sich der Substratumsatz ( $\Delta S_{ges.}$ ) in den BACTRAPs aus der Summe des biotischen ( $\Delta S_{biotisch}$ ) und des abiotischen Substratumsatzes ( $\Delta S_{abiotisch}$ ) zusammen. Der biotische Substratumsatz umfasst die in Zellbiomasse assimilierte ( $\Delta X$ ), die mineralisierte ( $\Delta CO_2$ ) sowie die in Metaboliten inkorporierte Substratmenge ( $\Delta Metabolit$ ). Der abiotische Substratumsatz bezeichnet die desorbierende Substratmenge. Demzufolge ergibt sich für den Gesamtumsatz folgende Gleichung:

$$\Delta S_{ges.} / \Delta t = \underbrace{\Delta X / \Delta t + \Delta CO_2 / \Delta t + \Delta Metabolit / \Delta t}_{\Delta S_{biotisch}} + \Delta S_{abiotisch} / \Delta t \quad [ 9 ]$$

Die während der *in situ* Inkubation der BACTRAPs in Zellbiomasse inkorporierte Kohlenstoffmenge des Substrates wurde basierend auf der Konzentration  $^{13}C$ -angereicherter Fettsäuren ermittelt. Die in Metaboliten inkorporierte Kohlenstoffmenge wird in der Literatur mit 0,5 bis 2,8% des metabolisierten Toluols aufgeführt (Seyfried et al., 1994; Beller et al., 1996), so dass dieser Parameter für die Berechnung vernachlässigt wurde. Die Bestimmung des abiotischen Substratumsatzes erfolgte mithilfe von Kinetikexperimenten im Labor (4.1.1). Zur Bestimmung der mineralisierten Substanzmenge unter *in situ* Bedingungen konnte die übli-

cherweise verwendete Analytik der  $^{13}\text{CO}_2$ -Emission nicht herangezogen werden, so dass diese durch Umformulierung der für den biotischen Substratumsatzes geltenden Gleichung als

$$\Delta\text{CO}_2 = \Delta S_{\text{biotisch}} - \Delta X \quad [10]$$

definiert wurde. Wegen  $\Delta X / \Delta S_{\text{biotisch}} = Y_{X/S}$ , wobei  $Y_{X/S}$  den Ertragskoeffizienten bezeichnet, resultierte

$$\Delta S_{\text{biotisch}} = \Delta X / Y_{X/S} \quad [11]$$

so dass sich für den biologischen Substratumsatz in den BACTRAPs

$$\Delta S_{\text{biotisch}} / \Delta t = \Delta X / \Delta t \times 1 / Y_{X/S} \quad [12]$$

ergab.

Es wurden für verschiedene indigene oder artverwandte Mikroorganismen des Grundwassers Zeit Ertragskoeffizienten in Labormikrokosmen bestimmt. *Azoarcus* sp. und ZBT 1 dienten als Referenzorganismen für den Toluolabbau unter nitratreduzierenden bzw. sulfatreduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde der sulfatreduzierende Stamm *Desulfobacterium cetonicum* herangezogen, um die geringe Ertragsausbeute der Anreicherungskultur ZBT 1 zu verifizieren. Dieser Stamm wurde ebenfalls im Rahmen einer Studie am Feldstandort Zeit identifiziert (unveröffentlichte Daten des Departments Bioremediation und Isotopenbiogeochemie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig, Deutschland). Wegen der geringen Biomassebildung auf den Beads während der *in situ* Inkubation konnten die Ertragsausbeuten nicht mithilfe der gängigen Methode über die Trockenmassebildung je Substratverbrauch bestimmt werden. Alternativ wurde die Fettsäuremenge als quantitativer Biomarker verwendet. Die Bestimmung der Fettsäurerträge je Substratverbrauch ( $Y_{\text{TLFA/S}}$ ) sind dem Kap. 3.7.2 zu entnehmen.

### Evaluierung des Quantifizierungsmodells

Die in Labormikrokosmen ermittelten Ertragskoeffizienten ( $Y_{\text{TLFA/S}}$ ) schwankten stark in Abhängigkeit von dem terminalen Elektronenakzeptor wie auch von den verwendeten Mikroorganismen. So betrug  $Y_{\text{TLFA/S}}$  für *Azoarcus* sp.  $1,7 \cdot 10^{-3}$  ( $\pm 1,5 \cdot 10^{-4}$ ). Die Erträge der sulfatreduzierenden Mikroorganismen waren dahingegen mit  $1,1 \cdot 10^{-4}$  ( $\pm 2,6 \cdot 10^{-5}$ ) für ZBT 1 und mit  $4,6 \cdot 10^{-4}$

( $5,4 \cdot 10^{-5}$ ) für *Desulfobacterium cetonicum* um etwa eine Zehnerpotenz kleiner. Diese beträchtliche Streuung der  $Y_{TLFA/S}$  resultierte in einer starken Streuung der berechneten Substratumsätze (Tab. 4-4). Während die Verwendung des für *Azoarcus* sp. bestimmten  $Y_{TLFA/S}$  in Toluolumsätzen von 190 bis 320  $\mu\text{mol}$  resultierte, wurden deutlich höhere Umsätze mit Werten von  $\geq 690$   $\mu\text{mol}$  berechnet, wenn die  $Y_{TLFA/S}$  der sulfatreduzierenden Organismen herangezogen wurden. Aufgrund der Tatsache, dass die BACTRAPs mit ca. 900  $\mu\text{mol}$  [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol beladen wurden, führte die Verwendung der für die sulfatreduzierenden Mikroorganismen bestimmten  $Y_{TLFA/S}$  zu einer Überschätzung des Toluolverbrauchs.

**Tab. 4-4** Berechnung des biotischen Substratumsatzes für BACTRAPs beladen mit  $^{13}\text{C}$ -Toluol,  $^{13}\text{C}$ -Toluol+Nitrat,  $^{13}\text{C}$ -Toluol+Sulfat und  $^{13}\text{C}$ -Toluol+Eisen nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich. Die Berechnung erfolgte mit, im Labor für die Referenzorganismen *Azoarcus* sp., *Desulfobacterium cetonicum* und ZBT 1 ermittelten, Fettsäuren basierenden Ertragskoeffizienten.

Probe	Kalkulierter biotischer Substratumsatz [ $\mu\text{mol}$ ]		
	$Y_{TLFA/S}$ ( <i>Azoarcus</i> sp.)	$Y_{TLFA/S}$ ( <i>D. cetonicum</i> )	$Y_{TLFA/S}$ (ZBT 1)
$^{13}\text{C}$ -Toluol	240 $\pm$ 20	900 $\pm$ 70	3720 $\pm$ 290
$^{13}\text{C}$ -Toluol/Nitrat	190 $\pm$ 30	690 $\pm$ 120	2860 $\pm$ 520
$^{13}\text{C}$ -Toluol/Sulfat	220 $\pm$ 30	800 $\pm$ 90	3330 $\pm$ 390
$^{13}\text{C}$ -Toluol/Eisen	320 $\pm$ 60	1180 $\pm$ 220	4920 $\pm$ 930

Dies impliziert, dass sich die  $Y_{TLFA/S}$  im Feldexperiment zwischen denen befinden, die für die nitrat- und sulfatreduzierenden Mikroorganismen bestimmt wurden. Die Abschätzung der mikrobiellen Abbauraten mit dem vorliegenden Modell liefert also Werte in einem geeigneten Rahmen, auch wenn zu dem jetzigen Zeitpunkt nur eine sehr grobe Abschätzung der mikrobiellen Abbauraten getroffen werden kann.

## 4.4 Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen

### 4.4.1 Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen in Labormikrokosmen

#### Anreicherung der toluolabbauenden Mikroorganismen

Die im Folgenden kurz umrissene Anreicherung des toluolabbauenden Konsortiums wurde von Carsten Vogt (Department für Isotopenbiogeochemie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig, Deutschland) durchgeführt. Mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol beladene BACTRAPs, welche sowohl als Besiedlungsoberfläche als auch Toluoladsorbens dienten, wurden zur Anreicherung toluolabbauender Mikroorganismen für 70 Tage im Grundwasser des Standortes Zeitz exponiert. Die hohen Sulfidkonzentrationen von  $35,3 \text{ mg l}^{-1}$  in der Messstelle deuteten auf überwiegend sulfatreduzierende Bedingungen hin. Nach Entnahme der BACTRAPs aus der Messstelle wurde das auf den Beads angesiedelte Konsortium in Labormikrokosmen unter sulfatreduzierenden Bedingungen kultiviert. Die Sulfidkonzentration in den Anreicherungskulturen stieg nach 197 Tagen Kultivierung auf  $6,4 \text{ mM}$  an. Da einhergehend mit dem Sulfidanstieg kein Anstieg der optischen Dichte zu verzeichnen war, konnte auf sessile, auf den Beads angesiedelte, toluolabbauende Mikroorganismen geschlossen werden. Diese Annahme wurde durch die mikroskopischen Aufnahmen der Beads bestätigt, welche eine dichte Besiedlung der Beadoberflächen mit verschiedenen mikrobiellen Morphotypen zeigten. Im Gegensatz dazu stieg in den substratfreien Kontrollmikrokosmen nur anfänglich das Sulfid auf  $1 \text{ mM}$  und stagnierte im Laufe der weiteren Kultivierung. Die Oberflächen der substratfreien Beads waren nur sehr vereinzelt besiedelt. Um die auf den Beads anheftenden sulfatreduzierenden Toluolabbauer physiologisch und phylogenetisch zu charakterisieren, wurden die Mikroorganismen vorsichtig von diesen abgelöst und in neues mit  $100 \mu\text{M}$  Toluol versetztes Mineral-salzmedium überführt. Nach 32 Tagen Kultivierung waren mehr als 90% des Toluols abgebaut. Aliquots dieser Anreicherungskultur, welche ‚ZBT 1‘ benannt wurde, wurden für das nachfolgend beschriebene Stable Isotope Probing (SIP) Experiment verwendet.

#### Strategie des Versuches

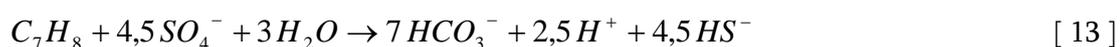
Labormikrokosmen, welche Beads als Besiedlungsmaterial und Adsorbens enthielten, wurden mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol,  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol oder  $^{13}\text{C}_7$ -Toluol versetzt und mit Aliquots der Grundwas-

seranreicherung ZBT 1 inokuliert. Während der 60-tägigen Inkubation wurde die Flüssigphase regelmäßig zur Analyse der Sulfidkonzentration beprobt, welche als indirekter Nachweis für den Toluolmetabolismus diente. Zusätzlich wurde zum Versuchsbeginn und Versuchsende die Toluolkonzentration in den Beads und in der Flüssigphase ermittelt. Die mikrobielle Besiedlung der Beads wurde mithilfe Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Die Verwendung von sowohl  $[^{13}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-Toluol}$  als auch  $[^{13}\text{C}_7]\text{-Toluol}$  diente zur Aufklärung der für SIP-Experimente generell erforderlichen Menge an Isotopenlabel. Um einerseits den Kohlenstofffluss des Toluols in das mikrobielle Konsortium zu verfolgen und andererseits die spezifische Rolle der jeweiligen im Konsortium enthaltenen Spezies im Hinblick auf den Toluolabbau zu untersuchen, wurde der Einbau des toluolbürtigen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffs in die mikrobiellen Fettsäuren und in die rRNA untersucht.

#### Abbauvermögen und Wachstum des toluolabbauenden Konsortiums ZBT 1

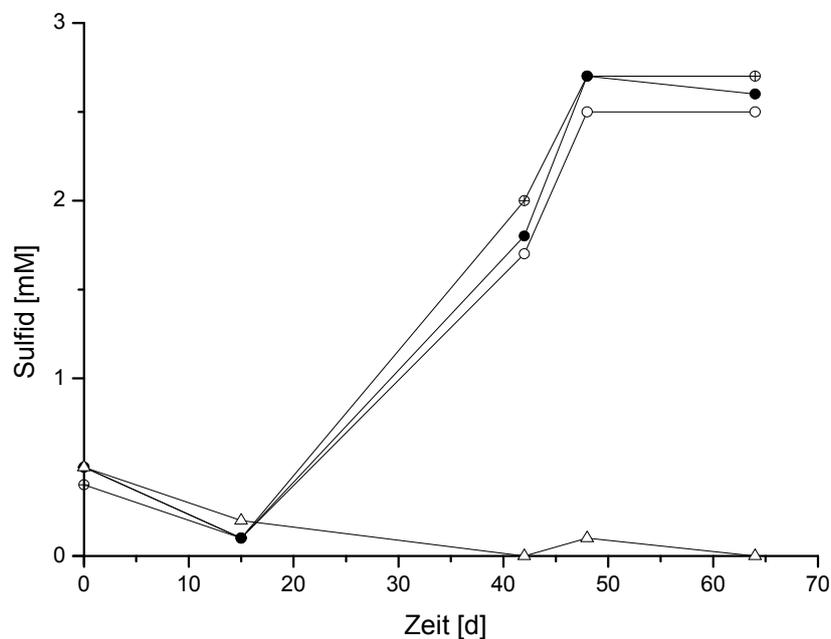
Während der 60-tägigen Inkubationsperiode stieg in allen Labormikrokosmen unabhängig von dem angebotenen Substrat die Sulfidkonzentration von 0,5 mM auf 2,5 – 2,7 mM. In den toluolfreien Kontrollmikrokosmen sank hingegen die anfängliche Sulfidkonzentration bis unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 4-13). Die Toluolkonzentration sank in allen Labormikrokosmen von  $2,7\pm 0,5$  mM auf  $0,6\pm 0,02$  mM in den Beads und von  $0,05\pm 0,01$  mM bis unterhalb der Nachweisgrenze in der Flüssigphase. Der höchste Toluolumsatz mit 2,8 mM (83%) erfolgte in den  $[^{13}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-Toluol}$ -Mikrokosmen und der niedrigste mit 1,7 mM (76%) in den  $[^{12}\text{C}]\text{-Toluol}$ -Mikrokosmen.

Für die vollständige Mineralisation von 1 M Toluol werden entsprechend Gl.[ 13 ] (Heider et al., 1998) 4,5 M Sulfat benötigt.



In den Labormikrokosmen lagen die gemessenen Sulfidproduktionen mit 1,1 mM Sulfid je 1 mM umgesetzten Toluol deutlich unter den theoretischen Werten. Die Ursache hierfür ist, dass ein Teil des Sulfides von dem Beadmaterial adsorbiert wurde, wie anhand der anfänglichen Sulfidabnahme in den Labormikrokosmen und in dem toluolfreien Kontrollmikrokosmos ersichtlich ist (Abb. 4-13). In Anbetracht dessen konnte die vollständige Mineralisation

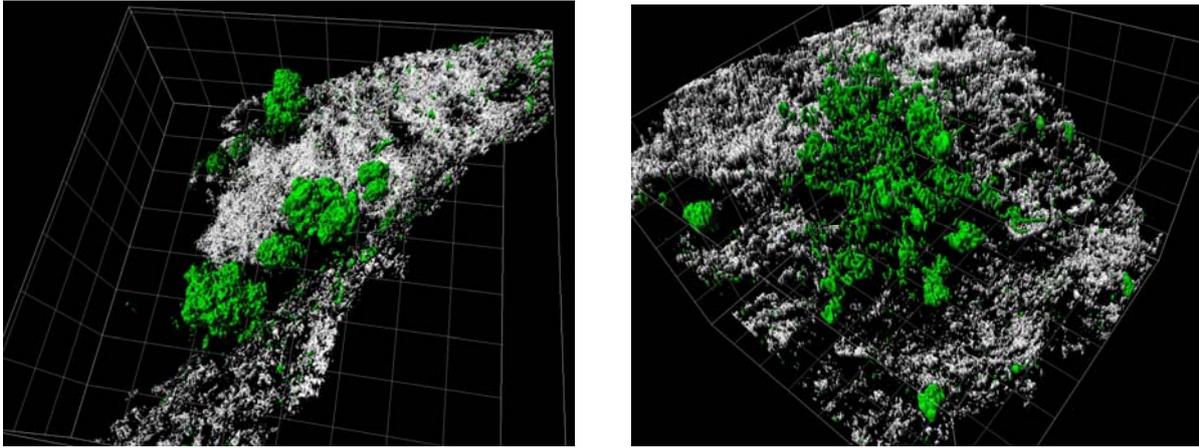
des Toluols mithilfe des Massenverhältnisses an verbrauchtem Toluol und produziertem Sulfid nicht bewiesen werden.



**Abb. 4-13** Sulfidproduktion der Anreicherungskultur ZBT 1 über die Zeit. Die Kultivierung erfolgte mit [<sup>12</sup>C]-Toluol (○), [<sup>13</sup>C]-α-Toluol (⊕) oder [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>]-Toluol (●) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle. (△) kennzeichnet Kontrollen ohne Toluol. Die initiale Sulfidabnahme ist auf die Adsorption des Sulfides an die Beadmatrix zurückzuführen. Die Daten sind Mittelwerte von Parallelansätzen.

Die mikrobielle Besiedlung der Beads wurde nach 60-tägiger Kultivierung mithilfe Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (engl. CLSM) untersucht. Die Beads aller Labormikrokosmen waren im Gegensatz zu denen aus dem toluolfreien Kontrollansatz dicht mit Mikrokolonien bildenden stäbchenförmigen Bakterien besiedelt (Abb. 4-14).

Eine Zählung der intakten Zellen mithilfe der CLSM-Aufnahmen war aufgrund der heterogenen Besiedlung schwierig, so dass die mikrobielle Biomasse mithilfe der Analyse von Fettsäuren quantifiziert wurde. Diese Methode erlaubte zudem die Quantifizierung der in die mikrobiellen Fettsäuren eingebauten <sup>13</sup>C-Atome.



**Abb. 4-14** Exemplarische Konfokale Laser Scanning Mikroskopie Aufnahmen der mikrobiellen Biofilme auf den Beads nach 60-tägiger Kultivierung von ZBT 1 mit Toluol. Den mit SYTO 60 gefärbten Zellen ist die Farbe grün und den Reflektionssignalen des Beadmaterials die Farbe weiß zugeordnet. Rasterlänge: 20  $\mu\text{m}$ .

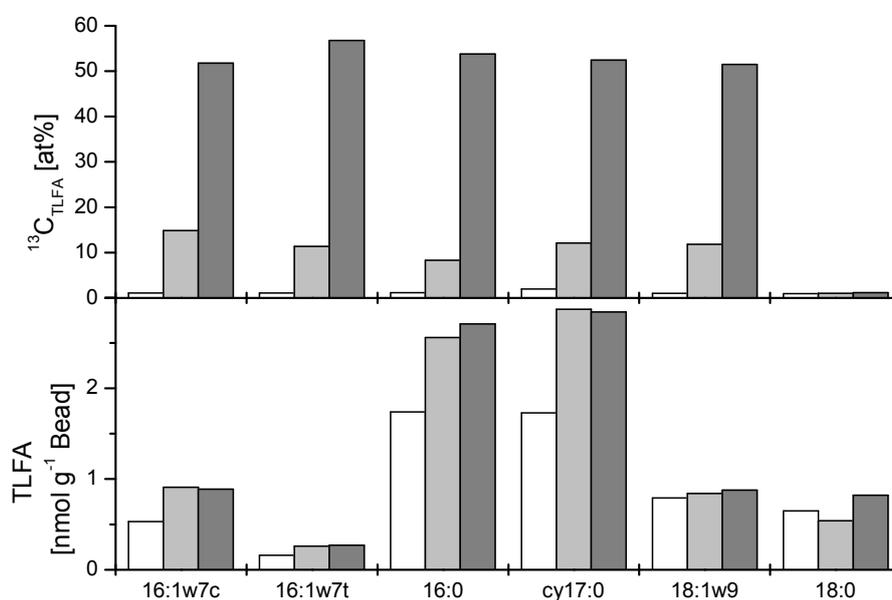
### Fettsäureprofile und $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in mikrobielle Fettsäuren

Die aus den Beads und Flüssigphasen extrahierten Fettsäuren zeigten ein vergleichbares Muster, so dass die sessile mikrobielle Gemeinschaft mit der planktonischen identisch war. Aufgrund dieser sich stark ähnelnden Fettsäuremuster sowie auch vergleichbaren  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in den jeweiligen Fettsäuren wird in diesem Kapitel nur auf die Ergebnisse der Beads näher eingegangen.

Die Konzentrationen der Fettsäuren variierten zwischen 5,6  $\text{nmol g}^{-1}$  Bead ( $^{12}\text{C}$ -Toluol) und 8,4  $\text{nmol g}^{-1}$  Bead ( $^{13}\text{C}_7$ -Toluol) ( $n=2$ ). Mit einem prozentualen Anteil von jeweils ca. 30% dominierten die Fettsäuren 16:0 und cy17:0 (Abb. 4-15), wobei letztere charakteristisch für sulfatreduzierende Bakterien ist (Kaur et al., 2005). Die Fettsäuren 16:1 $\omega$ 7, 18:1 $\omega$ 9 und 18:0 kamen mit prozentualen Anteilen <15% in geringen Konzentrationen vor. Da in den  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol- und  $^{13}\text{C}_7$ -Toluol-Proben die Konzentrationen der jeweiligen Fettsäuren zum Teil höher als in den  $^{12}\text{C}$ -Toluol-Proben waren, konnte ein inhibitorischer Effekt des isotopischen Substrates auf das mikrobielle Wachstum unter sulfatreduzierenden Bedingungen ausgeschlossen werden.

Die Kultivierung des Grundwasserkonsortiums ZBT 1 mit  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol als Kohlenstoff- und Energiequelle resultierte in einer  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung der mikrobiellen Fettsäuren von

8 – 15at% (Abb. 4-15). Wuchs das Konsortium auf [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol, betrug die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den Fettsäuren 51 – 57at%. Folglich waren die auf [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol kultivierten Zellen 3- bis 6-mal höher markiert als die auf [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol kultivierten Zellen, was im Hinblick auf die siebenfach höhere  $^{13}\text{C}$ -Markierung des [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol im Vergleich zum [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol auf eine differierende Inkorporation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobiellen Fettsäuren hindeutete. Von diesen Bilanzen ist die Fettsäure 18:0 ausgenommen, die weder in den Ansätzen mit [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol noch [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung aufwies. Dies ist verwunderlich, da diese Fettsäure gewöhnlich durch Kettenverlängerung der Fettsäure 16:0 synthetisiert wird, welche hohe Isotopenanreicherungen aufwies.



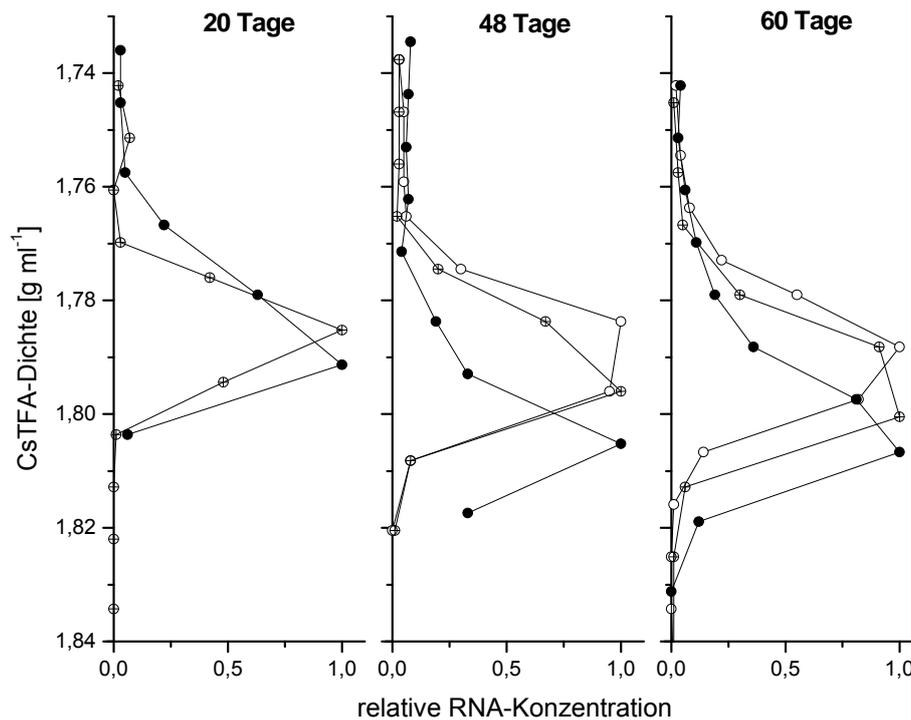
**Abb. 4-15** Konzentration der jeweiligen Fettsäuren (unten) und prozentuale Inkorporation des toluolbür-tigen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobiellen Fettsäuren (oben) nach 60-tägiger Inkubation der Anreicherungskultur ZBT 1 mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol ( $\square$ ), [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol ( $\square$ ) oder [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol ( $\blacksquare$ ) als Kohlenstoff- und Energiequelle.

### Identifizierung der toluolabbauenden Bakterien

Zur Identifizierung der auf den Beads siedelnden toluolabbauenden Mikroorganismen wurde von den Beads nach 20, 40 und 60 Tagen Inkubation RNA extrahiert und einer Caesiumchlo-

rid-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Entsprechend der höheren Schwimmdichte von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA im Vergleich zu unmarkierter  $^{12}\text{C}$ -RNA konnte somit  $^{13}\text{C}$ -markierte von  $^{12}\text{C}$ -RNA separiert werden. Die RNA-Extrakte der  $^{12}\text{C}$ -Toluolproben dienten dabei zur Kontrolle der Dichte von unmarkierter RNA. Die Untersuchung der zeitabhängigen  $^{13}\text{C}$ -Transformation in die 16S rRNA sollte Aufschluss darüber geben, welche Rolle die jeweiligen im Konsortium enthaltenen Spezies bei dem anaeroben Toluolabbau spielen.

Nach 20-tägiger Inkubation konnte aus den Beads der  $^{13}\text{C}$ -Toluolproben RNA isoliert werden, aus der  $^{12}\text{C}$ -Toluolprobe dagegen nicht. Auf Grund dessen wurde für diesen Probenahmezeitpunkt die Dichte der  $^{12}\text{C}$ -RNA, die von den  $^{12}\text{C}$ -Toluolproben nach 48- und 60-tägiger Inkubation ermittelt wurde, als Kontrolle herangezogen. Nach 20-tägiger Exposition zeigte die gesamte RNA der  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol- und  $^{13}\text{C}_7$ -Toluol-Proben im Vergleich zu den Kontrollen eine geringfügige Dichteverschiebung in den schweren Bereich (Abb. 4-16).

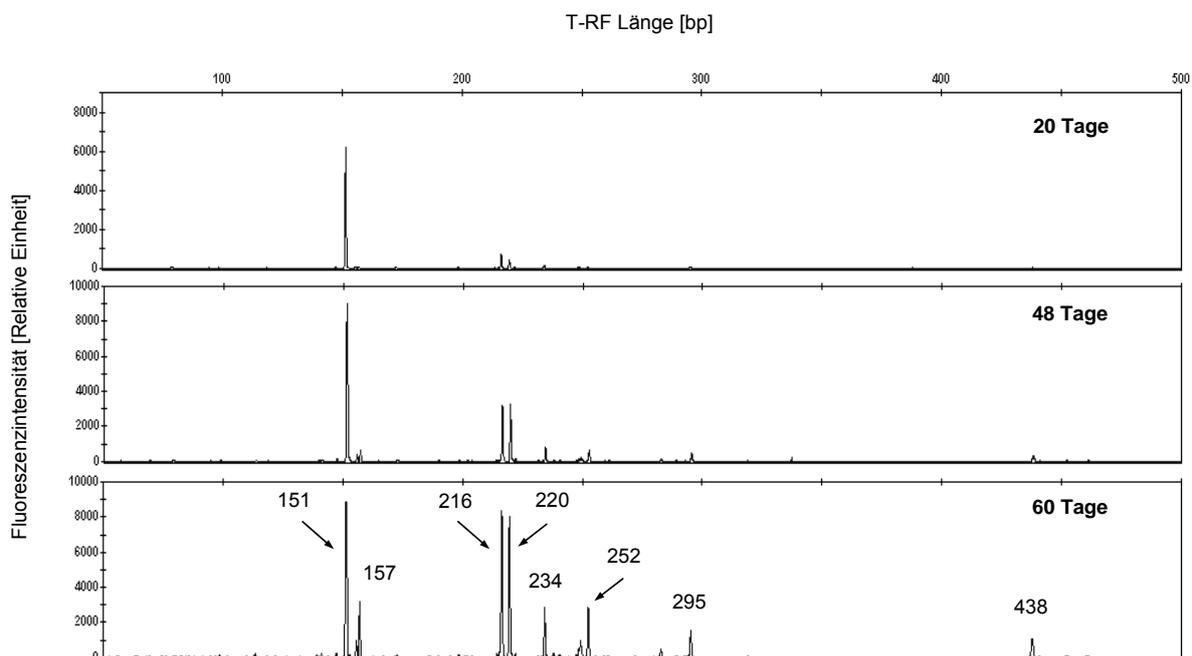


**Abb. 4-16** Quantitative Verteilung der RNA nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die Isolierung der RNA erfolgte direkt von den Beads, die aus den Labormikrokosmen versetzt mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol (○),  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol (⊕) oder  $^{13}\text{C}_7$ -Toluol (●) nach 20, 48 und 60 Tagen Inkubation entnommen wurden. Die quantitative Verteilung der rRNA in den Dichtefractionen wurde fluorometrisch bestimmt.

Im weiteren Verlauf der Inkubation nahm die Dichteverchiebung zu. Mit Erreichen der stationären Phase nach 48-tägiger Inkubation zeigte die RNA der  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol-Proben eine Verschiebung der Dichte in den schweren Bereich von ca.  $0,01 \text{ g ml}^{-1}$ . In den  $^{13}\text{C}_7$ -Toluol-Proben betrug die Dichteverchiebung ca.  $0,02 \text{ g ml}^{-1}$ .

Die Tatsache, dass in den  $^{13}\text{C}$ -Proben bereits nach 20-tägiger Exposition ausschließlich  $^{13}\text{C}$ -markierte RNA vorhanden war, deutet daraufhin, dass alle auf den BACTRAPs siedelnden Mikroorganismen das angebotene  $^{13}\text{C}$ -Toluol assimilierten. Entsprechend dieser Abwesenheit von unmarkierter RNA in den  $^{13}\text{C}$ -Proben zeigten die vergleichenden T-RFLP Profile eines Gradienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Dichtefractionen.

Dahingegen zeigten die T-RFLP Profile im Verlauf der Inkubation eine Zunahme der T-RFs (Abb. 4-17), was die mikrobielle Besiedlung der Beads reflektierte. Nach 20-tägiger Inkubation waren neben dem dominierenden T-RF 151 bp nur geringfügigen Abundanzen der T-RFs 216 bp und 220 bp detektierbar. Dahingegen zeigten die T-RFLP-Profile nach 60-tägiger



**Abb. 4-17** Mikrobielle Besiedlung der Beads während der Kultivierung der Anreicherungskultur ZBT 1. Exemplarisch dargestellt sind RNA-basierende T-RFLP-Profile, die von den Beads der mit  $^{13}\text{C}_7$ -Toluol versetzten Labormikrokosmen nach 20, 48 und 60 Tagen Inkubation erstellt wurden. Die T-RFLP-Profile der mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol und  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -Toluol versetzten Labormikrokosmen zeigten eine übereinstimmende Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft wie auch Dynamik über die Zeit.

Inkubation zum einen eine höhere Abundanz der bereits aufgeführten T-RFs sowie weitere fünf T-RFs (157, 234, 252, 295, 438 bp), welche nach 20-tägiger Inkubation noch nicht vorhanden waren.

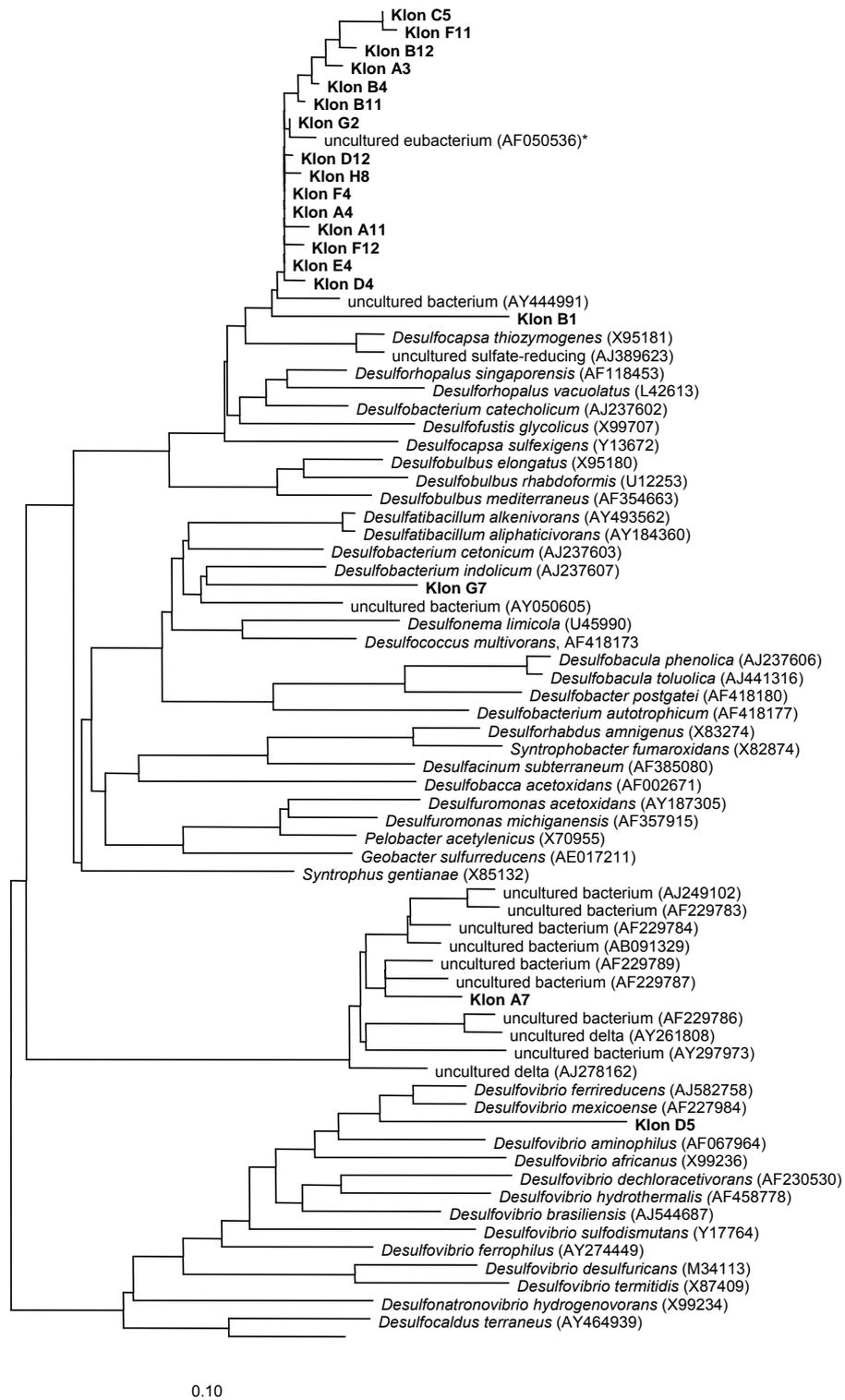
Zur Identifizierung der durch die jeweiligen T-RFs reflektierten Toluolabbauer wurde die RNA des Konsortiums ZBT 1 kloniert. Nach Genotypisierung der Kloninserts mithilfe einer Restriktionsfragmentanalyse wurden 24 Klone der 15 verschiedenen RFLP-Muster (=OTU) sequenziert und phylogenetisch analysiert. Die Zuordnung der Phylotypen zu den charakteristischen T-RFs erfolgte über eine Restriktionsverdau der Klone mit dem Enzym AluI.

**Tab. 4-5** Phylogenetische Zuordnung, Anzahl der Klonsequenzen und charakteristische T-RFs der Klonsequenzen in der Klonbibliothek generiert für die Anreicherungskultur ZBT 1. Die charakteristischen T-RFs wurden durch Verdau der Klone mit AluI bestimmt. Zur Überprüfung wurde ein *in silico* Verdau vorgenommen.

Phylogenetische Gruppe	nächster Verwandter NCBI (mit Accession Number)	Anzahl der Klone	Sequenzhomologie (%)	T-RF (bp)
<b>Anaerolineae</b>				
unclassified <i>Chloroflexi</i>	uncultured bacterium (AB355084.1)	4	98	186
<b>Clostridia</b>				
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i> sp. strain P6 (AY949857.1)	1	93	56
<b>Deltaproteobacteria</b>				
<i>Desulfocapsa</i>	uncultured bacterium (AF050536.1)	85	99	151
<i>Desulfovibrio</i>	uncultured bacterium (DQ443890.1)	3	92	215
unclassified <i>Deltaproteobacteria</i>	uncultured bacterium (EU037976.1)	1	97	153, 218
<i>Desulfobacterium</i>	uncultured bacterium (EF459882.1)	1	91	220
<b>Spirochaetes</b>				
<i>Spirochaeta</i>	uncultured <i>Spirochaeta</i> (AY780558.1)	1	99	239

---

Der Großteil der Klone (89%) zeigte eine 99%ige Sequenzähnlichkeit zu einem unkultivierten Bakterium der Gattung *Desulfocapsa* (Tab. 4-5). Vier Prozent der Klone gruppierten mit der Gattung *Anarolinea* und 3% mit der Gattung *Desulfovibrio*. Die restlichen nur selten detektierten Klone gruppierten innerhalb von *Clostridium* und *Desulfobacterium*, konnten aber keiner spezifischen phylogenetischen Gruppe zugeordnet werden. Abb. 4-18 stellt die phylogenetische Verwandtschaft der identifizierten Klonsequenzen in einem Stammbaum dar.



**Abb. 4-18** Phylogenetische Verwandtschaft der dominanten Klonsequenzen in der Klonbibliothek der Anreicherungskultur ZBT 1. Die identifizierten Klonsequenzen sind fett gedruckt. \* markiert die Sequenz eines unkultivierten Bakteriums der Gattung *Desulfocapsa*, zu dem 89% der detektieren Klonsequenzen 99%ige Sequenzähnlichkeit aufwiesen. Der Maßstabsbalken entspricht einem 10%igen Sequenzunterschied.

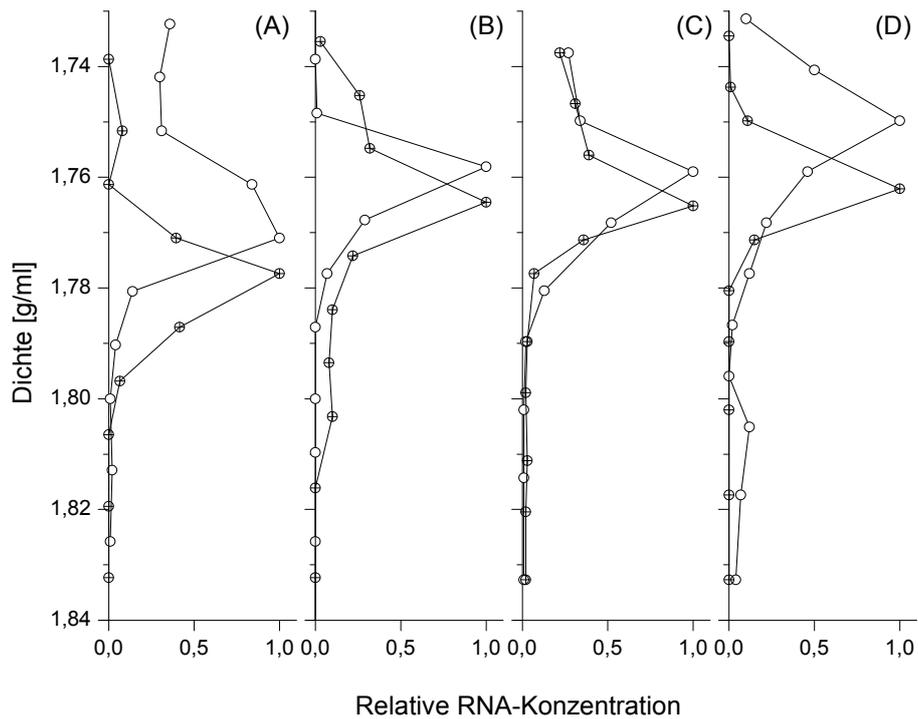
#### 4.4.2 Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen im Zeitzer Grundwasser

Um die toluolabbauenden Mikroorganismen am Feldstandort Zeitz zu identifizieren sowie den Einfluss der Elektronenakzeptoren auf die metabolisch aktiven Mikroorganismen zu untersuchen, wurden mit [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol sowie Nitrat, Sulfat oder Eisen beaufschlagte BACTRAPs für 3 Monate in einem Grundwasserbrunnen am Rande der Schadstofffahne inkubiert. Mit [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol beladene BACTRAPs dienten als Kontrolle. Die Identifizierung der Mikroorganismen erfolgte mithilfe von Dichtegradientenzentrifugation, die eine Separation der  $^{13}\text{C}$ -markierten RNA von der unmarkierten RNA ermöglichte, und anschließender Klonierung und Sequenzierung.

Nach 3-monatiger Inkubation der BACTRAPs im Grundwasser lag in allen  $^{13}\text{C}$ -Proben unabhängig von dem jeweilig angebotenen Elektronenakzeptor ausschließlich  $^{13}\text{C}$ -angereicherte RNA vor (Abb. 4-19, S.106). Dahingegen konnte in den Kontrollen keine  $^{13}\text{C}$ -angereicherte RNA nachgewiesen werden. Die  $^{13}\text{C}$ -Proben wiesen gegenüber den  $^{12}\text{C}$ -Proben eine Dichteverchiebung in den schweren Bereich von 0,1 - 0,2 g ml $^{-1}$  auf, was analog zu den in Labormikrokosmen gewonnenen Erkenntnissen ist (4.4.1). Die Tatsache, dass in den  $^{13}\text{C}$ -Proben ausschließlich  $^{13}\text{C}$ -markierte RNA vorhanden war, deutete daraufhin, dass alle auf den BACTRAPs siedelnden Mikroorganismen das angebotenen  $^{13}\text{C}$ -Toluol assimilierten.

Entsprechend der Abwesenheit von unmarkierter RNA in den  $^{13}\text{C}$ -Proben zeigten die vergleichenden T-RFLP Profile eines Gradienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Dichtefractionen. Signifikante Unterschiede in den T-RFLP-Profilen konnten jedoch, wie in Kap. 4.2.2 beschrieben, in Abhängigkeit von den verschiedenen Elektronenakzeptoren nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung der durch die jeweiligen T-RFs reflektierten Toluolabbauer wurde die von den Nitrat-BACTRAPs extrahierte RNA kloniert. Die T-RFLP-Profile dieser BACTRAPs umfassten alle der auf den unterschiedlichen BACTRAP-Ansätzen detektierten redundanten T-RFs. Eine Überprüfung der Klonierungsergebnisse erfolgte mittels einer zweiten, für die Sulfat-BACTRAPs erstellten, Klonbibliothek. Die Restriktionsfragmentanalyse der Klone ergab 15 verschiedene R-FLP Muster für die Nitrat-BACTRAPs und 14 für die Sulfat-BACTRAPs. Angesichts der in beiden Klonbibliotheken konvergierenden Klonsequenzen erfolgte nur für



**Abb. 4-19** Quantitative Verteilung der RNA nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die Isolierung der RNA erfolgte von BACTRAPs beladen mit Toluol (A), Toluol+Nitrat (B), Toluol+Sulfat (C), Toluol+Eisen (D) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich. (○) bezeichnet die Beladung mit  $[^{12}\text{C}]$ -Toluol und (⊕) mit  $[^{13}\text{C}]$ - $\alpha$ -Toluol. Die quantitative Verteilung der RNA in den Dichtefractionen wurde fluorometrisch bestimmt.

die Klonbibliothek der Nitrat-BACTRAPs eine Restriktionsverdau der Klone zur phylogenetischen Zuordnung der T-RFs.

In beiden Klonbibliotheken zeigten die Sequenzen größtenteils enge Verwandtschaft zu Sequenzen noch unkultivierter Bakterienspezies. Die dominierende Klonsequenz mit einer Häufigkeit von 67% gruppierte innerhalb der Gattungen *Janthinobacterium/Herbaspirillum* (Tab. 4-6). Einzelne Klone (9%) konnten eindeutig der Gattung *Azoarcus* zugeordnet werden. Spezies dieser Gattung sind als Toluolassimilierer unter nitratreduzierenden Bedingungen bekannt (Dolfing et al., 1990; Fries et al., 1994; Rabus and Widdel, 1995; Zhou et al., 1995; Kube et al., 2004). In der für die Nitrat-BACTRAPs erstellten Klonbibliothek zeigte ein geringer Anteil der Sequenzen enge Verwandtschaft zu Sequenzen innerhalb der Gattungen *Rhodoferrax* (8%) und *Duganella* (7%) sowie zu nicht näher klassifizierten *Betaproteobacteria* (6%).

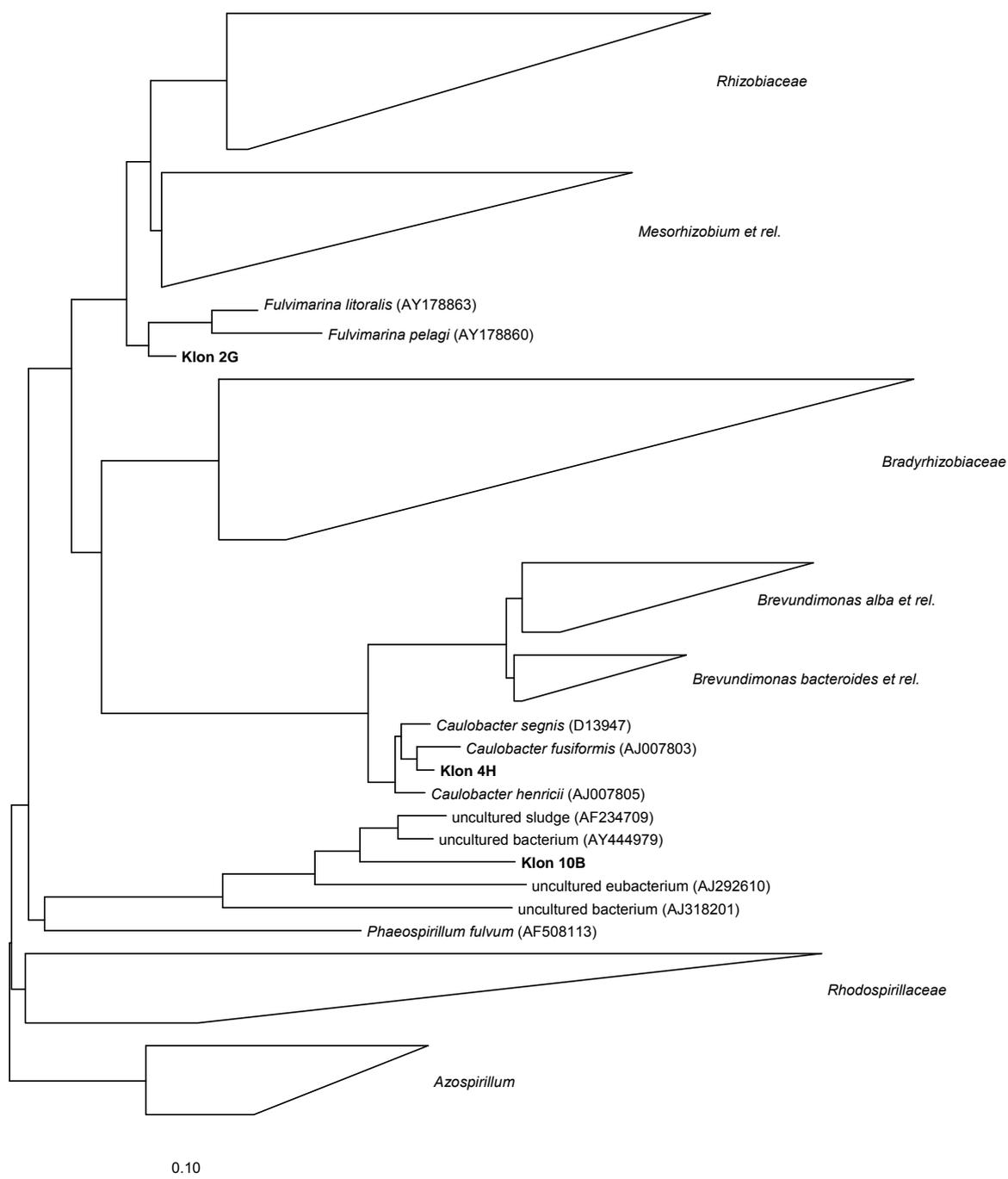
Lediglich zwei Prozent der Klonsequenzen gruppierten nicht innerhalb der Klasse *Betaproteobacteria* sondern wurden den *Deltaproteobacteria* bzw. *Bacteroidetes* zugeordnet.

**Tab. 4-6** Phylogenetische Zuordnung, Anzahl der Klonsequenzen und charakteristische T-RFs der Klonsequenzen in der Klonbibliothek generiert für die mit Toluol+Nitrat beladenen BACTRAPs. Die charakteristischen T-RFs wurden durch Verdau der Klone mit AluI bestimmt. Zur Überprüfung wurde ein in silico Verdau vorgenommen.

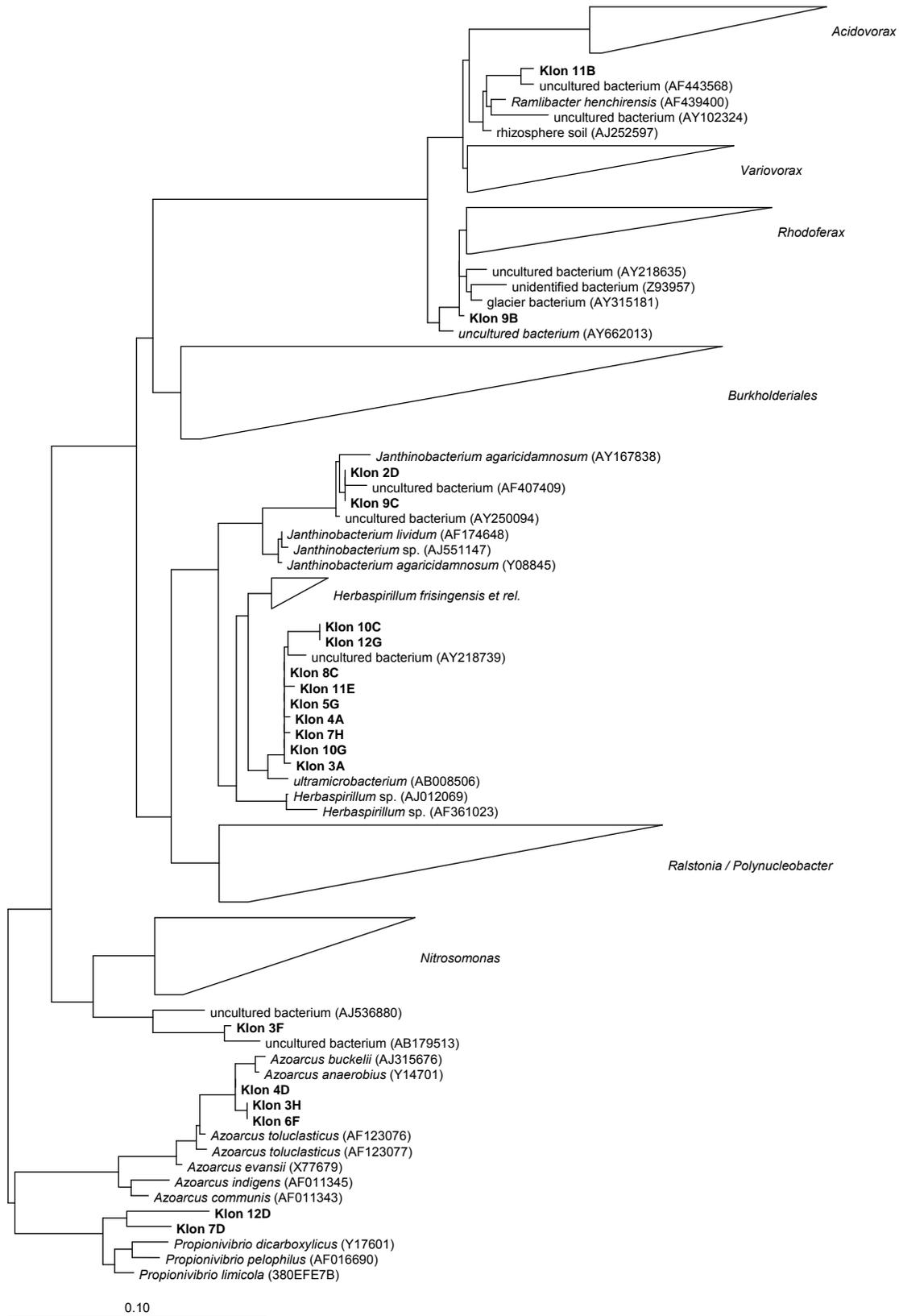
Phylogenetische Gruppe	nächster Verwandter NCBI (mit Accession Number)	Anzahl der Klone	Sequenzhomologie (%)	T-RF (bp)
<b><i>Bacteroidetes</i></b>				
<i>Crenotrichaceae</i>	uncultured freshwater bacterium (DQ065355.1)	1	97	205
<b><i>Betaproteobacteria</i></b>				
<i>Oxalobacteraceae</i> / <i>Duganella</i>	uncultured Bacterium (DQ264450.1)	6	99	61, 229
<i>Janthinobacterium</i> / <i>Herbaspirillum</i>	uncultured Bacterium clone KD5-6 (AY218739.1)	60	99	69, 274
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Rhodoferax ferrireducens</i> (CP000267.1)	7	98	148
<i>Azoarcus</i>	uncultured soil bacterium (DQ378207.1)	8	99	149
unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	uncultured <i>Betaproteobacteria</i> (AM403301.1)	5	99	232
unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	uncultured bacterium (AM158342.1)	1	96	230
<b><i>Deltaproteobacteria</i></b>				
$\delta$ - <i>Proteobacteria</i>	uncultured bacterium (AF495408.1)	1	89	56

Entsprechend der höheren mikrobiellen Diversität auf den Sulfat-BACTRAPs im Vergleich zu den Nitrat-BACTRAPs, war auch die Klonbibliothek mannigfaltiger. Neben der Dominanz *Janthinobacterium*-verwandter Sequenzen (67%) clusterten vereinzelte Sequenzen innerhalb der Gattungen *Azoarcus* (5%), *Duganella* (4%) und *Rhodoferax* (4%), aber auch innerhalb von *Rhodocyclus* (6%) und *Ramlibacter* (4%), welche nicht in der Klonbibliothek der Nitrat-BACTRAPs identifiziert werden konnten. Jeweils eine Klonsequenz konnte keiner Gattung

innerhalb der *Comamonadaceae* bzw. innerhalb der *Betaproteobacteria* zugeordnet werden. Die Klonsequenzen, welche in der für die Nitrat-BACTRAPs erstellten Klonbibliothek mit Sequenzen der *Deltaproteobacteria* sowie *Bacteroides* gruppierten, wurden in der Klonbibliothek der Sulfat-BACTRAPs nicht gefunden. Indes zeigten vereinzelte Klone Sequenzähnlichkeiten zu unkultivierten Spezies der Gattungen *Caulobacter* (1%), *Mesorhizobium* (1%) sowie der Familie *Sphingomonadaceae* (3%) innerhalb der *Alphaproteobacteria*. Drei Klone wiesen Sequenzähnlichkeiten mit einem unkultivierten Bakterium auf, welches bisher keiner phylogenetischen Gruppe näher zugeordnet werden konnte. Exemplarisch für die Klonbibliothek der Sulfat-BACTRAPs sind in Abb. 4-20 und Abb. 4-21 die Gruppierung der Klonsequenzen innerhalb der *Alpha*- und *Betaproteobacteria* dargestellt.

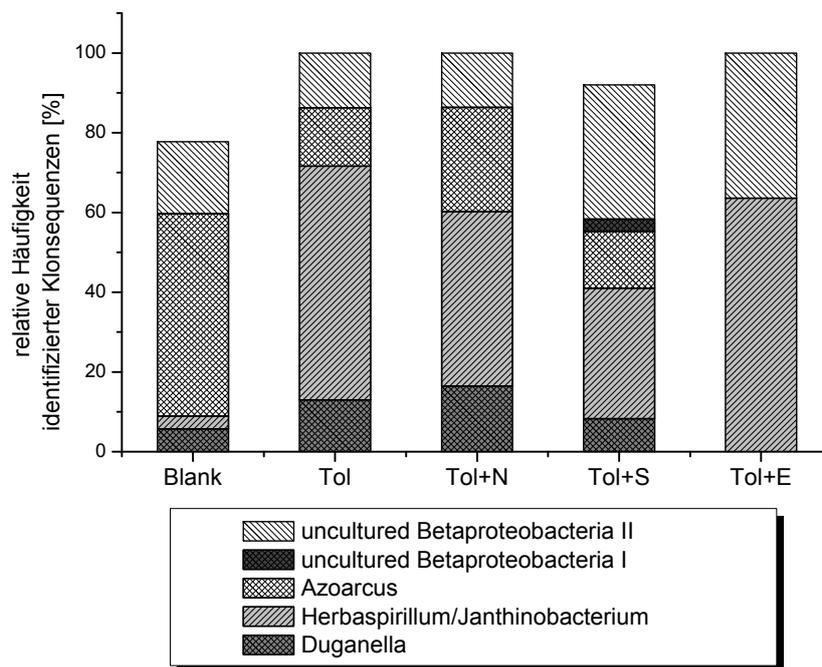


**Abb. 4-20** Phylogenetische Verwandtschaft der aus den BACTRAPs Toluol+Sulfat gewonnenen Klonsequenzen innerhalb der *Alphaproteobacteria*. Die identifizierten Klonsequenzen sind fett gedruckt. Der Maßstabsbalken entspricht einem 10%igen Sequenzunterschied.



**Abb. 4-21** Phylogenetische Verwandtschaft der aus den BACTRAPs Toluol+Sulfat gewonnenen Klonsequenzen innerhalb der *Betaproteobacteria*. Die identifizierten Klonsequenzen sind fett gedruckt. Der Maßstabsbalken entspricht einem 10%igen Sequenzunterschied.

Unter Vernachlässigung der hinreichend bekannten Fehlerquellen bei der Interpretation von T-RFLP-Profilen, welche die verschiedenartige Amplifizierbarkeit von rRNA, die Variationsbreite der Kopienzahl mikrobieller 16S rRNA Gene und die Formation von Sequenzartefakten während der PCR umfassen (Suzuki and Giovannoni, 1996; v. Wintzingerode et al., 1997; Fogel et al., 1999; Kitts, 2001; Lueders and Friedrich, 2003; Frey et al., 2006), würde sich für die verschiedenartig beladenen BACTRAPs die in Abb. 4-22 dargestellte prozentuale Verteilung der Organismen ergeben:



**Abb. 4-22** Prozentuale Verteilung der Organismen in den BACTRAPs beladen mit Toluol (A), Toluol+Nitrat (B), Toluol+Sulfat (C), Toluol+Eisen (D) nach 3-monatiger Exposition im niedrigkontaminierten Grundwasserbereich. Die relativen Häufigkeiten der Organismen basieren auf den relativen Häufigkeiten detektierter T-RFs, denen mithilfe der Klonbibliotheken Klonsequenzen zugeordnet wurden.

Während die mikrobielle Gemeinschaft der Blanks vorrangig durch Spezies der Gattung *Azoarcus* oder nahe verwandter Organismen geprägt scheint, dominieren in den Toluol-BACTRAPs vorrangig Spezies der Gattungen *Herbaspirillum* und/oder *Janthinobacterium* sowie bis dato unbekannte Spezies, die innerhalb der *Betaproteobacteria* nicht näher zugeordnet werden konnten. Des Weiteren scheint *Duganella* außer bei den Eisen-BACTRAPs eine wichtige Rolle zu spielen.

## 5 Diskussion

Vor dem Hintergrund der zahlreichen sanierungsbedürftigen Altlastenstandorte, denen augenblicklich nur kostenintensive Sanierungstechnologien mit oftmals unzureichenden Sanierungserfolgen gegenüberstehen, ist in den letzten Jahren das Interesse an der Nutzung natürlicher Rückhalte- und Abbauprozesse für die Sanierung schadstoffbelasteter Standorte stark gestiegen. Da im Zusammenhang mit diesen Prozessen nur der mikrobielle Abbau zu einer nachhaltigen Reduktion der Schadstoffmasse im Aquifer führt, ist dessen Nachweis und Quantifizierung für die Implementierung der natürlichen Selbstreinigungsprozesse in die Sanierungspraxis unabdingbar. Hieraus resultiert ein großer Bedarf an der Entwicklung geeigneter *in situ* Methoden, mithilfe derer die natürlichen Selbstreinigungsprozesse am jeweiligen Feldstandort beurteilt werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte die Eignung von *in situ* Mikrokosmen (BACTRAPs) zum Monitoring mikrobieller Gemeinschaften und zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus dargelegt werden. Durch Beladung der BACTRAPs mit  $^{13}\text{C}$ -Toluol sowie potentiellen Elektronenakzeptoren konnten Kenntnisse über die Limitationen terminaler Elektronenakzeptoren und damit auch mikrobieller Abbaupotentiale im Untergrund gewonnen werden. Durch Verwendung der Stable Isotope Probing Technik wurden neue toluolabbauende Mikroorganismen sowohl in einem Konsortium, welches erfolgreich mithilfe der BACTRAPs angereichert wurde, sowie direkt am Standort identifiziert.

### 5.1 BACTRAPs als *in situ* Methode für die Untersuchung des mikrobiellen Schadstoffabbaus

Auf die Relevanz von *in situ* Mikrokosmen zum Studium sessiler mikrobieller Gemeinschaften in Grundwasserökosystemen wurde bereits mehrfach in der Literatur hingewiesen (Mandelbaum et al., 1997). Denn einerseits können, im Gegensatz zu Labormikrokosmen, die Gemeinschaften unter *in situ* Bedingungen untersucht und andererseits neue kostenintensive Bohrungen der Grundwassersedimente vermieden werden.

Für das verwendete BACTRAP-System konnte im Rahmen der Dissertation eine gute Eignung für die Untersuchung schadstoffabbauender Mikroorganismen nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass die BACTRAPs während der Exposition im Grundwasser rasch durch unterschiedliche Morphotypen besiedelt wurden. Die starke Ähnlichkeit der mikrobiellen Gemeinschaften parallel exponierter BACTRAPs demonstrierte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Deutlich wurden jedoch auch, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft sowie die Gesamtbiomasse eine ausgeprägte zeitliche Dynamik aufwiesen, so dass diese Daten ein Sukzessionsstadium der mikrobiellen Gemeinschaft auf den BACTRAPs reflektieren.

Ähnliche Besiedlungsexperimente wurden bisher mit Objektträgern (Cecile, 1998) und vor allem sterilen Sedimenten als Besiedlungsoberfläche durchgeführt (Hirsch and Rades-Rohkohl, 1990; Alfreider et al., 1997; Griebler et al., 2002; Hendrickx et al., 2005). Letztere wurden in Gitterkörbchen (Alfreider et al., 1997), speziellen Glasgefäßen (Hirsch and Rades-Rohkohl, 1990), Metallgittern (Griebler et al., 2002) oder Polyamidmembranen (Hendrickx et al., 2005) im Grundwasserpegel exponiert, die einen Austausch mit dem umgebenden Grundwasser erlaubten. Ein weiterer Ansatz basierte auf der Exposition von kleinen Kammern, bestehend aus semipermeablen Membranen, die durch Einspeisung von verschiedenen Nährstoffen und Elektronenakzeptoren die Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften unter verschiedenen geochemischen Bedingungen ermöglichten (Mandelbaum et al., 1997).

Mehrfach wurde in der Literatur jedoch darauf hingewiesen, dass die Verwendung von *in situ* Mikrokosmen zu artifiziellen Ergebnissen führen kann (Bennett et al., 2000; Griebler et al., 2002). Denn einerseits werden künstliche Materialien verwendet und andererseits werden diese im Pegelwasser inkubiert, welches in seiner Beschaffenheit und in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft meist nicht der des umgebenden Sedimentporenwassers entspricht. Da 90-99% aller Bakterien in unberührten wie auch schadstoffbelasteten Aquiferen sedimentassoziiert sind (Kölbel-Boelke et al., 1988; Hazen et al., 1991; Alfreider et al., 1997; Griebler et al., 2002), kann eine Besiedlung von *in situ* Mikrokosmen ausschließlich durch sessile Mikroorganismen erfolgen, die von den Biofilmen der Sediment- und Partikeloberflächen losgelöst im umgebenden Grundwasser sind.

Dieser grundsätzliche Schwachpunkt von *in situ* Mikrokosmen bestätigte sich auch für die BACTRAPs. Der Vergleich von T-RFLP-Profilen, die von Grundwassersedimenten und zeitgleich im horizontalen Abstand von ca. 30 cm exponierten BACTRAPs angefertigt wurden, offenbarte eine deutlich geringere Diversität auf den BACTRAPs als in den Sedimentproben (unveröffentlichte Daten der Departments für Bioremediation und Isotopenbiogeochemie, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig). Die mikrobielle Gemeinschaft im Pegelwasser war dagegen nahezu identisch zu der auf den BACTRAPs (Kästner et al., 2006).

Trotz dieser Einschränkung gewährleisteten BACTRAPs die Untersuchung mikrobieller Prozesse direkt im Grundwasser-Ökosystem, während konventionelle Labormikrokosmen-Studien einzelne Organismen losgelöst von jenen komplexen Wechselbeziehungen betrachten, die die Aktivität der Mikroorganismen im jeweiligen Habitat maßgeblich beeinflussen (Meckenstock, 1999; Vogt et al., 2005). Alternativ könnte die mikrobielle Gemeinschaft der Grundwassersedimente untersucht werden. Jedoch sind, wie bereits erwähnt, die erforderlichen Bohrungen extrem kosten- und zeitintensiv und eine Wiederholung der Beprobung an gleicher Messstelle ist nicht möglich (Griebler et al., 2002).

Im Hinblick auf das angebotene Toluol konnte eine substratabhängige Besiedlung nachgewiesen werden. Die SSCP-Analytik der mikrobiellen Gemeinschaft lieferte Indizien dafür, dass eine spezifische toluolabbauende Bakteriengemeinschaft auf den Toluol beladenen BACTRAPs siedelte, während die Gemeinschaft auf den unbeladenen BACTRAPs von diversen sessilen Grundwasserspezies geprägt wurde.

Im Gegensatz zu bisherigen *in situ* Mikrokosmen, welche ausschließlich zum Studium sessiler mikrobieller Gemeinschaften eingesetzt wurden (Hirsch and Rades-Rohkohl, 1990; Alfreider et al., 1997; Mandelbaum et al., 1997; Griebler et al., 2002; Hendrickx et al., 2005), ermöglicht das BACTRAP-System durch Kombination mit isotopisch markierten Tracersubstanzen ( $^{13}\text{C}$ ) die Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften mit spezifischen metabolischen Fähigkeiten. Durch den Einbau des isotopisch markierten Kohlenstoffes in die Biomasse, wie z.B. Fettsäuren, können Mikroorganismen gezielt spezifischen Stoffwechselprozessen zugeordnet werden. Voraussetzung für diese Strategie ist eine geringe Polarität der Tracersubstanz, welche an der

hydrophoben Oberfläche der Beads bindet. Darüber hinaus ist eine Zuordnung nur möglich, wenn die Mikroorganismen das  $^{13}\text{C}$ -Substrat als Kohlenstoffquelle nutzen, was beispielsweise bei der Untersuchung reduktiver Dechlorierungsprozesse nicht gegeben ist.

Für Benzol und Toluol konnte gezeigt werden, dass die Beadmatrix beide Substanzen stark adsorbiert und, wie anhand der ermittelten Desorptionskinetiken abgeleitet werden konnte, die Desorption von den Beads nur langsam erfolgt. Demzufolge ist eine Bioverfügbarkeit der Substrate in den Beads während der 3-monatigen *in situ* Inkubation gewährleistet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die ermittelten Desorptionskinetiken nur eine Näherung darstellen, da während der Versuchsdurchführung der desorbierte Anteil nicht wie unter *in situ* Bedingungen mit dem Grundwasserstrom abtransportiert, sondern die Wasserphase in regelmäßigen Abständen ausgetauscht wurde. Zudem beeinflusste das im Grundwasser vorhandene Toluol und Benzol die Desorption. Obgleich unter Verwendung einer Durchflusszelle (Harms and Zehnder, 1995) eine exaktere Beschreibung der Desorptionskinetiken möglich wäre, stellt die getroffene Näherung der Kinetiken eine ausreichende Grundlage für die Beurteilung der Bioverfügbarkeit beider Substrate dar.

## 5.2 Beurteilung der mikrobiellen Abbaupotentiale

In vielen schadstoffbelasteten Aquiferen ist die Bioverfügbarkeit terminaler Elektronenakzeptoren limitiert (Wiedemeier et al., 1999), so dass ein biologischer Sanierungsansatz oftmals einer Stimulation der mikrobiellen Abbaupotentiale durch Zugabe entsprechender TEAs bedarf. Solche Sanierungsmaßnahmen wurden bisher häufig in Labormikrokosmen getestet (Lovley et al., 1994a; Lovley et al., 1995; Ball and Reinhard, 1996; Weiner et al., 1998; Burland and Edwards, 1999; Coates et al., 2001). Jedoch ist die Übertragbarkeit der so ermittelten Erkenntnisse auf den Feldstandort limitiert, da nur wenige Mikroorganismen bis heute kultivierbar sind (Amann et al., 1995) und Laborexperimente nicht die komplexen Wechselwirkungen in der Natur widerspiegeln können (Meckenstock, 1999; Vogt et al., 2005). Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der Dissertation das BACTRAP-System als *in situ* Methode zur Charakterisierung mikrobieller Abbaupotentiale erprobt.

Dazu wurde in einer ersten Studie die Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft nach Zugabe potentieller TEAs untersucht (5.2.1). Ziel einer weiterführenden Untersuchung war, den Einfluss der TEAs auf den mikrobiellen Toluolumsatz zu ermitteln (5.2.2). Als Verfahren wurden BACTRAPs eingesetzt, welche sowohl mit Toluol als Kohlenstoff- und Energiequelle als auch Nitrat, Sulfat oder Eisen als terminale Elektronenakzeptoren beladen wurden.

### **5.2.1 Einfluss der Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat und Eisen auf die mikrobielle Gemeinschaft**

Die Analytik mikrobieller Phospholipidfettsäuren und respiratorischer Chinone in Kombination mit Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie belegten übereinstimmend, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften und die mikrobiellen Biomassen von dem jeweilig angebotenen Elektronenakzeptor wesentlich beeinflusst wurden. Solche Dynamiken der mikrobiellen Gemeinschaft wurden bereits mehrfach in der Literatur für Biostimulationsstudien beschrieben (Roeling et al., 2002; Wenderoth et al., 2003; Sublette et al., 2006). Da in allen verschiedenartigen Ansätzen die gleichen Fettsäuren und Chinone gefunden wurden, jedoch deren relativen Häufigkeiten in Abhängigkeit von den TEAs variierten, wurde folgende Hypothese erhoben: Während der *in situ* Inkubation der BACTRAPs wird die Beadmatrix von diversen Bakterien aus dem umgebenden Grundwasser besiedelt, deren Aktivität maßgeblich durch die angebotenen Elektronenakzeptoren beeinflusst wird. Inwieweit die Stimulation der mikrobiellen Aktivität mit einem beschleunigten Toluolabbau einhergeht, konnte im Rahmen dieses Versuches nicht geklärt werden, war jedoch Gegenstand des weiterführenden Feldexperimentes (5.2.2).

Es erwies sich als schwierig, anhand der gemessenen Biomasse mengen den für die Biostimulation bedeutendsten TEA zu ermitteln. Während die Analyse von Phospholipidfettsäuren auf Nitrat als wichtigsten TEA deutete, wies die Chinonanalytik und Laser Scanning Microscopy auf Eisen. Auch wenn alle drei verwendeten Methoden in der Literatur als Methoden zur Quantifizierung mikrobieller Biomasse beschrieben sind (Vestal and White, 1989; White, 1993; White et al., 1996; Hiraishi, 1999; Hiraishi et al., 2003; Findlay, 2004; Staudt et al., 2004), muss jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse die unterschiedliche Herangehens-

weise der Methoden berücksichtigt werden. Phospholipidfettsäuren und respiratorische Chinone beruhen auf der biochemischen Analyse von Zellkompartimenten, während bei der Laser Scanning Mikroskopie das visualisierte Biovolumen zu Grunde liegt. Die Schwierigkeit, Biomassen, die mithilfe biochemischer Quantifizierungsmethoden ermittelt wurden, in Zellzahlen umzurechnen, wurde in einer Studie von White et al. (1995) diskutiert. Bedingt durch die natürliche und nährstoffbedingte Variation der Zellgrößen ist ein universeller Faktor zur Umrechnung des Lipidgehaltes in Zellzahlen oder Trockenmasse problematisch. Ein Vergleich der, mithilfe von Phospholipidfettsäuren und Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ermittelten Biomasse, wurde im Rahmen einer Studie zur Untersuchung mikrobieller Besiedlung von Seegräsern (Kusel et al., 1999) konzipiert. Dies war jedoch wegen starker Autofluoreszenz der Proben in dieser Studie nicht möglich. Demzufolge sollten die verschiedenen Methoden nicht vergleichend betrachtet werden, sondern in Kombination. Daraus ergibt sich ein wertvolles Instrumentarium, um mikrobielle Gemeinschaften qualitativ, quantitativ als auch physiologisch zu charakterisieren, sowie die Dynamiken der mikrobiellen Gemeinschaften zu erfassen.

Die Fettsäureanalyse zeigte im Vergleich zu einem früheren BACTRAP-Experiment am gleichen Standort, das im oberen Grundwasserleiter am Rande der Schadstofffahne durchgeführt wurde (Geyer et al., 2005), eine äußerst geringe Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft. So konnten lediglich vier verschiedene gesättigte Fettsäuren detektiert werden. Dieses Phänomen ist möglicherweise auf die hohen Benzolkonzentrationen ( $90 \text{ mg l}^{-1}$ ) in dem Untersuchungsbrunnen zurückzuführen. Zahlreiche Studien demonstrierten für verschiedene Habitate eine verminderte Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft infolge von Schadstoffeinträgen (Juck et al., 2000; Roeling et al., 2002; Fahy et al., 2005a; Hendrickx et al., 2005). Dazu kommt, dass das hohe Maß an gesättigten Fettsäuren ein Indiz für die Adaption der mikrobiellen Gemeinschaften an die hohen Schadstoffkonzentrationen ist. Nachweislich beeinträchtigen hydrophobe Lösungsmittel wie z.B. Benzol und Toluol die Fluidität der Zellmembran (Sikkema et al., 1995). Um dem entgegenzuwirken, können Bakterien u.a. den Sättigungsgrad der Membranfettsäuren erhöhen (Ingram, 1976). Gesättigte Fettsäuren weisen eine höhere Schmelztemperatur als ungesättigte auf, so dass folglich die Membranfluidität sinkt. Diese Adaptionstrategie wurde sowohl für aerobe als auch anaerobe Bakterienspezies beschrieben, welche Toluol

bzw. Benzol tolerieren oder metabolisieren (Heipieper and de Bont, 1994; Gutiérrez et al., 2003).

Die hohen Toluolkonzentrationen, mit denen die Beads beladen waren, sind als Ursache für die geringe Diversität auszuschließen, da in diversen BACTRAP-Studien zahlreiche ungesättigte Fettsäuren detektiert wurden (Büning et al., 2005; Geyer et al., 2005; Kästner et al., 2006; Stelzer et al., 2006a; Stelzer et al., 2006b).

Als Ursache für die geringe Diversität müssen auch methodische Aspekte der Fettsäureanalyse in Erwägung gezogen werden. Während im Rahmen dieses Versuches die Extraktion der Fettsäuren alleinig nach der Bligh&Dyer-Methode (3.8.4) erfolgte, wurde dieser Methode in späteren Versuchen eine Dichlormethanextraktion vorgeschaltet, wodurch die Fettsäureausbeute verdoppelt und eine effizientere Extraktion der ungesättigten Fettsäuren erzielt wurde. Dieser methodische Aspekt wird durch die Tatsache bekräftigt, dass die Membranlipide aller Mikroorganismen typischerweise auch ungesättigte Fettsäuren enthalten, welche jedoch in dem hier dargestellten Versuch nicht detektiert wurden.

Bezug nehmend auf eine Klassifikation der Mikroorganismen konnten die dominierenden Menachinone 9 und 10 keiner phylogenetischen Gruppe näher zugeordnet werden. Menachinon 9 wurde bisher in *Desulfonema*, *Rhodospirillaceae*, *Bacteroides* und *Corynebacteria* gefunden, während Menachinon 10 ein charakteristisches respiratorisches Chinon in *Rhodospirillaceae*, *Bacteroides*, *Corynebacteria* und *Hydrogenobacter* ist (Collins and Jones, 1981; Hiraiishi, 1999). Eine phylogenetische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft war auch mit der Phospholipidfettsäureanalyse nicht möglich, da gesättigte Fettsäuren ubiquitär im Reich der Bakterien vorkommen (Zelles, 1999; Ruess et al., 2002).

## **5.2.2 Stimulation des biologischen Abbaus durch Zugabe von Elektronenakzeptoren**

Ziel der weiterführenden Untersuchung war es, den Einfluss der TEAs auf den Toluolumsatz zu untersuchen. Hierzu wurde die <sup>13</sup>C-Anreicherung in mikrobiellen Fettsäuren, die von den mit unterschiedlichen TEAs beladenen BACTRAPs extrahiert wurden, ermittelt und mitein-

ander verglichen. Die T-RFLP- und Fettsäure-Profile sollten die unterschiedlichen Entwicklungen der mikrobiellen Gemeinschaften aufzeigen.

Die Fettsäuremuster zeigten in Übereinstimmung mit den T-RFLP-Profilen, dass sich eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft auf den BACTRAPs entwickelte, deren Struktur sichtlich von den angebotenen Elektronenakzeptoren geprägt wurde. Wie anhand der vergleichenden Fettsäuremuster hergeleitet werden konnte, zeigte Eisen sowohl im Hinblick auf die Menge der Biomasse als auch der Zusammensetzung des mikrobiellen Konsortiums den größten Effekt. Gleichfalls wurden mithilfe der T-RFLP-Profile deutlich verschiedenartige Gemeinschaften in den Eisen- wie aber auch Sulfat-BACTRAPs gegenüber den BACTRAPs ohne TEA-Beladung gefunden. Diese Resultate deuteten darauf hin, dass das angebotene Eisen und Sulfat die indigenen zur Sulfat- und Eisenreduktion befähigten Bakterien stimulierten. Nitrat hingegen zeigte keinen Effekt auf die mikrobielle Gemeinschaft.

Im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch (5.2.1) konnte aufgrund des verwendeten  $^{13}\text{C}$ -Substrates der direkte Nachweis des mikrobiellen Metabolismus von Toluol erbracht werden. In sämtlichen mit  $^{13}\text{C}$ -Toluol beladenen BACTRAPs wurden signifikante  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in den mikrobiellen Fettsäuren gefunden. Dies verifiziert zweifellos den mikrobiellen Abbau des  $^{13}\text{C}$ -Toluols, welcher mit einer Transformation des Toluols in die mikrobielle Biomasse einhergeht. Die Tatsache, dass nahezu alle detektierten Fettsäuren signifikante  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen aufwiesen, lässt auf die Anreicherung eines spezifischen toluolabbauenden Konsortiums schließen. Diese Annahme wird durch die Fettsäure- und T-RFLP-Profile bekräftigt. Die Blanks zeigen sowohl hinsichtlich der Biomassemenge als auch Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft massive Unterschiede im Vergleich zu den BACTRAPs mit Toluolbeladung.

Anhand der Quantifizierung des in die Fettsäuren inkorporierten  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes konnte der Einfluss der TEAs auf die metabolischen Aktivitäten der Mikroorganismen abgeleitet werden. So wurde der höchste Toluolumsatz, reflektiert durch die höchsten  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen, in den Eisen-BACTRAPs beobachtet. Dieses Ergebnis war überraschend, da in den Untersuchungsbrunnen eine starke Zehrung des Sulfates im Vergleich zu den nicht

kontaminierten Grundwasserbereichen vorlag, so dass Sulfatreduktion als abbaurelevanter Prozess vermutet wurde. Vorangegangene Isotopenfraktionierungsstudien am Standort Zeitz wiesen ebenfalls die Dominanz dieses Prozesses nach (Fischer et al., 2004; Vieth et al., 2005). Dagegen wurden Methanogenese und Eisenreduktion nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben (Fischer et al., 2004; Wachter et al., 2004). Sowohl der geringe Eisengesamtgehalt der Grundwassersedimente am Standort ( $1,63 \pm 4,05$  mg Fe(III) pro Gramm Sediment) (Dethlefsen et al., 2004a) wie auch der geringe Eisen(II)-Gehalt von  $0,05$  mg l<sup>-1</sup> in der Messstelle lieferten keinen Hinweis auf Eisenreduktion. Allerdings kann die Fällung von Fe(II) durch Sulfid zu einer Unterschätzung der Eisenreduktion führen oder bioverfügbares Eisen stellte den limitierenden Faktor dar (Tuccillo et al., 1999; Dethlefsen et al., 2004b), was die ermittelten Ergebnisse bestätigen würde. Generell ist Eisenreduktion als wichtiger Prozess bei der Metabolisierung von BTEX-Verbindungen bereits beschrieben (Heidrich et al., 2004; Jahn et al., 2005; Vieth et al., 2005), wobei dessen Relevanz und Potential in kontaminierten Grundwasserleitern möglicherweise unterschätzt wird. Mithilfe der Eisen-BACTRAPs konnten für den Standort Zeitz die Relevanz wie auch das Potential der Eisenreduktion für den mikrobiellen Toluolabbau unter den gegebenen Milieubedingungen eindeutig nachgewiesen werden.

Anhand der dargelegten Studie konnte gezeigt werden, dass sich BACTRAPs, beladen mit einer Kohlenstoff- und Energiequelle sowie verschiedenen Elektronenakzeptoren, zur Evaluierung mikrobieller Abbaupotentiale eignen. Als nachteilig erweisen sich bisher die verschiedenen Desorptionskinetiken der Elektronenakzeptoren. Während Eisen nur schwer wasserlöslich und infolgedessen über einen langen Zeitraum für die Mikroorganismen auf den BACTRAPs bioverfügbar ist, belegten Desorptionsversuche im Labor, dass Nitrat und Sulfat innerhalb weniger Tage von den BACTRAPs desorbieren (unveröffentlichte Daten). Dennoch wurde in einem weiteren Feldexperiment am Rande der Schadstofffahne, jedoch unter anderen geochemischen Milieubedingungen als in den dargestellten Untersuchungen, eindeutig die höchste Biomasse auf den mit Nitrat beladenen BACTRAPs detektiert (unveröffentlichte Daten), was in dem Versuch auf die Relevanz des Nitrats für die mikrobiellen Aktivitäten hindeutete. Unter Berücksichtigung der generellen Problematik von künstlichen *in situ* Mikrokosmen-Systemen kann das vorgestellte System wertvolle Informationen für die Kon-

zeption einer Enhanced Natural Attenuation Sanierungsmaßnahme liefern. Es gibt Aufschluss über grundsätzliche Abbaupotentiale bzw. geeignete TEAs, die zu einer Steigerung des vorhandenen mikrobiellen Abbauvermögens führen.

### 5.3 Abschätzung des mikrobiellen *in situ* Schadstoffabbaus mithilfe von BACTRAPs

Die Abschätzung des mikrobiellen *in situ* Schadstoffabbaus auf den BACTRAPs mithilfe des vorgestellten Quantifizierungsmodells illustrierte eine starke Streuung der ermittelten Schadstoffumsätze. Ausschlaggebend dafür war die enorme Variationsbreite der ermittelten Fettsäure basierenden Ertragskoeffizienten.

Generell wiesen die sulfatreduzierenden Modellorganismen um eine Zehnerpotenz niedrigere Erträge als die nitratreduzierende Kultur auf. Konventionelle Ertragskoeffizienten, die den Zusammenhang der Zunahme von Trockenmasse je Substratverbrauch beschreiben, sind in der Literatur für nitratreduzierende Toluolabbauer mit 0,4 - 0,6 (Goudar and Strevett, 1998; Spormann and Widdel, 2001) und für sulfatreduzierende Bakterien mit 0,1 - 0,3 (Edwards et al., 1992; Spormann and Widdel, 2001) beschrieben. Unter der Maßgabe, dass Fettsäuren 1-4% des Trockengewichtes darstellen (Nordstrom and Laakso, 1992) und die Wiederfindungsrate der auf den Beads formierten Gesamtlipidfettsäuren 26% ( $\pm 5$ ) beträgt (unveröffentlichte Daten), wurden für die Fettsäuren Ertragskoeffizienten im Bereich von  $6,2 \cdot 10^{-3}$  bis  $2,6 \cdot 10^{-4}$  erwartet. Diese hypothetischen Erträge wurden tatsächlich für *Azoarcus* sp. und *Desulfobacterium cetonicum* beobachtet, jedoch nicht für das sulfatreduzierende Konsortium ZBT 1, welches im Vergleich zu *Desulfobacterium cetonicum* vierfach geringere Erträge aufzeigte.

Da die kalkulierten Abbauraten bei Verwendung der für die sulfatreduzierenden Modellorganismen bestimmten  $Y_{TLFA/S}$  teilweise die ursprüngliche Beladungsmasse überstiegen, führten diese Ertragskoeffizienten offenkundig zu einer Überschätzung des mikrobiellen Toluolumsatzes in dem Feldexperiment. Dies impliziert, dass sich die Fettsäure basierenden Erträge in dem Feldexperiment zwischen denen für die nitrat- und sulfatreduzierenden Mikroorganismen bestimmen befinden. Die Abschätzung der mikrobiellen Toluolumsätze mit dem vorlie-

genden Modell liefert also Werte in einem geeigneten Rahmen, auch wenn zu dem jetzigen Zeitpunkt nur eine sehr grobe Abschätzung der mikrobiellen Schadstoffumsätze getroffen werden kann.

Bisherige BACTRAP-Studien erbrachten den qualitativen Nachweis des mikrobiellen *in situ* Abbaus jedoch ohne Aussicht auf eine Massenbilanz. Lediglich Kästner et al. (2006) näherte sich einer Abschätzung der mikrobiellen Schadstoffumsätze auf den BACTRAPs an: Diese erste Grobabschätzung, basierend auf der Analytik der Isotopenanreicherung in mikrobiellen Fettsäuren nach Inkubation von  $^{13}\text{C}$ -Toluol oder  $^{13}\text{C}$ -Benzol beladenen BACTRAPs, verdeutlichte die Relevanz von Ertragskoeffizienten auf Grundlage von Fettsäuren. Die dargelegte Studie lieferte erste Anhaltspunkte bezüglich der mikrobiellen Abbaupotentiale am jeweiligen Standort. Weitere Studien sind erforderlich, um anderweitige Ertragskoeffizienten, speziell für eisenreduzierende Mikroorganismen, zu bestimmen und die Eignung des vorgestellten Quantifizierungsmodells zu evaluieren. Zweifellos können die ermittelten Schadstoffumsätze aufgrund der inhärenten Eigenschaften von künstlichen *in situ* Mikrokosmen-Systemen nicht ohne weiteres auf die Feldsituation übertragen werden. Eine weitere Einschränkung stellt die Tatsache dar, dass keine Ertragskoeffizienten für die jeweiligen Keyplayer des Standortes existieren.

## **5.4 Identifizierung der toluolabbauenden Mikroorganismen**

### **5.4.1 Identifizierung der Toluolabbauer in Labormikrokosmen**

Zur Anreicherung schadstoffabbauender Grundwasserbakterien wurden bisher entweder Grundwasser (Harms et al., 1999; Kasai et al., 2006) oder Sedimentmaterial (Beller et al., 1996; Kleikemper et al., 2002; Jahn et al., 2005) verwendet. Da 90-99% aller Bakterien in unberührten wie auch schadstoffbelasteten Aquiferen sediment-assoziiert sind (Kölbel-Boelke et al., 1988; Hazen et al., 1991; Alfreider et al., 1997; Griebler et al., 2002), schienen mit Sedimentmaterial angefertigte Labormikrokosmen für die Untersuchung mikrobieller Abbauprozesse geeigneter. Allerdings ist die Probenahme von Grundwassersedimenten ein zeit- und kostenintensives Unterfangen und die Extraktion von ausreichenden Mengen an Nukleinsäuren für eine phylogenetische Analyse der Organismen gestaltete sich häufig aufgrund der Sorption

von Mikroorganismen an das Sediment wie auch der geringen Biomassen in Aquifersedimenten schwierig (Stapleton et al., 1998; Winderl et al., 2007).

Die dargestellten Resultate der Anreicherungskultur ZBT 1 zeigten am Beispiel von Toluol, dass mithilfe von substratbeaufschlagten BACTRAPs spezifische Konsortien aus dem Grundwasser angereichert werden können. Die Kultivierung des Grundwasserkonsortiums in Labormikrokosmen verifizierte einen mikrobiellen Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen. Unter Vernachlässigung einer möglichen Lag-Phase, die aufgrund der initialen Sulfidadsorption an das Bead-Material nicht aufgezeigt werden konnte, variierten die Abbauraten zwischen 35 und 58  $\mu\text{M d}^{-1}$ . Vergleichbare Abbauraten sind in der Literatur für den Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen beschrieben: 25  $\mu\text{M d}^{-1}$  für Stamm TRM1 (Meckenstock, 1999), 19  $\mu\text{M d}^{-1}$  für Stamm PRTOL1 (Beller et al., 1996), 126-262  $\mu\text{M d}^{-1}$  für *Desulfobacula toluolytica* (Rabus et al., 1993), 16  $\mu\text{M d}^{-1}$  für eine aus kontaminierten Meeresedimenten gewonnene Anreicherungskultur (Edwards et al., 1992) und 6  $\mu\text{M d}^{-1}$  für eine aus BTEX-kontaminierten Aquifersedimenten gewonnene Anreicherungskultur (Elshahed and McInerney, 2001). Dass die aus dem Grundwasser angereicherten und anschließend in Labormikrokosmen eingebrachten Mikroorganismen vorrangig auf den Beads siedelten, zeigte sich anhand der mit CLSM visualisierten Mikrokolonien. Bemerkenswerterweise erfolgte die Besiedlung ausschließlich auf der Oberfläche der Beads. In verschiedenen Feldexperimenten wurde dagegen überwiegend eine Besiedlung im Inneren der Beads beobachtet (4.1.2). Möglicherweise siedeln sich die Mikroorganismen vorrangig im Inneren der Beads an, um sich vor den toxischen Effekten des im umgebenden Grundwasser vorhandenen Benzols zu schützen. Die toxische Wirkung der Schadstoffe auf die Mikroorganismen war jedoch nicht im Fokus der Arbeit, so dass diese Vermutung im Rahmen der Dissertation nicht bestätigt wurde.

Durch Kombination von TLFA- und RNA-SIP konnten einerseits Erkenntnisse über den Kohlenstofffluss des Toluols in das mikrobielle Konsortium gewonnen und andererseits neue toluolabbauende Mikroorganismen identifiziert werden. Durch Verwendung von sowohl  $[^{13}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-Toluol}$  als auch  $[^{13}\text{C}_7]\text{-Toluol}$  konnten, ergänzend zu den aus der Literatur bekannten Daten, Kenntnisse über die für SIP-Experimente erforderliche Menge an Isotopenlabel gewonnen werden. Generell ist TLFA-SIP etwa 10fach sensitiver als RNA-SIP, bedingt durch die verschiedenen Analysemethoden. Während isotopisch markierte Fettsäuren durch Kombination

von GC-MS und GC-C-IRMS analysiert werden, ist für die Untersuchung isotopisch markierter RNA zunächst eine Separation dieser Moleküle von den unmarkierten notwendig (Neufeld et al., 2007a). Für ein erfolgreiches TLFA-SIP Experiment sind bereits Isotopenanreicherungen von 1‰ (>1,1at%) ausreichend (Boschker et al., 1998). Der wesentliche Nachteil von TLFAs liegt jedoch in deren geringen phylogenetischen Auflösung (Neufeld et al., 2007a) und gerade im Hinblick auf unkultivierte Mikroorganismen können keine phylogenetischen Informationen erhoben werden. Im Vergleich dazu erfordert RNA-SIP, mit Mindestanreicherungen von 10at% (Manefield et al., 2002b) bzw. 15at% (Whiteley et al., 2007), eine höhere <sup>13</sup>C-Inkorporation in die mikrobielle Biomasse, jedoch können die metabolischen Prozesse den entsprechenden Mikroorganismen zugeordnet werden.

Beide Methoden zeigten übereinstimmend, dass alle Mikroorganismen des Konsortiums nach 60-tägiger Inkubation eine <sup>13</sup>C-Markierung aufwiesen. Einzige Ausnahme stellte die Fettsäure 18:0 dar, die keine signifikante Transformation der <sup>13</sup>C-Markierung in die Fettsäure aufzeigte. Dies ist verwunderlich, da die Synthese dieser Fettsäure via der 16:0 Fettsäure erfolgt (Fahy et al., 2005b), welche eine signifikante <sup>13</sup>C-Anreicherung aufwies. Das gleiche Phänomen wurde allerdings bereits in dem in Kap. 4.2.2 beschriebenen Feldversuch beobachtet. Möglicherweise erfolgte die Synthese dieser Fettsäure über Speicherlipide, die während der vorangegangenen Kultivierung mit <sup>12</sup>C-Toluol synthetisiert wurden.

Alle anderen Fettsäuren waren in den auf [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>]-Toluol kultivierten Zellen 3-6fach höher angereichert als in den auf [<sup>13</sup>C]-α-Toluol kultivierten. In Anbetracht der siebenfach höheren <sup>13</sup>C-Markierung des [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>]-Toluols im Vergleich zum [<sup>13</sup>C]-α-Toluol erfolgte demnach in den auf [<sup>13</sup>C<sub>7</sub>]-Toluol kultivierten Zellen ein geringerer Einbau des <sup>13</sup>C-Kohlenstoffes in die Biomasse als in den auf [<sup>13</sup>C]-α-Toluol kultivierten. Als Ursache hierfür sind einerseits Messungenauigkeiten bei der Analyse der <sup>13</sup>C-Anreicherungen in Betracht zu ziehen. Der Vergleich von Isotopenanreicherungen, die für die [<sup>13</sup>C]-α-Toluol-Probe mithilfe von GC-IR-MS bestimmt wurden, mit denen, die mithilfe der Gaschromatographie-Massenspektren ermittelt wurden, zeigte Schwankungen von maximal 4at%. Dies kann für die geringeren Isotopenanreicherungen der [<sup>13</sup>C]-α-Toluol-Proben (8-15at%) zu großen relativen Fehlern führen. Andererseits liegen Indizien der Arbeitsgruppe von Tillmann Lüders (Institut für Grundwasseröko-

logie, Helmholtz Zentrum München) vor, dass der Kohlenstoff in der Methylgruppe des Toluols verstärkt für den Anabolismus und der in dem Benzolring verstärkt für die Mineralisation verwertet wird. Dies würde die höhere Isotopenanreicherung in den auf [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol kultivierten Zellen gegenüber den auf [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol kultivierten erklären. Eine unterschiedliche isotopisch bedingte Verwertung beider Substrate ist als Ursache auszuschließen, da sowohl die Toluolumsätze als auch Fettsäureerträge in beiden Ansätzen vergleichbar waren.

Die hohen Isotopenanreicherungen in den Fettsäuren der auf [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol kultivierten Zellen reflektierten des Weiteren den für den Toluolabbau unter anoxischen Bedingungen bekannten Abbauweg. Dieser ist in allen bisher untersuchten Stämmen und Konsortien unabhängig von dem verwendeten terminalen Elektronenakzeptor gleich (Überblick: Heider et al., 1998; Spormann and Widdel, 2001; Widdel and Rabus, 2001; Boll et al., 2002; Chakraborty and Coates, 2004; Heider, 2007). Initiiert durch das Enzym Benzylsuccinat-Synthase wird Fumarat an die Methylgruppe des Toluols addiert, was zur Bildung des Intermediats Benzylsuccinat führt. Im weiteren Reaktionsverlauf wird dieses Intermediat über eine  $\beta$ -Oxidation-ähnliche Reaktion zu Succinyl-CoA und Benzoyl-CoA oxidiert, so dass der ursprünglich in der Methylgruppe des Toluols eingebaute  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff in die mit dem Thioester verbundenen Carboxylgruppe des Benzoyl-CoA überführt wird. Möglicherweise wird das Benzoyl-CoA zu Acetyl-CoA transformiert, dem Präkursor der Fettsäurebiosynthese (Fahy et al., 2005b). Dies würde die signifikante  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den mikrobiellen Fettsäuren erklären.

Eine Studie von Abraham et al. (1998) demonstrierte, dass die Isotopensignatur einer Fettsäure im Wesentlichen das Isotopenverhältnis des Wachstumssubstrates widerspiegelt. Auch in Experimenten mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Kohlenstoffsubstraten ist die Isotopensignatur bei PLFAs verschiedener Kettenlänge etwa gleich (Pelz et al., 2001b). Des Weiteren gibt es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Wachstumsphasen und der Isotopensignatur mikrobieller Fettsäuren (Abraham et al., 1998). Folglich wären in den [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol- und [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol-Ansätzen Anreicherungen von ca. 14 bzw. 99at% zu erwarten gewesen, die jedoch aufgrund des durch das Inokulat eingebrachten  $^{12}\text{C}$ -Kohlenstoffes verdünnt wurden. Alternative Kohlenstoffquellen, die durch das Beadmaterial eingebracht wurden, sind auszuschließen, da

mehrfach in Labormikrokosmen unter Verwendung verschiedener Mikroorganismen gezeigt werden konnte, dass ein mikrobielles Wachstum nur nach Zugabe einer Kohlenstoffquelle erfolgte (unveröffentlichte Daten).

Im Hinblick auf eine isotopisch bedingte Wachstumslimitation, wie in einer Studie von Fang et al. (2004) beschrieben, konnte weder für [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol noch für [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol ein inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Im Gegenteil, die mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Toluol gewachsenen Zellen wiesen höhere Gesamtmengen an Fettsäuren als die mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol kultivierten Zellen auf. Fang et al. (2004) demonstrierte indessen, dass 4 von 5 getesteten Bakterienstämmen nach Kultivierung mit [ $^{13}\text{C}$ -ring]-Toluol gerade mal 37-75% der Fettsäuremenge der mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol kultivierten Zellen enthielten. Als Ursache dafür erwog die Autorin einerseits toxische Effekte des Toluols, welches in hohen Konzentrationen (10 mM) zugegeben wurde, und andererseits Isotopeneffekte. In der hier dargestellten Studie wurden toxische Effekte des Toluols erheblich minimiert, da der Großteil des Toluols von dem Beadmaterial adsorbiert wurde. Möglicherweise ist dies die Ursache für die vergleichbare Verwertung des unmarkierten und markierten Toluols. Andererseits demonstrierte Jehmlich et al. (2008), dass der Stamm *Azoarcus* sp. EbN1  $^{12}\text{C}$ -Toluol und [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol in ähnlicher Weise unter nitratreduzierenden Bedingungen metabolisiert, obgleich das Toluol in höheren Konzentrationen direkt ins Medium gegeben wurde. Daher sind möglicherweise die physiologischen Unterschiede der untersuchten Organismen ausschlaggebend für diese abweichenden metabolischen Effekte. Während unserer Studie sulfatreduzierende Bakterien zu Grunde lagen, basierten die Beobachtungen von Fang et al. (2004) auf aeroben toluolabbauenden Stämmen. Dessen ungeachtet implizieren diese Ergebnisse, dass die Biofilmformation auf den BACTRAPs, die mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Toluol beladen werden, keinen Isotopeneffekten unterliegt.

Dies ist die erste Studie, die [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol für Stable-Isotope-Probing-Experimente auf Nukleinsäurebasis verwendete. Obwohl wir aufgrund der Korrelation von Schwimmdichte der RNA und Menge an assimilierten  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff (Manefield et al., 2002b) nur eine geringe Dichteverschiebung in den schweren Bereich erwarteten, wies die aus den [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol-Ansätzen extrahierte RNA eine deutliche  $^{13}\text{C}$ -Markierung auf. Verglichen mit den  $^{12}\text{C}$ -Kontrollen wurde eine Dichteverschiebung in den schwereren Bereich von  $0,01 \text{ g ml}^{-1}$  ermit-

telt. Die Kultivierung auf [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol resultierte dagegen in einer Dichteverschiebung von  $0,02 \text{ g ml}^{-1}$ . Wurde RNA der [ $^{12}\text{C}$ ]-Toluol und [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol Proben künstlich in einem Reaktionsgefäß gemischt, konnte die  $^{13}\text{C}$ -markierte RNA erfolgreich mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation von der unmarkierten RNA separiert werden (unveröffentlichte Daten). Folglich kann das [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol anstatt des [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol für SIP-Experimente verwendet werden. Ein Aspekt, welcher aufgrund der ca. 10fach höheren Kosten des [ $^{13}\text{C}_7$ ]-Toluol gegenüber dem [ $^{13}\text{C}$ ]- $\alpha$ -Toluol, ökonomisch bedeutend ist.

Angesichts der Tatsache, dass in den  $^{13}\text{C}$ -Proben bereits nach 20-tägiger Inkubation ausschließlich  $^{13}\text{C}$ -markierte RNA vorhanden war, ist zu erwarten, dass alle Mikroorganismen des sulfatreduzierenden Konsortiums das Toluol metabolisierten. Andererseits kann eine indirekte Markierung der mikrobiellen RNA über eine Assimilation von  $^{13}\text{C}$ -markierter Biomasse wie z.B. von Stoffwechselprodukten oder abgestorbenem Zellmaterial (Radajewski et al., 2002) trotz der Zeitreihenanalyse nicht ausgeschlossen werden.

Durch Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass *Desulfocapsa*-verwandte Spezies eine Schlüsselrolle bei der Toluolmetabolisierung in dem Konsortium einnahmen. Bemerkenswerterweise wies der redundante Klon eine 99%ige Sequenzhomologie zu einem unkultiviertem Bakterium der *Desulfocapsa* auf, welches in einer Studie zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in einem mit Kohlenwasserstoffen und chlorierten Verbindungen kontaminierten Grundwasserleiter gefunden wurde (Dojka et al., 1998). Das *Desulfocapsa*-verwandte Spezies offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von Toluol spielen, zeigt sich auch an weiteren Studien: Die Arbeitsgruppe von Meckenstock (1999) isolierte den sulfatreduzierenden Toluolabbauer TRM1, der innerhalb der *Desulfocapsa* gruppiert. Darüber hinaus demonstrierte die gleiche Arbeitsgruppe, dass *Desulfocapsa*-verwandte Spezies in der sulfidischen Zone eines kontaminierten Grundwasserleiters dominierten, in dem Toluol die überwiegende Energie- und Kohlenstoffquelle darstellte (Winderl et al., 2008).

Vertreter der anderweitig detektierten Gattungen *Anaerolineae*, *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium* und *Clostridium* sind mit Ausnahme von *Desulfobacterium* (Harms et al., 1999) nicht für den Toluolabbau unter anoxischen Bedingungen bekannt. Zwar wurden *Desulfovibrio*-

verwandte Spezies in einem toluolabbauenden, sulfatreduzierenden Konsortium entdeckt (Pelz et al., 2001a), jedoch konnte für diese die Fähigkeit zum Toluolabbau nicht nachgewiesen werden. Bekannte Toluolabbauer gruppieren zum Großteil innerhalb des Phylums *Proteobacteria*, aber auch der Klasse *Clostridia* (Winderl et al., 2007). In Anbetracht dieser großen phylogenetischen Diversität, die sich auch in der Variation des für die Benzylsuccinat-synthase codierenden Genes widerspiegelt (Winderl et al., 2007), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in geringer Anzahl detektierten Phylotypen nicht auch das Toluol metabolisierten. Denkbar ist aber auch, dass die Organismen den Kohlenstoff aus den Metaboliten oder abgestorbenen Zellmaterial bezogen (Radajewski et al., 2002; Vogt et al., 2005).

Im Hinblick auf die geringe Anzahl bisher isolierter Spezies, die zum Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen in der Lage sind, lieferte diese Studie umfangreiche Erkenntnisse zur Physiologie eines sulfatreduzierenden Konsortiums als auch einen neuartigen methodischen Ansatz zur Anreicherung spezifischer Konsortien aus dem Grundwasser. Dabei erwies sich die Kombination von TLFA- und RNA-SIP als wertvolles Instrumentarium, um die Assimilation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes aus dem Toluol in die mikrobielle Biomasse zu verfolgen und die entsprechenden toluolabbauenden Spezies zu identifizieren. Exemplarisch wurde der Ansatz für Toluol demonstriert, welcher jedoch auch für andere Schadstoffe, wie z.B. Benzol oder MTBE, verwendet werden kann.

#### **5.4.2 Identifizierung der Toluolabbauer im Zeitzer Grundwasser**

Bedingt durch die hohen Kosten der  $^{13}\text{C}$ -Substrate und der Verdünnung dieser im Grundwasser wurden SIP-Versuche bisher nur selten direkt am Feldstandort durchgeführt (Jeon et al., 2003; Pombo et al., 2005; Liou et al., 2008). Der Einsatz des BACTRAP-Systems zur Aufklärung von Bakterienspezies, die für den *in situ* Metabolismus von bestimmten Umweltschadstoffen verantwortlich sind, erfolgte erstmalig durch Chang et al. (2005) und Kollegen. Allerdings erwies sich in dieser Studie die Interpretation der mithilfe von DNA-SIP erhaltenen Resultate schwierig, da zum einen nur marginale Biomassemengen extrahiert werden konnten und andererseits durch die Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -Acetat die Klonsequenzen nicht eindeutig den untersuchten uran-metabolisierenden Bakterien zugeschrieben werden konnten.

In der hier dargelegten Studie wurde das BACTRAP-System erstmals erfolgreich zur Identifizierung schadstoffabbauender Mikroorganismen am Feldstandort eingesetzt. Die Identifizierung erfolgte mithilfe von RNA-SIP. Die gewonnenen RNA-Extrakte der  $^{13}\text{C}$ -Bactraps wiesen eindeutig höhere Dichten als die der parallelen  $^{12}\text{C}$ -Proben auf, was die Assimilation des toluolbürtigen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes in die mikrobielle Biomasse demonstrierte. Eine mögliche Beeinflussung der Dichten durch verschiedenartige GC-Gehalte ist auszuschließen, da rRNA-Moleküle nur eine geringfügige Variationsbreite der GC-Gehalte aufweisen (Glotz et al., 1981) und sich die T-RFLP-Profile der parallelen  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -BACTRAPs stark ähnelten.

Die Klonierung und Sequenzierung der  $^{13}\text{C}$ -angereicherten RNA zeigte, dass die überwiegende Mehrheit der analysierten Klonsequenzen mit Mikroorganismen eng verwandt sind, die bisher nicht als anaerob toluolabbauende Mikroorganismen bekannt waren. Bekannte toluolabbauende Mikroorganismen wurden hingegen nur im Falle der Gattung *Azoarcus* gefunden (Dolfing et al., 1990; Fries et al., 1994; Rabus and Widdel, 1995; Zhou et al., 1995; Kube et al., 2004). Bemerkenswerterweise dominierten in den erhobenen Klondatenbanken sowie in den T-RFLP-Profilen *Janthinobacterium*- und/oder *Herbaspirillum*-verwandte Spezies. Bis dato sind *Herbaspirillum* spp. und *Janthinobacterium* spp. für den aeroben Toluolabbau an belasteten Standorten bekannt (Fries et al., 1997; Moore et al., 2006). Die Oxidation von Toluol in Kombination mit der Reduktion von Nitrat wurde jedoch bisher für kein Isolat dieser Gattungen gezeigt. Infolgedessen können zwei verschiedene Hypothesen konstatiert werden: (I) Aufgrund der BACTRAP-Exposition im niedrigkontaminierten Bereich der Schadstofffahne 4 Meter unterhalb der Gewässeroberkante könnten geringe Sauerstoffkonzentrationen eine Rolle spielen, gleichwohl vor Versuchsbeginn kein Sauerstoff im Grundwasser nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlicher erscheint aber die Hypothese (II), die von neuen toluolabbauenden Bakterien am Standort ausgeht. Sowohl Janthinobakterien als auch Herbaspirillen können ein breites Spektrum an Kohlenstoffquellen aerob und z.T. unter Verwendung von Nitrat verwerten (Lincoln et al., 1999; Brenner et al., 2005), so dass eine Oxidation von Toluol unter Reduktion von Nitrat in Betracht zu ziehen ist. Erst kürzlich wurde in einer Studie zur Identifizierung anaerober benzolabbauender Mikroorganismen die Dominanz von *Pseudomonas* und *Pelomonas*-Spezies in einem strikt anoxischen Labormikrokosmos demonstriert (Liou et al., 2008), wobei *Pseudomonas*-Spezies bis zum jetzigen Zeitpunkt nur als aerobe Benzolab-

bauer bekannt sind. Inwieweit die analysierten Sequenzen tatsächlich innerhalb beider Gattungen clustern, wie anhand des phylogenetischen Stammbaumes ersichtlich ist, kann, bedingt durch die massive Ähnlichkeit (>95%) der 16S rDNA Sequenzen beider Gattungen (Lincoln et al., 1999), nicht eindeutig geklärt werden.

Ebenfalls enge Sequenzhomologie zu diesen Gattungen weist die Gattung *Duganella* auf (Lincoln et al., 1999), die mehrfach in der Klondatenbank auftrat, jedoch bis dato auch keine Bedeutung hinsichtlich des anaeroben Toluolmetabolismus erlangte. Relevant schien gleichfalls *Rhodoferax ferrireducens*. Dieser ist entgegen anderer Spezies der Gattung *Rhodoferax* in der Lage, fakultativ via dissimilatorische Eisenreduktion zu wachsen (Finneran et al., 2003). Zwar wurde dieser Mikroorganismus auf ein breites Spektrum an verschiedenen Kohlenstoffquellen getestet, jedoch nicht auf Toluol. Die Wichtigkeit dieser Spezies am Standort Zeitz zeigte sich allerdings bereits im Rahmen einer umfangreichen mikrobiellen Diversitätserfassung, in der die Dominanz *Rhodoferax*-verwandter Spezies demonstriert wurde (Alfreider and Vogt, 2007). Ebenfalls wurde die Anwesenheit von *Rhodoferax ferrireducens* in einem BTEX und Naphtalen kontaminierten Grundwasser nahe von Dortmund dargelegt (Büning et al., 2005).

Neben diesen verschiedenen Sequenzen, die phylogentisch zu den *Betaproteobacteria* gehören, gruppierten vereinzelte Klonsequenzen zu unkultivierten Spezies der Gattungen *Caulobacter*, *Mesorhizobium* und Familie *Sphingomonadaceae* innerhalb der *Alphaproteobacteria*. Die Gattung *Caulobacter* kommt vorrangig in phosphatreichen Gewässern vor, doch wurde sie von Fahy et al. (2005a; 2006) auch in einem BTEX-kontaminiertem Aquifer nachgewiesen. Spezies der Gattung *Sphingomonas* wurden bereits mehrfach im Zusammenhang mit dem aeroben Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) beschrieben (Brenner et al., 2005). Dass *Mesorhizobium* relevant für den Toluolabbau im Grundwasser ist, kann ausgeschlossen werden, da es sich um ein Bodenbakterium handelt (Brenner et al., 2005), welches vermutlich während der Probenahme eingeschleppt wurde.

Auffälligerweise wurden weder für den Standort Zeitz bekannte sulfatreduzierende Mikroorganismen wie z.B. *Desulfovibrio* oder *Desulfosporosinus* (Alfreider and Vogt, 2007) noch anderweitige Sulfatreduzierer gefunden. Dies deutet darauf hin, dass sulfatreduzierende Prozesse

keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielten. Allerdings ist ein Rückschluss auf die relevanten Elektronenakzeptor reduzierenden Prozesse anhand der Sequenzanalyse problematisch, da zum einen ein beträchtlicher Anteil der Klonsequenzen enge Verwandtschaft zu unkultivierten Spezies aufwies und ein Teil der Sequenzen keiner individuellen phylogenetischen Gruppe innerhalb der *Proteobacteria* zugeordnet werden konnte. Hinzu kommen die hinreichend als potentielle Fehlerquellen bei der Interpretation von Klondatenbanken bekannten Aspekte wie die verschiedenartige Amplifizierbarkeit von rRNA, Formation von Sequenzartefakten während der PCR (Suzuki and Giovannoni, 1996; v. Wintzingerode et al., 1997) und eine möglicherweise unvollständige Erfassung der indigenen Phylotypen (Hughes et al., 2001; Schloss and Handelsman, 2006).

Generell zeigen die bisher bekannten Toluolabbauer eine große phylogenetische Diversität innerhalb des Phylums *Proteobacteria* und der Klasse *Clostridia* (Winderl et al., 2007). Demzufolge ist wahrscheinlich, dass die identifizierten Phylotypen das Toluol metabolisieren können. In diesem Fall würden die ermittelten Daten belegen, dass die derzeit bekannten toluolabbauenden Spezies nur eine Minderheit der tatsächlich existierenden widerspiegeln. Andererseits können die Organismen den  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff auch indirekt aus den Metaboliten oder aus abgestorbenen Zellmaterial der eigentlichen Toluolabbauer beziehen (Radajewski et al., 2002; Vogt et al., 2005). Gerade im Hinblick auf die lange Expositionszeit von 3 Monaten wie auch der einmaligen Beprobung, die keine dynamische Abbildung des Kohlenstoffflusses zulässt, muss dieser Aspekt in Betracht gezogen werden. Um die identifizierten Spezies eindeutig für den anaeroben Toluolabbau verantwortlich zu machen, müssten diese in Zukunft isoliert und charakterisiert werden.

Eine inhärente Schwierigkeit der SIP-Technik ist, dass zum einen ausreichende Anreicherungen für eine erfolgreiche Separation von unmarkierter und markierter RNA erforderlich sind, aber zum anderen längere Expositionszeiten das Potential einer indirekten Assimilation des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes erhöhen. Aus diesem Grund wurde in einem früheren BACTRAP-Versuch am Standort Zeitz die Dynamik der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in den mikrobiellen Fettsäuren untersucht (4.1.4). Eine Methode zur unmittelbaren Analytik der Isotopenverhältnisse in mikrobieller RNA ist am Department für Isotopenbiogeochemie bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht

etabliert. Auf Grundlage der Fettsäuren konnte gezeigt werden, dass eine 112-tägige Expositionszeit im Gegensatz zu einer 56-tägigen ausreichend hohe Isotopenanreicherungen gewährleisten konnte. Infolge dessen wurde eine 3-monatige Expositionszeit für einen erfolgreichen RNA-basierenden SIP-Versuch als optimal erachtet.

Der Vergleich von Sequenzierungsergebnissen des Feldversuches mit denen der Labormikroskosmen demonstrierte den starken Einfluss der geochemischen Milieubedingungen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften. Während für das SIP-Experiment am Feldstandort ein Grundwasserbrunnen am Rande der Schadstofffahne gewählt wurde, in dem vermutlich Nitratreduktion als Abbauprozess dominierte, erfolgte die Anreicherung des Konsortiums für den in Labormikroskosmen durchgeführten SIP-Versuch aus einer stark sulfidischen Messstelle. Die identifizierten Sequenzen bestätigten teilweise die jeweiligen geochemischen Bedingungen.

Vor dem Hintergrund der wenigen Methoden, mit denen bisher spezifische metabolische Prozesse am Feldstandort den jeweiligen Mikroorganismen zugeordnet werden konnten, sind BACTRAPs ein vielversprechender Lösungsansatz. Aufgrund des hohen Adsorptionsvermögens der Beads sind 50 mg eines  $^{13}\text{C}$ -markierten Substrates für einen erfolgreichen SIP-Versuch im Grundwasser ausreichend. Andererseits ist auch eine konventionelle Anreicherung der Spezies oder Konsortien möglich, gefolgt von dem Nachweis ihrer metabolischen Fähigkeiten in Kultivierungsexperimenten (4.4.1). Zukünftig wäre eine Kombination beider Methoden im gleichen Untersuchungsbrunnen empfehlenswert. Dadurch kann der fokussierte biochemische Prozess eindeutig bestimmten Mikroorganismen zugeordnet und die Aktivität dieser am Feldstandort nachgewiesen werden.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden *in situ* Mikrokosmen (BACTRAPs) zur Untersuchung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in einem BTEX-kontaminierten Aquifer verwendet. Ziel war es (I) die Eignung der BACTRAPs zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften und zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus zu validieren, (II) die BACTRAPs als *in situ* Methode für die Untersuchung mikrobieller Abbaupotentiale zu erproben, (III) ein Quantifizierungsmodell zur Abschätzung der mikrobiellen Schadstoffumsätze auf den BACTRAPs während der *in situ* Inkubation zu entwickeln und zu erproben sowie (IV) die relevanten toluolabbauenden Mikroorganismen am Standort Zeitz zu identifizieren.

- (1) Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wie auch molekularbiologischen Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaften, die sich während der Exposition im Grundwasser auf den BACTRAPs ansiedelten, belegten die Eignung des Bead-Materials als Besiedlungsfläche und damit zum Studium sessiler mikrobieller Gemeinschaften in Grundwasser-Ökosystemen.
- (2) Der Vergleich mikrobieller Gemeinschaften von parallel exponierten BACTRAPs demonstrierte eine reproduzierbare Besiedlung.
- (3) Der Vergleich mikrobieller Gemeinschaften von unbeladenen und mit  $^{12}\text{C}$ -Toluol beladenen BACTRAPs belegte eine substratabhängige Besiedlung.
- (4) Anhand der für Benzol und Toluol ermittelten Desorptionskinetiken und Modellierung dieser konnte die Bioverfügbarkeit beider Substrate in den BACTRAPs während einer 3-monatigen *in situ* Inkubation nachgewiesen werden.
- (5) Mithilfe von BACTRAPs, die mit  $^{13}\text{C}$ -Toluol und den Elektronenakzeptoren Nitrat, Sulfat oder Eisen beladen wurden, konnte die Eignung der BACTRAPs zu Untersuchung mikrobieller *in situ* Abbaupotentiale nachgewiesen werden. So wurde deutlich, dass sowohl die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft wie auch der mikrobielle Schadstoffumsatz deutlich von den Elektronenakzeptoren beeinflusst wurden. Unter den gegebenen Milieubedingungen des Grundwassers wurde der höchste Biostimulationseffekt auf den Eisen-BACTRAPs beobachtet. Demnach ist es möglich, mithilfe der

BACTRAPs Limitationen an terminalen Elektronenakzeptoren in dem Grundwasserleiter aufzuzeigen, welche das natürliche Abbauvermögen vermindern.

- (6) Um neben dem rein qualitativen Nachweis des *in situ* Abbaus quantitative Aussagen der mikrobiellen Schadstoffumsätze auf den BACTRAPs treffen zu können, wurde ein Quantifizierungsmodell entwickelt. Die Erprobung des Modells demonstrierte, dass basierend auf der Menge  $^{13}\text{C}$ -angereicherter mikrobieller Fettsäuren, die sich während der *in situ* Inkubation auf den BACTRAPs entwickeln, und verschiedenen in Laborexperimenten bestimmten TLFA-basierenden Ertragskoeffizienten die Schadstoffumsätze auf den BACTRAPs grob abgeschätzt werden können. Eine Übertragbarkeit der so ermittelten Schadstoffumsätze auf das Feld ist jedoch stark limitiert.
- (7) Im Zuge der Untersuchung toluolabbauender Mikroorganismen gelang es mithilfe der BACTRAPs ein toluolabbauendes Konsortium aus dem Grundwasser anzureichern. In nachfolgenden Kultivierungen mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Toluol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wurde die Metabolisierung des Toluols mit Sulfat als Elektronenakzeptor demonstriert. Die Identifizierung der isotopisch-markierten Mikroorganismen zeigte, dass eine *Desulfocapsa*-verwandte Spezies eine Schlüsselrolle bei der Toluolmetabolisierung in dem Konsortium einnahm.
- (8) Erstmals gelang es, BACTRAPs erfolgreich zur Identifizierung schadstoffabbauender Mikroorganismen am Feldstandort einzusetzen. Die Exposition von  $^{13}\text{C}$ -Toluol beladenen BACTRAPs im Grundwasserleiter in Kombination mit RNA-basierender Dichtegradientenzentrifugation indizierte unkultivierte Mikroorganismen der Gattungen *Herbaspirillum* und/oder *Janthinobacterium* als relevante Toluolabbauer auf den BACTRAPs. Spezies dieser Gattung sind gegenwärtig nicht als anaerobe Toluolabbauer bekannt. Nur vereinzelte Sequenzen wiesen eine enge Verwandtschaft zu der Gattung *Azoarcus* auf, aus der bereits für mehrere Spezies der Toluolabbau unter nitratreduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mithilfe von BACTRAPs wertvolle Informationen über die mikrobiellen Gemeinschaften und deren Fähigkeiten zum Schadstoffabbau in kontaminierten Grundwasserleitern gewonnen werden können. Darüber hinaus können mithilfe der BACTRAPs Limitationen an terminalen Elektronenakzeptoren im Grundwasser-

leiter aufgezeigt werden, welche das natürliche Abbauvermögen vermindern. Diese Erkenntnisse können eine Handlungsempfehlung für eine konzipierte biologische Sanierung liefern und kostenintensive Misserfolge verhindern. Auch wenn die verschiedenen Zielstellungen und Methodiken exemplarisch für die BTEX-Verbindung Toluol aufgezeigt wurden, ist eine Übertragbarkeit auf andere Schadstoffe, wie z.B. Benzol, MTBE oder PAK, prinzipiell möglich. Damit steht ein weiteres Verfahren zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus und zur Untersuchung mikrobieller Abbauprozesse in kontaminierten Grundwasserleitern zur Verfügung.

Mithilfe der dargelegten Studien wurde ein wichtiger Beitrag zu einem besseren konzeptuellen Verständnis der natürlichen Selbstreinigung in schadstoffbelasteten Grundwasserleitern geleistet. Es ist davon auszugehen, dass das Konzept zukünftig eine zunehmende Bedeutung zum Monitoring und der Bewertung mikrobieller Abbauprozesse im Hinblick auf biologische Sanierungsprojekte haben wird.

## 7 Referenzen

- Abdo, Z., Schüette, U.M.E., Bent, S.J., Williams, C.J., Forney, L.J., and Joyce, P. (2006) Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environ. Microbiol.* **8**: 929-938.
- Abraham, W.-R., Hesse, C., and Pelz, O. (1998) Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4202-4209.
- Aguilera, D.R., Jourabchi, P., Spiteri, C., and Regnier, P. (2005) A knowledge-based reactive transport approach for the simulation of biogeochemical dynamics in Earth systems. *Geochem. Geophys. Geosyst.* **6**: Q07012.
- Alfreider, A., and Vogt, C. (2007) Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water, Air, Soil Pollut.* **183**: 415-426.
- Alfreider, A., Krossbacher, M., and Psenner, R. (1997) Groundwater samples do not reflect bacterial densities and activity in subsurface systems. *Water Res.* **31**: 832-840.
- Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microb.Rev.* **59**: 143-169.
- Anders, H., Kaetzke, A., Ludwig, W., and Fuchs, G. (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 327-333.
- Anderson, R.T., and Lovley, D.R. (1997) Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation. *Adv. Microb. Ecol.* **15**: 289-350.
- Anderson, R.T., and Lovley, D.R. (2000) Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2261-2266.
- Andreoni, V., and Gianfreda, L. (2007) Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 287-308.
- Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S. et al. (2000) Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 518-523.

- Arneith, J.D., Milde, G., Kerndorff, H.H., and Schleyer, R. (1989) Waste deposit influences on groundwater quality as a tool for waste type and site selection for final storage quality. In *The Landfill. - Lecture Notes in Earth Sciences*. Baccini, P. (ed). Berlin: Springer Verlag.
- Ball, H.A., and Reinhard, M. (1996) Monoaromatic hydrocarbon transformation under anaerobic conditions at Seal Beach, California: laboratory studies. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 114-122.
- Beller, H.R., and Spormann, A.M. (1999) Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 147-153.
- Beller, H.R., Spormann, A.M., Sharma, P.K., Cole, J.R., and Reinhard, M. (1996) Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1188-1196.
- Bennett, P.C., Hiebert, F.K., and Rogers, J.R. (2000) Microbial control of mineral-groundwater equilibria: Macroscale to microscale. *Hydrogeol. J.* **8**: 47-62.
- Biegert, T., Fuchs, G., and Heider, J. (1996) Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* **238**: 661-668.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Boll, M., Fuchs, G., and Heider, J. (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**: 604-611.
- Borden, R.C., Gomez, C.A., and Becker, M.T. (1995) Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. *Ground Water* **33**: 180-189.
- Bordenave, S., Goni-Urriza, M.S., Caumette, P., and Duran, R. (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6089-6097.
- Boschker, H.T.S. (2004) Linking microbial community structure and functioning: stable isotope ( $^{13}\text{C}$ ) labeling in combination with PLFA analysis. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuk, G.A., Bruijn, F.J.d., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., and Elsas, J.D.v. (eds): Kluwer Academic Publisher, pp. 1673-1688.
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R. et al. (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by  $^{13}\text{C}$ -labelling of biomarkers. *Nature* **392**: 801-805.

- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H., and Tiedje, J.M. (2000) Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2096-2104.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. (2005) *The Proteobacteria (Part C)*. Berlin: Springer Verlag.
- Büning, C., Pfeifer, F., Podwojewski, E., Quecke, W., Dohrmann, A.B., Tebbe, C.T. et al. (2005) In situ Mikrokosmenuntersuchungen mit <sup>13</sup>C-markiertem Benzol und Toluol zum Nachweis des natürlich biologischen Abbaus im Grundwasser und zur molekularbiologischen Analyse der abbauaktiven Mikroflora. *Altlasten Spektrum* **14**: 137-146.
- Burland, S.M., and Edwards, E.A. (1999) Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 529-533.
- Cecile, C. (1998) A method based on artificial substrates to monitor hyporheic biofilm development. *Int. Rev. Hydrobiol.* **83**: 135-143.
- Chakraborty, R., and Coates, J.D. (2004) Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 437-446.
- Chakraborty, R., and Coates, J.D. (2005) Hydroxylation and carboxylation-two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5427-5432.
- Chang, Y.J., Long, P.E., Geyer, R., Peacock, A.D., Resch, C.T., Sublette, K. et al. (2005) Microbial incorporation of <sup>13</sup>C-labeled acetate at the field scale: Detection of microbes responsible for reduction of U(VI). *Environ. Sci. Technol.* **39**: 9039-9048.
- Chapelle, F.H., Robertson, J.F., Landmeyer, J.E., and Bradley, P.M. (2001) *Methodology for applying monitored natural attenuation to petroleum hydrocarbon-contaminated groundwater systems with examples for South Carolina*. Survey, U.S.G.: Water-Resources Investigation Report 00-4161.
- Christensen, T.H., Bjerg, P.L., Banwart, S.A., Jakobsen, R., Heron, G., and Albrechtsen, H.-J. (2000) Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *J. Contam. Hydrol.* **45**: 165-241.
- Cline, J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**: 454-458.

- Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.G., O'Connor, S.M., Cole, K.A., Bender, K.S., and Achenbach, L.A. (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* **411**: 1039-1043.
- Coleman, W.E., Munch, J.W., Streicher, R.P., Ringhand, H.P., and Kopfler, F.C. (1984) The identification and measurement of components in gasoline, kerosene, and no. 2 fuel oil that partition into the aqueous phase after mixing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **13**: 171-178.
- Collins, M.D., and Jones, D. (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **45**: 316-354.
- Coschigano, P.W., Wehrman, T.S., and Young, L.Y. (1998) Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: Putative role of a glycine free radical. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1650-1656.
- Cunningham, J.A., Rahme, H., Hopkins, G.D., Lebron, C., and Reinhard, M. (2001) Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 1663-1670.
- Da Silva, M.L.B., and Alvarez, P.J.J. (2004) Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4720-4726.
- Dagley, S. (1971) Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **6**: 1-46.
- Dean, B.J. (1985) Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res.* **154**: 153-181.
- DECHEMA (2008) *Kontrollierter natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierter Grundwässer und Böden*. Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. BMBF-Förderschwerpunkt KORA.
- Dethlefsen, F., Bliss, F., Wachter, T., and Dahmke, A. (2004a) Reaktive Tracer zur Bestimmung der sedimentären Aquifer-Oxidationskapazität im Labor- und Feldversuch. *Grundwasser-Zeitschrift der Fachsektion Hydrogeologie* **9**: 12-20.
- Dethlefsen, F., Meckenstock, R., Veehmayer, M.K., and Dahmke, A. (2004b) Determination of bioavailable Fe(III) content in column experiments with the reactive tracer phosphate. *Environ. Geol.* **46**: 896-904.
- Dohrmann, A.B., and Tebbe, C.C. (2004) Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphisms (PCR-SSCP). In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowal-

- chuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., and van Elsas, J.D. (eds): Kluwer Academic Publisher, pp. 809-838.
- Dojka, M.A., Hugenholtz, P., Haack, S.K., and Pace, N.R. (1998) Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3869-3877.
- Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P., and Schwarzenbach, R.P. (1990) Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* **154**: 336-341.
- Duba, A.G., Jackson, K.J., Jovanovich, M.C., Knapp, R.B., and Taylor, R.T. (1996) TCE remediation using in situ, resting-state bioaugmentation. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1982-1989.
- Edwards, E.A., Willis, L.E., Reinhard, M., and Grbic-Galic, D. (1992) Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganism under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 794-800.
- Ellis, D.E., Lutz, E.J., Odom, J.M., Buchanan, R.J., Bartlett, C.L., Lee, M.D. et al. (2000) Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 2254-2260.
- Elshahed, M.S., and McInerney, M.J. (2001) Is interspecies hydrogen transfer needed for toluene degradation under sulfate-reducing conditions? *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 163-169.
- Evershed, R.P., Crossman, Z.M., Bull, I.D., Mottram, H., Dungait, J.A.J., Maxfield, P.J., and Brennan, E.L. (2006) <sup>13</sup>C-labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 72-82.
- Fahy, A., McGenity, T.J., Timmis, K.N., and Ball, A.S. (2006) Heterogeneous aerobic benzene-degrading communities in oxygen-depleted groundwaters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 260-270.
- Fahy, A., Lethbridge, G., Earle, R., Ball, A.S., Timmis, K.N., and McGenity, T.J. (2005a) Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environ. Microbiol.* **7**: 1192-1199.
- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Jr., Murphy, R.C. et al. (2005b) A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**: 839-862.
- Fang, J., Lovanh, N., and Alvarez, P.J.J. (2004) The use of isotopic and lipid analysis techniques linking toluene degradation to specific microorganisms: applications and limitations. *Water Res.* **38**: 2529-2536.

- Findlay, R.H. (2004) *Determination of microbial community structure using phospholipid fatty acid profiles*. Kluwer Academic Publishers.
- Finneran, K.T., Johnsen, C.V., and Lovley, D.R. (2003) *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 669-673.
- Fischer, A., Vieth, A., Knöller, K., Wachter, T., Dahmke, A., and Richnow, H.-H. (2004) Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mithilfe von isopenchemischen Methoden. *Grundwasser* **9**: 159-172.
- Fischer, A., Theuerkorn, K., Stelzer, N., Gehre, M., Thullner, M., and Richnow, H.H. (2007) Applicability of stable isotope fractionation analysis for the characterization of benzene biodegradation in a BTEX-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **41**: 3689-3696.
- Fogel, G.B., Collins, C.R., Li, J., and Brunk, C.F. (1999) Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* **38**: 93-113.
- Frey, J.C., Angert, E.R., and Pell, A.N. (2006) Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *J. Microbiol. Methods* **67**: 9-19.
- Fries, M.R., Forney, L.J., and Tiedje, J.M. (1997) Phenol- and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1523-1530.
- Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J., and Tiedje, J.M. (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2802-2810.
- Geyer, R., Peacock, A.D., White, D.C., Lytle, C., and Van Berkel, G.J. (2004) Atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for simultaneous mass spectrometric analysis of microbial respiratory ubiquinones and menaquinones. *J. Mass Spectrom.* **39**: 922-929.
- Geyer, R., Peacock, A.D., Miltner, A., Richnow, H.H., White, D.C., Sublette, K.L., and Kästner, M. (2005) In situ assessment of biodegradation potential using biotrap amended with <sup>13</sup>C-labeled benzene or toluene. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 4983-4989.

- Glötz, C., Zwiebel, R., Brimacombe, K., Edwards, K., and Kossel, H. (1981) Secondary structure of the large subunit ribosomal RNA from *Escherichia coli*, *Zea mays* chloroplast, and human and mouse mitochondrial ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9**: 3287-3306.
- Gödeke, S., Weiß, H., Geistlinger, H., Fischer, A., Richnow, H.H., and Schirmer, M. (2004) Strömungs- und Tracer-Transportmodellierung am Natural-Attenuation-Standort Zeitz. *Grundwasser*. 3-11.
- Gödeke, S., Richnow, H.-H., Wei, H., Fischer, A., Vogt, C., Borsdorf, H., and Schirmer, M. (2006) Multi tracer test for the implementation of enhanced in-situ bioremediation at a BTEX-contaminated megasite. *J. Contam. Hydrol.* **87**: 211-236.
- Goudar, C.T., and Strevett, K.A. (1998) Comparison of relative rates of BTEX biodegradation using respirometry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 11-18.
- Grathwohl, P. (1997) Auswirkung der Lösungs- und Desorptionskinetik auf die Bioverfügbarkeit organischer Schadstoffe. In *Mikrobieller Schadstoffabbau - Ein interdisziplinärer Ansatz*. Knorr, C., and Schell, T. (eds): Vieweg, pp. 13-84.
- Grbic-Galic, D., and Vogel, T.M. (1987) Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 254-260.
- Griebler, C., and Mösslacher, F. (2003) *Grundwasser-Ökologie*. Facultas Verlags- und Buchhandels AG.
- Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D., and Geiger-Kaiser, M. (2002) Distribution patterns of attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm. *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 117-129.
- Griebler, C., Safinowski, M., Vieth, A., Richnow, H.H., and Meckenstock, R.U. (2004) Combined application of stable isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 617-631.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., and Bailey, M.J. (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5488-5491.
- Guckert, J.B., Antworth, C.P., Nichols, P.D., and White, D.C. (1985) Phospholipid, ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**: 147-158.

- Gutiérrez, T., Learmonth, R.P., Nichols, P.D., and Couperwhite, I. (2003) Comparative benzene-induced fatty acid changes in a *Rhodococcus* species and its benzene-sensitive mutant: Possible role of myristic and oleic acids in tolerance. *J. Chem. Ecol.* **29**: 2369-2378.
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rossello-Mora, R., and Widdel, F. (1999) Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 999-1004.
- Harms, H., and Zehnder, A.J.B. (1995) Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 27-33.
- Hazen, T., Jiménez, L., López de Victoria, G., and Fliermans, C. (1991) Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microb. Ecol.* **22**: 293-304.
- Hedrick, D.B., and White, D.C. (1986) Microbial respiratory quinones in the environment. A sensitive liquid chromatographic method. *J. Microbiol. Methods* **5**: 243-254.
- Heider, J. (2007) Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**: 188-194.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., and Widdel, F. (1998) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 459-473.
- Heidrich, S., Wei, H., and Kaschl, A. (2004) Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany). *Environ. Pollut.* **129**: 277-288.
- Heipieper, H.J., and de Bont, J.A. (1994) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4440-4444.
- Hendrickx, B., Dejonghe, W., Boenne, W., Brennerova, M., Cernik, M., Lederer, T. et al. (2005) Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: an in situ mesocosm study. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3815-3825.
- Herrmann, S., Kleinstaub, S., Neu, T.R., Richnow, H.H., and Vogt, C. (2008) Enrichment of anaerobic benzene-degrading microorganisms by in situ microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 94-106.
- Hiraishi, A. (1999) Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 449-460.
- Hiraishi, A., and Kato, K. (1999) Quinone profiles in lake sediments: Implications for microbial diversity and community structures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**: 221-227.

- Hiraishi, A., Iwasaki, M., Kawagishi, T., Yoshida, N., Narihiro, T., and Kato, K. (2003) Significance of lipoquinones as quantitative biomarkers of bacterial populations in the environment. *Microbes Environ.* **18**: 89-93.
- Hirsch, P., and Rades-Rohkohl, E. (1990) Microbial colonization of aquifer sediment exposed in a groundwater well in northern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2963-2966.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., and Bohannon, B.J.M. (2001) Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4399-4406.
- HydroServices (2008). Verfahren zur Sicherung/Sanierung von Grundwasser. URL <http://www.grundwassersanierung.de/altlast/verfahren.htm>
- Ingram, L.O. (1976) Adaption of membrane lipids to alcohols. *J. Bacteriol.* **125**: 670-678.
- Jahn, M.K., Haderlein, S.B., and Meckenstock, R.U. (2005) Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene in sediment-free iron-reducing enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3355-3358.
- Jehmlich, N., Schmidt, F., von Bergen, M., Richnow, H.-H., and Vogt, C. (2008) Protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) reveals active species within anoxic mixed cultures. *ISME J* **2**: 1122-1133.
- Jeon, C.O., Park, W., Padmanabhan, P., DeRito, C., Snape, J.R., and Madsen, E.L. (2003) Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 13591-13596.
- Johnson, P. (2008). Total Midyear Population for the World: 1950-2050. URL <http://www.census.gov/ipc/www/idb/worldpop.html>
- Johnson, S.J., Woolhouse, K.J., Prommer, H., Barry, D.A., and Christofi, N. (2003) Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. *Eng. Geol.* **70**: 343-349.
- Jourabchi, P., Van Cappellen, P., and Regnier, P. (2005) Quantitative interpretation of pH distributions in aquatic sediments: A reaction-transport modeling approach. *Am. J. Sci.* **305**: 919-956.
- Joyce, P. (2008). T-RFLP Stats. URL <http://www.webpages.uidaho.edu/~joyce/Lab%20page/TRFLP-STATS.html>

- Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G., and Greer, C.W. (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **33**: 241-249.
- Kane, S.R., Beller, H.R., Legler, T.C., and Anderson, R.T. (2002) Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* **13**: 149-154.
- Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., and Watanabe, K. (2006) RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3586-3592.
- Kästner, M., Fischer, A., Nijenhuis, I., Geyer, R., Stelzer, N., Bombach, P. et al. (2006) Assessment of microbial in situ activity in contaminated aquifers. *Eng. Life Sci.* **6**: 234-251.
- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R., and Kaushik, R. (2005) Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment and assessment in soil ecosystem. *Curr. Sci.* **89**: 1103-1112.
- Kitts, C.L. (2001) Terminal restriction fragment patterns - a tool for comparing microbial communities and assessing community. *Curr. Iss. Int. Microbiol.* **2**: 17-25.
- Kleikemper, J., Pelz, O., Schroth, M.H., and Zeyer, J. (2002) Sulfate-reducing bacterial community response to carbon source amendments in contaminated aquifer microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 109-118.
- Kölbel-Boelke, J., Anders, E.M., and Nehr Korn, A. (1988) Microbial communities in the saturated groundwater environment II: Diversity of bacterial communities in a pleistocene sand aquifer and their in vitro activities. *Microb. Ecol.* **16**: 31-48.
- Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kühner, S., Beck, A. et al. (2004) Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **181**: 182-194.
- Kusel, K., Pinkart, H.C., Drake, H.L., and Devereux, R. (1999) Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5117-5123.
- Labo (2006) *Bundesweite Kennzahlen zur Altlastenstatistik*. Umweltbundesamt: Bund- und Länderarbeitsgemeinschaft Bodenschutz.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). Chichester, United Kingdom: Wiley, pp. 11-175.

- Leuthner, B., and Heider, J. (2000) Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the bbs operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J. Bacteriol.* **182**: 272-277.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Hörth, P., Haehnel, W., Schiltz, E. et al. (1998) Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glyceryl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* **28**: 615-628.
- Leutwein, C., and Heider, J. (2001) Succinyl-CoA:(R)-Benzylsuccinate CoA-transferase: An enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **183**: 4288-4295.
- Leutwein, C., and Heider, J. (2002) (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Arch. Microbiol.* **178**: 517-524.
- Lin, B., Van Versefeld, H.W., and Röling, W.F. (2002) Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. *Biomed. Environ. Sci.* **15**: 130-144.
- Lincoln, S.P., Fermor, T.R., and Tindall, B.J. (1999) *Janthinobacterium agaricidamnosum* sp. nov., a soft roth pathogen of *Agaricus bisporus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1577-1589.
- Liou, J.S.-C., DeRito, C.M., and Madsen, E.L. (2008) Field-based and laboratory stable isotope probing surveys of the identities of both aerobic and anaerobic benzene-metabolizing microorganisms in freshwater sediment. *Environ. Microbiol.* **10**: 1964-1977.
- Lovley, D.R., Woodward, J.C., and Chapelle, F.H. (1994a) Stimulated anoxic biodegradation of aromatic hydrocarbons using Fe(III) ligands. *Nature* **370**: 128-131.
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H., and Woodward, J.C. (1994b) Use of dissolved H<sub>2</sub> concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 1205-1210.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Woodward, J.C., and Phillips, E.J.P. (1995) Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 953-958.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucl. Acids Res.* **32**: 1363-1371.
- Lueders, T., and Friedrich, M.W. (2002) Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2484-2494.

- Lueders, T., and Friedrich, M.W. (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 320-326.
- Lueders, T., Manefield, M., and Friedrich, M.W. (2003) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ. Microbiol.* **536**: 1-6.
- Mandelbaum, R.T., Shati, M.R., and Ronen, D. (1997) In situ microcosms in aquifer bioremediation studies. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 489-502.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., and Bailey, M.J. (2002a) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5367-5373.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Ostle, N., Ineson, P., and Bailey, M.J. (2002b) Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 2179-2183.
- Marsh, T.L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 323-327.
- Meckenstock, R.U. (1999) Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 67-73.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C., and Richnow, H.H. (2004) Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.* **75**: 215-255.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., and Richnow, H.H. (1999)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* **1**: 409-414.
- Moore, F.P., Barac, T., Borremans, B., Oeyen, L., Vangronsveld, J., van der Lelie, D. et al. (2006) Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**: 539-556.

- Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C.C., and Meckenstock, R.U. (2004) Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch. Microbiol.* **181**: 407-417.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., and Meckenstock, R.U. (2002) Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5191-5194.
- Neufeld, J., Dumont, M., Vohra, J., and Murrell, J. (2007a) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microb. Ecol.* **53**: 435-442.
- Neufeld, J.D., Vohra, J., Dumont, M.G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M.W., and Murrell, C.J. (2007b) DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols* **2**: 860-866.
- Nordstrom, K.M., and Laakso, S.V. (1992) Effect of growth temperature on fatty acid composition of ten *Thermus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1656-1660.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B., and Timmis, K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **2**: 39-50.
- Peacock, A.D., Chang, Y.J., Istok, J.D., Krumholz, L., Geyer, R., Kinsall, B. et al. (2004) Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microb. Ecol.* **47**: 284-292.
- Pelz, O., Chatzinotas, A., Zarda-Hess, A., Abraham, W.-R., and Zeyer, J. (2001a) Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using <sup>13</sup>C-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**: 123-131.
- Pelz, O., Chatzinotas, A., Andersen, N., Bernasconi, S.M., Hesse, C., Abraham, W.-R., and Zeyer, J. (2001b) Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations. *Arch. Microbiol.* **175**: 270-281.
- Pombo, S.A., Pelz, O., Schroth, M.H., and Zeyer, J. (2002) Field-scale <sup>13</sup>C-labeling of phospholipid fatty acids (PLFA) and dissolved inorganic carbon: tracing acetate assimilation and mineralization in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 259-267.
- Pombo, S.A., Kleikemper, J., Schroth, M.H., and Zeyer, J. (2005) Field-scale isotopic labeling of phospholipid fatty acids from acetate-degrading sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**: 197-207.
- Rabus, R., and Widdel, F. (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**: 96-103.

- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W., and Widdel, F. (1993) Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1444-1451.
- Radajewski, S., McDonald, I.R., and Murrell, J.C. (2003) Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 296-302.
- Radajewski, S., Webster, G., Reay, D.S., Morris, S.A., Ineson, P., Nedwell, D.B. et al. (2002) Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* **148**: 2331-2342.
- Regnier, P., O'Kane, J.P., Steefel, C.I., and Vanderborght, J.P. (2002) Modeling complex multi-component reactive-transport systems: towards a simulation environment based on the concept of a Knowledge Base. *Appl. Math. Model.* **26**: 913-927.
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W., and Meckenstock, R.U. (2003) Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *J. Contam. Hydrol.* **65**: 101-120.
- Roeling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., and Head, I.M. (2002) Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5537-5548.
- Rückert, M., Großmann, J., Richnow, H.-H., Vogt, C., Popp, P., and Weiß, H. (2005) Untersuchung natürlicher Abbaupotenziale für altlastenbedingte Belastungen in Fließgewässern. *Altlasten Spektrum* **3**: 125-130.
- Ruess, L., Haggblom, M.M., Garcia Zapata, E.J., and Dighton, J. (2002) Fatty acids of fungi and nematodes-possible biomarkers in the soil food chain? *Soil Biol. Biochem.* **34**: 745-756.
- Schink, B. (2006) Microbially driven redox reactions in anoxic environments: Pathways, energetics, and biochemical consequences. *Eng. Life Sci.* **6**: 228-233.
- Schirmer, M., Dahmke, A., Dietrich, P., Dietze, M., Godeke, S., Richnow, H.H. et al. (2006) Natural attenuation research at the contaminated megasite Zeitz. *J. Hydrol.* **328**: 393-407.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2006) Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6773-6779.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., and Tebbe, C.C. (2001) Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3557-3563.

- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumppower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **18**: 3091-3092.
- Schrimpf, G. (2002) *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Schroth, M.H., Kleikemper, J., Bolliger, C., Bernasconi, S.M., and Zeyer, J. (2001) In situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses. *J. Contam. Hydrol.* **51**: 179-195.
- Schwieger, F., and Tebbe, C.C. (1998) A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4870-4876.
- Seyfried, B., Glod, G., Schocher, R., Tschech, A., and Zeyer, J. (1994) Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and m-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4047-4052.
- Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H. et al. (2005) Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: Isolation and degradation genes. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **69**: 1483-1491.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201-222.
- Sittig, M. (1985) *Handbook of toxic & hazardous chemicals & carcinogens*. Park Ridge, U.S.: Noyes Publications.
- Snyder, R. (2004) Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab. Rev.* **36**: 531-547.
- Spormann, A.M., and Widdel, F. (2001) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Stapleton, R.D., Ripp, S., Jimenez, L., Cheol-Koh, S., Fleming, J.T., Gregory, I.R., and Sayler, G.S. (1998) Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: site assessment and characterization. *J. Microbiol. Methods* **32**: 165-178.
- Staudt, H., Horn, H., Hempel, D.C., and Neu, T.R. (2004) Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **88**: 585-592.

- Stelzer, N. (2008) *Entwicklung eines Testsystems zur Erfassung der in situ Biodegradation im Grundwasser*. Doktorarbeit. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Department für Isotopenbiogeochemie.
- Stelzer, N., Fischer, A., Richnow, H.H., and Kästner, M. (2006a) Analyse des anaeroben Benzolabbaus: Vergleich von In-situ-Mikrokosmen, Elektronenakzeptorbilanzen und Isotopenfraktionierungsprozessen. *Grundwasser* **11**: 247-258.
- Stelzer, N., Büning, C., Pfeifer, F., Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., Nijenhuis, I. et al. (2006b) In situ microcosms to evaluate natural attenuation potentials in contaminated aquifers. *Org. Geochem.* **37**: 1394-1410.
- Stumm, W., and Morgan, J.J. (1996) *Aquatic Chemistry*. New York: Wiley.
- Sublette, K., Peacock, A., White, D., Davis, G., Ogles, D., Cook, D. et al. (2006) Monitoring subsurface microbial ecology in a sulfate-amended, gasoline-contaminated aquifer. *Ground Water Monit. Rem.* **26**: 70-78.
- Suzuki, M.T., and Giovannoni, S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625-630.
- Tebbe, C.C., Schmalenberger, A., Peters, S., and Schwieger, F. (2001) Single-strand polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. In *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Rochelle, P.A. (ed). Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, pp. 161-175.
- Thullner, M., Van Cappellen, P., and P., R. (2005) Modeling the impact of microbial activity on redox dynamics in porous media. *Geochim. Cosmochim. Acta* **69**: 5005-5019.
- Travis, C., and Doty, C. (1990) ES&T Views: Can contaminated aquifers at superfund sites be remediated? *Environ. Sci. Technol.* **24**: 1464-1466.
- Tuccillo, M.E., Cozzarelli, I.M., and Herman, J.S. (1999) Iron reduction in the sediments of a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Appl. Geochem.* **14**: 655-667.
- U.S.-EPA (1999) *Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action and Underground Storage Tank Sites*. Directive Number: 9200: OSWER.
- Ulrich, A.C., Beller, H.R., and Edwards, E.A. (2005) Metabolites detected during biodegradation of <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 6681-6691.

- v. Wintzingerode, F., Göbel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213-229.
- Vestal, J.R., and White, D.C. (1989) Lipid analysis in microbial ecology-Quantitative approaches to the study of microbial communities. *Bioscience* **39**: 535-541.
- Vieth, A., Kästner, M., Schirmer, M., Weiss, H., Gödeke, S., Meckenstock, R.U., and Richnow, H.H. (2005) Monitoring in situ biodegradation of benzene and toluene by stable carbon isotope fractionation. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 51-60.
- Villanueva, L., Navarrete, A., Urmeneta, J., Geyer, R., White, D., and Guerrero, R. (2007) Monitoring diel variations of physiological status and bacterial diversity in an estuarine microbial mat: An integrated biomarker analysis. *Microb. Ecol.* **54**: 523-531.
- Vogel, T.M., and Grbic-Galic, D. (1986) Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 200-202.
- Vogt, C., Losche, A., Kleinstüber, S., and Müller, S. (2005) Population profiles of a stable, commensalistic bacterial culture grown with toluene under sulphate-reducing conditions. *Cytometry Part A* **66A**: 91-102.
- Vogt, C., Gödeke, S., Treutler, H.-C., Weiß, H., Schirmer, M., and Richnow, H.-H. (2007) Benzene oxidation under sulfate-reducing conditions in columns simulating in situ conditions. *Biodegradation* **18**: 625-636.
- Vroblesky, D.A., and Chapelle, F.H. (1994) Temporal and spatial changes of terminal electron-accepting processes in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and the significance for contaminant biodegradation. *Water Resour. Res.* **30**: 1561-1570.
- Wachter, T., Dethlefsen, F., Gödeke, S., and Dahmke, A. (2004) Räumlich-statistische Charakterisierung der Hydrogeochemie einer BTEX-Grundwasserkontamination am Standort "RETZINA"/Zeitz. *Grundwasser-Zeitschrift der Fachsektion Hydrogeologie* **9**: 21-32.
- Wagner, M., Loy, A., Klein, M., Lee, N., Ramsing, N.B., Stahl, D.A., and Friedrich, M.W. (2005) Functional marker genes for identification of sulfate-reducing Prokaryotes. *Methods Enzymol.* **397**: 469-489.
- Weaver, J. (2008). EPA online-tools for site assessment calculations. URL <<http://www.epa.gov/athens/learn2model/part-two/onsite/estdiffusion.htm>>

- Weiner, J.M., and Lovley, D.R. (1998) Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 775-778.
- Weiner, J.M., Lauck, T.S., and Lovley, D.R. (1998) Enhanced anaerobic benzene degradation with the addition of sulfate. *Bioremediation J.* **2**: 159-173.
- Wenderoth, D.F., Rosenbrock, P., Abraham, W.R., Pieper, D.H., and Höfle, M.G. (2003) Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microb. Ecol.* **46**: 161-176.
- Whitby, C., Bailey, M.J., Whitely, A., Murrell, J.C., Kilham, K., Prosser, J., and Lappin-Scott, H. (2005) Stable isotope probing links taxonomy with function in microbial communities. *ASM News* **71**: 169-173.
- White, D.C. (1993) In situ measurement of microbial biomass, community structure and nutritional status. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **344**: 59-67.
- White, D.C., and Ringelberg, D.B. (1998) Signature lipid biomarker analysis. In *Techniques in microbial ecology*. Burlage, R.S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., and Sayler, G. (eds): Oxford University Press., pp. 255-272.
- White, D.C., Pinkart, H.C., and Ringelberg, D.B. (1995) Biomass measurements: biochemical approaches. In *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C.H., Kudsen, G., McInerney, M., Stetzenbach, L.D., and Walter, M. (eds): American Society for Microbiology Press. Washington, DC, pp. 91-101.
- White, D.C., Stair, J.O., and Ringelberg, D.B. (1996) Quantitative comparisons of in situ microbial diversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 185-196.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., and Bobbie, R.J. (1979) Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**: 51-62.
- Whited, G.M., and Gibson, D.T. (1991) Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to p-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**: 3010-3016.
- Whiteley, A.S., Manefield, M., and Lueders, T. (2006) Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 67-71.
- Whiteley, A.S., Thomson, B., Lueders, T., and Manefield, M. (2007) RNA stable-isotope probing. *Nat. Protocols* **2**: 838-844.

- Widdel, F., and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259-276.
- Wiedemeier, T.D., Rifai, H.S., Newell, C.J., and Wilson, J.T. (1999) *Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface*. John Wiley & Sons, Inc.
- Winderl, C., Schaefer, S., and Lueders, T. (2007) Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environ. Microbiol.* **9**: 1035-1046.
- Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., and Lueders, T. (2008) Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 792-801.
- Zelles, L. (1999) Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol Fertil Soils* **29**: 111-129.
- Zengler, K., Heider, J., Rosselló-Mora, R., and Widdel, F. (1999) Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfovirdis*. *Arch. Microbiol.* **172**: 204-212.
- Zhou, J.Z., Fries, M.R., Cheesanford, J.C., and Tiedje, J.M. (1995) Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus toluolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 500-506.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Kollegen bedanken, die mich während der Dissertation unterstützt haben.

- Mein erstes großes Dankeschön gilt Matthias Kästner, der mir zu jeder Zeit mit regen Diskussionen, Anregungen und Problemlösungen zur Seite stand.
- Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Röske für die Betreuung, das rege Interesse an meiner Arbeit und das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift bedanken.
- Ein großes Dankeschön geht an Roland Geyer, der trotz seines Wegganges vom UFZ und den damit entstandenen 730 km Distanz zwischen uns, stets großes Interesse an der Arbeit hatte und mich kräftig mit seinem Lipid-Know-How und dem kritischen Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift sowie des Manuskriptes unterstützte.
- Ein großer Dank gilt auch Hans Richnow und Anja Miltner für die fachlichen Diskussionen und Unterstützung bei der Auswertung von Massenspektren.
- Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Diplomandinnen Lydia Bräunlich, Jana Oberender und Doreen Ockert sowie der Auszubildenen Annett Ohlendorf, die mit ihrer Arbeit wertvolle Beiträge zu dieser Dissertation lieferten.
- Angelika Wichmann und Claus Härtig danke ich ganz herzlich für die große Unterstützung im Laboralltag, vor allem bei der Fettsäureanalytik.
- Kerry Sublette danke ich ganz herzlich für das zur Verfügungstellen der BioSep<sup>®</sup> Beads.
- Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Werner Kletzander bedanken, der mir bei allen Feldarbeiten unabhängig von Wind und Wetter mit seinem technischen Know-How zur Seite stand und damit für einen reibungslosen Ablauf der Feldexperimente sorgte. Für die Unterstützung bei den Feldexperimenten danke ich auch Nicole, Anko und Steffi.
- Ein großes Dankeschön gilt auch Antonis Chatzinotas für die gute Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten. Darüber hinaus möchte ich mich bei den Laborantinnen Verena, Annett und Ute bedanken, die mir stets bei allen molekularbiologischen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

- Für die sehr gute Betreuung im Isotopenlabor danke ich Ursula Günther und Matthias Gehe.
- Ein weiteres großes Dankeschön gilt Chris Tebbe, Anja Bettina-Dohrmann, Karin Trescher und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für den sehr fruchtbaren Crashkurs in Molekularbiologie und die großartige Zeit in Braunschweig.
- Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Tillmann Lueders und Sabine Schäfer für die die sehr gute Einführung in die RNA-basierende Dichtegradientenzentrifugation und das Bereitstellen der DNA- und RNA-Extraktionsprotokolle bedanken, mit denen ich nach einem Jahr Arbeit endlich ausreichend Nukleinsäuren von den BACTRAPs isolieren konnte.
- Für die Modellierung der Desorptionskinetiken und regen Diskussionen über das Quantifizierungsmodell bedanke ich mich herzlich bei Martin Thullner. Ein weiteres großes Dankeschön gilt Ingo Fetzer und Gwenäel Imfeld, die mich bei der statistischen Auswertung der Messdaten unterstützten.
- Besonders bedanken möchte ich mich bei Burkhard Schmidt-Brücken für die wunderbaren rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der besiedelten und unbesiedelten BioSep Beads und die viele Zeit, um diese zu erstellen.
- Carsten Vogt und Ivonne Nijenhuis danke ich für die große Unterstützung bei der Anaerobenkultivierung.
- Kerstin Ethner, Ines Mäusezahl und Elvira Knaak danke ich herzlich für den reibungslosen Laborablauf und ihren wunderbaren Humor.
- Für die großartige Zeit am UFZ danke ich ganz herzlich meinen Mitdoktoranden, allen voran Kilian, Steffen, Anja, Paula, Stefan, Claudia, Charles und Alvaros.
- Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freund Normen, der sich geduldig alle Schwierigkeiten des Forscheralltages anhörte und mir mit zahlreichen Anregungen wie auch mathematischen und computertechnischen Hilfestellungen zur Seite stand. Meiner Familie und meinem Freundeskreis danke ich für das Verständnis des Forscheralltages und Alex Masch für das Einbringen seiner Lektorenerfahrungen.

**Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 2004 bis Februar 2008 im Department für Umweltmikrobiologie am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig, unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Kästner (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung-UFZ, Leipzig) und Prof. Dr. Isolde Röske (TU Dresden) angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 20.03.2000 an.

Leipzig, 17.12.2008

Petra Bombach