



# UFZ-Bericht

UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

Nr. 4/2000

---

**Systemintegrierte Umweltbiotechnologie  
zur Sanierung von organisch und  
anorganisch belasteten Grund- und  
Oberflächenwässern**

---

Herausgeber: L. Meierling<sup>1)</sup>, N. Schmidt<sup>1)</sup>

W. Babel<sup>1)</sup>, W. Geller<sup>1)</sup>, M. Höfle<sup>2)</sup>,  
U. Stottmeister<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

<sup>2)</sup> Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,  
Braunschweig

ISSN 0948-9452

## Zwischenbericht zum HGF-Strategiefondsprojekt

### **Systemintegrierte Umweltbiotechnologie zur Sanierung von organisch und anorganisch belasteten Grund- und Oberflächenwässern**

L. Meierling<sup>1</sup>), N. Schmidt <sup>1</sup>) (Herausgeber)

W. Babel <sup>1</sup>), W. Geller <sup>1</sup>), M. Höfle <sup>2</sup>), U. Stottmeister <sup>1</sup>)



1) UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

2) Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig

## AUTOREN- UND TEILNEHMERVERZEICHNIS

1. **Dr. Abraham, Wolf-Rainer**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Chemische Mikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Tel.: 0531/6181-419, e-mail: wab@gbf.de
2. **Prof. Babel, Wolfgang**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Tel.: 0341/235-2225, e-mail: babel@rz.ufz.de
3. **Dr. Bozau, Elke**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale, Tel.: 0345/5585-225, e-mail: bozau@hdg.ufz.de
4. **Dr. Dermietzel, Jürgen**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale, Tel.: 0345/5585-208, e-mail: dermietz@hdg.ufz.de
5. **Elsner, Wolfgang**, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, TPT, Max-Planck-Straße, 21502 Geesthacht, Tel.: 04152/87-1904
6. **Dr. Friese, Kurt**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-300, e-mail: friese@gm.ufz.de
7. **Frömmichen, René**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-304, e-mail: froemmi@gm.ufz.de
8. **Prof. Geller, Walter**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-100, e-mail: geller@limnion.gm.ufz.de
9. **Dr. Göttlicher, Jörg**, Forschungszentrum Karlsruhe, ITC-WGT, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Tel.: 07247-82-3969, e-mail: joerg.goettlicher@itc-wgt.fzk.de
10. **Dr. Groeneweg, Joost**, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG6, 52425 Jülich, Tel.: 02461/61-4822, e-mail: j.groeneweg@fz-juelich.de
11. **Dr. Hard, Barbara C.**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Tel.: 0341/235-2022, e-mail: hard@umb.ufz.de
12. **Dr. Hartmann, Anton**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-4109, e-mail: hartmann@gsf.de
13. **Dr. Herzsprung, Peter**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-330, e-mail: herzsprung@gm.ufz.de
14. **PD Dr. Höfle, Manfred G.**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Umweltmikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Tel.: 0531/6181-419, e-mail: mho@gbf-braunschweig.de

15. **Dr. Hoque, Enamul**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Hydrologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg
16. **Kellner, Silke**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-433, e-mail: [kellner@gm.ufz.de](mailto:kellner@gm.ufz.de)
17. **Klauth, Peter**, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG6, 52425 Jülich, Tel.: 02461/61-2787 e-mail: [p.klauth@fz-juelich.de](mailto:p.klauth@fz-juelich.de)
18. **Klotz, Dietmar**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Hydrologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-2597, e-mail: [klotz@gsf.de](mailto:klotz@gsf.de)
19. **Klumpp, Erwin**, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG7, 52425 Jülich, Tel.: 02461/61-6635, e-mail: [e.klumpp@fz-juelich.de](mailto:e.klumpp@fz-juelich.de)
20. **Knöller, Kai**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale, Tel.: 0345/5585-219, e-mail: [knoeller@hdg.ufz.de](mailto:knoeller@hdg.ufz.de)
21. **Dr. Koschorreck, Matthias**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-405, e-mail: [koschorreck@gm.ufz.de](mailto:koschorreck@gm.ufz.de)
22. **Langener, S.**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Umweltmikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig
23. **Lorbeer, Helmut**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig
24. **Dr. Lorke, Andreas**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-442, e-mail: [lorke@gm.ufz.de](mailto:lorke@gm.ufz.de)
25. **Dr. Lünsdorf, Heinrich**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig
26. **Luther, Günther**, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, TPT, Max-Planck-Straße, 21502 Geesthacht, Tel.: 04152/87-1903, e-mail: [guenther.luther@gkss.de](mailto:guenther.luther@gkss.de)
27. **Ma, Kanxin**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Hydrologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg
28. **Martinius, Holger**, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG6, 52425 Jülich, Tel.: 02461/61-2787, e-mail: [h.martinius@fz-juelich.de](mailto:h.martinius@fz-juelich.de)
29. **Dr. Meierling, Lars**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Tel.: 0341/235-2737 e-mail: [meierlin@san.ufz.de](mailto:meierlin@san.ufz.de)
30. **Dr. Mogge, Bernhard**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-2478, e-mail: [mogge@gsf.de](mailto:mogge@gsf.de)

31. **Prof. Munch, Jean Charles**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-4064, e-mail: [munch@gsf.de](mailto:munch@gsf.de)
32. **Dr. Narres, Hans-Dieter**, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG7, 52425 Jülich, Tel.: 02461/61-3292
33. **Dr. Neu, Thomas R.**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg
34. **Dr. Pieper, Dietmar**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Tel.: 0531/6181-467, e-mail: [dpi@gbf.de](mailto:dpi@gbf.de)
35. **Pöhler, Ines**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Umweltmikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig
36. **Dr. Pohlmann, Markus**, Forschungszentrum Karlsruhe, ITC-WGT, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Tel.: 07247/82-3202, e-mail: [markus.pohlmann@itc-wgt.fzk.de](mailto:markus.pohlmann@itc-wgt.fzk.de)
37. **Dr. Priesack, Eckart**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-3354, e-mail: [priesack@gsf.de](mailto:priesack@gsf.de)
38. **Dr. Rosenbrock, Petra**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Tel.: 0531/6181-403, e-mail: [prb@gbf.de](mailto:prb@gbf.de)
39. **Dr. Scheunert, Irene**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-2774, e-mail: [scheunert@gsf.de](mailto:scheunert@gsf.de)
40. **Dr. Schmidt, Nicole**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Tel.: 0341/235-2737, e-mail: [nschmidt@san.ufz.de](mailto:nschmidt@san.ufz.de)
41. **Seifert, Kristina**, Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Interdisziplinäre Isotopenforschung, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig
42. **Prof. Seiler, Klaus-Peter**, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Hydrologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Tel.: 089/3187-2585, e-mail: [seiler@gsf.de](mailto:seiler@gsf.de)
43. **Prof. Stottmeister, Ulrich**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Tel.: 0341/235-2220, e-mail: [stottmei@san.ufz.de](mailto:stottmei@san.ufz.de)
44. **Dr. Strauch, Gerhard**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale, Tel.: 0345/5585-206, e-mail: [strauch@hdg.ufz.de](mailto:strauch@hdg.ufz.de)
45. **Vieth, Andrea**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale
46. **Vogt, Carsten**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

47. **Dr. Wenderoth, Dirk**, GBF-Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Umweltmikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Tel.: 0531/6181-440, e-mail: dfw@gbf.de
48. **Dr. Wendt-Potthoff, Katrin**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg, Tel.: 0391/8109-810, e-mail: potthoff@gm.ufz.de
49. **Witthuhn, Barbara**, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG7, 52425 Jülich, Tel.: 02461/61-4047, e-mail: b.witthuhn@fz-juelich.de
50. **Prof. Wünsche, Lothar**, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Tel.: 0341/235-2392, e-mail: wuensche@umb.ufz.de

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
English Summary .....	vii-xii
N. SCHMIDT & U. STOTTMEISTER	
Einleitung .....	xiii-xvii
L. MEIERLING, U. STOTTMEISTER, N. SCHMIDT	
<b>1 Teilprojekt 1.....</b>	<b>1</b>
<i>In situ</i> -Steuerung von mikrobiellen Schwefelumsetzungen in schwefelsauren Braunkohlentagebaurestseen und deren hydrogeologischem Umfeld	
<i>In situ control of microbial sulphate turnover in sulphur-acidic lignite mining lakes and their hydrogeological surroundings</i>	
W. GELLER	
1.1 Hydrogeologische und geochemische Modellierung an einem schwefel sauren Tagebaurestsee zur biotechnologischen Sanierung .....	10
E. BOZAU, K. KNÖLLER, G. STRAUCH	
1.2 Mineralreaktionen in Braunkohlentagebaukippen: Ihre Bedeutung für die Versauerung von Grund- und Oberflächenwässern am Beispiel des ehemaligen Tagebaus "Grube Agnes" bei Plessa (Lausitz).....	19
J. GÖTTLICHER, M. POHLMANN	
1.3 Untersuchungen zur <i>in situ</i> -Sulfatreduktion in einer Enclosure-Anlage .....	28
M. KOSCHORRECK, K. FRIESE, R. FRÖMMICHEN, W. GELLER, P. HERZSPRUNG, S. KELLNER, A. LORKE, K. WENDT-POTTHOFF	
1.4 Sulfatreduzierende Bakterien des Restlochs 111 .....	48
B. C. HARD, W. BABEL	
1.5. Analyse der taxonomischen Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaften des Restloches 111 mit molekularbiologischen Methoden.....	51
D. F. WENDEROTH, I. PÖHLER, M.G. HÖFLE	
1.6 Groß-Enclosure für Seeveruche.....	59
G. LUTHER, W. ELSNER	
<b>2 Teilprojekt 2.....</b>	<b>67</b>
Grundlagen zur mikrobiologisch-technischen <i>in situ</i> -Sanierung eines mit Chlororganika kontaminierten Grundwasserleiters im Raum Bitterfeld	
<i>Basic principles of the microbial-biotechnical in situ remediation of an aquifer contaminated by organohalogenes in the Bitterfeld area</i>	
W. BABEL	
2.1 Analyse der autochthonen Biozönose in bezug auf ökophysiologische .....	70
Gruppen	
L. WÜNSCHE, H. LORBEER, C. VOGT, B. HARD	

2.2 Bestimmung des Leistungspotentials der autochthonen Bakteriozönose für den Abbau von Chloraromaten in kontaminiertem Grundwasser.....	89
J. DERMIETZEL, A. VIETH, K. SEIFERT	
2.3 Sorptionsprozesse und biologischer Abbau von Chlororganika .....	104
B. WITTHUHN, E. KLUMPP, H.-D. NARRES, P. KLAUTH, H. MARTINIUS, J. GROENEWEG	
<b>3 Teilprojekt 3.....</b>	<b>109</b>
Einsatz mehrskaliger experimenteller Systeme zur Leistungssteigerung und Modellierung biotechnologischer <i>in situ</i> -Sanierungsverfahren	
<i>Application of multi-scale experimental systems for enhanced performance and modelling of biotechnological in situ remediation processes</i>	
M. G. HÖFLE	
3.1 Bestimmung von bodenphysikalischen, hydraulischen, chemischen und mikrobiologischen Grundparametern der Sedimente der Bohrung SAF BIT 32 .....	112
D. KLOTZ, E. HOQUE, K.-P. SEILER	
3.2 Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft in chlororganika-belastetem Grundwasser und Aquifer in Bitterfeld durch <i>in situ</i> -Hybridisierung mit phylogenetischen Sonden und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie.....	120
B. MOGGE, A. HARTMANN, J.C. MUNCH	
3.3 Untersuchungen zur Biofilmentwicklung in einem "rotating annular reactor" ....	126
T. NEU	
3.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur <i>in situ</i> -Situation autochthoner Bakterien im Chlororganika-kontaminierten Aquifer .....	129
H. LÜNSDORF, D. F. WENDEROTH, W.-R. ABRAHAM	
3.5 Vergleichende Untersuchungen des Chloraromatenabbaus im Bitterfelder Grundwasser durch Spezialkulturen und die autochthone Mikroflora .....	132
P. ROSENBROCK, S. LANGENER, W.-R. ABRAHAM , D. PIEPER.	
3.6 Mehrskalige experimentelle Systeme zur Leistungssteigerung der Bodenmikroflora zum Abbau chlorierter Verbindungen.....	142
I SCHEUNERT	
3.7 Entwicklung eines prozeßorientierten Modells zum mikrobiologischen Abbau von Chlororganika im Boden. ....	149
K. MA, E. PRIESACK, J.C. MUNCH	

## Anhang

Veröffentlichungen und Ausblick



## English Summary

### **SYSTEM-INTEGRATED ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY – REMEDIATION OF ORGANICALLY AND INORGANICALLY POLLUTED GROUNDWATER AND SURFACE WATER**

NICOLE SCHMIDT & ULRICH STOTTMEISTER

UFZ – Centre for Environmental Research, Department of Remediation Research,  
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

#### **Project aim**

This status report presents the results so far achieved in the project 'System-integrated environmental biotechnology – Remediation of organically and inorganically polluted groundwater and surface water'. Designed to investigate and develop biotechnological remediation strategies, the project is part of the Strategy Fund of the Hermann von Helmholtz Association of National Research Centres (HGF). As such, its philosophy is to establish an innovative project in close co-operation between research centres and industry, and to implement significant basic and applied research.

Currently, there is a lack of effective, economically viable strategies for the remediation of contaminated groundwater and surface water in central eastern Germany. Two demonstration cases have been chosen for the development of remediation strategies and technologies using biotechnical principles. The first case involves the study of processes in an open cast lignite mining lake in Lusatia, where the biotic and abiotic formation of sulphuric acid resulting from the sulphurous lignite seam is acidifying the lake. The second case focuses on the Bitterfeld aquifer – a typical example of contamination by chloroaromatic and chloroaliphatic compounds stemming from a neglectful chlorine-based chemical industry.

The system-integrated concept of the project is based on the development of multi-scale biotechnological remediation strategies in the third sub-project. The biocatalytic potential of microorganisms for self-purification has by no means been

exhausted with respect to technical usage and has received insufficient attention within the complex relationship of the overall system. Biotechnological principles and engineering techniques are being derived from not only ecological and microbiological but also hydrogeological and geochemical findings.

The three sub-projects complement each other by virtue of their methodological findings and interdisciplinary co-operation.

### **Sub-project 1**

#### *In situ control of microbial sulphate turnover in sulphur-acidic lignite mining lakes and their hydrogeological surroundings*

Ascertaining the processes leading to acidification (oxidation) and neutralisation (reduction) is essential if sulphur-acidic mining lakes are to be remediated to form sustainable, biochemically stable systems. The investigation of biotechnical remediation strategies focuses on microbial iron and sulphur reduction, producing alkalinity. The extent of the acidification potential is being determined by modelling the sulphur balance of the study area of mining lake no. 111 (RL 111).

Hydrogeological and geochemical investigations of the lake water (BOZAU et al., this report) detected high concentrations of sulphate (1.3 mg/l) and iron (156 mg/l), and found pH values of =3. Other results indicate that sulphur input owing to the erosion of the surrounding dumps has a major role in controlling the overall balance. In addition, analyses of the mineral reactions have revealed that sulphate is in all likelihood being formed in the lake sediments by the hydrolysis of jarosite (GÖTTLICHER & POHLMANN, this report). Redox changes of sulphur and iron take place at aerobic-anaerobic interfaces which have been populated by biofilm-forming microbial communities. Sulphur oxidation is catalysed by bacteria of the species *Thiobacillus* and sulphur reduction by desulphuricants. In culture, sulphur-reducing bacteria (SRB) have been found to thrive at pH 7 but not at pH 2.5, indicating that the bacteria concerned inhabit micro-sites in their natural habitat (HARD & BABEL, this report). These findings, along with chemical and limno-physical parameters, have been further investigated in small-scale enclosure units (24 m<sup>3</sup>) designed to

determine the milieu parameters for enhanced sulphate reduction and neutralisation. Thus, different combinations of substrates (lime, ethanol and straw amendment) are being tested under *in situ* conditions (KOSCHORRECK et al., this report). The present results have shown that anaerobic conditions alone are insufficient for desulphurisation to occur. Substrate amendment induced iron and sulphate reduction as well as H<sub>2</sub>S formation. Yet, back oxidation and the formation of elementary sulphur ('sulphur milk') took place, presumably due to the high rates of flow through the reactor in the particular enclosure unit. Furthermore, the different treatments affected bacterial count and diversity (WENDEROTH et al.). In enclosure units with substrate amendment, the total bacterial count increased, presumably stimulating those bacteria favouring the respective substrate, since diversity decreased. These findings are to be scaled up and tested in process engineering and the development of large scale enclosures (5,000 m<sup>3</sup>). This large scale enclosure plant has been completed (LUTHER & ELSNER), and the approval procedure for its installation in the lake is currently underway.

## **Sub-project 2**

### *Basic principles of the microbial-biotechnical in situ remediation of an aquifer contaminated by organohalogens in the Bitterfeld area*

The soil and groundwater in the area of Bitterfeld have been severely polluted by the uncontrolled dumping of by-products of the local chemical industry in disused lignite mining pits and by the direct deposition of mainly organochlorines containing a broad range of pollutants, especially dichloroethane, monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-Dichlorobenzene.

In addition to the pollutants themselves, microbial degradation processes are confronted by extreme abiotic conditions owing to the anaerobic and oligotrophic nature of the aquifer. Microbiological analyses quantified and characterised the autochthonous microbiota. Aerobic, denitrifying, sulphate- and iron-reducing bacteria were identified and quantified using culture methods (WÜNSCHE et al., this report). Bacteria from the aquifer were also found to be able to utilise chlorobenzenes as a

carbon and energy source under both aerobic and denitrifying conditions. Usage of  $^{14}\text{C}$ -chlorobenzene-tracers showed that the decomposition of the pollutants proceeds to first-order kinetics with a half-life period of 4–7 days (Dermietzel et al., this report). Anaerobic nitrate amendment stimulated the microbial degradation of monochlorobenzene and 1,4-dichlorobenzene within on-site reactors.

The bioavailability of organochlorines may be controlled by the modification of adsorbates on the surfaces of silicate clay minerals (WITTHUHN et al., this report), which become hydrophobic as a result of cation ion exchange at the exchange complexes. Replacement of sodium ions by different cation surfactants affected the length and number of alkyl chains adsorbed. These processes proceed within four hours and are completely reversible. The microscopic study of bacteria associated with clay minerals was achieved with a modified staining procedure. The fluorescent stain Sytox Green proved to give reliable total counts and recovery rates.

### **Sub-project 3**

#### *Application of multi-scale experimental systems for enhanced performance and modelling of biotechnological in situ remediation processes*

Whether *in situ* remediation using biological techniques is successful depends on up- and down-scaling – i.e. whether the large number of laboratory findings can be transferred to the field scale and vice versa. For this purpose a series of experimental systems with different scales is used, ranging from the Erlenmeyer flask up to large reactors. Comparability between the individual levels is ensured by the overlapping dimensioning of experimental systems and wherever possible the usage of the same methodological equipment. This should ensure the site- and habitat-specific conditions necessary to induce and maintain the desired biochemical (degradation) reactions – not only for the microbial communities belonging to the ecosystem, but also for external microorganisms introduced and even genetically modified microorganisms (GEMs). The overall aim of this sub-project is to generate experimental data at all necessary levels and to process it in synthetic, partly mathematical models, so that it provides a scientific basis for the *in situ*

bioremediation of sulphuric lakes (Sub-project 1) and aquifers contaminated by organochlorines (Sub-project 2).

The past activities of Sub-project 3 focused on the establishment of a co-operation infra-structure, adaptation of the analytical methods to aquifer material, joint field and measuring campaigns, and experiments with aquifer microcosms.

During this first year, the HGF Centres involved in this sub-project conducted two joint measuring campaigns in Bitterfeld. The activities comprised determining the hydrological conditions of the aquifer in relation to microorganisms, analysis of three dimensional microstructures of the bacterial groundwater biocenosis, and comparison of microbial degradation of chloroaromatics under different conditions in the microcosms.

Determination of the hydrological conditions of the aquifer revealed the possibility of bacteria transportation within the upper 20 metres of the aquifer (KLOTZ et al., this report). As a consequence of the texture analyses, further experiments will investigate microbial movement through fine, medium and coarse sands, as well as fine gravel. The bacteria of aquifer samples predominantly showed a spherical (i.e. coccus) morphology with up to two polar flagella, and did not coincide with a particular texture class. Physiological activity was low since only a small proportion of cells could be detected by means of 16S rRNA fluorescence *in situ* hybridisation (MOGGE et al., this report). However, the majority of the groundwater microbiota was associated with solid aquifer material. These bacteria occurred in lumps of small rod-shaped cells (LÜNSDORF et al., this report).

Biofilm-producing bacteria are also being identified by experiments within a biofilm reactor, namely a rotating annular reactor (NEU, this report).

Further experiments are focused on the smallest scale, i.e. microcosms with a volume of up to one litre. The reductive dehalogenisation of chloroaromatics in soils and the effect of specific cultures on the degradation process was studied. The capacity for the *in situ* degradation of three strains of bacteria selected by a laboratory screening procedure was studied in aquifer microcosms, i.e. in competition with the autochthonous microbiota. These bacteria were found to

enhance the degradation of chloroaromatic compounds (ROSENBROCK et al., this report). Conditions for optimum microbial activity found by laboratory tests are being investigated at the next upper scale in lysimeters under field conditions (SCHEUNERT, et al. this report). These and other results of degradation experiments constitute the data basis for a process-oriented model (MA et al., this report).

## EINLEITUNG

L. MEIERLING, U. STOTTMEISTER, N. SCHMIDT

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung,  
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

Zum heutigen Zeitpunkt liegen keine aus ökologischer Sicht sinnvollen Konzepte zur Sanierung verunreinigter Grund- und Oberflächenwässer im ost- und mitteldeutschen Raum vor, die gleichzeitig ökonomisch vertretbar und damit praktikabel sind.

Die Schadenszentren vieler als Folge intensiver Chemieproduktion entstandenen Grundwasserverunreinigungen sind nur begrenzt lokalisierbar. Voraussagen über räumliche und zeitliche Verteilungen lassen sich aufgrund unterschiedlichster stofflicher Eigenschaften der Kontaminanten und des Untergrundes schwer treffen. Aufgrund dessen gibt es für herkömmliche Sanierungstechnologien nach dem *pump and treat* – Prinzip große Unsicherheiten bezüglich Dauer und Kosten der Sanierung.

Die durch die Flutung von Tagebaurestlöchern entstandenen Oberflächenwässer sollen langfristig eine Seenlandschaft mit großen Wasserressourcen darstellen. Durch die geologische Besonderheit führte die Flutung zu einer Versauerung, die die Nutzung dieser Gewässer stark einschränkt. Für eine dringend notwendige Sanierung dieser schwefelsauren Gewässer fehlen geeignete Technologien, da die Erfahrungen der Behandlung versauerter Weichwasserseen sich nur begrenzt auf die geogen versauerten Restseen übertragen lassen.

Ziel des Projektes ist es Strategien und Technologien für die effektive und nachhaltige *in situ* - Sanierungen der angesprochenen Umweltsegmente mit Hilfe biotechnischer Prinzipien zu entwickeln. Dazu sollen Populationen von Mikroorganismen, die das Potential haben die betreffenden Schadstoffe zu eliminieren, aktiviert und schließlich gesteuert werden. Hierbei soll geklärt werden, ob und inwieweit das biokatalytische Potential von Mikroorganismen zur Selbstreinigung im Hinblick auf eine technische Nutzung effektiver als bisher ausgeschöpft werden kann.

Als Modellstandorte im mitteldeutschen Raum wurden ein kontaminierter Grundwasserleiter im Großraum Bitterfeld und stark schwefelsaure

Oberflächenwässer mit gefluteten Tagebaurestlöchern gewählt. Um den wichtigen Aspekt der Maßstabsübertragung zu berücksichtigen wurden als Grundlage Untersuchungen im Labor- und Feldmaßstab durchgeführt.

Der im Rahmen des Projektes praktizierte systemintegrierte Ansatz ist gekennzeichnet durch Zusammenarbeit naturwissenschaftlicher, technischer und ökonomischer Disziplinen. Diese finden sich in den sechs beteiligten Zentren der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft, die erstmalig in einem Projekt mit dem Schwerpunkt der Umweltbiotechnologie kooperieren.

### **Teilprojekt 1**

#### *In situ-Steuerung von mikrobiellen Schwefelumsetzungen in schwefelsauren Braunkohlentagebaurestseen und deren hydrogeologischem Umfeld*

Bei den Restlöchern der ehemaligen Braunkohlentagebaue und den umgebenden Bergbaukippen handelt es sich um Systeme, in denen der natürliche Schwefelhaushalt gestört wurde. Die Bildung von Schwefelsäure erfolgt durch biotische und abiotische Prozesse. Mit pH-Werten zwischen 2 und 3 erreicht die Versauerung der Restseen ein dramatisches Ausmaß. Die Dimensionen dieses Umweltproblems verdeutlichen folgende Zahlen: Die zu erwartende Menge an entstehendem gelösten Sulfat wird auf 3 Millionen Tonnen geschätzt. Die Menge der entstehenden verdünnten Schwefelsäure entspricht dem Wasserinhalt des Starnberger Sees. Die starke Versauerung dieser Systeme entzieht diese einer jeglichen Ressourcennutzung (Trinkwasser, Erholung). Darüber hinaus ist die Entstehung naturnaher Ökosysteme stark eingeschränkt.

Die Voraussetzung für eine Sanierung zu nachhaltig biochemisch stabilen Systemen kann nur geschaffen werden, wenn die zur Versauerung (Oxidationen) und zur Neutralisierung (Reduktionen) der jeweiligen Habitate führenden Prozesse aufgeklärt sind. Die für eine Sanierung wichtigen Prozesse finden primär an oxisch-anoxischen Grenzflächen statt, die von Biofilme erzeugenden mikrobiellen Gemeinschaften besiedelt sind. Der Redoxwechsel von Schwefel an diesen Grenzflächen wird von Bakterien der Gattung *Thiobacillus* (Schwefeloxidation) und von Desulfurikanten (Sulfatreduktion) katalysiert. Zu berücksichtigen sind dabei die vorherrschenden



ökologischen Faktoren wie beispielsweise Temperatur, Populationslimit oder Schwermetalle, die die mikrobielle Aktivität steuern bzw. durch Vergiftung völlig zum Erliegen bringen können. Die Untersuchung der Redox-Prozesse in solchen Biofilmen unter Berücksichtigung der Umsatzstöchiometrie der notwendigen Substrate und das Zusammenspiel mit abiotischen Prozessen mit dem Ziel der Entwicklung von Sanierungsstrategien bilden den Kern des Vorhabens.

Unter Beteiligung von GBF, GKSS, FZK und UFZ steht für das Projekt ein fachlich breit gefächertes Spektrum zur Verfügung. Hydrogeologische und geochemische Untersuchungen bilanzieren zunächst die Schwefelflüsse des Modellstandortes. Die biologischen Grundlagenuntersuchungen betreffen die Charakterisierung von Schwefel- und Eisenbakterien anhand der natürlichen mikrobiologischen Konsortien und von kultivierten Isolaten sowie ihrer Ökophysiologie. Die Ergebnisse der zuvor genannten Grundlagenuntersuchungen gehen in die Entwicklung objektbezogener biotechnologischer Verfahren ein. Am ausgewählten Modellobjekt, dem Restloch 111, werden Optionen für Sanierungskonzepte untersucht. Über die Entwicklung von Klein-Enclosures (24 m<sup>3</sup>) und Groß-Enclosures (5000 m<sup>3</sup>) werden biotechnologische Verfahren zur Entsäuerung stufenweise vom Laborversuch in den halbertechnischen Maßstab geführt und vor Ort im größeren Maßstab bis zur *in situ*-Sanierung getestet.

## **Teilprojekt 2**

*Grundlagen zur mikrobiologisch-biotechnischen in situ-Sanierung eines mit Chlororganika kontaminierten Grundwasserleiters im Raum Bitterfeld*

Böden und Grundwasser im Raum Bitterfeld sind durch fahrlässige Deponierung von Abprodukten der ortsansässigen chemischen Industrie in ausgekohnten Braunkohletagebauen und durch den Direkteintrag besonders chlororganischer Verbindungen mit einem breiten Schadstoffspektrum, überwiegend mit Chloraromaten und -aliphaten erheblich belastet. So erreichen die Gehalte an Monochlorbenzol beispielsweise rund 40 mg l<sup>-1</sup>.

Durch Veränderungen der hydrogeologischen Verhältnisse nach Einstellung des Braunkohlenbergbaus und mit der vorgesehenen Flutung von Tagebaurestlöchern

können sich diese Problemstoffe großflächig im Grundwasser ausbreiten und weite Areale gefährden. Zur Eliminierung dieser Problemstoffe, Sanierung der kontaminierten Grundwasserleiter und Verhinderung einer weiteren Ausbreitung der Schadstoffe erscheinen vor allem mikrobiologische *in situ*-Sanierungsverfahren erfolgversprechend.

Im Hinblick auf den mikrobiellen Schadstoffabbau stellt der mit Chlororganika belastete Grundwasserleiter einen Extremstandort dar, da er darüber hinaus oligotrophe und anaerobe Bedingungen aufweist. Nach bisherigem Kenntnisstand ist ein Abbau der vorhandenen Schadstoffe unter diesen Bedingungen sehr diffizil. Mit dem Ziel den mikrobiellen Schadstoffabbau biotechnologisch zu optimieren und zu steuern, richten sich die mikrobiologischen Untersuchungen zunächst auf die Analyse der autochthonen Biozönose, deren Diversität und ökophysiologischen Eigenschaften sowie der Bestimmung ihrer Leistungsfähigkeit. Mit einer mobilen Versuchseinheit werden die Ergebnisse aus dem Labor zunächst in einem halbtechnischen Maßstab ins Gelände übertragen und dort überprüft. Da die biologische Verfügbarkeit von Schadstoffen zudem noch von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Festphase abhängen, werden die Wechselbeziehungen zwischen den mineralischen Bestandteilen, den Schadstoffen und den Mikroorganismen des Aquifers gesondert untersucht.

Die direkte technologische Verwertung der erzielten Ergebnisse ist gegeben durch die Einbindung der Arbeiten zum Teilprojekt 2 in das unter Federführung des UFZ unter Beteiligung unterschiedlichster Forschungseinrichtungen und Praxispartner aus der gesamten Bundesrepublik und dem Ausland bearbeitete Verbundprojekt SAFIRA (Sanierungsforschung in regionalen Aquiferen). Ziel des Verbundprojektes SAFIRA ist es neuartige *in situ*-Sanierungstechnologien für kontaminierte Grundwasserleiter zu entwickeln, an der konkreten Situation in Bitterfeld zu erproben und auf analoge Schadensfälle zu übertragbar zu machen.

### Teilprojekt 3

#### *Einsatz mehrskaliger experimenteller Systeme zur Leistungssteigerung und Modellierung biotechnologischer in situ-Sanierungsverfahren*

Entscheidend für den Erfolg einer *in situ*-Sanierung durch biologische Verfahren ist die Übertragbarkeit der Vielzahl der Laborbefunde auf den Feldmaßstab und umgekehrt (*up-* bzw. *down-scaling*). Hierzu dienen eine Reihe von experimentellen Systemen mit unterschiedlichem Maßstab, der vom Erlenmeyerkolben bis zum Großreaktor reicht. Durch eine überlappende Dimensionierung der experimentellen Systeme und ein möglichst durchgängig einsetzbares Methodenbesteck soll die Vergleichbarkeit bei *up-* und *down-scaling* auf den einzelnen Ebenen gewährleistet werden. Hieraus werden dann die standort- bzw. -habitatspezifischen Bedingungen zur Induktion und Aufrechterhaltung der gewollten biochemischen (Abbau-) Reaktionen, sowohl für die ökosystemeigenen mikrobiellen Lebensgemeinschaften als auch für eingebrachte ökosystemfremde oder gentechnisch modifizierte Mikroorganismen (GEMs), erarbeitet. Insgesamt gesehen ist es die Aufgabe dieses Teilprojektes experimentelle Daten auf alle notwendigen Ebenen zu generieren und in synthetischen, teilweise mathematischen Modellen so aufzuarbeiten, dass sie die naturwissenschaftliche Basis bilden für die *in situ*-Bioremediation von mit Haloorganika kontaminierten Grundwasserleitern (TP2) und schwefelsauren Seen (TP1).

Somit fungiert Teilprojekt 3 als Bindeglied zwischen Freiland und Labor um damit das Know-How für eine zuverlässige, leistungsfähige und an den Standort bzw. die Problemstoffe angepasste Umweltbiotechnologie zu schaffen. In einem ersten Ansatz dieses Teilprojektes werden die funktionalen und organismischen Zusammenhänge der umweltmikrobiologischen Prozesse im Zielhabitat analysiert. Ein solches funktionales Verständnis einzelner Bakterienarten ist neu und besonders für den mikrobiellen Schadstoffabbau und seine Regulationsfaktoren essentiell. Dieser Ansatz sichert daher den Erfolg der gewünschten biologischen Prozesse im Sanierungsverfahren. In einem zweiten Ansatz dieses Teilprojektes werden über mehrere Skalen die mikrobiologische, biotechnische und hydrologische Vorhersagen

über die Leistungsfähigkeit und die notwendigen Rahmenbedingungen von Bioremediationsverfahren, bis hin zu mathematischen Modellen, evaluiert.

Dieser neuartige Forschungsansatz sowie sein skalenübergreifendes Methodeninventar besitzt einen gewissen Verallgemeinerungsgrad und lässt daher Rückschlüsse über den Erfolg verschiedener Sanierungsstrategien zu. Darüber hinaus wird in Zusammenarbeit mit Sanierungsunternehmen, eine wirtschaftliche biotechnologische *in situ*-Sanierung von Grund- und Oberflächenwasser ermöglicht.

## 1 Teilprojekt 1

### **IN SITU-STEUERUNG VON MIKROBIELLEN SCHWEFELUMSETZUNGEN IN SCHWEFELSAUREN BRAUNKOHLENTAGEBAURESTSEEN UND DEREN HYDROGEOLOGISCHEM UMFELD**

WALTER GELLER

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung,  
Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg

#### **Forschungsziel**

Ziel des Projektes ist es, Strategien und Technologien für die effektive und nachhaltige *in situ*-Sanierung von geogen schwefelsauren Tagebaurestseen und schwefelsäurebelasteten Bergbaukippen mit Hilfe biotechnologischer Prinzipien zu entwickeln, um die Wasserqualität langfristig zu sichern. Kern der biotechnologischen Lösungsansätze zur Entsäuerung schwefelsaurer Gewässer sind die bakterielle Eisen- und Sulfatreduktion zur Bildung von Alkalinität.

Die biologischen Grundlagenuntersuchungen betreffen die Charakterisierung von Schwefel- und Eisenbakterien anhand der natürlichen mikrobiologischen Konsortien und von kultivierten Isolaten sowie der Milieuparameter ihrer Aktivität. Die objektbezogenen biotechnologischen Verfahren werden stufenweise vom Laborversuch über den halbtechnischen Maßstab geführt und vor Ort im größeren Maßstab bis zur *in situ*-Sanierung von Demonstrationsobjekten, z.B. eines ganzen Bergbaurestsees, getestet.

Das Ausmaß des Versauerungspotentials hat große Bedeutung für den Ablauf des mikrobiellen Schwefelumsatzes im Tagebaurestsee. Eine Bilanzierung des Schwefelhaushaltes wird Daten über die Verfügbarkeit von Sulfat liefern, die zusammen mit mikrobiellen Umsatzraten Rückschlüsse auf die Dauer und damit auf den Umfang von Sanierungsmaßnahmen erlauben. Die Ergebnisse der mineralogischen, kristallographischen und der hydrologisch-geochemischen Untersuchungen des Rest-

seeumfeldes sollen die technische Durchführung der Sanierung des Restsees einfließen.

### **Erzielte Ergebnisse von Juli 1998 bis Oktober 1999**

#### *Untersuchungen des hydrogeologischen Umfeldes*

Grundlegende Parameter (Grundwasserstände, Niederschlagshöhen, Verdunstungsraten, Durchlässigkeitsbeiwerte) zur hydrogeologischen Charakterisierung des Einzugsgebietes wurden bestimmt. Die Hauptfließrichtungen des Grundwassers sind bekannt. Eine Konkretisierung des vom Institut für Umweltphysik der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellten regionalen Grundwassermodells (MODFLOW) für das Restloch 111 ist in Arbeit.

Neben der kontinuierlichen Erfassung der hydrologischen Daten wurden umfangreiche geochemische und isotopengeochemische Untersuchungen an Grund-, See- und Niederschlagswasser sowie an Kippen- und Seesedimenten durchgeführt, mit deren Hilfe Abschätzungen zum jährlichen Schwefelein- bzw. -austrag sowie eine erste Bilanzierung des Sulfates vorgenommen werden können.

Die Technische Mineralogie des Forschungszentrums Karlsruhe hat im bisherigen Zeitraum der Projektbearbeitung mit Hilfe festkörperanalytischer Methoden Verfahrensschritte entwickelt, um den mineralogischen Phasenbestand im hydrogeologischen Umfeld und in den Seesedimenten zu ermitteln und quantitativ zu erfassen. Grundlegende Bedeutung für den Eintrag von Säure und Metallen, zum Teil in toxisch wirkenden Konzentrationen, in Tagebaurestseen kommen den sulfatischen Mineralneubildungen aus der Sulfidoxidation, im wesentlichen Jarosite, und ihrem Freisetzungspotential bei zunehmender Wassersättigung der Kippen zu. Mit Kenntnis solcher kinetischer Daten kann das Verhalten von Schadstoffen bei Überschreiten der Stabilitätsgrenzen einzelner Minerale nach Veränderung der Umgebungsbedingungen (z.B. Flutung der Kippen in einem Braunkohlentagebaurestloch) abgeschätzt werden. Synthetische Eisensulfat-Minerale sind im Labor im Einsatz, um die Verfügbarkeit von Sulfat unter oxischen und insbesondere unter anoxischen Bedingungen für eine mikrobiell katalysierte Sulfatreduktion zu ermitteln.

### *Mikrobiologische Untersuchungen*

Im Rahmen zweier BMBF-Projekte in der Lausitz wurden von der AG Mikrobiologie der UFZ-Gewässerforschung Grundlagenuntersuchungen an den Bakterienkonsortien in die Wege geleitet, die an den wesentlichen Stoffumsetzungen in stark sauren Seen beteiligt sind. Es wurden hohe Sulfat- und Eisenreduktionsraten im Sediment des Sees RL 111 gemessen, die im substratbeschickten Enclosure um ein bis zwei Größenordnungen über den Vergleichswerten im See lagen. In der Folge kam es zu einem Anstieg des pH-Wertes im Sediment.

Die Sektion Umweltmikrobiologie hat sulfatreduzierende Bakterien (SRB) aus dem RL 111 isoliert und deren Wachstum bei pH 2,5 und pH 7 gemessen. Alle Isolate zeigten Wachstum nur im Neutralbereich, nicht jedoch bei dem Original-pH-Wert des Standortes. Dies deutet darauf hin, daß die SRB in Mikrohabitaten wachsen, deren pH-Milieu mit dem pH-Wert des freien Seewassers nicht hinreichend charakterisiert wird, oder daß es nicht gelungen ist, die am Standort tatsächlich aktiven Bakterien zu isolieren.

Die Abteilung Umweltmikrobiologie der GBF hat sich mit der Bestimmung der taxonomischen Struktur der Bakteriengemeinschaften aus RL 111 mit Hilfe der direkten Analyse von Nukleinsäuren und Lipiden aus der Umwelt befaßt. Mit diesem Ansatz war es möglich, die taxonomische Struktur der planktischen Bakteriengemeinschaften bis zur Gattungs- oder Artebene direkt zu bestimmen, d. h. ohne die Bakterien zu kultivieren. Im Ergebnis waren die Bakteriengemeinschaften in den Experimentallansätzen und im See sehr ähnlich zusammengesetzt. Nur ein kleiner Teil der Bakteriengemeinschaft zeigte eine metabolische Aktivität.

### *Limnologische Seeuntersuchungen und Enclosure-Versuche im Freiland*

In der Sektion Gewässerforschung wurden Grundlagen der Limnologie, Gewässerchemie und Mikrobiologie saurer Tagebaurestseen erarbeitet. Regelmäßige Sondenmessungen, chemische und biologische Probenahmen fanden in monatlichen Zweitageskampagnen statt, um die saisonale Entwicklung im See und in den gegenwärtig zu beobachtenden *Klein-Enclosures* (2m Ø) zu verfolgen. Der Versuchsbetrieb an den *Klein-Enclosures* erfolgt bis 1999 im Rahmen eines laufenden BMBF-

Programms und wird inhaltlich in das hier vorgestellte HGF-Projekt integriert. Die limnologischen Untersuchungen führten zu einer umfassenden Beschreibung und Analyse der physikalischen, chemischen und biologischen Verhältnisse und deren saisonaler Entwicklung und sind in entsprechenden Publikationen dokumentiert. Die Meßdaten sind Grundlage für die Validierung entsprechender Modellierungen.

Die biotechnologische Sanierung über mikrobielle Eisen- und Sulfatreduktion im Labor- und Enclosure-Maßstab wurde zunächst in dem 1999 abgeschlossenen BMBF-Projekt untersucht. Verschiedene Reinsubstrate und Industrie-Abprodukte wurden im Labormaßstab erprobt, dann die Versuchsansätze in Säulenexperimenten weitergeführt, wobei natürliche Temperaturschwankungen und Schichtungsinstabilitäten simuliert wurden. Im Labormaßstab der Standsäulen wurde nach Zugabe einer Substratkombination von Stroh und Carbokalk eine vollständige Neutralisierung (von pH 2,6 bis pH 6,0) durch mikrobiologische Sulfatreduktion und anschließende Eisendisulfid-Fällung im Zeitraum von ca. 20 Wochen erreicht. Das Verfahrensprinzip wurde zum Patent angemeldet.

Das 'scale-up' wurde anschließend in einer 6x-Enclosure-Anlage im Freilandversuch den natürlichen Wetter- und Umfeldbedingungen weiter angenähert. Die Stoffzugabe im Freilandversuch der *Klein-Enclosures* (24m<sup>3</sup>) wurde minimal gehalten, um den Fortgang und das Ausmaß der Folgereaktionen genau erfassen zu können. Es zeigte sich eine starke Zunahme der biologischen Reduktionsprozesse und Alkalinitätssteigerung im Sediment. In der bisherigen Laufzeit der Freilandversuche wurde eine Neutralisierung der Wassersäule noch nicht erreicht. Die Ergebnisse der Enclosureuntersuchungen und auch der Bakterienisolierungen haben gezeigt, daß die Milieubedingungen am Mikrostandort der Bakterien von entscheidender Bedeutung für deren Aktivität sind. Zur Charakterisierung von Mikrohabitaten und zur Quantifizierung von Umsatzraten wurde die nötige Meßtechnik (Mikrosensoren) eingerichtet und getestet.

Im Rahmen des HGF-Projektes und in Zusammenarbeit mit GKSS wurden die Versuche im Sommer/Herbst 1999 in zwei Varianten weitergeführt: (1.) Ergänzung von laufenden Enclosure-Ansätzen durch De-Oxygenierung der Wassersäule mittels



Ausblasen mit  $N_2$  und (2.) Einbau/Betrieb eines strohgefüllten, 6m-langen vertikalen Reaktorrohres ( $\varnothing$ : 30cm) mit solarbetriebener Wasserumwälzung. Im (1.) "Passiv-Ansatz" wurde Anaerobie und eine deutliche Senkung des Redoxpotentials im gesamten Enclosure-Volumen erreicht, die Reaktionen schritten im Beobachtungszeitraum jedoch nicht bis zur Stufe der Sulfatreduktion fort. Der Versuch zeigt, daß allein ein anoxischer Wasserkörper (d.h. Hypolimnion) nicht ausreicht, um den im Sediment deutlichen Neutralisierungseffekt schnell in die Wassersäule zu übertragen. Als Ursache wird eine zu geringe Substratdosierung angenommen. Im (2.) "Aktivan-satz" ging die Reaktion weiter bis zur Eisen- und Sulfatreduktion und  $H_2S$ -Bildung. Die Reaktionen führten jedoch durch  $H_2S$ -Rückoxidation im oberen Teil der Wassersäule zum elementaren Schwefel ("Schwefelmilch"). Als Ursache wird ein für die angestrebte Eisenmonosulfid-Fällung zu niedrig bleibender pH-Wert wegen zu hoher Wasseraustauschrate im Reaktorrohr angenommen. Abgeleitet aus Versuchsergebnissen mit geschlossenen Reaktoren wurde der offene *in situ*-Reaktor mit ca. 20 Stunden Austauschzeit des Reaktorvolumens betrieben. Die sich dabei ergebenden typischen Anströmgeschwindigkeiten der mit Biofilm assoziierten Bakterien von ca. 100x Zelldurchmesser pro Sekunde waren hoch und verhinderten wahrscheinlich eine hinreichende Ausbildung der notwendigen pH-Mikrozonierungen im strohgefüllten Reaktorbett. Im geplanten Folgeversuch soll eine um ein bis zwei Größenordnungen verringerte Wasserumwälzung (>1 Woche Volumenaustauschzeit und Anströmgeschwindigkeiten von ca. 1x Zelldurchmesser pro Sekunde) eingesetzt werden. Das bei diesen Versuchen mit dem steuerbaren "Aktivreaktor" deutlich werdende Problem der zu optimierenden Durchflußgeschwindigkeit soll im halbtechnischen Maßstab mit unterschiedlichen Durchsatzraten und Substratdosierungsraten untersucht werden.

#### *Technische Verfahrensentwicklung und großmaßstäbliche Versuche*

Für den Maßstab der ca. 5000  $m^3$  fassenden *Groß-Enclosures* und des ganzen Sees oder von See-Teilbecken waren technische und logistische Probleme zu lösen, die die von GKSS eingebrachte Ingenieurkompetenz erfordern.

In einer Vorstudie wurden die biologischen, technischen und logistischen Rahmenbedingungen dieses Verfahrens zur Sanierung schwefelsaurer Restseen aus technologischer Sicht analysiert. Es wurden zunächst die Rahmenbedingungen für die Auslegung und den Betrieb der *Groß-Enclosures* definiert. Ein Enclosure mit 10m Durchmesser wurde technisch geplant und bereits hergestellt. Er soll Ende 1999 bis Anfang 2000 in den See eingesetzt werden. Der Vorgang der Einbringung, die Verankerung und die Betriebsweise sind bereits Gegenstand des beim Brandenburgischen Oberbergamt im Bearbeitungsverfahren befindlichen Sonderbetriebsplans für Restloch 111, auf dessen Grundlage die weiteren Arbeiten erst möglich werden. Die Ausarbeitung der die Forschungs- und Betriebsaktivitäten beschreibenden Anteile des Sonderbetriebsplans, der von der LMBV/Länderbereich Brandenburg federführend erarbeitet und in das Genehmigungsverfahren eingebracht werden mußte, war ein wesentlicher Bestandteil der technisch-logistischen Arbeiten 1999.

Kurzfristig wurde ein Plan für den Einbau/Betrieb eines vertikalen Reaktorrohres mit solarbetriebener Wasserumwälzung in einen der bestehenden *Klein-Enclosures* realisiert. Der Enclosure wurde mit dieser Ausstattung von einem "Passiv-Reaktor" zu einem steuerbaren "Aktiv-Reaktor" weiterentwickelt. Der erste Experimentaleinsatz und vorläufige Ergebnisse sind oben beschrieben.

### **TP1 Erfolgskontrolle zu Meilenstein-Vorgaben**

Das Arbeitsprogramm gliederte sich in drei Abschnitte, die objekt- und methodenbezogen getrennt behandelt werden: (1.) Die landseitigen Untersuchungen des hydrologischen Umfeldes, (2.) die mikrobiologischen Laboruntersuchungen und (3.) die Untersuchungen des Restsees selbst und die Freilandexperimente mit Enclosures.

*(1.) Untersuchungen des hydrologischen Umfeldes und Analyse der Sulfatquellen  
(FZK Technische Mineralogie, UFZ-Hydrogeologie)*

Bei der Erfassung der hydrogeologisch-hydrodynamischen und geochemischen Ausgangssituation wurden die Meilensteinvorgaben für 1999, z.T. auch schon für Anfang 2000, erreicht (Untersuchung des Grundwasserfeldes, Abstimmung der Probenahmen wegen der Hydrochemie des Restsees und der Koordination der Proben-

behandlung wegen der Festphasenanalytik). Die geplanten Recherchen bei LMBV und Forstverwaltung wegen der geologischen Situation wurden im wesentlichen erfolgreich durchgeführt.

Zur Auswahl der spezifischen Schwefel-Ausgangsverteilung am Modellstandort wurden die notwendigen Sedimentkerne und Kippenmaterial gewonnen und die Abstimmung bezüglich vorhandener Schwefelphasen durchgeführt. Die Isotopensignaturen von Grund- und Seewasser sind ermittelt worden, die Kinetik der Schwefelfreisetzung konnte in ersten Elutionsversuchen erfaßt werden. Anhand der Isotopensignaturen von Grund- und Seewasser konnten die mittlere Verdunstungsrate des Restloches und die mit dem Grundwasserstrom verbundene Sulfatfracht bestimmt werden. Drei neue Grundwassermeßstellen wurden errichtet.

Die für Sulfatbindung und -freisetzung wesentlichen Minerale des Kippenmaterials, der anstehenden tertiären Sedimente und der Seesedimente wurden bestimmt. Damit konnte die Identifizierung von Mineralneubildungen als Sulfatquellen und die Nennung ihrer möglichen Mineralreaktionen bei Milieuänderung als Grundlage für entsprechende Modellierungen weitgehend abgeschlossen werden. Mit der Synthese der in den Felduntersuchungen nachgewiesenen Sulfate für die Untersuchungen zur Ermittlung ihrer Hydrolysekinetik ist bereits begonnen worden.

## *(2.) Mikrobiologische Untersuchungen (UFZ-Gewässerforschung. & Umweltmikrobiologie, GBF)*

Die taxonomische, physiologische und molekularbiologische Charakterisierung der Bakteriengemeinschaft am Standort wurde im geplanten Zeitrahmen durchgeführt und wird fortgesetzt. Im einzelnen umfaßt dies die Lipidanalysen relevanter Bakteriengattungen, Untersuchungen zur Anpassung der 5S rRNA Fingerprinttechnik auf Biofilme, die Bestimmung der taxonomische Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaft während des Ausgangszustandes im Bergbaurestsee unter Einbeziehung nicht kultivierter Mikroorganismen, die Bestimmung mikrobiologischer Basisparameter und der Abundanz von Bakterien des Fe- und S-Kreislaufs, die Isolation und Selektion metall- und säuretoleranter Sulfat- und Eisenreduzierer, sowie die taxo-

nomische Einordnung von Isolaten nach biochemisch/physiologischen Methoden und auf der 16S rRNA Ebene.

Die entnommenen mikrobiologischen Proben werden im Labor als Gemeinschaften charakterisiert und/oder in Isolatkulturen unabhängig vom Freilandprogramm weiter bearbeitet. Die mikrobiologischen Untersuchungen am See bzw. in den Enclosures betreffen Inkubationsversuche zur Bestimmung der Umsatzraten, bzw. –potentiale (die Sulfatreduktion wird zwar im Labor gemessen, ist aber eine *in situ*-Rate). Die Bestimmung der Bakterienabundanz und des Lipidphosphates wurden im Rahmen mindestens zweitägiger Kampagnen mehrere Male im Jahr durchgeführt und werden fortgesetzt.

### *(3.) Seeuntersuchungen und technische Umsetzungen*

Die Seeuntersuchungen wurden über das im HGF-Antrag beschriebene Ausmaß hinaus weiter geführt. Insbesondere die limnophysikalischen Messungen im See und die Modellierung der Strömungs- und Wasseraustauschvorgänge haben den Charakter einer Grundlagenuntersuchung, die als Wissensbasis für den Maßstab der späteren Ganz-See-Experimente und allgemein für das Verständnis der physikalischen Vorgänge in Seen mit komplexer Beckenstruktur wichtig ist (weitere Anwendungsbeispiele: Goitschensee und Geiseltalsee).

Die Messungen mit automatischen Sonden (Jojo-Prinzip) haben Details der Algen- und pH-Entwicklung offengelegt, die als eigene Phänomene weiter verfolgt werden und den Rahmen des HGF-Projektes überschreiten. Ähnlich zu bewerten sind die ausführlichen Untersuchungsergebnisse zur Verteilung der Schwermetalle in Wasser und Sediment und ihre Anreicherung in definierten Tiefenbereichen des Sees.

Die Versuche mit *Klein-Enclosures* bilden die Anfangsphase des HGF-Projektes. Die oben beschriebenen Versuchsvarianten und die dabei erzielten Ergebnisse sind unmittelbar aus vorherigen Versuchsergebnissen abgeleitet worden und waren in der Versuchplanung des HGF-Antrags so nicht vorgesehen. Die wichtigen Ergebnisse dieser Versuche stellen einen gewissen Ausgleich dar für die Verzögerungen der Arbeiten mit den *Groß-Enclosures*, deren Beginn von der derzeit noch ausstehenden

Genehmigung des beantragten LMBV-Sonderbetriebsplans für das Restloch 111 abhängt.

Die Erarbeitung der technischen Konzeption der *Groß-Enclosures* ist abgeschlossen und liegt im Zeitplan. Die technischen Rahmen- und Arbeitsbedingungen wurden definiert und sind Bestandteil des o.g. Sonderbetriebsplans für RL 111. Die geplanten Vorversuche wurden z.T. im Labormaßstab durchgeführt, z.T. – anders als zunächst geplant – im Maßstab der *2m-Klein-Enclosures* begonnen (s.o.). Die Versuche zur Methodik der Einbringung und Handhabung der *Groß-Enclosures* stehen noch aus und können erst nach Vorliegen der amtlichen Genehmigung – voraussichtlich nicht vor Dez. '99/Jan. 2000 - begonnen werden. Dies soll im ersten Schritt mit dem schon beschafften 10m-Enclosure erfolgen, bevor im Folgeschritt der erste 30m-Enclosure zum Einsatz kommt.

## **1.1 Hydrogeologische und geochemische Modellierung an einem schwefelsauren Tagebaurestsee zur biotechnologischen Sanierung**

BOZAU, E.; KNÖLLER, K.; STRAUCH, G.

Umweltforschungszentrum Leipzig – Halle GmbH/Sektion Hydrogeologie  
Theodor-Lieser-Straße 4, 06120 Halle/Saale

### **Einleitung**

Die Landschaft der Niederlausitz wurde durch den Braunkohlentagebau starken anthropogenen Veränderungen unterworfen. In vielen der ehemaligen Restlöcher des Lausitzer Braunkohlenreviers entwickelten sich nach Einstellung der Kohleförderung, bedingt durch den Wiederanstieg des Grundwassers, Seen.

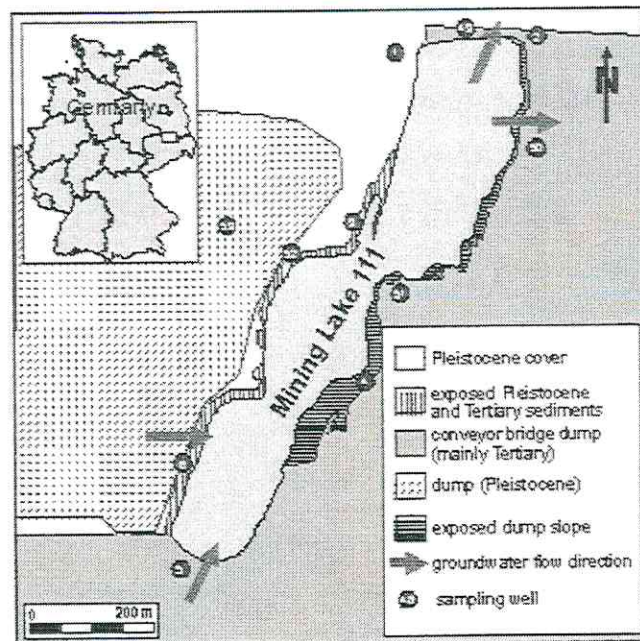
Durch die in den Kippengesteinen stattfindenden Mineralumwandlungen und die damit verbundenen chemischen Reaktionen zwischen dem ansteigenden Grundwasser und den Kippengesteinen entstehen meist saure Gewässer mit hohen Eisen- und Sulfatgehalten, die sog. „acidic mining lakes“. Diese Gewässer mit pH-Werten von etwa  $<3$  sind weder für eine Freizeitnutzung noch als Trinkwasserreservoir geeignet. Auch die Entwicklung von artenreichen Ökosystemen ist eingeschränkt.

### **Methodik**

Für die Durchführung bzw. Planung einer biotechnologischen Sanierung versauerter Seen sind die Kenntnisse der hydrogeologischen und geochemischen Prozesse von ausschlaggebender Bedeutung. Deshalb werden vorliegende Untersuchungen dieser Prozesse am Restloch 111 (Knöller, 1999; Knöller & Strauch, 1999) weitergeführt und vertieft.

Neben der Erfassung der hydrogeologischen Verhältnisse erstrecken sich die weiteren, vor allem chemischen und isotopengeochemischen Untersuchungen einerseits auf das Grundwasser selbst, andererseits auf die das Restloch umgebenden Sedimente.

**Abb. 1:**  
Lage und geologische Situation  
des Untersuchungsgebietes  
(Knöller, 1999)



## Ergebnisse und Diskussion (Kurzdarstellung)

### *Hydrogeologie*

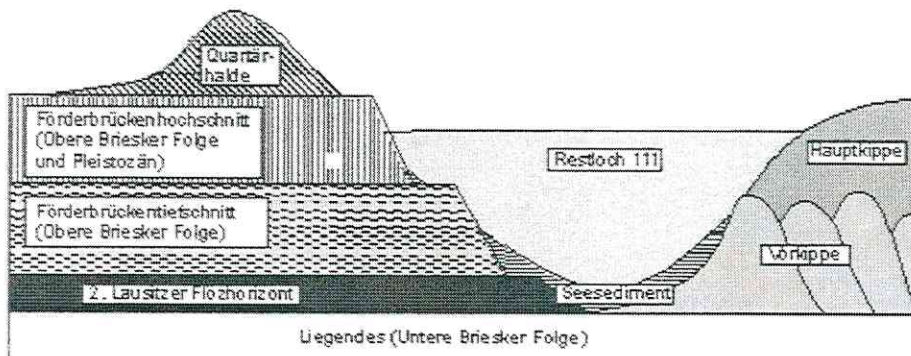
Das Untersuchungsgebiet (Abbildung 1) befindet sich zwischen dem Lausitzer Urstromtal und dem Deutsch-Sornoer Becken. Näher eingegrenzt stellt es den Übergangsbereich des Lausitzer Urstromtales zu der sich nördlich daran anschließenden Endmoräne mit Sanderflächen (saalekaltzeitliche Stauchmoräne von Plessa) dar.

Abbildung 2 stellt die heutige geologische Situation am Restloch (Südbecken) dar.

Die vor dem Kohleabbau anstehende und am NW-Ufer noch anzutreffende Schichtenfolge gliedert sich wie folgt: Der obere Grundwasserleiter wird hauptsächlich von glazifluviatil abgelagerten, relativ gut durchlässigen Schmelzwassersanden gebildet (Mächtigkeit ca. 2 m). Die Wasserführung in diesen Sanden ist jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen und niederschlagsabhängig. Unter diesen Sanden stehen Geschiebemergel, tonige bis schluffige Schichten und Braunkohle (2. Lausitzer Flözhorizont) an, die als Grundwasserschwach- bzw. Nichtleiter eingestuft werden können und deren mittlere Mächtigkeit auf 12 m geschätzt wird. Im Liegenden dieser Schichten befinden sich tertiäre, schluffige

Sande mit Mächtigkeiten zwischen 30 und 50 m. Unter den tertiären Sanden folgen präkambrische Schichten (Lausitzer Grauwacke).

Im Untersuchungsgebiet wurde Kohle des 2. Lausitzer Flözhorizontes von etwa 1925 bis in die fünfziger Jahre abgebaut. Im Tagebau Plessa kam erstmalig eine Abraumförderbrücke, die für die Struktur der Kippen maßgeblich verantwortlich ist, zum Einsatz.



**Abb. 2:** Bergbautechnologischer Schnitt durch den Tagebaurestsee (Knöller, 1999)

Das Tagebaurestloch besteht aus drei hintereinander liegenden, verbundenen Teilbecken (Abbildung 1). Mit einer Längsausdehnung von ca. 900 m (N-S) und einer Breite der Becken von ca. 120 bis 140 m nimmt das Restloch eine Fläche von ca. 110.000 m<sup>2</sup> ein. Die maximale Wassertiefe von 10,2 m befindet sich im mittleren Teilbecken. Im nördlichen und südlichen Teilbecken werden maximale Tiefen von ca. 7 m erreicht. Der See wird fast vollständig von Kiefern- und Birkenwäldern umgeben. Der Wasserspiegel des Restloches stellt sich in Abhängigkeit von den Grundwasserzu- und -abflüssen, des in den Böschungsbereichen zufließenden Wassers sowie der Niederschlags- und Verdunstungsrate ein.

Das Restloch wird von SSW nach NNE durchströmt. Zuflüsse existieren vor allem an der Westböschung wegen des erhöhten hydraulischen Potentials. Ein regionales, großräumiges Grundwassermodell für die gesamte Restlochekette (MODFLOW, Diskretisierung 200 x 200 m) liegt vor (Knoll, 1998 und Weber, 1999) und muß für das Untersuchungsgebiet konkretisiert werden.



### Hydrochemie

Eine regelmäßige Beprobung des Seewassers findet seit 1996 statt. Zur Beurteilung des Grundwassers wurden 6 neue 1"-Grundwassermeßstellen (max. 7 m tief) in ufernahen Bereichen des Restloches installiert und, ebenso wie bereits vorhandene 2"-Grundwassermeßstellen aus dem LMBV-Überwachungsnetz, in die regelmäßige Beprobung einbezogen. Mit den ausgewählten Grundwassermeßstellen werden das seenahe Grundwasser und Grundwässer der quartären und tertiären Schichten sowie der Kippensedimente erfaßt.

Das Seewasser weist einen pH-Wert von 2,6 bis 3,1 auf. Die durchschnittliche Sulfatkonzentration beträgt 1.310 mg/l, die durchschnittliche Eisenkonzentration 156 mg/l. Durch den Verdunstungseinfluß, die Böschungserosion und den Übergang des unterirdischen Wassers in aerobe Bereiche werden im Seewasser höhere Elementkonzentrationen und niedrigere pH-Werte gemessen als in den im Anstrom liegenden Grundwassermeßstellen. Anhand der Isotopensignaturen des Wassers und der darin gelösten Stoffe (Sulfat, C- und N-Verbindungen) lassen sich die Verdunstung abschätzen und Unterschiede zwischen See- und Grundwasser charakterisieren.

**Abb. 3:**  
 $\delta^2\text{H}$ - $\delta^{18}\text{O}$ -Diagramm mit GMWL (Global Meteoric Water Line) für Grund- und Oberflächenwasserproben des Untersuchungsgebietes (Knöller, 1999)

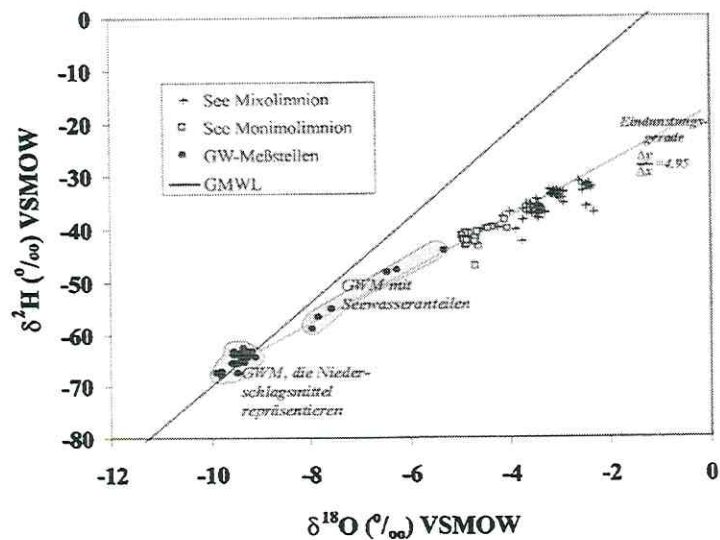
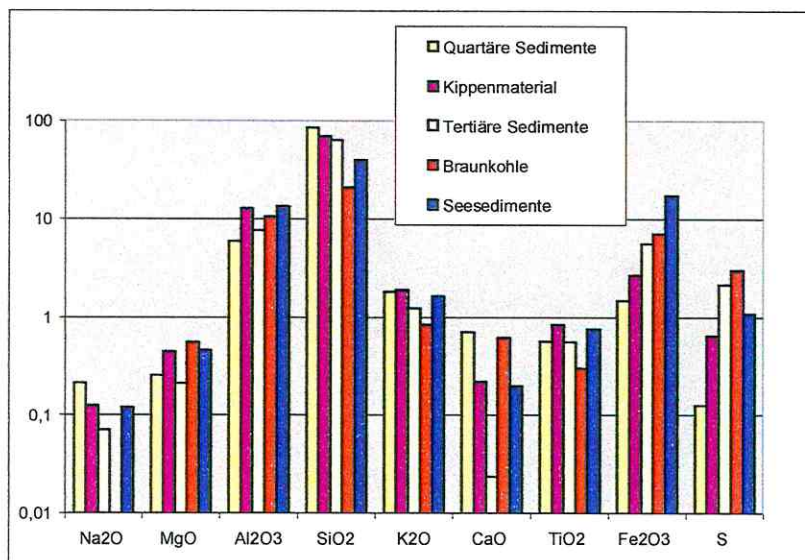


Abbildung 3 zeigt die für an- und abströmendes Grundwasser sowie das Seewasser typischen  $\delta^{18}\text{O}$ - und  $\delta^2\text{H}$ -Werte. Die meisten Grundwasserproben weisen  $\delta^{18}\text{O}$ - und  $\delta^2\text{H}$ -Werte im Bereich der GMWL auf. Durch die das Seewasser betreffende erhöhte Verdunstung reichert sich das Seewasser isotopisch an und kann als natürlicher Tracer im Grundwasserbereich genutzt werden. Das unterschiedliche

Fraktionierungsverhalten von  $^2\text{H}$  und  $^{18}\text{O}$  beim Verdunsten spiegelt sich in der Eindunstungsgeraden wider. Anhand der Isotopenwerte lassen sich Zumischungen des natürlich getracerten Seewassers zum Grundwasser in den im Abstrom befindlichen Meßstellen nachweisen.

### *Sedimentgeochemie*

Im Untersuchungsgebiet stehen quartäre und tertiäre Sedimente an, die zum größten Teil durch den Braunkohlenabbau umgelagert worden sind. Ost- und Südufer des gesamten Sees sowie Teile des Westufers bestehen aus Kippensedimenten. Angaben zur durchschnittlichen Zusammensetzung der oberflächlich anstehenden Sedimente können Abbildung 4 entnommen werden. Die tertiären Sedimente und die Braunkohle weisen die höchsten Gehalte an Schwefel (Gesamtschwefel) auf, während sich die quartären Sedimente durch einen hohen  $\text{SiO}_2$ -Anteil auszeichnen.



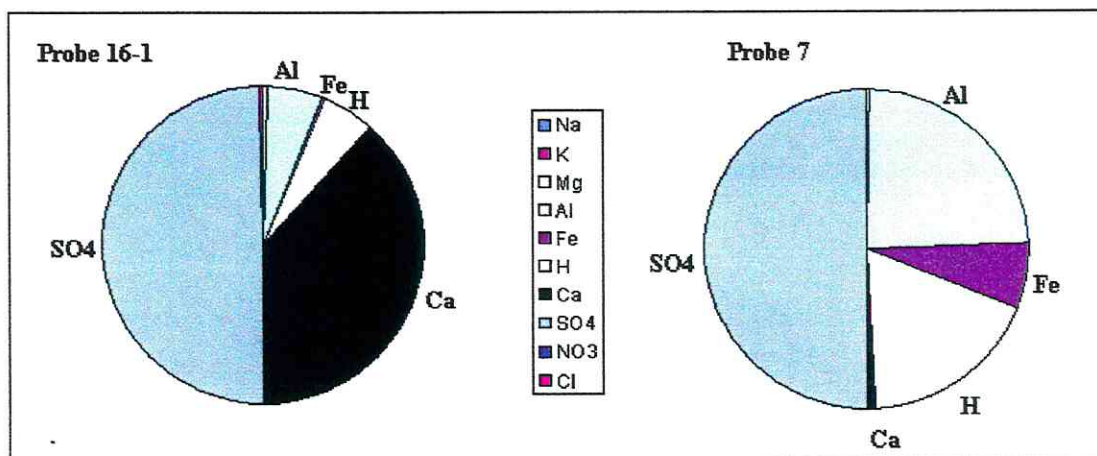
**Abb.4:**  
Durchschnittliche  
Feststoffgehalte der  
Sedimentproben in %  
(RFA-Vollanalyse,  
Untersuchungsstand  
August 1999)

Die Kippensedimente stellen eine Mischung aus quartärem und tertiärem Material dar, wobei letzteres überwiegt. Die höchsten Eisengehalte wurden im Seesediment nachgewiesen.

Neben den Feststoffuntersuchungen bisher durchgeführten Experimente an den sehr heterogen aufgebauten Kippensedimenten zeigen, daß das Versauerungspotential noch nicht erschöpft ist. Eluat-Versuche (Bulk-Experimente/freie pH-Wert-Entwicklung) mit destilliertem Wasser und Lysimeter-Untersuchungen weisen nach,

daß dieses Sedimentmaterial Säure mit pH-Werten zwischen 2,4 und 3,6 freisetzt. Abbildung 5 zeigt 2 Beispiele für die Eluatzusammensetzung der untersuchten Proben. Das dominierende Anion beider Proben ist Sulfat. Während in Probe 16-1 Kalzium als dominierendes Kation auftritt, lassen sich in Probe 7 Eisen und Aluminium finden.

Als Elutionsmittel für die Bulk-Experimente wurde auf destilliertes Wasser zurückgegriffen, da erste Wasseranalysen des am Restloch fallenden Niederschlages pH-Werte um 6 und Leitfähigkeiten von ca. 30  $\mu\text{S}/\text{cm}$  aufwiesen und somit der Chemie des destillierten Wassers ähnlich sind. Die Untersuchungen des Niederschlagswassers vom Juli und August 1999 zeigten, daß auch niedrigere pH-Werte (bis ca. 4,4) im Regen auftreten können.



**Abb. 5:** Ionenbilanzen zweier Eluate der Oberflächensedimente

Probe 16-1 (pH-Wert 3,4 -  $\Sigma$  Anionen: 3,77 meq/mol -  $\Sigma$  Kationen: 3,78 meq/mol)  
 Probe 7 (pH-Wert 2,4 -  $\Sigma$  Anionen: 16,8 meq/mol -  $\Sigma$  Kationen: 16,3 meq/mol)

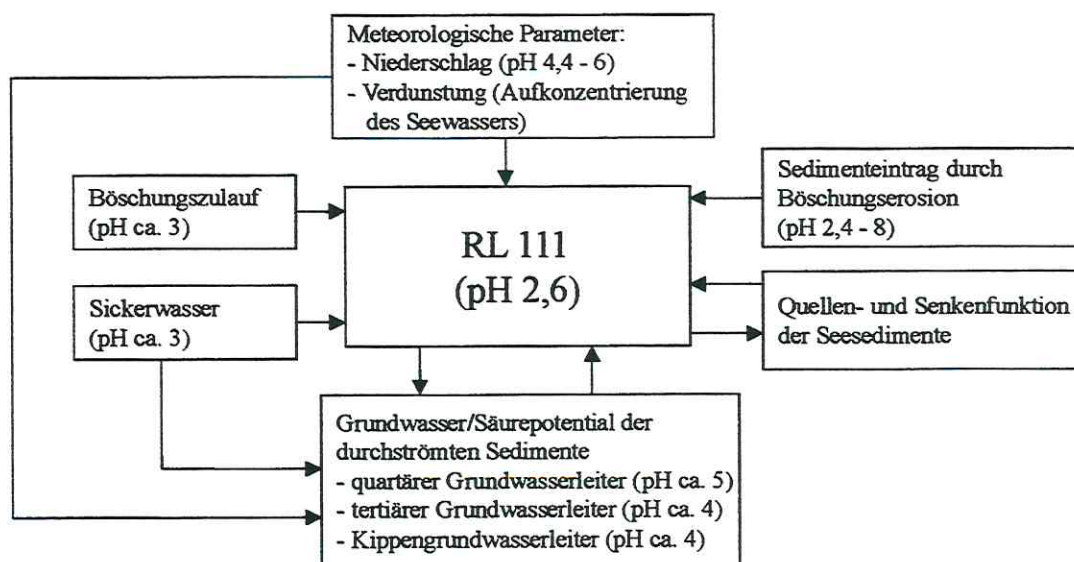
Die pH-Werte im Grundwasser erreichen höhere Werte als in den Eluat- und Lysimeteruntersuchungen festgestellt worden ist, so daß sich die Zusammensetzung des Grundwassers nicht auf eine ausschließliche Sedimentauswaschung (wie in den Eluaten simuliert) zurückführen läßt. Das Grundwasser kann sich in bevorzugten, bereits stark ausgelaugten Zonen bewegen. Verdünnungseffekte (z.B. durch Grundwasserzuflüsse aus quartären Sedimenten) können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Untersuchungen an Sedimenten größerer Tiefen (anaerobe Bereiche) werden z. Zt. durchgeführt. Die erste Trockenbohrung zur Gewinnung von Probematerial wurde im Juni 1999 am Nordwestufer des Restloches abgeteuft (Endteufe 8 m) und als Grundwassermeßstelle im oberen Grundwasserleiter (quartäre Sedimente) ausgebaut.

Die Säurefreisetzung aus den durch Erosionsvorgänge in das Restloch eingetragenen Ufersedimenten ist für die Versauerung ebenfalls ein wichtiger Faktor, so daß eine entsprechende Bilanzierung vorgenommen werden muß. Der jährliche Abtrag im Böschungsbereich unbefestigter Kippen wurde von Werner (1999) auf 10 cm geschätzt.

### Ausblick

Ziel der Untersuchungen am Restloch 111 ist es, die Stoff-, insbesondere die Schwefelquellen und -senken zu erfassen sowie den Transport der die Versauerung verursachenden Stoffe zu modellieren.



**Abb. 6:** Die für das Restloch 111 versauerungsrelevanten Kompartimente

Eine Aussage zur weiteren hydrogeochemischen Entwicklung des Gewässers soll getroffen werden. Dabei sind die in Abbildung 6 dargestellten Umweltkompartimente



## Literatur

- KNÖLLER, K. (1999): UFZ - Sektion Hydrogeologie, Dissertation (unveröffentlicht).
- KNÖLLER, K.; STRAUCH, G. (1999): Assessment of the flow dynamic of a mining lake by stable isotope investigation. *Isotopes Environ. Health Stud.* (angenommen).
- KNOLL, D. (1998): *Grundwasseranbindung von alten Tagebau-Restseen im Niederlausitzer Braunkohletagebauegebiet*. Institut für Umweltphysik, Universität Heidelberg, Diplomarbeit (unveröffentlicht).
- WEBER, L. (1999): Institut für Umweltphysik der Universität Heidelberg, Dissertation (unveröffentlicht)
- WERNER, F. (1999): *Modellgestützte Untersuchungen zur Genese der Wasserbeschaffenheit in Folgelandschaften des Braunkohlebergbaus*. DGFZ e.V., Heft 14.

## 1.2 Mineralreaktionen in Braunkohlentagebaukippen: Ihre Bedeutung für die Versauerung von Grund- und Oberflächenwässern am Beispiel des ehemaligen Tagebaus "Grube Agnes" bei Plessa (Lausitz)

GÖTTLICHER J., POHLMANN M.

Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Technische Chemie, Bereich Wasser- und Geotechnologie, Technische Mineralogie, Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen  
e-mail: joerg.goettlicher@itc-wgt.fzk.de, markus.pohlmann@itc-wgt.fzk.de

### Einleitung

Braunkohlenbergbau löst in FeS<sub>2</sub>-haltigem Nebengestein (in der Regel tertiäre Sedimente) Mineralreaktionen aus, die zur Bildung, Freisetzung, Zwischenspeicherung und Wiederabgabe von Sulfat führen und damit den Versauerungsgrad von Grund- und Oberflächenwässern beeinflussen. Der Sulfateintrag in einen sauren Tagebaurestsee ist eine bedeutende Größe für Dauer und Umfang biotechnologischer Sanierungsmaßnahmen, wie sie am Restloch RL111 (ehemalige "Grube Agnes" bei Plessa) geplant sind. Deshalb ist es notwendig, die Sulfatquellen zu identifizieren und quantitativ zu erfassen sowie die Kinetik der Sulfatfreisetzung aus den Festphasen zu ermitteln. Entscheidend für den Erfolg der Sanierungsmaßnahmen wird sein, ob es gelingt, den Schwefel wieder in sulfidischen Festphasen zu binden. Ziel der mineralogischen Untersuchungen ist es, die Wege des Schwefels zu verfolgen und die milieuabhängigen Reaktionen zwischen der wässrigen Phase und den mineralischen Festkörpern aufzuklären. Die Ergebnisse werden dann zusammen mit den hydrogeologisch-geochemischen Daten (UFZ) in die Schwefelbilanzierung und in die technische Durchführung der Sanierung des Restsees einfließen.

### Methodik

Für eine umfassende Bestandsaufnahme der Mineralphasen müssen das anstehende Tertiär, die Kippen- und die Seesedimente beprobt werden. Repräsentative Proben bis zu einer Tiefe von 2 m wurden mit Stechbohrer und Spaten (bis zu 10 kg) entnommen und durch Rotationsteilung für die analytischen Untersuchungen auf

Mengen zwischen 10 g und 100 g reduziert; sie stehen für Korngrößenanalyse, Mineralphasenseparation und -identifikation zur Verfügung. Bohrungen mit Kernprobenahme sollen Informationen über die Sedimente aus tieferen Regionen liefern. Eine Bohrung im Anstehenden ist bereits abgeteuft, drei weitere in den tertiären Kippen folgen im Herbst 1999. Seesedimentproben aus den drei Teilbecken und aus dem Schwellenbereich zwischen dem Nord- und Mittelbecken konnten mit einem Sedimentkernstecher bis zu einer Sedimenttiefe von 40 cm gewonnen werden. Nach dem Schneiden wurden die Seesedimentproben vor Ort eingefroren und anschließend im Labor gefriergetrocknet. Zur Aufklärung der grundlegenden Mineralreaktionen, die zu einer Versauerung führen, werden in Laborexperimenten Modellsubstanzen eingesetzt, da aus dem Kippenmaterial die gewünschten Mineralphasen oftmals nicht in ausreichender Menge und Reinheit separiert werden können. Analogien in der Chemie und der Oberflächenbeschaffenheit sichern die Übertragbarkeit der an den synthetischen Phasen gewonnenen Daten. Festkörper- und oberflächenanalytische Methoden, wie Röntgenpulverdiffraktometrie, IR-Spektrometrie, Rasterelektronenmikroskopie mit energiedispersiver Röntgenanalyse, Elektronenstrahlmikroanalyse, Röntgenfluoreszenzspektrometrie und Rasterkraftmikroskopie werden eingesetzt, um Mineralphasen zu identifizieren und Mineralreaktionen aufzuklären.

## **Ergebnisse**

Kippenanschnitte zeigen einen äußerst inhomogenen Aufbau: Lagen von Sedimenten unterschiedlicher Färbung wechseln im cm- bis dm-Abstand. Sandige Bereiche mit richtungslosem Gefüge enthalten tonreiche und kohlehaltige Einschlüsse unterschiedlicher Größe. Die häufig intensive Gelbfärbung tonhaltiger Bereiche (bis 1 m Durchmesser bzw. Mächtigkeit) ist auf eisen- und sulfathaltige Sekundärminerale zurückzuführen. Hauptphasen in den anstehenden Sedimenten sind Quarz ( $\text{SiO}_2$ ), Kaolinit ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ), Illit ( $(\text{K},\text{H}_3\text{O})\text{Al}_2[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}](\text{OH})_2$ ) und Kalifeldspat ( $\text{KAlSi}_3\text{O}_8$ ). Sedimente aus einer Bohrung zur Einrichtung von Grundwassermeßstellen im anstehenden Tertiär [1] enthalten Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ), der aber in den oberflächennahen Bereichen des anstehenden tertiären Materials am Westufer des Sees und auch in den



Kippensedimenten röntgenographisch nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Tabelle 1). Dafür finden sich in fast allen oberflächennahen Proben Jarosite ((Na,K,H<sub>3</sub>O,NH<sub>4</sub>)Fe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>). Durch den Vergleich mit synthetischem Material gelang auch der Nachweis des schlecht-kristallinen Eisen(III)-oxyhydroxysulfates Schwertmannit (Fe<sub>16</sub>O<sub>16</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>12</sub>) im südlichen Uferbereich außerhalb des Sees und im Seesediment. Zur Zeit wird geprüft, ob eine Auftrennung des Probenmaterials nach Korngrößen und anschließende Mineralanreicherung durch Dichtentrennung in Kombination mit Zentrifugation und Magnetseparation möglich ist. Diese Anreicherungs-schritte sollen Auskunft über die Sekundärmineralanteile in den Fraktionen geben.

**Tabelle 1:** Identifikation der Mineralphasen in den anstehenden tertiären Sedimenten, den oberflächennahen Kippensedimenten und den Seesedimenten mit Hilfe der Röntgenpulverdiffraktometrie.

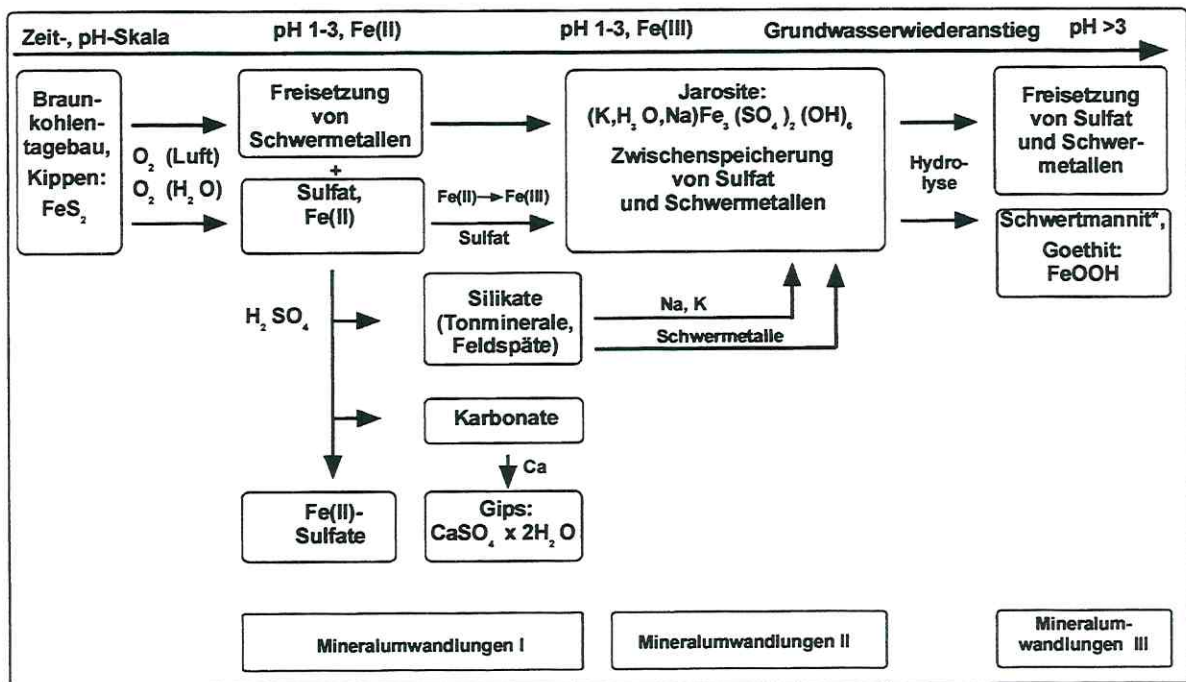
Primärminerale		Anstehendes (Tertiär)	Kippensediment (oberflächennah)	Seesediment
Quarz (Q)	SiO <sub>2</sub>	x	x	x
K-Feldspat (KFs)	KAlSi <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	x	x	x
Kaolinit (K)	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>	x	x	x
Illit (I)	(K,H <sub>3</sub> O)Al <sub>2</sub> [AlSi <sub>3</sub> O <sub>10</sub> ](OH) <sub>2</sub>	x	x	x
Pyrit (Py)	FeS <sub>2</sub>	x	n	n
Sekundärminerale				
Gips (G)	CaSO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	n	x	x
Jarosit (Jt)	(Na,K,H <sub>3</sub> O,NH <sub>4</sub> )Fe <sub>3</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>6</sub>	x	x	x
Schwertmannit (Sh)	Fe <sub>16</sub> O <sub>16</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sub>12</sub>	n	n	x
Goethit (Gt)	FeOOH	n	n	x

n: nicht vorhanden oder unterhalb der röntgenographischen Nachweisgrenze

### Mineralreaktionen

Mineralreaktionen in Braunkohlentagebaukippen können, beginnend mit der Oxidation der Eisendisulfide (Pyrit und Marksasit), in drei zeitlich nacheinander ablaufende Stufen eingeteilt werden (Abbildung 1): (1) Zunächst entstehen wasserhaltige Eisen(II)-Sulfate, die für das langfristige Geschehen keine Bedeutung haben, da sie leicht löslich sind und der Fe(II)-Anteil mit fortschreitender Oxidation ständig abnimmt. (2) Die vollständige Oxidation zu Fe(III) führt - zusammen mit den durch schwefelsaure Porenwässer mobilisierten Alkalien aus Silikaten - zur Bildung von Jarositen ((Na,K,H<sub>3</sub>O)Fe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>) in den Kippensedimenten, die bei den

niedrigen pH-Werten (ca. 1-3) und hohen Eh-Werten als Zwischenspeicher für Sulfat wirken. (3) Änderungen der pH/Eh-Bedingungen in Folge des Grundwasserwiederanstiegs in stillgelegten Tagebauen führen u.a. zu Hydrolysereaktionen des Jarosits, die über einen längeren Zeitraum andauern (Abbildung 1). Zeitliche Überlappungen der Reaktionen sind möglich, da Milieuänderungen sich nicht überall im Bergbaufolgegebiet gleichzeitig einstellen.



**Abb. 1:** Mineralreaktionen in Braunkohlentagebaukippen, stark modifiziert nach [2].  
 (\*Fe<sub>16</sub>O<sub>16</sub>(OH)<sub>12</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)

Durch Hydrolysereaktionen wird Sulfat erneut mobilisiert. Kippe und Tagebaurestsee stehen über verschiedene Pfade miteinander in Kontakt. Die absoluten Mengen der in den Kippen sekundär gebildeten Eisensulfatminerale und ihr Fe/S-Verhältnis bestimmen im wesentlichen das Fe/S-Verhältnis der in den See eintretenden Lösungen (Tabelle 2). Abhängig davon können aus diesen Lösungen bei Übersättigung (z.B. durch Oxidation von Fe(II) zu Fe(III), Verdunstung) eisen- und sulfathaltige Minerale ausfallen. Sie bilden zusammen mit dem mineralischen und organischen Detritus das Seesediment.

**Tabelle 2:** Einfache Modellvorstellung zum Grad einer Versauerung. Das Alkalienangebot in den Kippen entscheidet über die Menge an Jarosit, die in den Kippen gebildet werden kann und damit über das maximal mögliche Fe/S-Verhältnis in den Restwässern.

$\text{FeS}_2 \xrightarrow{\text{ox}}$		$x\text{AFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6 + (1-3x)\text{Fe}^{2+,3+} + 2(1-x)\text{SO}_4^{2-}$	$y=(1-3x)/(2-2x)$				
		2 Grenzfälle			$x, \text{Mol Jt}$	$y, (\text{Fe/S})_l$	$(\text{Fe/S})_s$
(1)	$\text{FeS}_2 \xrightarrow{\text{ox}}$	$\text{Fe}^{2+,3+} + 2\text{SO}_4^{2-}$	0.0	0.5	--		
(2)	$\text{FeS}_2 \xrightarrow{\text{ox}}$	$1/3 \text{AFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6 + 4/3 \text{SO}_4^{2-}$	0.33	0.0	1.5		

A = K, Na, (H<sub>3</sub>O); Jt, AFe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>= Jarosit; l = in Lösung; s = im Festkörper

Mineralreaktionen in den Kippen- und Seesedimenten des ehemaligen Tagebaus "Grube Agnes" bei Plessa (stillgelegt 1958) befinden sich zur Zeit am Ende der zweiten und am Beginn der dritten Stufe der Mineralumwandlungen. Der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens von Jarosit kann mangels Untersuchungen in den zurückliegenden Jahrzehnten nicht mehr rekonstruiert werden. Aus aktiven Braunkohlentagebauen ist bekannt, daß sich Jarosite erst nach einer "Inkubationszeit" von ein bis zwei Jahren bilden, nachdem sich die in Stufe (2) genannten Bedingungen eingestellt haben. In den Seesedimenten des Restloches 111 wurden neben Jarosit auch Schwertmannit ( $\text{Fe}_{16}\text{O}_{16}(\text{OH})_{12}(\text{SO}_4)_2$ ) und Goethit ( $\text{FeOOH}$ ) nachgewiesen: Ein Hinweis auf die Hydrolyse von Jarosit. Laborversuche bei Raumtemperatur an synthetischen Jarositen bestätigen die Feldbeobachtungen und belegen, daß Goethit, aber auch andere Eisen(III)-oxyhydroxide, Produkte der Jarosithydrolyse sein können (Tabelle 3). Diese sulfatfreisetzenden Reaktionen werden solange anhalten, bis sich anaerobe Bedingungen von selbst einstellen oder durch gezielte biotechnologische Maßnahmen initiiert werden.

**Tabelle 3:** Vergleich Laborexperimente zur Hydrolyse von Jarosit mit Feldbeobachtungen. Die Experimente bestätigen die Feldbeobachtungen, daß Goethit (FeOOH) ein Folgeprodukt der Jarosithydrolyse sein kann.

Laborexperimente im Reaktor zur Hydrolyse an synthetischem Jarosit						Feldbeobachtungen		
Art der Experimente	Jarosit/deion. H <sub>2</sub> O [g/l]	T [°C]	Dauer [d]	pH Ende	Phasen	Ort	pH	Phasen
Freie pH-Entwicklung	10	RT	19, 88	3.0	Jt	See-sedi-ment	≥2.5	Jt
	1			3.0	Jt, Gt			Jt, Gt
	0.1			3.6	Jt, Gt			Jt, Sh, Gt
	0.01			4.4	Fh	Ufer	ca. 4.5	Jt, Sh

Jt: Jarosit (K<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O)Fe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>; Sh: Schwertmannit Fe<sub>16</sub>O<sub>16</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>12</sub>;  
Fh: Ferrihydrit 5Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O; Gt: Goethit FeOOH

Mineralwachstums- und Auflösungsprozesse laufen an Phasengrenzen (Oberflächen) ab. Rasterkraftmikroskopische *in situ*-Messungen in wässriger Lösung zur Hydrolyse des Jarosites zeigen auf molekularer Ebene, daß die Mechanismen und die Kinetik seiner Auflösung von der Speziation des Eisens in der wässrigen Phase beeinflusst werden. Ohne Komplexierung bilden sich rasch Beläge aus Eisen(III)-oxyhydroxiden, die eine Auflösung verlangsamen können. Komplexierung bewirkt einen direkten Angriff des Lösungsmittels und den flächenhaften Abbau von Wachstumsterrassen [3]. Enthalten Kippenwässer chemische Komponenten, die eine Fe-Komplexierung ermöglichen (z.B. Huminsäuren), so ist dort eine Jarosithydrolyse ohne Oberflächenbelagbildung denkbar.

## Diskussion

Die bisherigen Feldbeobachtungen, Analysen und Laborexperimente lassen bereits eine zeitliche Einordnung von Mineralreaktionen in den oberflächennahen Bereichen des Systems Kippe-Restsee im ehemaligen Tagebau Plessa zu. Trockenbohrungen im anstehenden Sediment und in den Kippen sollen auch die tieferen Bereiche zugänglich machen. Mineralseparation und Laborexperimente zur Hydrolyse der Sekundärminerale mit schrittweiser Erweiterung um die in den Kippensedimenten identifizierten Mineralphasen werden das Elutionsverhalten des Gesamtmaterials im Detail verstehen helfen. Von großer Bedeutung für die nach dem Grundwasseran-

stieg in den Kippen- und Seesedimenten ablaufenden Prozesse werden Hydrolyse-reaktionen unter reduzierenden Bedingungen und unter Berücksichtigung mikrobieller Einflüsse sein.

### *Schwefelbilanzierung*

Aus geostatistischen Daten [5] und dem mittleren Sulfatgehalt des Seewassers läßt sich diejenige Sedimentmenge abschätzen, deren vollständige Eisendisulfid-Oxidation notwendig ist, um die im Wasser vorhandenen Sulfatmengen zu liefern (Tabelle 4). Eine vollständige Sulfatbilanz kann jedoch noch nicht aufgestellt werden, da der in den Sedimenten und ihrem Porenwasser sowie der in Sekundärmineralen in Kippen und als freie Schwefelsäure vorliegende Sulfatanteil derzeit noch nicht bestimmt worden ist. Selbst wenn die Abschätzungen um den Faktor 2 falsch sein sollten, so zeigen sie doch, daß von den großen Mengen an Kippenmaterial formal nur ein Bruchteil ausreicht, um in einem Wasservolumen von 0.5 Mio m<sup>3</sup> eine Sulfatkonzentration von ca. 1300 mg/l zu erzeugen.

**Tabelle 4:** RL111 - Größe der Zone vollständiger FeS<sub>2</sub> Oxidation, die notwendig ist, um die Menge an Sulfat zu erzeugen, die zur Zeit im Seewasser gelöst ist.

Geostatistische Daten [5]: Volumen, Uferlinie	0.5x10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> (= 0.5x10 <sup>9</sup> l), 2200 m
SO <sub>4</sub> -Konz. im See, absolute SO <sub>4</sub> -Menge	ca. 1.3 g/l, 0.65x10 <sup>9</sup> g (= 6.77x10 <sup>6</sup> mol)
Dafür benötigtes FeS <sub>2</sub>	3.38x10 <sup>6</sup> mol (= 4.06x10 <sup>8</sup> g, ca. 410 t FeS <sub>2</sub> )
FeS <sub>2</sub> -Gehalte der Abraum-Sedimente in Plessa	Annahme 1 Gew%
Benötigte Menge an Kippenmaterial bei Gehalten von ca. 1 Gew% FeS <sub>2</sub>	41.000 t
Volumen des Kippenmaterials, das ca. 410 t FeS <sub>2</sub> enthält (Annahme Dichte (Kippe): ca. 2.0 g/cm <sup>3</sup> )	20.500 m <sup>3</sup>
Beispiel der Ausdehnung einer Oxidationszone	20.500 m <sup>3</sup> entsprechen einer ca. 2 m tiefen, 1000 m langen und 10 m breiten Zone

### **Ausblick**

Die Aufklärung der in den Seesedimenten und im seenahen Umfeld ablaufenden Mineralreaktionen durch Felduntersuchungen, Laborexperimente sowie auf molekularer Ebene unter Berücksichtigung mikrobieller Aktivitäten wird wesentlich zum Verständnis der Schwefelumsetzungen beitragen. Aber erst zusammen mit den hydrogeologischen und geochemischen Daten (UFZ) über die zeitliche und

räumliche Verteilung der Wasserein- und -austräge wird eine Bilanzierung des Schwefels möglich. Sanierungsmaßnahmen können dann besser geplant und eingeschätzt werden. Am Ende wird neben einer Schwefelbilanz auch eine Verfahrensvorschrift stehen, die als Leitfaden für zukünftige zu sanierende Standorte dient.

Der Zeitplan für das zweite Projektjahr sieht eine Intensivierung der Arbeiten zur quantitativen Abschätzung des Sulfateintrages in den Restsee vor, nachdem die wesentlichen Mineralphasen identifiziert und bereits Mineralreaktionen, die eine erhebliche Veränderung der Eisen- und Schwefel-Gehalte und –Verhältnisse zur Folge haben, nachgewiesen wurden. Dazu werden die Mineralseparationsverfahren optimiert und die bisher nur Teilaspekte einer Gesamtschwefelbilanz enthaltenen Modellvorstellungen erweitert. Die begonnenen Versuche zur Jarosithydrolyse sollen auf anoxisches Milieu unter bakterieller Beteiligung erweitert werden, da im Seesediment stellenweise anaerobe Bedingungen herrschen [5].

Folgende Arbeiten werden in Kooperationen durchgeführt, um eine gemeinsame Ausgangsbasis für die analytischen Untersuchungen zu legen und um Versuche durchführen zu können, die nur durch Kombination des Expertenwissens mehrerer Partner möglich sind:

- Tiefbohrungen mit gemeinsamer Probenahme für geochemische, mineralogische und mikrobiologische Untersuchungen (Sektionen Hydrogeologie und Gewässerforschung des UFZ)
- Probenahme und Untersuchungen von oberflächennahen Kippen- und Seesedimentproben (Sektion Hydrogeologie des UFZ)
- Versuche zur Wechselwirkung von sulfatreduzierenden Bakterienstämmen mit Mineraloberflächen (Sektionen Gewässerforschung und Umweltmikrobiologie des UFZ, Bereich Mikrobiologie der GBF).

## Literatur

- [1] KNÖLLER K., STRAUCH G.: Probenmaterial UFZ, Sektion Hydrogeologie.
- [2] NORDSTROM D.K. (1982): *In Acid Sulfate Weathering* - Kittrick J.A., Fanning D.S, Hossner L.R. (Eds.) *SSSY Special Publication Number 10*, Soil Science Society of America, Madison, Chapter 3, 37-56.

- 
- [3] GASHAROVA B., GÖTLICHER J. PENTINGHAUS H. (1999): *Beih. z. Eur. J. Mineral.*, Vol 11, No 1, 77.
- [4] BÜTTNER O., BECKER S., DELLNER S., KUEHN B., WENDT-POTTHOFF K., ZACHMANN D.W., FRIESE K. (1998): *Water, Air and Soil Pollution*, Vol 108, Nos. 3-4, 297-316.
- [5] HERZSPRUNG P., FRIESE K, FRÖMMICHEN R., KELLNER S. (1999): *Bericht 1. Workshop z. HGF-Strategiefondsprojekt Systemintegrierte Umweltbiotechnologie zur Sanierung von organisch und anorganisch belasteten Grund- und Oberflächenwässern*, Leipzig 7.18.07.1999, 2-3.

### 1.3 Untersuchungen zur *in situ*-Sulfatreduktion in einer Enclosure-Anlage

M. KOSCHORRECK, K. FRIESE, R. FRÖMMICHEN, W. GELLER, P. HERZSPRUNG, S. KELLNER, A. LORKE, K. WENDT-POTTHOFF

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Gewässerforschung,  
Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg

#### Einleitung

Schwerpunkt der Arbeiten im Untersuchungszeitraum bildete der Feldversuch zur Neutralisierung in Klein-Enclosures im Restsee 111 (Lausitzer Revier). Dabei konnte auf die fundierten Arbeiten des im März 1999 beendeten BMBF-Projektes "Untersuchung zur Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur *in situ*-Sulfatreduktion von geogen schwefelsauren Bergbaurestseen des Lausitzer Braunkohlereviers" aufgebaut werden. Im Rahmen des BMBF Projektes waren im Sommer 1998 sechs Klein-Enclosures (zwei mal zwei Meter) im Restsee 111 mit verschiedenen Kombinationen von Stroh und Carbonationskalk bzw. Ethanol beaufschlagt worden (Abb. 1), mit dem Ziel, *in situ* die mikrobielle Sulfatreduktion anzuregen und damit eine Neutralisierung des Wassers im Enclosure zu erreichen. Da es sich hier um ein Langzeit-Sanierungsverfahren handelt, konnten die Versuche im Rahmen der Laufzeit des BMBF-Projektes nicht abgeschlossen werden und wurden deshalb innerhalb des HGF-Strategiefondsprojektes übergangslos weitergeführt. Darüber hinaus ergaben sich während des laufenden Versuches neue Aspekte, die im Rahmen von experimentellen Modifikationen an den Enclosures untersucht wurden. Die bisher ausgewerteten Ergebnisse der im laufenden Versuch durchgeführten chemischen, limnophysikalischen und mikrobiologischen Untersuchungen werden im folgenden vorgestellt.



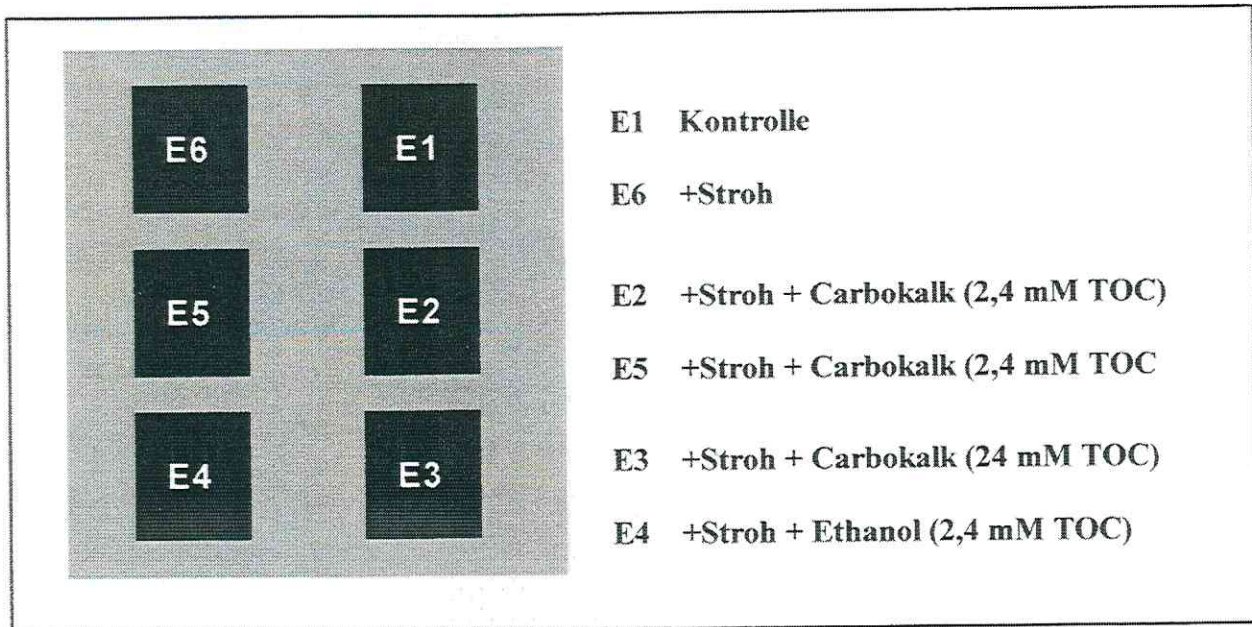


Abb. 1: Prinzipielle Versuchsanordnung der Enclosureanlage

## Chemie

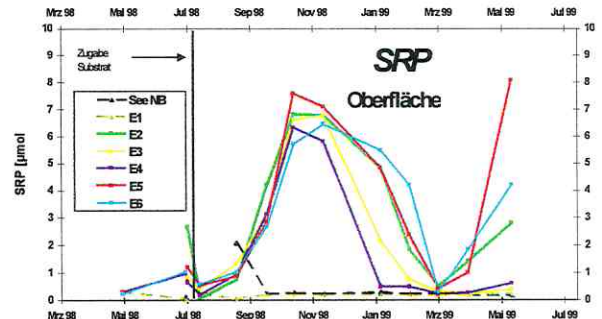
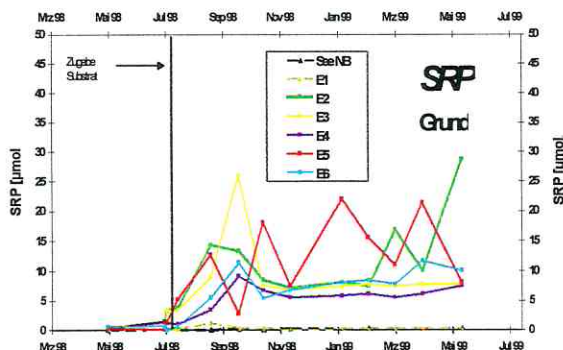
Die bisherigen Meßergebnisse werden anhand von ausgewählten Parametern im Hinblick auf das Entsäuerungsziel erläutert.

Die Konzentrationen des **anorganisch gebundenen Kohlenstoffs (TIC)** bewegten sich vor der Zugabe von Stroh am 5.5.98 auf einem für das pyritversauerte Wasser typisch niedrigen Niveau von  $< 0,2$  mmol/l. Bereits nach Einbringen von Stroh waren die TIC-Konzentrationen über dem Grund in allen Enclosures relativ zur Kontrolle E1 deutlich erhöht. Nach Substrateinbringung kam es zu einer weiteren Erhöhung der TIC-Gehalte über dem Grund (bis zu 3 mmol/l). Diese Konzentrationserhöhung war in den mit Carbokalk beaufschlagten Enclosures stärker ausgeprägt. Als in dem mit Ethanol beaufschlagten Enclosure. Nach Einsetzen der Zirkulation im Oktober fielen die Werte auf ein niedriges Niveau ( $< 0,4$  mmol/l) zurück. Die weitere Entwicklung der TIC -Konzentrationen zeigt keinen eindeutigen Trend.

Erwartungsgemäß blieben die Gehalte an **gesamt organisch gebundenen Kohlenstoff (TOC)** im Kontroll-Enclosure durchwegs auf einem niedrigen Ausgangsniveau. Die Substrateinbringung mit Stroh, Ethanol bzw. Carbokalk

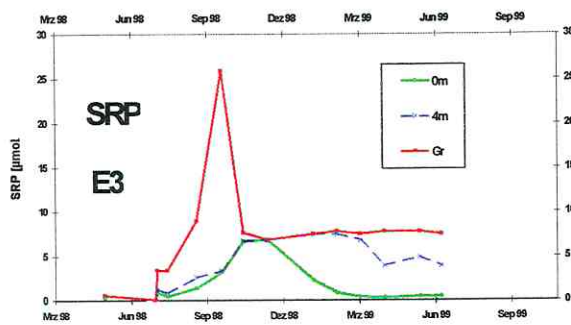
spiegelte sich in entsprechend höheren TOC-Konzentrationen gegenüber dem Kontroll-Enclosure wieder.

Die Konzentration des **reaktiven gelösten Phosphors SRP** ist in den substratbeaufschlagten Enclosures relativ zum Kontroll-Enclosure E1 und relativ zum See stark angestiegen. Nach Substrateinbringung stiegen die Werte zunächst nur über dem Grund auf bis zu etwa  $10 \mu\text{mol/l}$  (Abb. 2). An der Oberfläche (Abb. 3) und in vier Meter Tiefe stiegen die SRP-Konzentrationen erst mit Einsetzen der Zirkulation im Herbst, während die Konzentrationen über dem Grund entsprechend rückläufig waren. Nach Einsetzen der Zirkulation wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede mehr für SRP zwischen den Enclosures beobachtet.

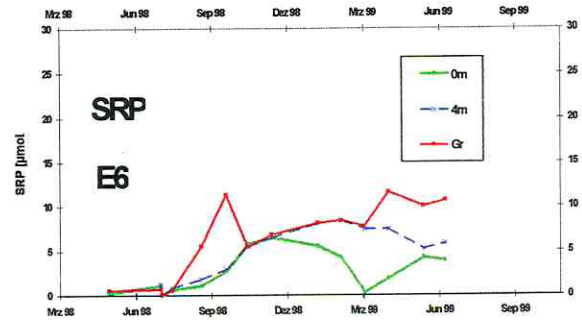


**Abb. 2:** SRP-Gehalte der Enclosure und des Sees (NB) über dem Seegrund **Abb. 3:** SRP-Gehalte der Enclosure und des Sees (NB) an der Wasseroberfläche

Ein Vergleich des Verlaufs der SRP Konzentrationen der Enclosures E2, E3 (Abb. 4), E4 und E5 mit dem Enclosure E6 (Abb. 5) (nur Strohzugabe) zeigt qualitativ gleiche Konzentrationsentwicklungen. Hieraus kann geschlossen werden, daß SRP in großem Ausmaß aus dem Stroh in die gelöste wäßrige Phase in den Enclosures übergeht. Im Kontroll-Enclosure E1 blieben die SRP-Konzentrationen demgegenüber auf einem konstant niedrigen Ausgangsniveau. Der Konzentrationsverlauf im Jahre 1999 zeigt ab März den Rückgang der SRP-Konzentrationen an der Oberfläche für alle substratbeaufschlagten Enclosure relativ zu den Tiefenstufen 4m und über dem Grund.



**Abb. 4:** SRP-Gehalte des Enclosures (E3)  
(Stroh+Carbokalk; 24 mM TOC)  
Probennahme: Seegrund, 4 m, 0 m



**Abb. 5:** SRP-Gehalte des Enclosures (E6) (Stroh)  
Probennahme: Seegrund, 4 m, 0 m

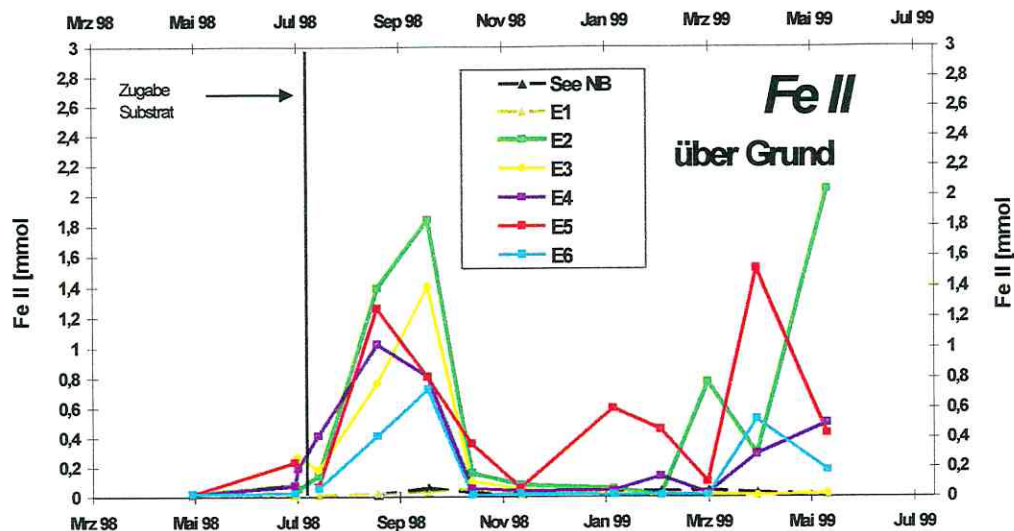
Die Ergebnisse des Phosphateintrages aus dem Stroh in die Wasserphase der Enclosures kann mit der Beobachtung von starken Algenblüten jeweils an der Wasseroberfläche in Zusammenhang gebracht werden. Die relative Konzentrationsabnahme von SRP an der Oberfläche relativ zu tieferen Schichten kann mit dem Einbau von Phosphor in Algenbiomasse erklärt werden.

Die Konzentration von Ammoniumstickstoff ist im Tagebaurestsee RL111 mit etwa  $200 \mu\text{mol l}^{-1}$  relativ zu neutralen, nicht anthropogen beeinflussten Seen relativ hoch. Typischerweise liegt das molare Verhältnis von Ammoniumstickstoff zu Nitratstickstoff in pyritversauerten Tagebaurestseen in der Größenordnung von zehn zu eins. Die relativen Ammoniumkonzentrationen sind hier so hoch, da offensichtlich die Nitrifikation unter den stark sauren pH-Bedingungen gehemmt ist. Die Analysen in den Enclosures zeigen bisher generell keine signifikanten Abweichungen von diesen Vorbedingungen. Auffällig ist lediglich, daß der Ammoniumgehalt in vergleichbarer Tiefe in den substratbeaufschlagten Enclosures allgemein etwas geringer ist als in den Kontrollproben E1 und NB. Dies deutet darauf hin, daß Ammonium in den substratbeaufschlagten Enclosures als Stickstoffquelle genutzt wird und in Biomasse eingebaut wird. Sinkende Ammoniumkonzentrationen bei starkem Algenwachstum wurden bereits in einem anderen pyritversauerten Tagebaurestsee im mitteldeutschen Braunkohlerevier beobachtet.

Ungewöhnliche Konzentrationsverläufe bezüglich Nitrat waren in E3 (Stroh + viel Carbokalk) zu verzeichnen. Die Nitratkonzentration war signifikant höher als in den anderen Enclosures bzw. Kontrollen E1 und NB. Während der Stratifikation war die Konzentration über dem Grund höher als an der Oberfläche im Unterschied zu allen anderen Enclosures und NB. Nachträglich ist noch zu klären, inwiefern der eingebrachte Carbonatationsschlamm als Quelle für Nitrat fungiert.

Die mikrobielle Reduktion von Nitrat erfolgt energetisch nach dem Sauerstoff und noch vor den dreiwertigen Eisenverbindungen und dem Sulfat und produziert ebenfalls Alkalinität. Die Sulfatreduktion wird erst stattfinden, wenn praktisch kein Nitrat mehr detektierbar ist. Die analytische Erfassung von Nitrat ist neben der Bestimmung des Eisen (III) : Eisen (II) - Verhältnisses und der Ermittlung des Redoxpotentials ein guter Parameter für die Beurteilung der momentanen Aussichten für eine beginnende Entsäuerung über dem Grund. Die Nitratkonzentrationen im Juni 1999 in den Enclosures besagen, daß der eigentliche Schritt der Entsäuerung zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht sein kann.

Steigende Konzentrationen von zweiwertigem **Eisen** gehen grundsätzlich einer beginnenden Sulfatreduktion und Entsäuerung voraus. Normalerweise können beim Einsetzen der Sulfatreduktion keine bedeutsamen Eisen (III) - Konzentrationen mehr detektiert werden.



**Abb. 6:** Eisen(II)-Gehalte der Enclosures und des Sees (NB) über dem Seegrund

In allen substratbeaufschlagten Enclosures (auch in E6, nur mit Stroh beaufschlagt) konnten vorübergehend signifikant erhöhte Eisen (II) -Konzentrationen (über dem Grund) beobachtet werden (Abb. 6). Von Ende Juli bis zum Beginn der Stratifikation im Oktober 1998 war dies der Fall, während in den Kontrollen E1 und NB Eisen (II) auf einem relativ konstant niedrigen Niveau verblieb. Nach dem Beginn der Stratifikation im Frühjahr 1999 wurden in den oben genannten Enclosures E1,2,4,5,6 erneut steigende Eisen (II) Konzentrationen beobachtet. Signifikanterweise war in E3 (mit dem zehnfachen Substratansatz an Carbokalk gegenüber E2 und E5) im Frühjahr 1999 keine Entwicklung von Eisen (II) über dem Grund zu beobachten. Beim Stand der zuletzt ausgewerteten Ergebnisse am 15.6.99 gab es in allen substratbeaufschlagten Enclosures keine durchgreifende Abweichung der Gesamteisenkonzentration von den Kontrollproben in E1 und NB. Das Verhältnis von Eisen (III) zu Eisen (II) lag bisher generell deutlich über eins. Dieses Ergebnis besagt ähnlich wie das oben diskutierte Ergebnis zu den Nitratkonzentrationen, daß der eigentliche Entsäuerungsprozeß im Wasser noch nicht begonnen hat.

Eine Abnahme der **Sulfat**konzentrationen in der Wassersäule gibt, bei einer deutlichen Verringerung des Redoxpotentials und Anhebung des pH-Wertes

Hinweise auf Sulfatreduktion. In den substratbeaufschlagten Enclosures gab es relativ zu den Kontrollproben zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Sulfatkonzentrationen. Eine merklich quantifizierbare Sulfatreduktion war aufgrund der bei den Parametern Nitrat und Eisen(II) diskutierten Ergebnisse auch nicht zu erwarten.

Die **Basenkapazität** ist als Summenparameter für die im Wasser vorhandenen Puffersysteme ein geeignetes Kriterium zur Beurteilung der erreichten Entsäuerung. Eine durchgreifende Abnahme der Basenkapazität relativ zu den Startbedingungen nach Substratzugabe und relativ zu den Kontrollen E1 und NB konnte nicht beobachtet werden. Die bisher gemessenen Basenkapazitäten  $K_{b8,2}$  lagen deutlich über 10 mmol/l.

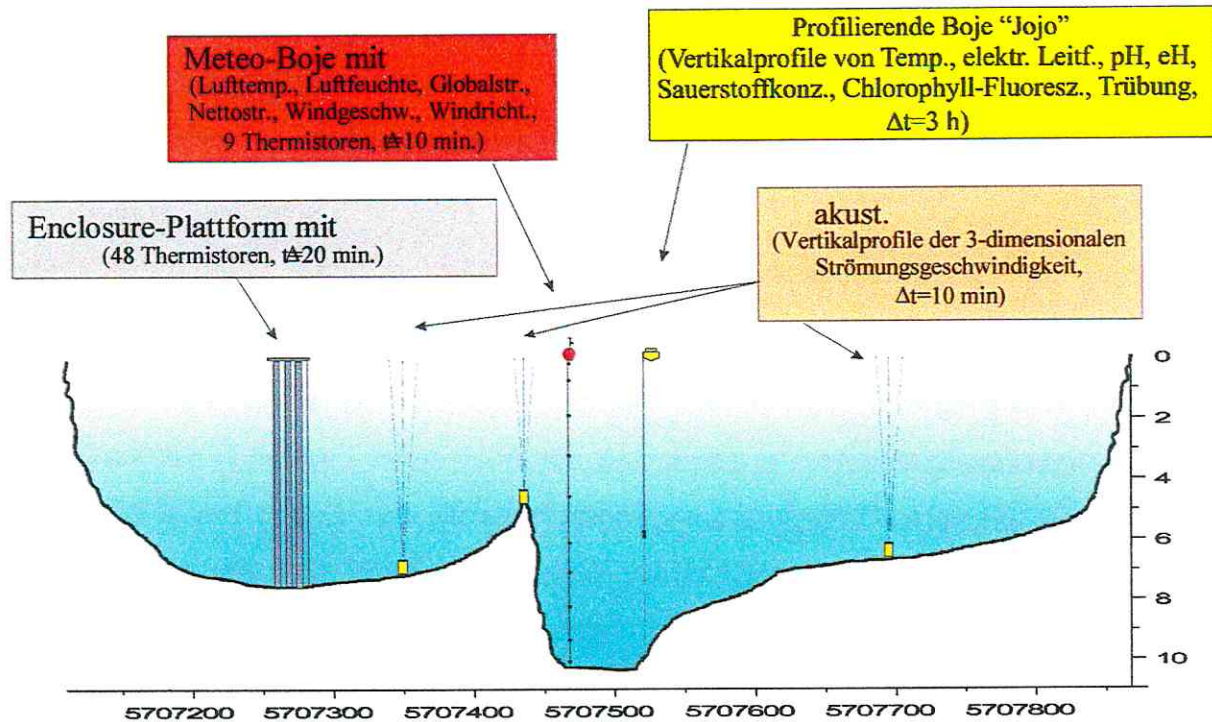


Abb. 7: Übersicht über die im RL 111 installierten automatischen Meßeinrichtungen

### Limnophysik

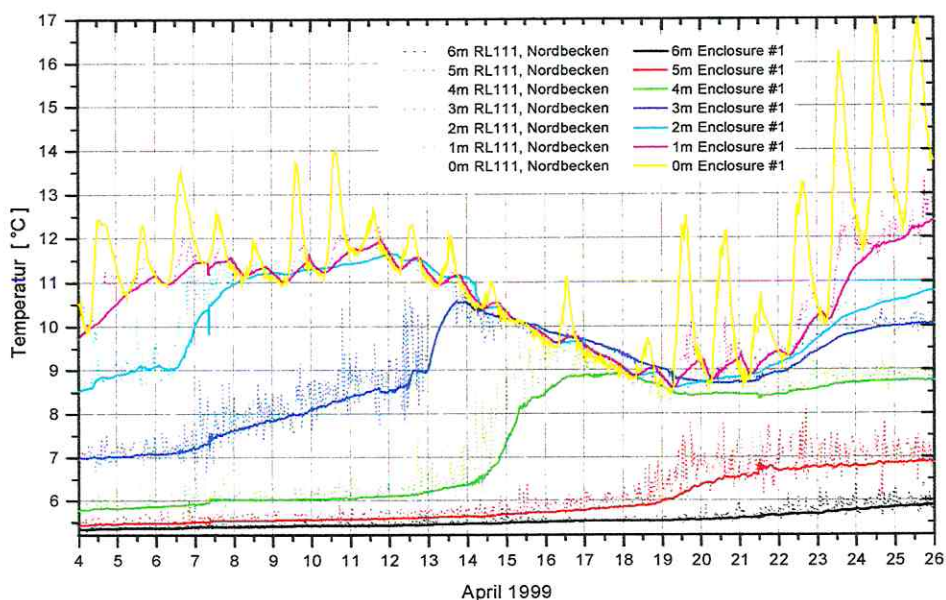
Zur Untersuchung limnophysikalischer Prozesse sowie zum Monitoring physikochemischer Parameter in den Enclosures sowie im See selber wurde ein umfangreiches Sortiment automatisch arbeitender Meßeinrichtungen installiert. Diese sind in Abbildung 7 skizziert. In ausgewählten Enclosures sowie neben den Enclosures im Nordbecken des Sees wurden Thermistorketten installiert, die den Temperaturverlauf in unterschiedlichen Tiefen aufzeichnen. Im Mittelbecken des Sees ist seit November 1996 eine Meteoboje (Aanderaa) verankert, die neben den meteorologischen Sensoren zusätzlich mit einer Thermistorkette ausgestattet ist. Ebenfalls im Mittelbecken wurde im März 1999 eine profilierende Boje installiert, die in einem Zeitabstand von drei Stunden Vertikalprofile von Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotential, Sauerstoffsättigung, Trübung und Chlorophyll-Fluoreszenz mißt. Zur Messung von Strömungsgeschwindigkeiten wurden ebenfalls im Frühjahr 1999 drei profilierende Strömungsmesser (Fa. RDI) ausgebracht, die in der Lage sind Vertikalprofile der dreidimensionalen Strömungsgeschwindigkeit zu messen.

Darüber hinaus wurden zu den seit 1999 14-tägig durchgeführten Probenahme-kampagnen Vertikalprofile von Temperatur, elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotential, Sauerstoffsättigung, Chlorophyll-Fluoreszenz und Trübung gemessen.

Hauptziel der limnophysikalischen Untersuchungen ist es, vertikale Transportprozesse in der Wassersäule bzw. in den Enclosures zu quantifizieren und ggf. in ein gekoppeltes physikalisch-chemisches Modell einfließen zu lassen.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, daß die Enclosures bezüglich der vertikalen Schichtungs- und somit Transportbedingungen nicht als vom See getrennt betrachtet werden können. Abbildung 8 zeigt einen Auszug des zeitlichen Temperaturverlaufs in verschiedenen Tiefen im Enclosure eins und im Nordbecken des Sees, direkt neben den Enclosures. Enclosure und See unterschieden sich hinsichtlich ihres Schichtungsverhaltens kaum. Da das Eindringen der kurzwelligigen Solarstrahlung und die oberflächliche Durchmischung durch das Wirken des Windes sich in den Enclosures durch das Verwenden der schwarzen Folie sehr vom See unterscheidet, läßt sich schließen, daß ein aktiver Wärmetransport durch die Enclosurefolie stattfindet. Das heißt, die thermische Schichtung in den Enclosures wird durch den See vorgegeben. Lediglich hochfrequente Temperaturschwankungen (interne Wellen) werden durch die Enclosure-Folie herausgefiltert (siehe Abb. 8). Daraus ergibt sich, für ein Verständnis der vertikalen Schichtungs- und Transportbedingungen in den Enclosures, die Notwendigkeit, dieselben für den gesamten See zu untersuchen. Da hier die vertikalen Transportprozesse besonders im Hypolimnion auch sehr entscheidend durch horizontale Transportphänomene bestimmt werden, erhöht sich dadurch die Komplexität der Untersuchungen. So müssen hier Prozesse wie windgetriebene Strömungen, Seiches (stehende interne Wellen, Schwingungen) oder Randmischung mit einbezogen werden. Besonders durch den Einsatz der profilierenden Strömungsmesser in Kombination mit dreidimensionalen Strömungsmodellierungen, die vom Verein zur Erforschung und zum Schutz der Gewässer e.V. (VESGO) durchgeführt werden, sind diesbezüglich gute Ergebnisse zu erwarten.

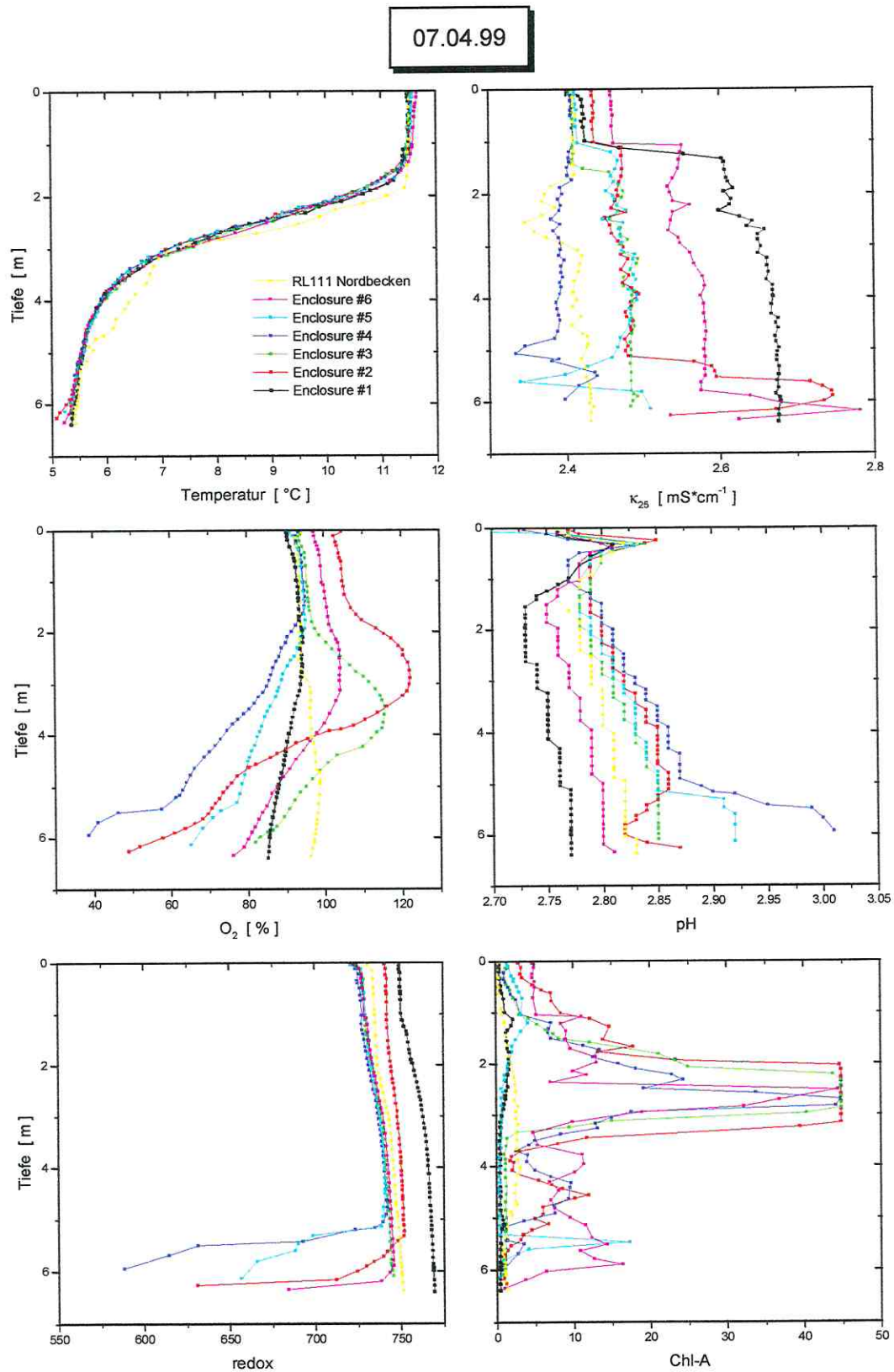




**Abb. 8:** Zeitlicher Verlauf der Temperatur im Nordbecken des RL111 sowie im Enclosure 1. Dargestellt ist der Zeitraum vom 4. bis 26. April 1999, gemessen mit den installierten Thermistorketten.

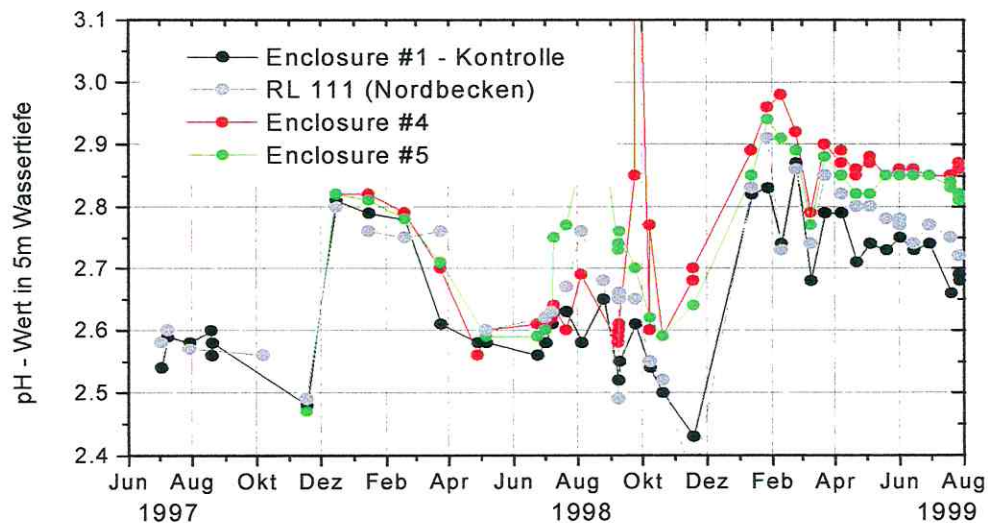
Abbildung 9 zeigt exemplarisch mit Hilfe der Multiparametersonde am 07.04.99 gemessene Vertikalprofile in den Enclosures und im Nordbecken des Sees. Trotz der frühen Jahreszeit hatte sich zu diesem Zeitpunkt bereits eine stabile thermische Schichtung etabliert. Leicht erhöhte pH-Werte, verbunden mit einem abgesenkten Redoxpotential sind am deutlichsten im Enclosure E4 (Ethanol-Zugabe) sichtbar. Charakteristisch für alle behandelten Enclosures sind stark erhöhte Chlorophyll-Fluoreszenzwerte, die auf hohe Algenkonzentrationen schließen lassen. Diese sind besonders in einem Fluoreszenz-Peak zwischen drei und vier Meter Tiefe angesiedelt. Hier sind auch Sauerstoff-Maxima zu verzeichnen. Die Sauerstoffkonzentrationen sind allerdings auch im Tiefenwasser, über dem Sediment noch relativ hoch. Die Messungen aus dem Jahr 1998 haben gezeigt, daß sich dort auch nach längerer Stagnationsphase keine anaeroben Verhältnisse einstellen, die eine Voraussetzung für die mikrobielle Sulfatreduktion darstellen. Als Quellen für Sauerstoff wurden atmosphärischer Sauerstoffeintrag und/oder photosynthetische Sauerstoffproduktion durch Phytoplankton vermutet. Um den Einfluß dieser beiden Faktoren auf die Sauerstoffkonzentration im Hypolimnion

abzuschätzen, wurden die Enclosure E4 und E5 am 05.05.99 mit einem Deckel aus blauer Schwimmfolie versehen. Diese sollten einerseits den atmosphärischen Sauerstoffeintrag und gleichzeitig durch Abdunklung der Enclosures die photosynthetische Sauerstoffproduktion verringern. Zusätzlich wurde im Enclosure E5 der in der Wassersäule vorhandene Sauerstoff durch eine Begasung mit Stickstoff nahezu ausgetrieben. Diese Begasung ist in Abbildung 10 dokumentiert. Die thermische Schichtung im Enclosure wurde während der Begasung vollständig zerstört, stellte sich aber durch die oben beschriebene thermische Kopplung mit dem See sehr schnell wieder ein (Abb. 10). Als Effekt sowohl der Abdeckung als auch der Begasung gingen die Phytoplanktonkonzentrationen in beiden Enclosures zurück, und insbesondere in dem begasten Enclosure wurde ein nahezu anaerobes Hypolimnion hergestellt. Dies führte allerdings nicht zu einer Beschleunigung des Neutralisationsprozesses.



**Abb. 9:** Darstellung der Multiparameter-Profile aus den Enclosures und dem Nordbecken des RL111 vom 07.04.99. Redoxpotential in mV, Chl-A in relativen Einheiten.

Zusammenfassend ist in Abbildung 11 die zeitliche Entwicklung des pH-Wertes in fünf Meter Wassertiefe dargestellt. Die Werte wurden aus den Sondenprofilen während der Probenahmekampagnen zusammengestellt. Der Vergleich der pH-Entwicklung in dem Kontroll-Enclosure E1 mit demjenigen im Nordbecken des Sees zeigt, daß es hinsichtlich des pH-Wertes keine signifikanten Enclosure-Effekte gibt. Enclosure E5 reagiert auf die Substratzugabe sehr prompt mit einer deutlichen pH-Erhöhung. Diese ist in dem mit Ethanol behandelten Enclosure E4 erst sehr viel später zu beobachten. In beiden Enclosures fällt der pH-Wert allerdings wieder und liegt seither kontinuierlich etwa 0,1 pH-Einheiten über dem des Kontroll-Enclosures.



**Abb. 11:** Vergleich des zeitlichen Verlaufs des pH-Wertes in 5 m Wassertiefe in dem Kontroll-Enclosure LE1 (Kontrolle), dem RL111, sowie den Enclosures LE4 (24 mM TOC) und LE5 (2,4 mM TOC) über den Untersuchungszeitraum.

## Mikrobiologie

Aufgrund der geringen Größe der Enclosures war nicht auszuschließen, daß die Entnahme von Sedimentproben die Chemie und Schichtungsverhältnisse in der Wassersäule beeinflussen würde. Deshalb konnten während der laufenden Versuche keine Untersuchungen am Sediment durchgeführt werden. Die Messungen in der Wassersäule deuteten jedoch darauf hin, daß die Substratzugabe Veränderungen insbesondere im bzw. direkt über dem Sediment hervorrufen. Um zumindest einen Eindruck über die Verhältnisse im Sediment zu erhalten, wurde deshalb am 7.4.1999 stichprobenhaft das Sediment in Enclosure E5 (Stroh und Carbokalk: 2,4 mM TOC) untersucht und mit dem ungestörtem Sediment aus dem See neben der Enclosure-Anlage (7 Meter Stelle) verglichen.

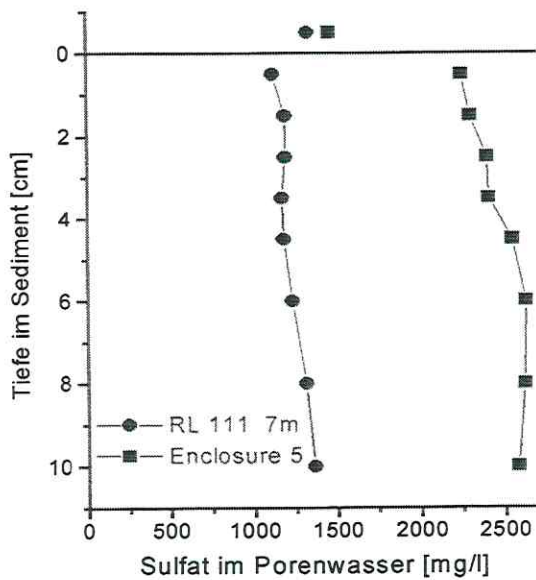


Abb. 12: Sulfatgehalte im Porenwasser

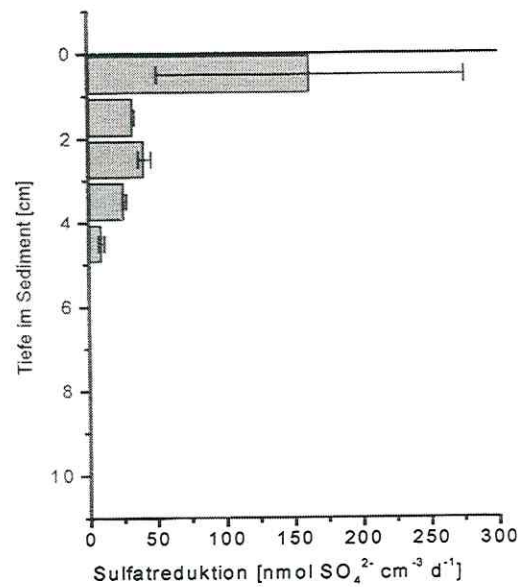
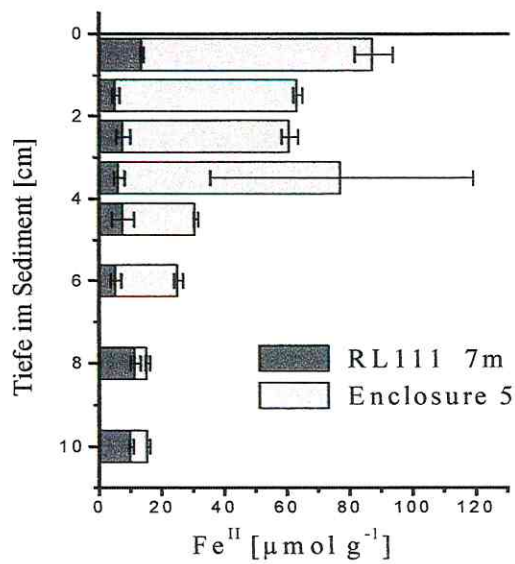
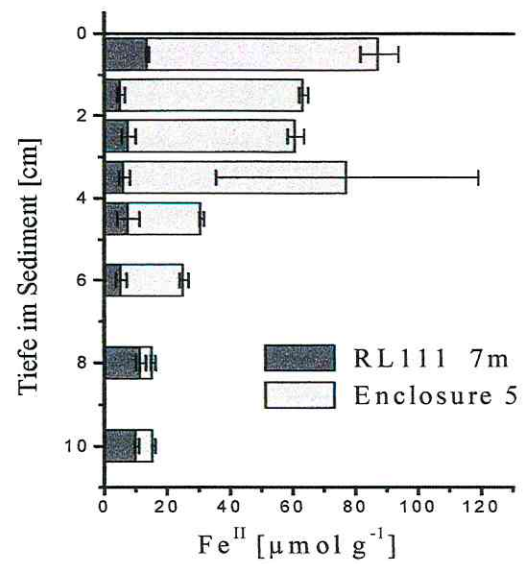


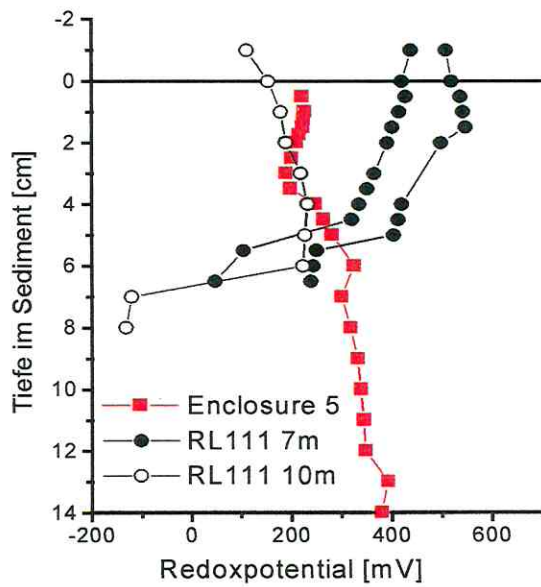
Abb. 13: Sulfatreduktionsraten; <sup>35</sup>S-Core injection.



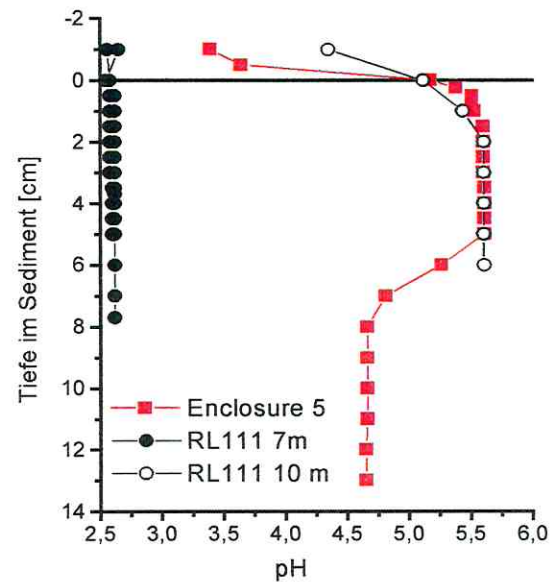
**Abb. 14:** Gehalte an HCl-löslichem Fe(II); RL111 (7m-Stelle)



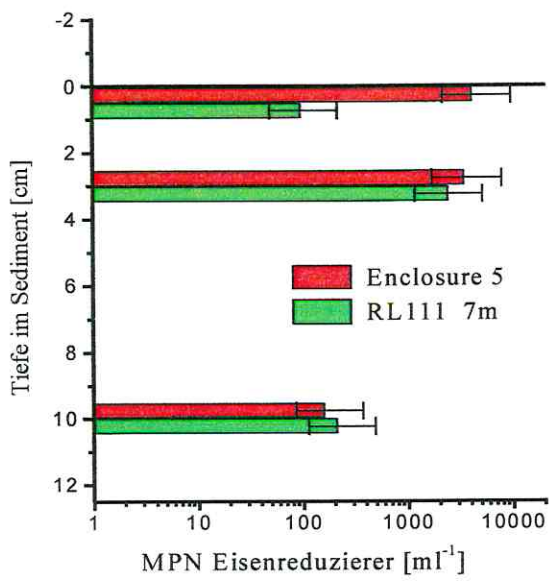
**Abb. 15:** Gehalte an Hydroxylamin-löslichem Eisen RL111 (7m-Stelle)



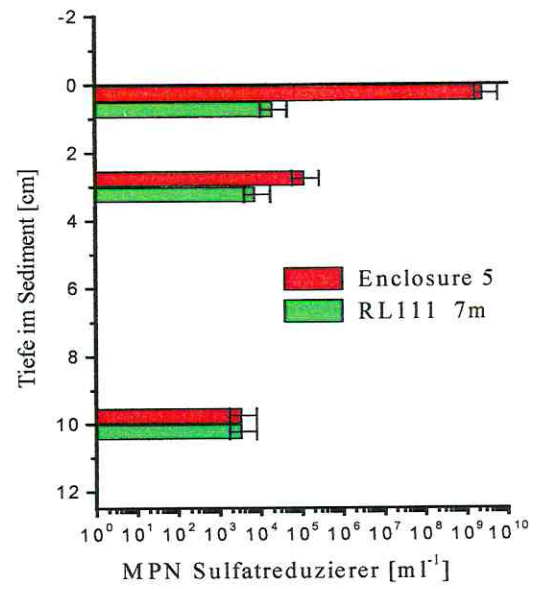
**Abb. 16:** *in situ*-Redoxpotentiale



**Abb. 17:** *in situ*-pH-Wert; RL111 7 m: 2 Profile



**Abb. 18:** Zellzahlen (most probable number) eisenreduzierender Bakterien



**Abb. 19:** Zellzahlen (most probable number) sulfatreduzierender Bakterien

Das Porenwasser des Sediments im Enclosure enthielt etwa doppelt soviel Sulfat wie das Seesediment (Abb. 12). Sulfat nahm mit der Sedimenttiefe leicht zu. Anscheinend kam es durch die Zugabe von Stroh und Carbokalk zu einer Mobilisierung von im Sediment festgelegtem Sulfat. Gegenüber dem See war im Enclosure der Gehalt an hydroxylamin-löslichem Eisen erhöht, d.h. es konnte hier ein Modifikationswechsel des Eisens im Sediment registriert werden (Abb. 15). Der Effekt war in den obersten sechs Zentimetern des Sedimentes am höchsten und wurde hauptsächlich durch eine deutliche Zunahme der HCl-löslichen Fe(II)-Fraktion verursacht (Abb. 14). Seit der Zugabe der Substrate, wechselten im Sediment des Enclosures (E5)  $75 \mu\text{mol Fe g}^{-1} \text{TS}$  in den zweiwertigen Valenzzustand.

Das Redoxpotential an der Sedimentoberfläche war im Enclosure (5) und an der 10,5 Meter-Stelle identisch und von der 7 Meter-Stelle verschieden (Abb. 16). In den oberen 5 Zentimetern war das Redoxpotential im Enclosure um ca. 200 mV niedriger als im See, unterhalb von 6 Zentimetern war das Redoxpotential im Enclosure höher als an beiden Stellen im See. Offensichtlich konzentriert sich der Effekt der Mineralisation des zugegebenen organischen Materials auf die obersten fünf Zentimeter des Sedimentes. Dies wird auch durch das pH-Profil (Abb. 17) belegt. In den obersten sechs Zentimetern lag der pH-Wert im Enclosure und an der 10,5 Meter-Stelle über 5,5, unterhalb von acht Zentimetern im Enclosure konstant bei 4,7. Im See an der 7 Meter-Stelle war der pH-Wert konstant bei 2,6. Der Vergleich zeigt, daß es offensichtlich in dem Enclosure gelungen ist, die pH-Verhältnisse der 10 Meter-Stelle zu simulieren. Die Messung von zwei Profilen an der 7 Meter-Stelle zeigt die gute Reproduzierbarkeit der Messung. Wenn man den Protonengehalt des gesamten Porenwassers im Enclosure und im See berechnet, kann man unter der Annahme, daß der See an der 7 Meter-Stelle heute mit dem Zustand des Enclosures vor Ausbringen der Substrate am 7.7.98 identisch ist, eine Protonenabnahme berechnen. Diese beträgt  $134 \text{ mmol m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  für die obersten fünf Zentimeter bzw.  $434 \text{ mmol m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  für die obersten 13 Zentimeter des Sedimentes.

Die Sulfatreduktion wurde nur im Enclosure gemessen. Das Aktivitätsmaximum ist im obersten Zentimetern lokalisiert (Abb. 13). Darunter befindet sich eine drei bis vier Zentimeter dicke Schicht hoher Aktivität. Die gemessenen Raten sind für das RL111



sehr hoch. An der 7 Meter-Stelle war Sulfatreduktion bisher kaum nachweisbar und an der 10,5 Meter-Stelle liegen typische Sulfatreduktionsraten zwischen 5 und 10  $\text{nmol cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (d.h. um einen Faktor  $>10$  niedriger als im Enclosure). Unter der Annahme einer Stöchiometrie von zwei verbrauchten Protonen pro Molekül Sulfat läßt sich allein durch die Sulfatreduktion in den obersten fünf Zentimetern ein Protonenverbrauch von  $2005 \text{ mmol m}^{-2} \text{ a}^{-1}$  berechnen.

Gegenüber dem See sind die Zellzahlen der Sulfatreduzierer im Enclosure um bis zu fünf Größenordnungen erhöht. Die höchsten Zellzahlen findet man im obersten Zentimeter mit mehr als  $10^9$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  (Abb. 19). Dies ist eine sehr hohe Zahl. An der 7 Meter-Stelle fand man bisher maximal  $10^3$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ; an der 10 Meter-Stelle weniger als  $10^4$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Nicht ganz so groß ist der Effekt bei den eisenreduzierenden Bakterien, wobei auch hier die Zahlen im Enclosure an der Sedimentoberfläche gegenüber dem See deutlich erhöht sind (Abb. 18).

Am 19.7.1999 wurde das Sediment in einem weiteren Enclosure beprobt (E3). Auch hier war der pH im Sediment deutlich angestiegen. Die Daten zu dieser Probenahme sind jedoch noch nicht vollständig ausgewertet.

### **Fazit und Ausblick**

Anhand eines ausgewählten Enclosures wurde gezeigt, daß durch Zugabe von Stroh und Carbokalk im Sediment die gewünschten Effekte erzielt wurden:

1. Die mikrobielle Sulfatreduktion wurde deutlich stimuliert, es kam zu einer Vermehrung sulfatreduzierender Bakterien
2. Die Eisenreduktion wurde deutlich stimuliert

Als Ergebnis kam es zu einer Produktion von Alkalinität und damit zu einem deutlichen Anstieg des pH-Wertes im Sediment. Dies führte jedoch bislang nicht zu einer deutlichen Neutralisierung des Wasserkörpers. Der Versuch der sauerstofffreien Begasung eines Enclosures zeigt, daß auch in einem anoxischen Wasserkörper die Neutralisierung nicht beschleunigt ist. Das heißt bei den eingesetzten vergleichsweise niedrigen Substratkonzentrationen findet die mikrobielle Alkalinitätsproduktion ausschließlich im Sediment statt. Dies bedeutet

auch, daß das Verfahren unabhängig von einem anoxischen Hypolimnion ist und somit in Seen verschiedenster Tiefen und Schichtungsverhältnissen anwendbar sein sollte. Insbesondere im Hinblick auf die geplanten Groß-Enclosures kommt der Quantifizierung der mikrobiologischen Umsatzraten im Sediment sowie der Untersuchung von Transportprozessen zwischen Sediment und Wasser eine entscheidende Bedeutung zu. Diese Daten sind zur Erstellung einer tragfähigen Neutralisierungsprognose unerlässlich. Dazu ist in Zusammenarbeit mit der GKSS die Beprobungstechnik für die Sediment-Wasser Kontaktzone zu optimieren.

Um die eventuell durch Sediment-Wasser Transportprozesse limitierte Neutralisierungsrate zu erhöhen, wurde in Zusammenarbeit mit der GKSS ein aktiver *in situ*-Reaktor entwickelt und in Betrieb genommen. Es handelt sich dabei um ein 6,5 Meter langes mit Stroh gefülltes Rohr, das in ein Enclosure hineingehängt wurde und über eine Pumpe ständig mit Tiefenwasser, dem Ethanol zudosiert wird, von oben nach unten durchströmt wird. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß damit tatsächlich innerhalb weniger Wochen ein meßbarer pH-Anstieg im Enclosure erreicht werden kann, wobei es jedoch aufgrund der hohen Substratzugabe zu einer Eutrophierung des Enclosures kommt. Im Hinblick auf einen eventuell in einem der geplanten Groß-Enclosures zu verwirklichenden aktiven Reaktors ist die Frage der Substratzudosierung zu klären. Es muß hier ein Kompromiß zwischen Eutrophierungsgefahr und Neutralisierungsgeschwindigkeit eingegangen werden.

Die Rolle der mikrobiellen Eisenreduktion ist noch nicht geklärt und soll in Zusammenarbeit mit dem FZK genauer untersucht werden. Der Einfluß des Algenwachstums, das durch den Phosphateintrag aus dem Stroh hervorgerufen wird auf die Zielstellung Entsäuerung ist bisher unklar. Unter autotrophen Wachstumsbedingungen würde eine Primärproduktion resultieren, also eine zusätzliche Freisetzung von Sauerstoff und Produktion von organisch gebundenem Kohlenstoff unter gleichzeitigem Verbrauch von anorganisch gebundenem Kohlenstoff. Die Produktion von Sauerstoff kann der Entstehung von anoxischen Bedingungen im Gesamt-Enclosure behindern. Auf der anderen Seite wird durch Photosynthese organisch gebundener Kohlenstoff erzeugt, der bei einer Sedimentation der Algen (nach dem Absterben) zum Grund als Reduktionsmittel für Eisen (III) und Sulfat

zusätzlich zum eingebrachten Substrat zur Verfügung stehen könnte. Da endgültige Forschungsergebnisse über die Lebensweise von Algen in pyritversauerten Seen noch ausstehen, kann bisher nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Algenpopulationen überwiegend oder ausschließlich heterotroph leben. Unter dieser Annahme würden die Algen im Enclosure einen Teil des eingebrachten Substrates, das prinzipiell organisch gebundenen Kohlenstoff mit der Aufgabe der Eisen- und Sulfatreduktion darstellt, zur Energiegewinnung nutzen. Diese Energiegewinnung könnte dann insgesamt zu Lasten des Entsäuerungszieles gehen.

Die chemischen Untersuchungen der Wassersäule der Enclosures stehen mit den mikrobiellen Untersuchungen des Sediments im Einklang. Die erhöhten Eisen (II) Konzentrationen über dem Grund der substratbeaufschlagten Enclosures korrelieren mit der Stimulation der Eisenreduktion. Die Mobilisierung von Sulfat (Konzentrationserhöhung im Sediment-Porenwasser) unter anoxischen Bedingungen bedarf noch weitreichender Forschungen. Hier kann die Arbeitsgruppe des FZK durch Untersuchung der beteiligten Mineralphasen Jarosit, Schwertmannit und Goethit einen wertvollen Beitrag leisten. Hydrogeologische Untersuchungen der Sektion Hydrogeologie (UFZ) können Aufschluß geben, inwiefern Konzentrationen von Porenwasserinhaltsstoffen durch Transportprozesse über das Grundwasser beeinflußt werden.

## 1.4 Sulfatreduzierende Bakterien des Restlochs 111

BARBARA C. HARD, WOLFGANG BABEL

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie,  
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

### Einleitung

Die Wässer von Braunkohle-Tagebaurestlöchern und aus dem Uranbergbau sind durch niedrige pH-Werte (zwischen 1 und 4), hohe Sulfatgehalte und hohe Metallkonzentrationen gekennzeichnet. Die Metalle, die dort eine dominierende Rolle spielen, sind Eisen, Aluminium, Mangan, Kupfer, Blei, Nickel, Kobalt, Cadmium und im Falle der Uranbergwerkssickerwässer Uran und andere Radionuklide. Um diese Bergwerkswässer in Flüsse einleiten zu können bzw. die Tagebaurestlöcher als Freizeitgewässer nutzen zu können, müssen sie gereinigt werden.

Sulfatreduzierender Bakterien sind für Dekontaminationsprozesse dieser Wässer geeignet. Sie sind tolerant gegenüber einer Reihe von verschiedenen Metallen und können sich demnach in Wässern mit hohen Metallgehalten vermehren und Sulfat reduzieren. Durch die Sulfatreduktion werden Protonen weggefangen und das Wasser wird neutralisiert, Metalle fallen aus und werden somit aus dem Wasser entfernt.

### Material und Methoden

#### *Probenahme und Kultivierung*

Schlamm-/Wasserproben wurden aus dem Restloch 111 entnommen. Für die Isolierung der Sulfatreduzierer wurde ein modifiziertes Postgate Medium verwendet (Hard und Babel, 1995). Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden Lactat (20 mM), Pyruvat (20 mM) und Methanol (10 mM) eingesetzt. Inkubation der Proben fand bei pH 2,5 und pH 7 statt.

#### *Bestimmung der Wachstumsraten*

Die Wachstumskinetik wurde über Proteinmessungen verfolgt. Protein wurde nach einer modifizierten Methode von Bradford (1976) gemessen.

### *Chemische Analysen*

Sulfat wurde mit einem Sulfat-Fertigtest „Spectroquant“ von Merck, Darmstadt bestimmt. Lactat und Pyruvat wurden ebenfalls mit Fertigtests von Merck gemessen. Die Bestimmung von Methanol erfolgte mit Hilfe eines Gas-Chromatographen (Dani, Gera).

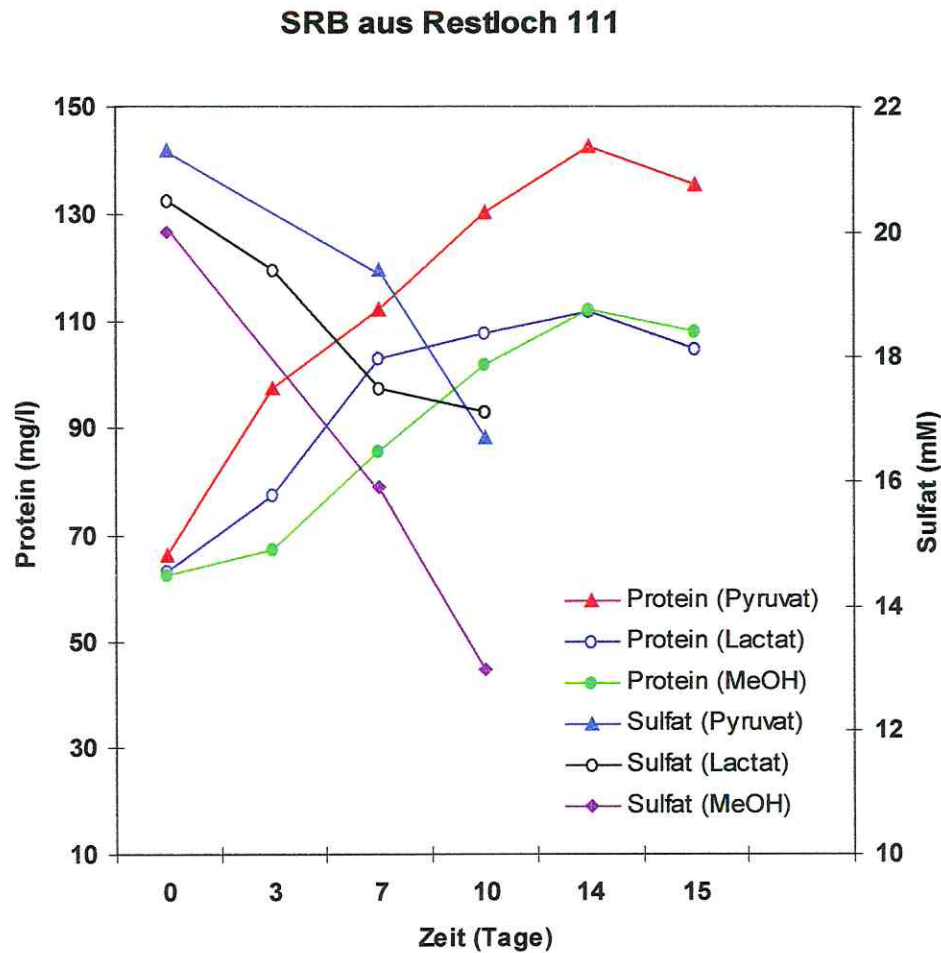
### **Ergebnisse und Diskussion**

Eine Reihe von sulfatreduzierenden Bakterien wurden in Anreicherungskulturen bei pH 7 kultiviert. Als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wurden Lactat, Pyruvat und Methanol zugegeben. Die Reduktion des Eisensulfates zu Eisensulfid und die Ausfällung der Flocken als schwarzer Schlamm war in den Kulturgefäßen sichtbar. Wachstum und Sulfatreduktion sind in Abbildung 1 dargestellt.

Bei pH-Werten von 2,5 fanden kein Wachstum und keine Sulfatreduktion statt, Sporen wurden nicht beobachtet.

Die Tatsache, daß die Sulfatreduzierer nicht bei dem Original pH-Wert von 2,5 des Standortes kultiviert werden konnten, deutet darauf hin, daß die Bakterien im Schlamm des Sees in Mikronischen vorkommen, in denen die pH-Werte wohl eher im neutralen Bereich liegen.

Zukünftige Arbeiten werden die Zusammensetzung der Biozönose des Sees untersuchen, die Suche nach acido- und metalltoleranten Sulfatreduzierern fortsetzen, die Wechselwirkungen der Zellen mit unterschiedlichen Metallen näher untersuchen und den Einfluß abiotischer Faktoren, wie z.B. Sauerstoff überprüfen.



**Abb. 1:** Wachstum und Sulfatreduktion mit unterschiedlichen Kohlenstoff- und Energiequellen.

## Literatur

- BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- HARD, B.C., BABEL, W. (1995): Characterization of a methanol-utilizing sulfate-reducing bacterium isolated from a wastewater pond. *J. Basic Microbiol.* 35, 385-392.

## 1.5 Analyse der taxonomischen Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaften des Restloches 111 mit molekularbiologischen Methoden

D. F. WENDEROTH, I. PÖHLER, M.G. HÖFLE

GBF- Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,  
Abt. Umweltmikrobiologie, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig

### Einleitung

Zur Bestimmung der Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsansätze in den Experimentaleinheiten des Restloches 111 (RL111) wurde die räumliche und die zeitliche Änderung des Bakterioplanktons, sowohl in den einzelnen Enclosures als auch in der Freiwasserzone, bestimmt. Der Schwerpunkt lag im ersten Bearbeitungsjahr auf der Analyse der taxonomischen Diversität und der Zellkonzentrationen unter Einbeziehung der nicht-kultivierbaren Bakterien mit Hilfe von molekularbiologischen Fingerprinttechniken. Diese erlaubten die Analyse der taxonomischen Diversität auf der Ebene der 16S rDNA und der metabolisch aktiven Taxa auf der Ebene der 5S rRNA.

### Methodik

#### *Probenahme*

Wasserproben wurden mit einem 3 l Ruttner-Schöpfer aus der Freiwasserzone des Restloches 111 (RL111) bzw. den Enclosures entnommen. Das Bakterioplankton wurde nach einer Vorfiltration durch einen 3 µm Polycarbonatfilter (3 µm Porengröße; 90 mm Durchmesser; Nucleopore) auf einem Filtersandwich aus Glasfaserfilter (Typ GF/F; 90 mm Durchmesser; Whatman) und einem Polycarbonatfilter (0,2 µm Porengröße; 90 mm Durchmesser; Nucleopore) gewonnen. Für spätere Nucleinsäureanalysen wurden die Filtersandwiche bei -70 °C gelagert. Zusätzlich wurden 95 ml der Wasserproben mit 5 ml Formol (37 %) für die Zellzahlbestimmung konserviert und bei 4 °C gelagert.

#### *Zellzahlbestimmung*

Die Zellzahl in den Wasserproben wurde nach Noble und Fuhrman (1998) bestimmt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

### *DNA-/RNA-Extraktion*

Die parallele DNA- und RNA-Extraktion aus den Filtersandwiches wurde nach Weinbauer *et al.* (pers. Mitteilung) durchgeführt. Die Filtersandwiches wurden in kleine Streifen geschnitten und mit Lysispuffer (10 mM EDTA, 50 mM Na-Acetat, 1 % SDS, pH 4,2), Phenol/Chloroform (pH 4,2) sowie Glasperlen in Teflontöpfe gegeben und in einem Mikrodismembrator (B. Braun, Melsungen) auf der höchsten Frequenz geschüttelt. Der Überstand, der die Gesamt-RNA enthielt, wurde abpipettiert und einer üblichen Nukleinsäureaufreinigung unterworfen. Die DNA wurde aus der Phenol/Chloroform-Phase nach Anheben des pH mit 1 mM Tris-HCl (pH 10,5) gewonnen. Mit dem die DNA enthaltenden Überstand wurde ebenfalls eine Nukleinsäureaufreinigung durchgeführt.

### *16S-PCR und Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)*

Die 16S-PCR (Forward-Primer 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'; Reverse-Primer 5'-ACG GGC GGT GTG TAC +GC-3') und die anschließende DGGE wurde nach Muyzer *et al.* (1993) durchgeführt. Die Fingerprints wurden digitalisiert und für eine Clusteranalyse (Methode: UPGMA) sowie der Berechnung der Diversität (Shannon und Weaver, 1969) herangezogen.

### *Niedermolekulare RNA-Fingerprints*

Die niedermolekulare 5S rRNA wurde radioaktiv am 3'-Ende markiert und gelelektrophoretisch nach Höfle *et al.* (1999) aufgetrennt.

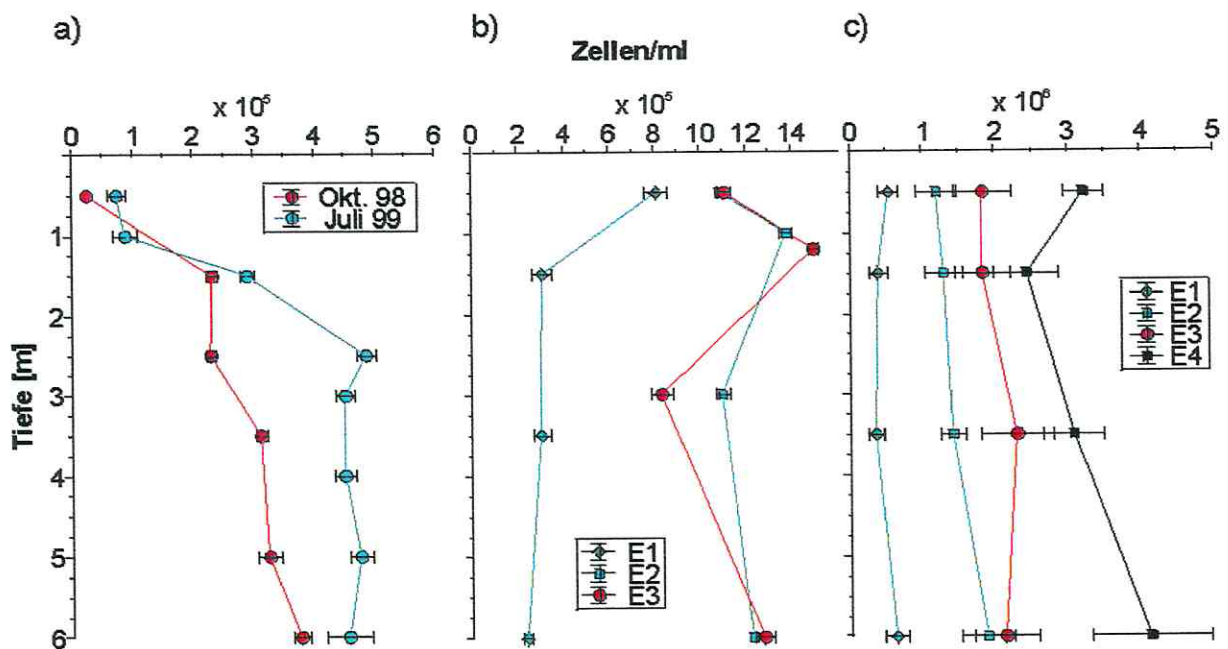
## **Ergebnisse**

### *Gesamtzellzahlen des Bakterioplanktons*

Die direkte Bestimmung der Bakterienzahlen mit Hilfe des Nukleinsäurefarbstoffs Cybergreen sollte mögliche Unterschiede in den Enclosures aufzeigen, die sich auf Grund der unterschiedlichen Behandlungen einstellten. Um dabei jahreszeitliche Schwankungen zu erfassen, wurden Proben vom Oktober 1998 und Juli 1999 miteinander verglichen (Abb. 1). Als Bezugsgröße dienten Zellzahlen des Freiwassers ("See"). Die geringste Zellkonzentration wurde in der Probe "Okt. 98" in der Oberflächenschicht bei 0,5 m des Sees gemessen (Abb. 1a). Mit zunehmender Tiefe nahm die Zellkonzentration um das 9,3-14,8 fache, verglichen mit der Oberflächenschicht, zu. Die höchste Zellzahlkonzentration wurde in einer Tiefe von 6,0 m festgestellt. Ei-



nen ähnlichen Verlauf der Zellzahlen im Tiefenprofil des Sees zeigten die Proben der Probenahme "Juli 99". Wiederum wurde die geringste Zellkonzentration in der Oberflächenschicht bei 0,5 m ermittelt. Bis zu einer Tiefe von 2,0 m wurde ein starker Anstieg festgestellt. Die Zellkonzentrationen blieben dann bis 6,0 m Tiefe konstant. Bei einem Vergleich der Zellzahlen beider Probenahmeterminen, fällt auf, dass die Zellkonzentrationen innerhalb der Juli 99 Varianten signifikant höher waren als in den Varianten der Probenahme Okt. 98 (Abb. 1a).



**Abb. 1:** Bakterienzahlen des Sees (a); der Enclosures Okt. 98 (b) und der Enclosures Juli 99 (c)

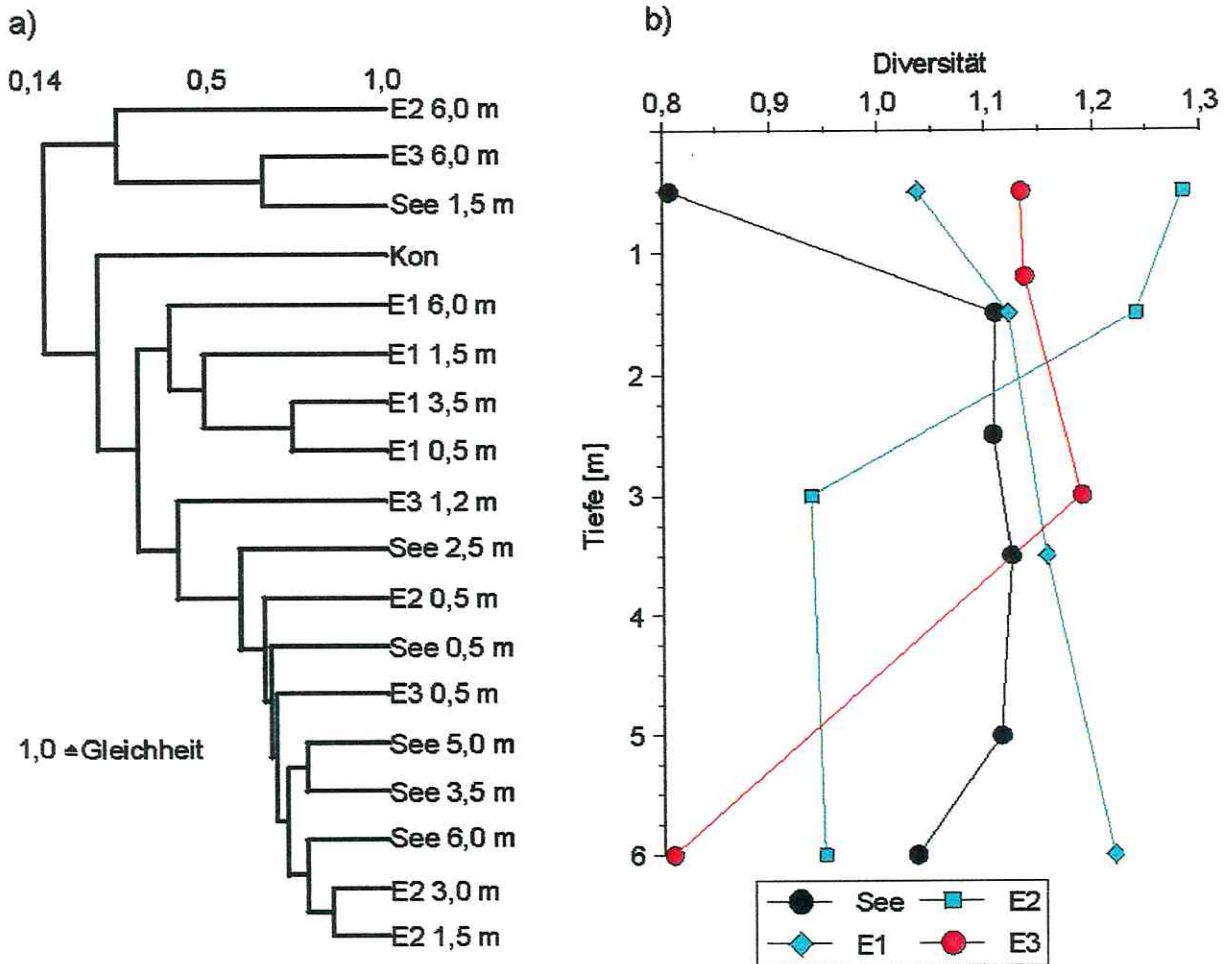
Mit der Ausbringung der Enclosures und der Einbringung von Substraten begann im Mai 1998 der experimentelle Teil des Projekts. Schon innerhalb der Proben, die im Okt. 98 genommen wurden, unterschieden sich die Enclosures in ihren ermittelten Zellkonzentrationen (Abb. 1b). Die beiden Varianten E2 und E3, die verschiedene Applikationen des Carbokalks erhalten hatten, wiesen um bis zu 5-fach höhere Zellkonzentrationen gegenüber dem Kontroll-Enclosure E1 auf. Keine gravierenden Änderungen traten in den Proben Juli 99 auf. Die Zellkonzentrationen lagen entsprechend der Behandlung über denen des Enclosures E1 (Abb. 1c). Die hier erstmals bestimmten Zellzahlen im Enclosure E4 (Ethanol- und Strohzugabe) lagen zwischen

der Kontrolle E1 und E3. Die höchsten Zellzahlen wurden in E2 (8 kg Carbokalk und Stroh) ermittelt. Auffällig war die deutliche Differenzierung der Varianten, verglichen mit den Proben Okt. 98.

#### *Bestimmung der Diversität des Bakterioplanktons*

Zur Bestimmung der taxonomischen Struktur der unterschiedlichen Behandlungsansätze im See bzw. in den Enclosures wurden Verteilung und Veränderung der bakteriellen Lebensgemeinschaften mit Hilfe von 5S rRNA und 16S rDNA Fingerprints erfaßt. Die Gesamt-DNA und Gesamt-RNA wurden dabei parallel aus einer Wasserprobe extrahiert. Die Gesamt-DNA wurde einer PCR unterworfen, worin ein Teil des 16S-rRNA-Gens amplifiziert wurde. Das 16S-Amplicon wurde sequenzspezifisch aufgetrennt.

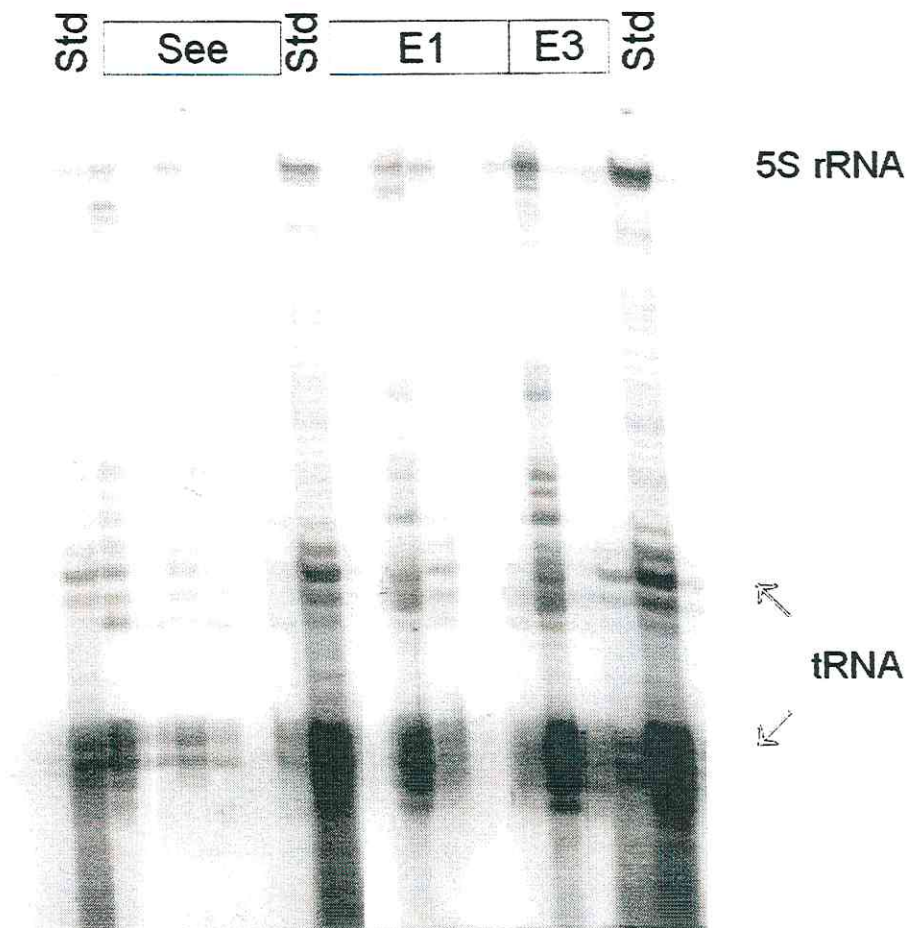
Die einzelnen Fingerprints aus der DGGE wurden einer Clusteranalyse unterworfen. Das aus dieser Clusteranalyse resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 2a dargestellt. Es besagt, dass die Varianten E2 6,0 m, E3 6,0 m und See 1,5 m eine Ähnlichkeit von mindestens 40 % untereinander aufwiesen. Alle Varianten E1 wurden ebenfalls mit einer hohen Ähnlichkeit zusammen geclustert. Die Varianten von E2 und E3 wurden zwar teilweise mit einer hohen Ähnlichkeit gruppiert, wiesen aber keine homogene Ähnlichkeit auf (Abb. 2a).



**Abb. 2:** Vergleich der DGGE Fingerprints in einer Clusteranalyse (a); Diversität innerhalb der DGGE Fingerprints der bakteriellen Lebensgemeinschaften (b)

Zusätzlich zu der Clusteranalyse der einzelnen Fingerprints wurde die Diversität nach Shannon und Weaver (1969) für jede Variante und Tiefe berechnet. Die Oberflächenprobe des Sees wies die geringste Diversität gegenüber den Enclosures auf. Mit zunehmender Tiefe stieg die Diversität im See an. Ein solcher Anstieg konnte nur noch im Kontroll-Enclosure E1 beobachtet werden. In beiden Enclosures E2 und E3, die verschiedene Applikationen des Carbokalks und Stroh beinhalteten, kam es zu einem Rückgang der Diversität mit zunehmender Tiefe. Hier wurde ein Effekt durch die Substratzugabe gemessen.

Zusätzlich zu den Fingerprints, die das 16S-Amplicon lieferten, wurden zusätzlich niedermolekulare 5S-rRNA Profile mit Hilfe einer hochauflösenden Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) erzeugt (Abb. 3). Ein Vergleich beider Methoden zeigte, dass nur ein geringer Teil metabolisch aktiv war.



**Abb. 3:** Niedermolekulares RNA-Profil einiger RL-111-Proben. Std = Molekulargewichtsstandard aus *Escherichia coli* 5S rRNA und tRNAs, inclusive ihrer Hydrolyseprodukte.

## Diskussion

Ziel im ersten Bearbeitungsjahr war es, die Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungen auf die taxonomische Diversität des Bakterioplanktons zu untersuchen. Hierbei kamen 16S rDNA Fingerprinttechniken zur Anwendung, aus denen Clusteranalysen und Diversitätsberechnungen hervorgingen. Zusätzlich wurden, um die metabolischen aktiven Taxa zu bestimmen, niedermolekulare 5S rRNA-Profile erstellt.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass sich die einzelnen Behandlungen in den Enclosures auf die Diversität und die Zellzahlen auswirken. Die relativ niedrigen Zellzahlen in der Oberflächenschicht (0,5 m) des Sees (Abb. 1a) war vermutlich auf eine photoinduzierte Radikalbildung zurückzuführen (Scully *et al.*, 1997),

die einen schädigenden Einfluss auf die Zellen hatte. Eine deutliche Auswirkung der Behandlung (Zugabe von Substrat) auf die Zellkonzentration wurde in den Enclosures E2 und E3 festgestellt, die eine 5fach höhere Zellzahl als der Kontroll-Enclosure E1 aufwiesen. Keine deutlichen Unterschiede in den Zellzahlen wurden zwischen E2 und E3 gemessen. Erwartungsgemäß hätte E3, wo eine 10fach höhere Menge an Substrat appliziert wurde, mehr Zellen aufweisen müssen. Dies wurde auf die kurze Zeitspanne zwischen Beprobung (Okt. 98) und Applikation des Substrats (Mai 98) zurückgeführt. Eine deutlichere Differenzierung in der Zellkonzentrationen der Enclosures wurde in den Wasserproben "Juli 99" gemessen (Abb. 1c). Alle behandelten Enclosures zeigten eine höhere Zellkonzentration gegenüber der Kontrolle. Die geringste Auswirkung auf die Bakterienzahlen zeigte Ethanol als Substrat. Überraschender Weise wurden in E3 (80 kg Carbokalk) weniger Bakterien detektiert als in E2 (8 kg Carbokalk).

Das Hauptziel im ersten Bearbeitungsjahr war es, die taxonomische Struktur des Bakterioplankton mit kultivierungsunabhängigen Methoden zu ermitteln. Mit Hilfe der DGGE wurde für die verschiedenen Enclosures und den See auf der 16S rDNA basierende Fingerprints erstellt, die sich zur Differenzierung der einzelnen Varianten eigneten. Das daraus resultierende Dendrogramm (Abb. 2a) ordnete die einzelnen Varianten größtenteils entsprechend ihrer Herkunft richtig ein. Die aus den Fingerprints errechnete Diversität zeigte eine deutlichere Erniedrigung in den Oberflächenproben des Sees und des E1 (Abb. 2b). In beiden Varianten nahm die Diversität mit zunehmender Tiefe zu. Nach Salonijs (1981) ist die Diversität eng mit der Gesamtzellzahl, die ebenfalls zunahm (Abb. 1a) gekoppelt. In den behandelten Enclosures (E2 und E3) war trotz erhöhter Zellzahl eine Erniedrigung der Diversität ab 3 m zu finden. Hier hatten sich vermutlich Arten, die bevorzugt die eingebrachten Substrate nutzen konnten, durchgesetzt (Alexander, 1997).

### **Ausblick**

Im nächsten Bearbeitungsjahr sollen Sequenzanalysen der ribosomalen RNA zur taxonomischen Identifizierung einzelner Gruppen der bakteriellen Lebensgemeinschaften durchgeführt werden. Zur weiteren Bestimmung der metabolisch aktiven Taxa werden von der direkt extrahierten rRNA, nach Umschreibung in DNA,

Fingerprints angelegt und mit denen der rDNA verglichen. Zusätzlich zur DGGE als Trennmethode für die 16S-Amplicons soll die SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) zu Vergleichszwecken etabliert werden. Alle Arbeiten, die bisher auf die Wassersäule beschränkt waren, sollen auch auf die Sedimente ausgedehnt werden. Dort werden, neben den gesamten bakteriellen Lebensgemeinschaften, besonders die Lebensgemeinschaften der Sulfatreduzierer untersucht werden.

## Literatur

- ALEXANDER, M. 1997. Microbial communities and interactions: a prelude. In: C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach und M.V. Walter (eds.) *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D.C., 5-13.
- HÖFLE, M.G.; H. HAAS UND K. DOMINIK. 1999. Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3164-3174.
- MUYZER, G.; E.C. DE WAAL UND A.G. UITTERLINDEN. 1993. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- NOBLE, R.T. UND J.A. FUHRMAN. 1998. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* **14**: 113-118.
- SALONIUS, P.O. 1981. Metabolic capabilities of a forest soil microbial populations with reduced species diversity. *Soil Biol. Biochem.* **13**: 1-10.
- SCULLY, N.M.; W.F. VINCENT, D.R.S. LEAN UND W.J. COOPER. 1997. Implications of ozone depletion for surface-water photochemistry: sensitivity of clear lakes. *Aquat. Sci.* **59**: 260-274.
- SHANNON, P.O. UND W. WEAVER. 1969. *The mathematical theory of communication*. Fourth edition. The University of Illinois Press, Urbana, Chicago, London.

## 1.6 Groß-Enclosure für Seeveruche

G. LUTHER, W. ELSNER

GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, TPT,  
Max-Planck-Straße, 21502 Geesthacht

### Einleitung

Unter realen Umgebungsbedingungen sollen Versuche in abgeschlossenen Wasserkörpern durchgeführt werden können. Dazu werden *Groß-Enclosures* benötigt, die bis zu 5000 m<sup>3</sup> Wasser enthalten. Bei Versuchsbeginn entsprechen die Bedingungen am Boden dem Zustand des Seebodens im freien Wasser. Die Entwicklung von *Groß-Enclosures* und die Untersuchung von Seeabsperrungen mußten zusätzlich in das laufende F+E-Programm der GKSS eingebunden werden. Der HGF-Strategiefonds war damit ursächlich die Basis für die Aufnahme der gemeinsam abzuwickelnden F+E-Aktivitäten in diesem Teilprojekt. Die Mitarbeit des GKSS-Forschungszentrums erfolgte auf Anregung des UFZ, Sektion Gewässerforschung, Magdeburg.

Ziele der GKSS-Arbeiten sind die Entwicklung von Groß-Enclosures mit einem Durchmesser von bis zu 30 Metern inkl. Infrastruktur, deren Einsatz im Rahmen der geplanten *in situ*-Versuche und deren technische Übertragbarkeit auf ähnlich gear-tete saure Seen. Darüber hinaus werden Möglichkeiten zur Leistungssteigerung der angewandten Verfahrensprinzipien zur Umwandlung von Sulfat in Sulfid untersucht. Die Versuche werden durch Laboruntersuchungen unterstützt. Die Probleme, die bei einer Übertragung des Verfahrens auf größere Seen entstehen, werden analysiert. Es wird in diesem Zusammenhang auch nach technischen Lösungen für eine See-teilung gesucht und ein Verfahrensvorschlag erarbeitet.

## Methodik

Das Bioreaktorverfahren basiert auf der mikrobiologischen Sulfatreduktion, bei der Mikroorganismen unter anaeroben Umgebungsbedingungen Sulfat als Elektronenakzeptor nutzen. Wie der Literatur [1,2,3,4] zu entnehmen ist, haben Versuche die grundsätzliche Machbarkeit eines *in situ*-Reaktors zur Neutralisation saurer Seen ergeben.

Mit dem *ex situ*-Verfahren [1,2] konnten Sulfatgehalte von weniger als 500 mg/l bei einem Sulfateingangswert von ca. 1.800 - 2.000 mg/l erreicht werden. Als Reaktorsubstrat wurden Lavasteine benutzt. Die pH-Werte wurden durch den mikrobiellen Sulfatabbau von 2,8 (3,0) auf 6,8 - 7,5 angehoben. Die Einfahrzeit des *ex situ*-Reaktors betrug ca. 30 Tage.

Ergebnisse der Säulenversuche [3,4] haben gezeigt, daß mit dem Versuchsansatz "Stroh + Carbokalk" stabile pH-Werte von 6 in der ganzen Säule erreicht, die Eisengehalte fast vollständig aus der Wasserphase durch Sulfidfällung entfernt und die Sulfatgehalte im unteren Bereich der Säule deutlich verringert wurden.

## Ergebnisse

In einer Vorstudie wurden die generellen biologischen, technischen und logistischen Rahmenbedingungen für die Entwicklung von Groß-Enclosures aus technologischer Sicht erfaßt und analysiert. Tabelle 1 enthält die Hauptdaten eines 30 m-Enclosures.

Tab. 1: Hauptdaten des 30 m-Enclosures<sup>1</sup>

Durchmesser	ca.	30	m
Bauhöhe	ca.	7	m
Oberfläche	ca.	700	m <sup>2</sup>
Umfang d. Enclosure-Ringes	ca.	100	m <sup>3</sup>
Volumeninhalt	ca.	5.000	m <sup>3</sup>
Sulfatanteil gesamt	ca.	6.000	kg
Eisenanteil gesamt	ca.	750	kg
Sauerstoffmenge (gesamt)	ca.	50	kg

<sup>1</sup> Angenommen, der Reaktionsschlamm hätte eine Schlammichte von 1,2 t/m<sup>3</sup>, dann ergäbe sich bei 700 m<sup>2</sup> Bodenfläche eine Schichtstärke Reaktionsschlamm von nur 7 mm.



Da es wegen der örtlichen Gegebenheiten und des finanziellen Rahmens nicht möglich war, eine starre Konstruktion für das 30 m-Enclosure zu verwenden, wurde eine Konstruktion gewählt, die sich im Wasser entfalten kann. Die Dichtigkeit am Grund soll über eine weiche Schürze mit Kette als Grundgewicht erzielt werden. Außerdem gleicht die Schürze Bodenwellen von bis zu einem Meter aus. In einer Machbarkeitsstudie wurden Herstellungs- und Handhabungsanforderungen an flexible *Groß-Enclosures* ermittelt. Danach wurden die notwendigen detaillierten Spezifikationen erstellt und in 1998 die erforderlichen Anfragen ausgeschrieben. Da jede Neuentwicklung bei ihrem Ersteinsatz nicht vorhersehbare technische und betriebliche Probleme bereiten kann, wird das Prinzip *Groß-Enclosure* inkl. Ausbringen zunächst mit einem 10 m-Enclosure getestet und erst danach der 30 m-Enclosure spezifiziert. Parallel zu den Planungsarbeiten wurden die technischen und betrieblichen Grundlagen für die Erteilung der Betriebsgenehmigung erarbeitet. Sie wurden dem UFZ zugeleitet.

Wesentlich komplexer als die Fertigung eines Enclosures sind, sein Ausbringen und seine Positionierung im See. Das Bodenprofil im Nordbecken des Restsees 111 wurde erkundet. Drei geeignete Positionen für die Installation der Enclosures wurden vermessen und markiert. Parallel dazu wurde das Verankerungssystem, bestehend aus Ankerbojen, Vorlaufketten und Zugseilen, konzipiert. Abstimmungsgemäß sollen die Enclosures nur wenig Freibord besitzen und werden daher lediglich ca. 15 cm aus dem Wasser ragen. Stege und Arbeitsponton sorgen für gute Begehrbarkeit. Ein Meßhütte auf dem Arbeitsponton dient der Aufnahme logistischer Einrichtungen.

Zur Erfassung erster Grundlagendaten für die Auslegung eines aktiv gesteuerten *in situ*-Reaktors und zur Sammlung von Erfahrungen mit solarenergieversorgter Umwälzanlage wird ein Strohrefaktor in einem Klein-Enclosure von 2 x 2 m Größe betrieben. Das Dosiersystem für den Nährstoff Alkohol wird hydraulisch gesteuert.

Der Bioreaktor hat eine Höhe von ca. 7 m, davon ca. 5 m mit Stroh gefüllt. Die Betriebsdaten des vertikal angeordneten Strohreaktors sind aus Tabelle 2 zu ersehen.

**Tab. 2:** Betriebsdaten des vertikal angeordneten Strohreaktors

a) Wasserdurchsatz	20 l/h
b) Ethanolzugabe	10 g/h
c) Verweilzeit im Reaktor	24 h
d) Strohfüllungshöhe	5 m
e) Durchmesser	300 mm

Nach etwa 14 Tagen Betriebszeit war der pH-Wert am Boden des *Klein-Enclosures* von ca. 2,5 auf 3,28 angestiegen. Zur Animpfung mit den benötigten Mikroorganismen wurde nach den 14 Tagen Betriebszeit 1 l Seebodenschlamm (Greiferprobe außerhalb des *Klein-Enclosures*) in den oberen Teil des Reaktors zugegeben. Nach ca. 6 Wochen war das Wasser im Enclosure anoxisch. Durch biologische Prozesse war das Sulfat weitestgehend bis zum Schwefel abgebaut, wobei der pH-Wert noch nicht ausreichend angehoben werden konnte (wahrscheinliche Ursache: Fehlen von Aktivzonen mit pH-Werten > 4,5 als Start).

## Diskussion

Vor Beginn einer Entwicklung ist es sinnvoll, erste Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen durchzuführen. Dieses ist besonders dann zu empfehlen, wenn aufgrund der Größenordnung der Sanierungsaufgabe mit erheblichen Kosten zu rechnen ist. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen sind auch eine gute Grundlage, die Chancen einer Anwendung des neuen Verfahrens abzuschätzen. Selbst eine grobe Kostenschätzung zeigt bereits häufig, ob die zu erwartende Größenordnung den vertretbaren Rahmen sprengt.

**Tab. 3:** Daten des Restsees 111

Inhalte:			
Sulfatgehalt	ca.	1.200	mg/l
Eisengehalt	ca.	150	mg/l
Sauerstoffgehalt	ca.	10	mg/l
Oberfläche	ca.	100.000	m <sup>2</sup>
Wasservolumen	ca.	500.000	m <sup>3</sup>
ca. 27% zwischen 4 und 10 m Tiefe			
Sulfat (gesamt)	ca.	600	t
Eisen (gesamt)	ca.	75	t
pH-Wert	ca.	2,5	
Basenkapazität	ca.	20	mmol/l

**Tab. 4:** Voraussetzungen für den Prozeß zur Sulfatumwandlung

Neutralisation des unteren Teils (4 m -10 m)
Kein vollständiger Sulfatabbau
Umwandlungsbedarf: 30% des Sulfatgehaltes (s. 1)
Im Freiwasser wird die Zugabe von Äthanol als Nährstoff empfohlen (statt Methanol (s. 1, 2)). Der Umrechnungsfaktor liegt bei ca. 0,75 kg EOH /kg MOH.

**Tab. 5:** Betriebsdaten des 30 m-Enclosures

Durchsatzleistung	V	=	2 m <sup>3</sup> /h
Durchsatzzeit für 1.350 m <sup>3</sup> (0,27 x 5000 = 1 350 m <sup>3</sup> )	tw	=	700 h
Sauerstoffabbau (0,27 x 70) (ohne Neueintrag)	O <sub>ab</sub>	=	20 g/h
Sulfatabbau (1,2 kg/m <sup>3</sup> x 2 m <sup>3</sup> /h x 20/60)	S <sub>ab</sub>	=	0,8 kg/h
Äthanolzugabe (0,75 x 0,8 kg/h )	EOH	=	0,6 kg/h
Carbokalk bis max.	Kalk <sub>zu</sub>	=	5 kg/h
<u>Strohballen</u>			
Anzahl (für eine Ringlage von 100 m)	Z <sub>B</sub>	=	200 Stück
Querschnittsfläche (0,5 m x 0,5 m x 200)	F <sub>B</sub>	=	50 m <sup>2</sup>
Durchflußgeschwindigkeit (2m <sup>3</sup> /h / 50 m <sup>2</sup> )	v <sub>B</sub>	=	0,04 m/h
Verweilzeit pro m Ballenlänge (bezogen auf den freien Querschnitt)	t <sub>wB</sub>	=	25 h/m

Ausgehend von den Daten des Restsees 111 (Tab. 3), den Voraussetzungen (Tab. 4) und den Betriebsdaten des 30 m-Enclosures (Tab. 5) ergeben sich die in Tabelle 6 ermittelten Kosten.

**Tab. 6:** Schätzung der Sanierungskosten für den Restsee 111

3 Enclosures Installation + Rückbau	600 – 1.000	TDM
Betriebsstoffe (Stroh, Alkohol, ...) + Wartung	150	TDM
Personal (1 Person/3 Jahre)	450	TDM
Gesamtkosten	1.200 – 1.600	TDM

Unabhängig von den Investitions- und Personalkosten sind besonders die Betriebskosten bei der Bewertung von Sanierungsverfahren von besonderer Bedeutung. Die Schätzungen zeigen, daß mit Betriebskosten von ca. 0,3 DM/m<sup>3</sup> Seewasser gerechnet werden kann. Der interne Nahrungskreislauf durch abgestorbenes Biomaterial wird zusätzlich helfen, die Nährstoffzugabe (Alkohol) zu reduzieren.

### Ausblick

Entweder hofft man auf die biologische Selbstreinigungskraft eines Sees oder man unterstützt den Reinigungsprozeß durch technische Anlagen zur Steigerung der mikrobiologischen Abbaurate (z.B. durch biologische Kläranlagen in den Zuflüssen). Bei der Größe des Problems, das die Versauerung der Tagebaurestseen darstellt, und der Zeit, die die Seen für eine Selbstreinigung benötigen, ist es mehr als sinnvoll, die Möglichkeiten der Verfahrenstechnik für die biologische Umwandlung von Sulfat zu Sulfid zu nutzen. Gemeinsam mit UFZ und BTUC wurden daher die Möglichkeiten zur Leistungssteigerung analysiert und ein Prinzipschema entwickelt (Abb. 1).

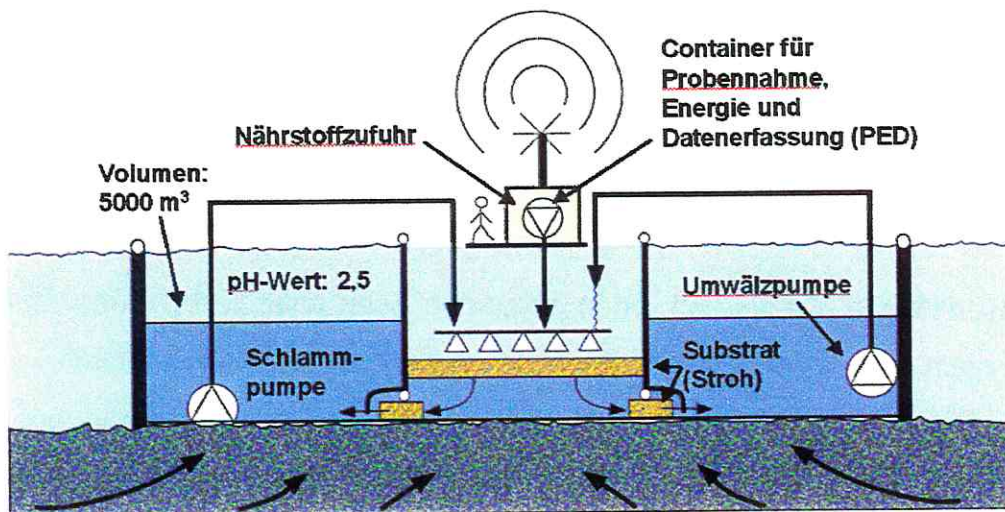


Abb. 1: Prinzipschema zur Leistungssteigerung

Die in den GKSS-Arbeitspaketen "Eignung technischer Verfahrensprinzipien" und "Technologische Grundlagen zur Sanierung schwefelsaurer Restseen" geplanten Untersuchungen zur Leistungssteigerung von Verfahrensprinzipien und zur Entwicklung kostengünstiger Seeteilungen werden durch ein von der GKSS finanziertes Hochschulprogramm der BTU Cottbus am Institut für Wassertechnik unterstützt. Durch Untersuchungen mit einem horizontal angeordneten Reaktor sollen die Grenzen der Leistungssteigerung und die optimalen Betriebsbedingungen eines *in situ*-Bioreaktors, insbesondere diejenigen für das Anfahrverhalten, erfaßt werden.

Das anstehende Untersuchungsprogramm zur Steigerung der Umsatzleistung hat mindestens folgende Schwerpunkte zu bearbeiten:

- a) Anspringverhalten / Einfahrzeit,
- b) Durchsatz/Verstopfung/Zeitverhalten
- c) Verlauf und Stabilität der Anaerobie,
- d) Bedarf und Dauer der Nährstoff- und Karbokalkzugabe
- e) Wasserqualität
- f) Kostenrahmen (Investitionskosten + Betriebskosten),
- g) Übertragbarkeit,
- h) Rückbaufähigkeit.

Mit einem aktiv gesteuerten *in situ*-Bio-Reaktor soll ein kosteneffizientes Verfahren für die Sanierung saurer Seen zur Verfügung stehen, bei dem mit überschaubaren Sanierungszeiten gerechnet werden kann. Vorausgesetzt, daß die Leistungsdaten auch im Feldversuch *realiter* erzielt werden können, ergibt sich eine Regenerationszeit für ein 30 m-Enclosure von ca. 700 Stunden oder 30 Tagen (ohne Einfahrzeit).

Der wirtschaftliche Nutzen und die in gesunden Seen erzielbare Artenvielfalt rechtfertigen nach derzeitigen Erkenntnissen den vorgesehenen F+E-Aufwand.

#### Literaturhinweise:

- 1 Glombitza F.: "Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur Behandlung saurer sulfatreicher eisenhaltiger Wässer aus dem Braunkohlentagebau". In: Tagungsband zum 2. Statusseminar zur BMBF- Fördermaßnahme "Sanierung und ökologische Gestaltung der Landschaften des Braunkohlenbergbaus in den neuen Bundesländern", 7. und 8 Oktober 1998, Cottbus, S. 92-93
- 2 Glombitza F.: "Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur Behandlung saurer sulfatreicher eisenhaltiger Wässer aus dem Braunkohlentagebau (Zwischenbericht zum Projekt FKZ 02WB9539/0)". In: Neue Technologien der Wasserver- und -entsorgung - FuE-Vorhaben 1996. FZK Karlsruhe GmbH- Projektträger PtWT (Hrsg.), S. 140-141
- 3 Friese, K.; Herzprung, P.; Kuehn, B.; Scharf, B.; Schimmele, M.; Wendt-Potthoff, K.: "Untersuchungen zur Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur *in situ*-Sulfatreduktion von geogen-schwefelhaltigen Bergbaurestseen des Lausitzer Braunkohlenreviers (Projekt FKZ 02 WB9592/6)" Zwischenbericht für FZK Karlsruhe GmbH - Projektträger PtWT (53 Seiten)
- 4 Klapper, H.; Friese, K.; Herzprung, P.; Koschorreck, M.; Kuehn, B.; Lorke, A.; Packroff, G.; Scharf, B.; Wendt-Potthoff, K.: "Untersuchungen zur Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur *in situ*-Sulfatreduktion von geogen-schwefelsauren Bergbaurestseen des Lausitzer Braunkohlereviers (BMBF-Forschungsvorhaben 02 WB 9592/6)" Teil I: Abschlußbericht September 1999 für FZK Karlsruhe GmbH - Projektträger PtWT (180 Seiten)

## 2 Teilprojekt 2

### GRUNDLAGEN ZUR MIKROBIOLOGISCH-BIOTECHNISCHEN *IN SITU*-SANIERUNG EINES MIT CHLORORGANIKA KONTAMINIERTEN GRUNDWASSERLEITERS IM RAUM BITTERFELD

W. BABEL

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie,  
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

#### Zusammenfassung des Bearbeitungsstandes

Das Ziel dieses Teilprojektes ist im Titel formuliert. Der Untersuchungsgegenstand ist ebenfalls benannt; es handelt sich um Grundwasser, das vor allem mit Monochlorbenzenen, gefolgt von 1,2- und 1,4-Dichlorbenzenen kontaminiert ist.

Weil Schadensherd und -dimension nicht lokalisierbar bzw. auszumachen sind, erscheint eine *in situ*-Sanierung angezeigt. Die Spezifik dieses Vorhabens ergibt sich aus den abiotischen Bedingungen. Sie sind gekennzeichnet durch Anaerobiose und geringe Konzentrationen an anorganischem Phosphat und DOC. Nitrat als möglicher Elektronenakzeptor ist ebenfalls kaum verfügbar, wohl Sulfat, so daß der Abbau der in Rede stehenden Problemstoffe, wenn er *in situ* stattfinden sollte, im wesentlichen vom Desulfurikanten katalysiert wird. Ob Chlorbenzene produktiv unter Zuhilfenahme von Nitrat oder Sulfat abgebaut werden können, ist nicht bekannt. Gleichgültig, ob die aktuellen Bedingungen mikrobielles Leben überhaupt zulassen, sie schränken auf jeden Fall Wachstum und Vermehrung sowie Besiedlungsdichte erheblich ein. Wenn die Besiedlungsdichte als Maß für biokatalytisches Potential genommen wird, dann dürfte letzteres auch nur gering sein. Dies galt es zu untersuchen. Ausgehend von detaillierten Kenntnissen über die Lebensbedingungen im Grundwasserleiter konzentrierten sich die experimentellen Arbeiten daher auf

1. die Analyse der Mikrobiologie dieses Ökosystems sowie des Leistungspotentials der autochthonen Bakteriozönose sowie von Isolaten
2. das Sorptions- und Desorptionsverhalten chlororganischer Verbindungen, d. h. Interaktionen der in Rede stehenden Schadstoffe mit abiotischen Modell-Matrizes.

Die Resultate sind in drei Berichten ausführlich dargestellt. Sie lassen sich wie folgt zusammenfassen

1. Obwohl die Lebensbedingungen in bezug sowohl auf die Verfügbarkeit an Kohlenstoff und Stickstoff als auch auf die chemodynamische, chemoorgano-heterotrophe Generierung von "biologischer" Energie eher famine zu nennen sind, werden im Ökosystem Bakterien gefunden, die wahrscheinlich - angesichts des sehr geringen DOC-Gehaltes - Chlorbenzene als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (können).
2. Aus Sediment- und Grundwasserproben wurden vier Reinkulturen isoliert, die Monochlorbenzene aerob assimilieren. Drei Isolate gehören zweifelsfrei zur Gattung *Rhodococcus*, das 4. Isolat konnte noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Denitrifizierende Reinkulturen mit MCB-Abbaupotential konnten bisher nicht isoliert werden. Analysen mit molekularbiologischen Methoden weisen auf *Hydrogenophaga palleronii*, *Pseudomonas stutzeri*, *Lactosphaera pasteurii* und *Agrobacterium tumefaciens* hin. MCB, 1,2- und 1,4-DCB scheinen auch von sulfatreduzierenden Bakterien verwertbar zu sein.
3. Unter aeroben Bedingungen, im Experiment erzeugt, findet - erwartungsgemäß - bakteriell vermittelter Abbau statt.
4. Durch Hinzufügen von Nitrat wird der Abbau von Monochlorbenzenen, das nach unserem bisherigen Kenntnisstand anaerob nicht aktiviert wird und metabolisierbar ist, stimuliert. Hier gilt es, die bisherigen Meßergebnisse unwiderruflich zu sichern und den Biochemismus aufzuklären. Zu klären ist auch, auf welchem Wege sulfatreduzierende Bakterien Chlorbenzene als Kohlenstoff-



und Energiequelle erschliessen, ob der Abbau produktiv oder co-metabolisch erfolgt.

Die im Projektantrag für das erste Bearbeitungsjahr gestellten Aufgaben wurden erfolgreich bearbeitet, so daß antragsgemäß die Arbeiten fortgesetzt werden können. Was angesichts des erreichten Standes wichtig erscheint, ist, noch stärker als bisher, die einzelnen Schritte und die von den Zentren UFZ, FZJ und GBF zu vollbringenden Leistungen inklusive Wahl der Modelle und der Methoden abzustimmen, so daß der integrale und synergistische Effekt, der durch das Zusammenführen von Experten unterschiedlicher wissenschaftlicher Kompetenz (UFZ, FZJ und GBF) beabsichtigt ist, wirklich entsteht.

## 2.1 Analyse der autochthonen Biozönose in bezug auf ökophysiologische Gruppen

L. WÜNSCHE, H. LORBEER, C. VOGT, B. HARD

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie,  
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

### Mikrobielle Besiedlungsdichte chlororganisch kontaminierter Aquifere im Raum Bitterfeld

Die Region Bitterfeld (Bundesland Sachsen-Anhalt) war über Jahrzehnte ein Zentrum der chemischen Industrie und des Braunkohlenbergbaus. Durch direkten, unkontrollierten Eintrag unterschiedlicher End-, Zwischen- und Abprodukte in die Böden, besonders aber über die Deponierung riesiger Mengen von Ab- und Nebenprodukten in ausgekohlten Braunkohletagebauen in Verbindung mit sich drastisch ändernden hydrogeologischen Verhältnissen (Anstieg des Grundwasserspiegels) sind die Grundwässer in dieser Region großflächig, besonders mit chlororganischen Substanzen belastet. Nach aktuellen Schätzungen (Peter et al. 1995) sind über 200 Millionen m<sup>3</sup> Grundwasser, verteilt über ein Gebiet von mehr als 25 km<sup>2</sup>, hochgradig kontaminiert und müssen als eigenständiger Schadensherd betrachtet werden. Vor diesem Hintergrund wurde das SAFIRA-Konzept (**S**anierungsforschung **i**n **r**eional kontaminierten **A**quiferen) entwickelt: Am Beispiel der Region Bitterfeld sollen biotische und abiotische Verfahrensvarianten einer *in situ*-Sanierung regional kontaminierter Grundwässer erarbeitet und großtechnisch erprobt werden. Der ausgewählte Modellstandort liegt an der südöstlichen Peripherie des Stadtgebietes Bitterfeld im Grundwasserabstrom der Chemie AG (Weiß et al. 1997).

Am Modellstandort reicht das Grundwasser bis zum in ca. 50 m Tiefe liegenden Rupelton (regionaler Aquitard). Die grundwasserführenden Sand- und Kiesschichten werden durch ein in ca. 22-28 m liegendes, als lokaler Aquitard wirkendes Braunkohlenflöz in einen oberen (quartären) und unteren (tertiären) Aquifer geteilt (Weiß et al. 1998).

Analysen der mikrobiellen Besiedlungsdichten wurden am Standort der on-site- bzw. der Pilotanlage SAFIRA an Bohrkernen von Rammkernbohrungen bzw. an Grundwasser aus diesen Bohrungen vorgenommen. Die den quartären Aquifer überlagernden organismenreichen Bodenschichten (bis zu einer Bohrtiefe von 4 m) wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen.

Bis zur maximal untersuchten Bohrtiefe (ca. 50 m uGOK, direkt über dem regionalen Aquitard) wiesen die Aquifere relativ hohe bakterielle Besiedlungsdichten auf. Die Sedimente des quartären Aquifers enthielten bis zu  $10^6$  aerobe und  $10^4$  anaerobe Bakterien pro g Sedimenttrockensubstanz, bestimmt als koloniebildende Einheiten unter Standardbedingungen (Abb.1), die Grundwässer bis zu  $10^5$  Bakterienzellen/ml (bestimmt durch direkte Zählungen unter dem Lichtmikroskop). Im tertiären Aquifer wurden, im Vergleich zum quartären Aquifer und zu den braunkohleführenden Schichten, geringere bakterielle Besiedlungsdichten gemessen; eine kontinuierliche Abnahme mit der Bohrtiefe wurde jedoch nicht gefunden. Hefen und filamentöse Pilze spielen in den untersuchten Ökosystemen keine bzw. nur eine sehr untergeordnete Rolle. Lediglich in der obersten noch erfaßten Sedimentschicht (6 m uGOK) und im Braunkohlenflöz wurden maximal  $5 \times 10^2$  cfu/g Trockensubstanz nachgewiesen.

Da nur der quartäre Aquifer höhere Konzentrationen an Schadstoffen, besonders an Monochlorbenzen (MCB) enthält und aus technologisch-ökonomischer Sicht für eine *in situ*-Sanierung nach dem *funnel-and-gate*-Prinzip in Frage kommt, wurden die weiterführenden mikrobiologischen Untersuchungen nur an Proben aus dem quartären Aquifer durchgeführt. Aus mikrobiologischer Sicht ist der quartäre Bitterfelder Aquifer durch eine Kombination wachstumslimitierender abiotischer Milieufaktoren gekennzeichnet:

- Nichtverfügbarkeit von molekularem Sauerstoff und Nitrat als terminale Elektronenakzeptoren
- Verfügbarkeit von Sulfat, jedoch bei einem Redoxpotential zwischen 85 - 210 mV für Sulfatreduzierer als terminaler Elektronenakzeptor kaum verwertbar
- Außer Mono- und 1,4-Dichlorbenzen (1,4-DCB) sind potentielle C-Quellen nur in Spuren vorhanden. Der TOC im Grundwasser liegt bei 20-30 mg/l, rein rechnerisch macht der durchschnittliche MCB-Gehalt allein ca. 70% dieses

Wertes aus. Werden die Chlorbenzene durch Begasen mit Stickstoff aus dem Grundwasser ausgetrieben, verbleibt ein Rest-TOC von maximal 8 mg/l.

Vor diesem Hintergrund war die klare Dominanz aerober Bakterien in den autochthonen Bakteriozöosen des Grundwassers ( $10^5$  cfu/ml, Tab.1) und der Aquifersedimente ( $10^5$  bis maximal  $10^6$  cfu/g Trockensubstanz, Tab.1 und Abb.1) zunächst überraschend. Mit der üblichen Nachweismethode werden jedoch auch fakultativ anaerobe Bakterien erfaßt, die einen erheblichen Anteil (bis zu 90%) an Aquiferbakteriozöosen haben können (Hoos und Schweisfurth 1982). Mittels Replica-Technik konnte gezeigt werden, daß die Aerobierfraktion der Bakteriozönose des Bitterfelder quartären Aquifers denitrifizierende Bakterien enthält. Mit der MPN-Technik konnte jedoch nur eine geringe Abundanz der Denitrifizierer nachgewiesen werden. Sie lag mindestens eine, im Extremfall jedoch fast drei Größenordnungen unter der Gesamtbesiedlungsdichte mit aeroben/fakultativ anaeroben Bakterien (Tab. 1). Diese geringe Besiedlungsdichte korrespondiert mit dem Fehlen des Elektronenakzeptors Nitrat in diesem Habitat.

Angesichts des reichlichen Sulfatangebotes (700 - 860 mg/l Grundwasser) war die Besiedlungsdichte mit sulfatreduzierenden Bakterien relativ niedrig ( $8,0 \times 10^3$  cfu/ml Grundwasser bzw.  $1,1 - 1,6 \times 10^3$  cfu/g Sediment). Weder im Grundwasser noch im Sediment konnten Spuren der metabolischen Aktivität dieser Bakteriengruppe entdeckt werden (keine  $H_2S$ -Bildung, keine auffällige Schwarzfärbung aufgrund von Metallsulfiden). Aus jeder Grundwasser- und Sedimentprobe konnten jedoch Sulfatreduzierer angereichert und unter Laborbedingungen vermehrt werden. Limitierender Faktor am natürlichen Standort ist höchstwahrscheinlich das Redoxpotential im Grundwasser, das mit mit 85 - 210 mV weit vom Optimum dieser ökophysiologische Gruppe (- 250 bis -500 mV) entfernt ist.

Günstiger, aber ebenfalls nicht optimal, ist das *in situ*-Redoxpotential für eisenreduzierende Bakterien, die mit einer Besiedlungsdichte von  $2,4 - 6,7 \times 10^4$  nach den aeroben/fakultativ anaeroben Bakterien in der Aquiferbiozönose dominieren.

Generell erhebt sich für alle ökophysiologischen Gruppen die Frage nach der Kohlenstoffquelle, die eine insgesamt relativ hohe Bakteriendichte ermöglicht. Als

Wachstumssubstrate kommen praktisch nur Chlorbenzene in Frage, die zumindest von den autochthonen Aerobiern, Nitrat- und Sulfat atmern als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden konnten, wenn die entsprechenden Elektronenakzeptoren zur Verfügung gestellt bzw. optimale Wachstumsbedingungen eingestellt wurden (vgl. Abschnitt 1.2). Neben Chlorbenzenen kommen organische Verbindungen, die sich als Wachstumssubstrate eignen könnten, nur in Spuren vor.

Der anscheinende Widerspruch zwischen extrem wachstumslimitierenden abiotischen Milieufaktoren und der hohen bakteriellen Besiedlungsdichte resultiert aus der Tatsache, daß ein Aquifer als offenes System mit vielfältigen Verbindungen zu anderen Ökosystemen zu betrachten ist. Die gemessenen Werte für die Konzentrationen an Elektronenakzeptoren, Kohlenstoff und Energiequellen sowie an Bakterien stellen somit *steady state*-Konzentrationen in einem dynamischen, kontinuierlichen System dar.

#### **Bestimmung des Potentials der autochthonen Bakteriozönose des quartären Bitterfelder Aquifers zum Chlorbenzenabbau im Labormaßstab**

Im Rahmen eines breit angelegten Screeningprogrammes wurde nachgewiesen, daß autochthone Bakterien des Bitterfelder quartären Aquifers in der Lage sind, die im entsprechenden Grundwasser enthaltenen Chlorbenzene (MCB, 1,4- und 1,2-DCB) unter unterschiedlichen Bedingungen zu metabolisieren.

Unter aeroben Bedingungen wurden *in situ*-relevante Konzentrationen an Chlorbenzenen in relativ kurzer Zeit vollständig mineralisiert. Bei Verwendung von natürlichem Aquifermaterial ohne Voranreicherung als Inokulum und MCB-Anfangskonzentrationen bis zu 20 mg/l war diese Substanz nach 14 d Bebrütung bei Raumtemperatur nicht mehr nachweisbar (Abb. 2). Aus Sediment- und Grundwasserproben wurden vier Reinkulturen isoliert, die MCB als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können. Drei Stämme konnten zweifelsfrei der Gattung *Rhodococcus* (nach Gram-Verhalten, Morphologie, Fettsäurespektrum, GC-Gehalt, Zellwandzusammensetzung, Ribotyping), aber nur in einem Fall einer valid beschriebenen Art dieser Gattung (*R. fascians*) zugeordnet werden. Das vierte Isolat gehört wahrscheinlich ebenfalls zu *Rhodococcus*. Abbildung 3 zeigt

Wachstum und MCB-Abbau durch den Stamm *Rhodococcus spec. GW 3* in *fed batch*-Kultur. Nach Kultivierungszeiten von weniger als 48 Stunden wurden die zugesetzten MCB-Mengen (13 bzw. 9 mg/l) vollständig metabolisiert. Diese Ergebnisse wurden gesichert durch Experimente mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem MCB: Bei Verwendung von nativem Sediment als Inokulum wurden 68% der Radioaktivität des zugesetzten  $^{14}\text{C}$ -MCB im  $\text{CO}_2$ , 17% in der gebildeten Biomasse gefunden.

Unter strikt anaeroben Bedingungen (Verwendung von gasdicht verschlossenen Headspace-Röhrchen ohne überstehende Gasphase als Kulturgefäße; Entfernung von Luftsauerstoff aus den Medien durch Spülen mit  $\text{O}_2$ -freiem  $\text{N}_2$ , Einstellung eines optimalen Redoxpotentials mit Dithionit; Befüllung und Beimpfung sowie Kultivierung und Entnahme der Proben in einer Anaerobox mit analytisch nachgewiesener  $\text{O}_2$ -freier Atmosphäre) führte der Zusatz von Nitrat ebenfalls zu einer signifikanten Verringerung des MCB-Gehaltes der Kulturlösungen. Bei Verwendung von nativem Aquifersediment als Inokulat enthielten die Kultursuspensionen nach 28 d Bebrütungszeit ca. 50% des zu Beginn zugesetzten MCB (Abb. 2); in *fed batch*-Experimenten mit einer denitrifizierenden Anreicherungskultur waren zugesetzte MCB-Mengen zwischen 14 und 18 mg/l nach jeweils 10-32 d Bebrütungszeit in den Kultivierungsgefäßen nicht mehr nachweisbar (Abb. 4).

Der Mechanismus des MCB-Abbaus unter denitrifizierenden Bedingungen ist noch unklar und erfordert weitere intensive Untersuchungen. Unter anaeroben Bedingungen ist die reduktive Dehalogenierung höherchlorierter Benzene der einzige und intensiv untersuchte Biodegradationsprozeß, der beim MCB und/oder bei den drei Isomeren des DCB endet. MCB und DCB werden unter anaeroben Bedingungen als biologisch nicht abbaubar angesehen, die Ringöffnung soll molekularem Sauerstoff erfordern. Es gibt jedoch wenige Hinweise, daß MCB und DCB auch unter anaeroben Bedingungen metabolisiert werden könnten. Bei Untersuchungen an einem anaeroben Biofilmreaktor fanden Fathepure und Vogel (1991) 16% der Radioaktivität des eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -markierten MCB im gebildeten  $\text{CO}_2$ . Nach Liang et al. (1992) wird MCB durch methanogene Bakterien partiell in  $\text{CO}_2$  umgewandelt. Auf welchem Wege dies stattfinden soll, ist nicht geklärt. Nowak et al. (1996) berichteten, daß eine methanogene Mischkultur in der Lage war,

höherchlorierte Benzene in Gegenwart von Pyruvat und Methanol reduktiv über MCB zu Benzen zu dehalogenieren und anschließend in Methan und CO<sub>2</sub> umzuwandeln.

In unseren Versuchsansätzen wurden neben dem Abfall der Chlorbenzenkonzentrationen Nitratverbrauch und Nitritbildung nachgewiesen. Lückenlose Bilanzen konnten aber noch nicht aufgestellt werden. Der Einsatz von <sup>14</sup>C-MCB führte bisher vor allem aus methodischen Gründen nicht zu einer eindeutigen Klärung. Lediglich geringe Anteile (<1%) der eingesetzten Radioaktivität wurden nach 21 Tagen Bebrütung bei Raumtemperatur als <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> wiedergefunden. Da die Untersuchungen unter strengster Beachtung der Prinzipien der Anaerobtechnik (s.o.), durchgeführt wurden, ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auszuschließen, daß die Luft- bzw. O<sub>2</sub>-Mengen, die zum aeroben Umsatz der eingesetzten MCB-Konzentrationen erforderlich wären, unkontrolliert in die Versuchsansätze gelangt sein können. Es ist daher auch unwahrscheinlich, daß die von Wilson und Bauer (1997) für (unsubstituierte) Aromaten beschriebene Möglichkeit des Abbaus unter „gemischt“ mikroaerob/anaeroben Bedingungen (Ringspaltung mit Dioxygenasen, anschließende Mineralisierung der Spaltprodukte unter denitrifizierenden Bedingungen) auf den MCB-Abbau zutrifft. Immerhin wären selbst unter diesen Annahmen allein zur Ringspaltung an den vorgegebenen 14 -18 mg/l MCB 8-10 mg O<sub>2</sub>/l erforderlich, das entspricht etwa der Sättigungskonzentration für O<sub>2</sub> in den Nährmedien bei Raumtemperatur (≤ 9 mg O<sub>2</sub>/l).

Denitrifizierende Reinkulturen mit MCB-Abbaupotential konnten bisher noch nicht aus den Anreicherungskulturen isoliert werden, Analysen mit molekularbiologischen Methoden lieferten jedoch erste Anhaltspunkte über die taxonomische Diversität der denitrifizierenden Mischkulturen: Nach Extraktion und Reinigung der gesamten chromosomalen DNA aus der Mischkultur wurden die Gene der 16S rRNA mit den Universalprimern 27F und 1525R amplifiziert. Die Amplifikate wurden im TA-Cloning Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert. Vergleiche mit Sequenzen aus dem Ribosomal Database Project ergaben Ähnlichkeiten von 97,4 bis 99,9 zu 16S rRNA aus *Hydrogenophaga palleroni*, *Pseudomonas stutzeri*, *Lactosphaera pasteurii*, *Agrobacterium tumefaciens* und einem denitrifizierendem Fe-oxidierenden

Bakterium. *P. stutzeri* ist als alternativ denitrifizierende *Pseudomonas*-Spezies beschrieben. Einige Stämme von *A. tumefaciens* sind fähig zur anaeroben Respiration in Anwesenheit von Nitrat, einige Arten der Gattung *Hydrogenophaga* (*H. pseudoflava* und *H. taeniospiralis*) zeigen Nitratrespiration mit Denitrifikation.

Anreicherungskulturen sulfatreduzierender Bakterien aus dem Bitterfelder quartären Aquifer scheinen ebenfalls auf MCB, 1,2- und 1,4-DCB als einziger Kohlenstoffquelle wachsen zu können. Unter den oben beschriebenen strikt anaeroben Bedingungen und den Chlorbenzenen als einziger organischer Substanz im Medium (kein Zusatz von Hefeextrakt oder definierten Vitaminen) wurden die Anreicherungskulturen im Zeitraum von 18 Monaten durch regelmäßiges Überimpfen aktiv gehalten. Wachstum wurde anhand von Proteinmessungen verfolgt, Sulfatreduktion über Abnahme der Sulfatkonzentrationen und die Bildung von Eisensulfid gemessen. Bei kontinuierlicher Kultivierung unter anaeroben Bedingungen im Laborfermentor und Verfügbarkeit von Chlorbenzenen als einziger Kohlenstoffquelle wurden in der Gasphase  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{S}$  massenspektrometrisch nachgewiesen. Wie bei den Denitrifizierern gelang es auch bei den sulfatreduzierenden Bakterien bisher nicht, Reinkulturen mit Chlorbenzen-Abbaupotential zu isolieren.

#### **Quantifizierung der Schadstoffabbauleistungen der autochthonen Bakteriozönose unter *in situ*-nahen Bedingungen (*on site*-Pilotanlage)**

In der mobilen Testeinheit (*on site*-Anlage im kontaminierten Areal in Bitterfeld) sollten die im Labor gefundene Möglichkeit der anaeroben Eliminierung von Chloraromaten durch denitrifizierende autochthone Bakterien des quartären Bitterfelder Aquifers unter *in situ*-nahen Bedingungen im halbertechnischen Maßstab bestätigt und Kennziffern für Projektierung und Langzeitbetrieb einer *in situ*-Pilotanlage erarbeitet werden.

Die Untersuchungen wurden in Säule 3 der mobilen Testeinheit (nutzbare Länge 1m) durchgeführt. Abbildung 5 zeigt das technologische Schema der Säule. Die Säule wurde mit 7,8 l autochthonem Aquifermaterial aus 18-20 m Tiefe befüllt, aus dem Wassergehalt des Aquifermaterials (28%) ergab sich ein Arbeitsvolumen des Reaktors von 2,2 l (Bezugswert für die Berechnung von Verweilzeiten im Reaktor).



Das Originalgrundwasser aus dem quartären Aquifer durchströmte den Reaktor von unten nach oben mit variierbarer Zulauftrate. Nitratlösung (16 mM  $\text{KNO}_3$ ) wurde mit einer separaten Pumpe dem zuströmenden Grundwasser zudosiert. Der Anteil der Nitratlösung an der insgesamt dosierten flüssigen Phase betrug bis zu 20%, die im zulaufenden Grundwasser gemessenen Schadstoffkonzentrationen (Sektion Analytik des UFZ) wurden rechnerisch um diesen Faktor korrigiert. Um die der *in situ*-Situation entsprechenden anaeroben Verhältnisse im Reaktor und dessen Peripherie aufrechtzuerhalten, wurden jeder Luftkontakt des Grundwassers bei Förderung, Deponierung und Dosierung vermieden, das Vorratsgefäß mit der ( $\text{O}_2$ -frei gespülten) Nitratlösung mit einer  $\text{N}_2$ -Phase zum Ausgleich der dosierten Flüssigkeitsmenge versehen und die über Schnellkupplungen austauschbaren Probenahmegefäße mit  $\text{N}_2$  gefüllt.

Die gesamte Versuchszeit betrug 300 d (April 1998 bis März 1999) und war in 5 Phasen unterteilt:

- Phase I (83 d): Referenzphase ohne Nitratdosierung, Verweilzeit 4 d
- Phase II (107 d): Versuchsbetrieb mit Nitratdosierung, Verweilzeit 4 d
- Phase III (42 d): Kontrollphase; Überbrückung des Reaktors durch eine Bypass-Schaltung, keine Nitratdosierung
- Phase IV (50 d) Versuchsbetrieb mit Nitratdosierung, Verweilzeit 12 d
- Phase V (18 d): Versuchsbetrieb mit Nitratdosierung, Verweilzeit 6 d

Die Phasen schließen jeweils Übergangsstadien bis zur Einstellung stabiler Prozeßzustände ein.

Die Ergebnisse zum Chloraromatenabbau in der *on site*-Anlage sind in den Abbildungen 6 und 7 zusammengestellt. 1,2-DCB wurde wegen seiner minimalen Konzentration im Grundwasser (0,03 bis 0,08 mg/l) nicht in diese Auswertung einbezogen.

Die kontinuierliche Dosierung der Nitratlösung (Phasen II, IV und V) führte zu einer signifikanten Verringerung des MCB- und 1,4-DCB-Gehaltes des Grundwassers. Die Verweilzeit beeinflusste deutlich die Abbauraten im Reaktor. Untersucht wurden drei Verweilzeiten (4, 6 und 12 d). Bei der höchsten Verweilzeit (12 d, Phase IV) wurden

Restkonzentrationen von ca. 1 mg/l MCB bzw. 0,01 mg/l 1,4-DCB gefunden, das entspricht Abbauraten (bezogen auf die Ausgangskonzentrationen im dosierten Gemisch aus Grundwasser und Nitratlösung) von durchschnittlich 95% für MCB und 91% für 1,4-DCB. In allen drei Versuchsphasen war die zugeführte Nitratmenge ausreichend für die Entwicklung der denitrifizierenden Bakterien unter den gegebenen Bedingungen: In Abhängigkeit von der Verweilzeit wurden Nitrat-Restkonzentrationen zwischen 60 und 250 mg/l gefunden, der Titer der denitrifizierenden Bakterien (und die Gesamtzellzahlen) im abfließenden Grundwasser stiegen durchschnittlich auf das 2-4fache der entsprechenden Werte im Zulauf. Nitrit wurde ebenfalls im Säulenablauf nachgewiesen (bis zu 10 mg/l). Eine exakte Stickstoffbilanz war aus technischen und methodischen Gründen nicht möglich (u.a. Dosierungsungenauigkeiten, Problem der Bestimmung von N<sub>2</sub>).

Versuchsphase I sollte Referenzdaten zu Veränderungen des Chlorbenzengehaltes im gesamten technischen System unter Versuchsbedingungen wie in Phasen II, IV und V, jedoch ohne Nitratdosierung, liefern. Es wurden Verluste von ca. 33% für MCB und sogar bis 62% des 1,4-DCB, bezogen auf die zugeführten Chlorbenzenmengen, gefunden. Diese Verluste machen rechnerisch mehr als 50% des bei Nitratdosierung und gleicher Verweilzeit gefundenen MCB- bzw. 1,4-DCB-Abbaus aus. Für diese unerwartet hohen Chlorbenzenverluste können mehrere Gründe in Frage kommen:

- Verluste der hochflüchtigen Chlorbenzene durch Diffusion durch oder in die in der Reaktorperipherie verwendeten Viton-Schläuche und/oder Entweichen durch Undichtigkeiten im gesamten System
- Aerobe/mikroaerophile Abbauprozesse durch Eindringen von Sauerstoffspuren durch undichte Stellen im System bzw. über Diffusion durch die Schlauchwandungen
- Anaerobe Abbauprozesse mit anderen Elektronenakzeptoren als Nitrat. Nicht völlig ausgeschlossen werden kann die Verfügbarkeit von Spuren von Nitrat (unter der Nachweisgrenze der analytischen Routinemethode) im zudosierten Grundwasser.

Die Ursachen für das Verschwinden eines beträchtlichen Teils der Chlorbenzene konnten noch nicht befriedigend aufgeklärt werden. Auf eine Beteiligung biotischer

Prozesse an den Chlorbenzenverlusten in der Referenzphase deutet die Zunahme der Bakteriendichte (Zellzahl) nach Passage des Reaktors, besonders die überproportionale Vermehrung der (fakultativ aeroben) Denitrifizierer (um 1-2 Größenordnungen) hin. Nach den mit der O<sub>2</sub>-Elektrode im Reaktorzulauf gemessenen Konzentration an gelöstem Sauerstoff (0% der Sättigungskonzentration) und dem Redoxpotential < 160 mV ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Sauerstoffmengen mit dem Grundwasserstrom in den Reaktor gelangen, die zum aeroben Umsatz der als Verlust ausgewiesenen Chlorbenzene erforderlich wären. Um den Einfluß abiotischer Prozesse in der Peripherie des Reaktors abzuschätzen, wurde die Säule durch eine Bypass-Schaltung überbrückt (Versuchsphase III). Die Chlorbenzenverluste gingen deutlich zurück, betragen aber immer noch ca. 15% bzw. 33% des zugeführten MCB bzw. 1,4-DCB. Das spricht dafür, daß zumindest ein Teil der Chlorbenzenverluste in der Referenzphase auf abiotische, nichtkatalytische Ursachen (Diffusionsprozesse) zurückgeführt werden kann. Diese Annahme wird gestützt durch den Befund, daß sich die Zelldichten im Grundwasser während der Bypass-Passagen nicht signifikant änderten. Erkannte Fehlerquellen, die zu abiotisch bedingten Verfälschungen der Ergebnisse führen können, wurden bei der Konzipierung der Pilotanlage ausgeschlossen.

## Literatur

Fathpure, B.Z. and T.M. Vogel (1991) Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3418-3422.

Hoos, E. und Schweisfurth, R. (1982) Untersuchungen über die Verteilung von Bakterien von 10 bis 90 m unter Bodenoberkante. In: *Jahrbuch vom Wasser* 58, 103-112, Verlag Chemie Weinheim Bergstraße.

Liang, L-N., Edwards, E A., Wills, L.E., Grbic-Galic, D. and M.Reinhard (1992) Anaerobic microbial transformation of aromatic hydrocarbons, chlorinated benzenes, and mixtures, and the relevance to bioreclamation of contaminated groundwater aquifers. U.S. Project EPA (Environmental Protection Agency) R-815252-01-0. Abstract of the final progress report for the period from 10/1/1988 to 9/30/1991.

Nowak, J., Kirsch, N.H., Hegemann, W. and H.-J. Stan (1996) Total reductive dechlorination of chlorobenzenes to benzene by a methanogenic mixed culture enriched from Saale river sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 700-709.

Peter, H., Großmann, J. and G. Schulz-Terfloth (1995) Rahmensenierungskonzept des Großprojektes Bitterfeld/Wolfen (remediation outline concept for the Bitterfeld/Wolfen region). In: Lühr, H.-P. (ed.) *Grundwassersanierung 1995*. IWS Schriftenreihe 23, 123-128; Erich Schmidt-Verlag Berlin, Germany.

Weiß, H., Daus, B., Fritz, P., Kopinke, F.-D., Popp, P. and Wünsche L. (1998) In situ groundwater remediation research in the Bitterfeld region in Eastern Germany (SAFIRA). In: Herbert, M. and K. Kovar (eds.): *Groundwater quality. Remediation and protection* (proceedings of the GQ '98 Conference held at Tübingen, Germany, September 1998).

IAHS Publication 250, 443-450.

Weiß, H., Teutsch, G. and B. Daus (eds.) (1997) *Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA)*. UFZ-Bericht 27/1997.

Wilson L.P. and Bouwer, E.J. (1997) Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J.Industrial Microbiol. Biotechnol.* **18**, 116-130.

## 2.2 Bestimmung des Leistungspotentials der autochthonen Bakteriozönose für den Abbau von Chloraromaten in kontaminiertem Grundwasser

J. DERMIETZEL\*, A. VIETH\*, K. SEIFERT\*\*

\* UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale

\*\* Universität Leipzig-Fakultät für Biowissenschaften, Interdisziplinäre Isotopenforschung, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

### Einleitung

Der mikrobielle Abbau von Chlorbenzenen mit Rein- und Mischkulturen ist seit den achtziger Jahren sowohl unter aeroben [1, 2] als auch unter anaeroben [3, 4, 5] Bedingungen untersucht worden. Voraussetzung für die vollständige Mineralisierung von Chloraromaten ist die Spaltung der C-Cl-Bindung(en). Nach gegenwärtigem Kenntnisstand über den Reaktionsmechanismus [8] erfolgt die Dechlorierung in Gegenwart von Sauerstoff **nach** der Spaltung des aromatischen Ringes. Mit steigendem Chlorierungsgrad steigt die Stabilität des  $\pi$ -Elektronensystems gegen oxidativen Abbau. Dagegen werden reduktive enzymatische Angriffe durch anaerobe Mikroorganismen zunehmend begünstigt. Beim anaeroben Abbau von Chloraromaten findet eine schrittweise reduktive Dechlorierung statt, die beim Monochlorbenzen endet [9].

Folgerichtig sollte für ein kontaminiertes Wasser, das ein Gemisch aus höher und niedrig chlorierten Benzenen enthält, eine zweistufige Behandlung mit anaerober Dechlorierung und einer nachgeschalteten aeroben Stufe zum Abbau der niedrig chlorierten Benzene das Verfahren der Wahl sein.

Die praktische Umsetzung dieses Verfahrensprinzips in Wirbelschichtreaktoren ist sowohl mit Modellwässern [6] als auch mit real kontaminiertem Grundwasser [7] erfolgreich demonstriert worden.

Mit den vorliegenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob diese Strategie auch auf die *in situ*-Sanierung des Bitterfelder Grundwassers übertragbar ist.

Erste Untersuchungen haben gezeigt, daß die Grundwässer bis  $10^5$  KBE pro Milliliter und die Sedimente bis zu  $10^6$  KBE pro Gramm Trockengewicht mit autochthonen Bakterien besiedelt sind [10]. Neben aeroben Bakterien dominieren denitrifizierende, eisen- sowie manganreduzierende Bakterien bei den ökophysiologischen Gruppen.

Das Konzentrationsverhältnis der Aromaten im quartären Grundwasser des Untersuchungsgebietes - viel Monochlorbenzen (MCB) neben wenig Dichlorbenzenen (DCB) und Benzen - legt den Schluß nahe, daß im Aquifer ein anaerober Abbauprozess stattfindet, der auf der Stufe des MCB einen vorläufigen Abschluß erreicht. Bei dieser Ausgangssituation sollte folglich die Stimulation des aeroben Abbaupotentials gute Erfolgsaussichten haben.

### **Versuchsdurchführung**

Die Untersuchungen zur aeroben Degradation der Schadstoffe im Bitterfelder Grundwasser, vorzugsweise von Chlorbenzen, erfolgte durch Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs BSB<sub>5</sub> bei 20°C mit dem Gerät OxiTop Control der Firma WTW. Dabei wird der Sauerstoffverbrauch einer Wasserprobe mit einem Volumen von 365 oder 432 ml respirometrisch ermittelt und in Zeitabständen von einer Stunde gespeichert. Auf diese Weise kann die Kinetik der sauerstoffverbrauchenden Prozesse verfolgt werden. In geeigneten Zeitabständen wurden die Konzentrationen der organischen Kontaminanten durch Probenahme aus den BSB-Flaschen ermittelt. Nach dem Abklingen der Sauerstoffverbrauchskurve wurde den Proben erneut Chlorbenzen in definierter Menge zugefügt und Sauerstoffverbrauch sowie Konzentrationsänderungen verfolgt.

Schließlich wurde die Vollständigkeit des Abbaus von Chlorbenzen und 1,4-Dichlorbenzen durch Ermittlung von Kohlenstoff- und Chlorbilanzen überprüft. Nähere experimentelle Angaben dazu sind den entsprechenden Abschnitten zu entnehmen.

Zur Verifizierung der Laborergebnisse unter naturnahen Bedingungen stand die Säule 5 des mobilen Reaktors auf dem SAFIRA-Versuchsgelände zur Verfügung. Die Säule wurde mit erbohrten Sedimenten aus dem quartären Bitterfelder Grundwasserleiter gefüllt und mit Grundwasser aus der Meßstelle Saf Bit 7/97 durchströmt.

Die Säule wurde in der ersten Phase bis Ende 1998 als Referenzversuch betrieben, um eventuelle Veränderungen der Grundwasserqualität bei der Passage von einem Meter Sediment bei einer realitätsnahen Flußrate zu beobachten. Es wurde von der Annahme ausgegangen, daß autochthone Bakterien mit dem Grundwasser in die Säule transportiert werden und sich auf den Sedimenten ansiedeln, so daß in der auf 14°C thermostatierten Säule ähnliche Bedingungen wie im realen Aquifer herrschen. Der Versuch diente damit gleichzeitig zur Absicherung der Ergebnisse aus parallel laufenden Reaktoren.

Nach Abschluß des Referenzversuches wurden mit der gleichen Säulenfüllung Versuche zum aeroben Abbau von Chloraromaten durchgeführt. Zur Herstellung von aeroben Bedingungen wurde in den Grundwasserzustrom mit Hilfe eines zweiten Dispensors Luft dosiert und das Wasser/Luft-Gemisch ohne weitere Vorbehandlung dem Säuleneinlaß zugeführt.

Probenahmen zur Bestimmung der Zulauf- und Ablaufkonzentrationen des Grundwassers erfolgten in regelmäßigen Abständen wöchentlich. Während der aeroben Fahrweise wurden zusätzlich Analysenproben aus den seitlichen Ventilen entnommen, um das vertikale Konzentrationsprofil innerhalb der Säule zu erfassen.

## **Ergebnisse**

### *BSB-Versuche mit Grundwasser aus unterschiedlichen Pegeln*

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf den Chloraromaten-Abbaus im quartären Grundwasserleiter. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Abbaupotential an der jeweiligen Meßstelle und deren Vorbelastung besteht. Im Ergebnis dieser Versuchsreihe mit Grundwasser-

proben aus zehn Meßstellen wurde festgestellt, daß in allen mit Chloraromaten belasteten Meßstellen mit Ausnahme der GWM 19/91 ein mikrobiologisches Abbaupotential für Chlorbenzenen vorhanden ist.

Im Randbereich der Schadstoff-Fahne mit MCB-Konzentrationen nahe oder unterhalb der Nachweisgrenze (0,002 mg/l) ergab sich ein differenziertes Bild. In den Meßstellen Saf Bit 21/97 und 25/98 setzte nach Zugabe von MCB (30 mg/l) keine relevante Sauerstoffzehrung ein, während mit Wasserproben der ebenfalls kaum belasteten Meßstellen Saf Bit 18/97 und 26/98 der zum Abbau einer MCB-Konzentration von 30 mg/l erforderliche Sauerstoffverbrauch erreicht oder übertroffen wurde. Die Ergebnisse können als Hinweis darauf verstanden werden, daß ein Abbaupotential für Chloraromaten nicht *a priori* vorhanden ist, sondern sich in der autochthonen Bakteriozönose erst unter dem Anpassungsdruck einer längeren Belastung entwickelt. Diese Anpassung könnte durch Austausch und Neukombination von Genen unterschiedlicher Mikroorganismen erfolgen, wie das aus neuen Ergebnissen genetischer Analysen abgeleitet wird [11,12].

#### *Kohlenstoffbilanz des Chloraromaten-Abbaus*

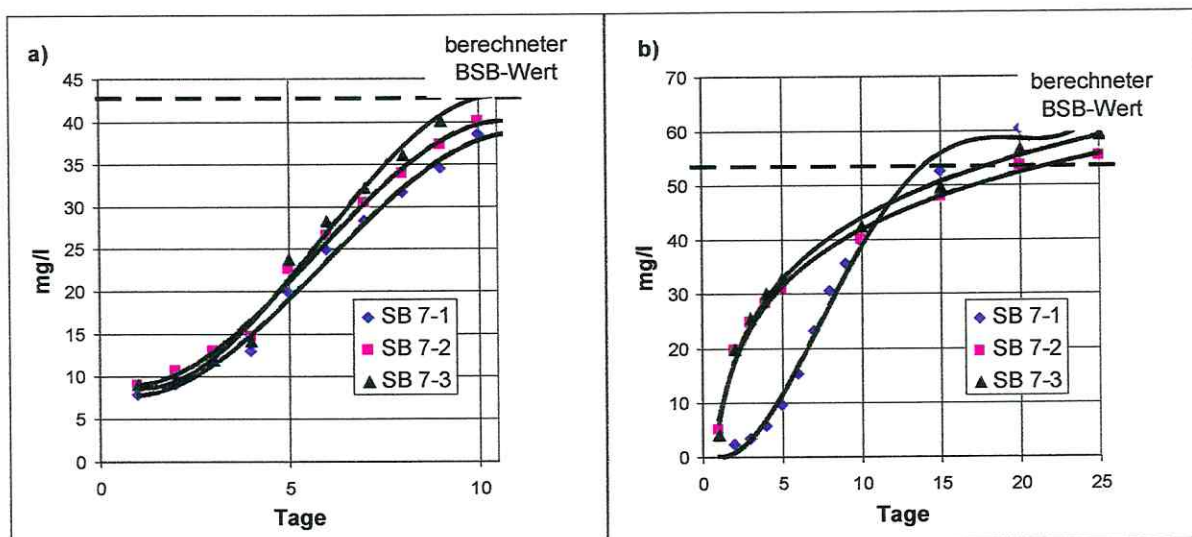
Das Verschwinden von Schadstoffen innerhalb eines Betrachtungsraumes ist eine notwendige, aber keinesfalls hinreichende Bedingung für ihren Abbau. Die vollständige Umwandlung zu mineralischen Endprodukten kann nur durch den Nachweis dieser Reaktionsprodukte bewiesen werden.

Mit Hilfe von Isotopen-Tracermethoden ist es möglich, die Reaktionswege von Einzelstoffen in einem Vielstoffgemisch aufzuklären. Als Tracer zur Ermittlung der Kohlenstoffbilanz beim aeroben Abbau von Chloraromaten diente <sup>14</sup>C-Chlorbenzenen (uniform markiert). Die Durchführung der Tracerversuche und der Aktivitätsmessungen erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie - Interdisziplinäre Isotopenforschung. Die pro Versuch eingesetzte Aktivität lag fast zwei Größenordnungen unter der zulässigen Freigrenze (für C-14: 500.000 Bq).



Die Tracerversuche erfolgten mit Grundwasser aus der Meßstelle Saf Bit 7/97, das vor Ort in sterilisierte Flaschen abgefüllt wurde. Damit wurden BSB5-Versuchsreihen bei 20°C mit je 365 ml Wasser in zwei bis vier parallelen Ansätzen pro Pegel durchgeführt. Es wurde der Sauerstoffverbrauch respirometrisch bestimmt und im 5-Tage-Rhythmus Analysen-Proben, die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Wasser und in dem absorbierten Kohlendioxid mittels Flüssigszintillationstechnik (LSC) gemessen. Am Versuchsende erfolgte eine vollständige Bilanzierung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung in den Kompartimenten Wasser, Kohlendioxid und Biomasse.

Abbildung 1 zeigt die Sauerstoffverbrauchskinetik für die original belastete Probe (a: 23 mg/l Chlorbenzen + 0,3 mg/l Dichlorbenzene) und nach neuer Zugabe von Chlorbenzen (b: 30 mg/l). Es konnten 91% der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität wiedergefunden werden, davon 68% im  $\text{CO}_2$ , 16% in der Lösung und 7% im Bioschlamm. Bei dem in Lösung befindlichen Anteil handelt es sich nicht um die Ausgangssubstanz.



**Abb. 1:** Sauerstoffverbrauch der Originalprobe (a) und nach Zugabe von Chlorbenzen mit einer Anfangskonzentration von 30 mg/l (b)

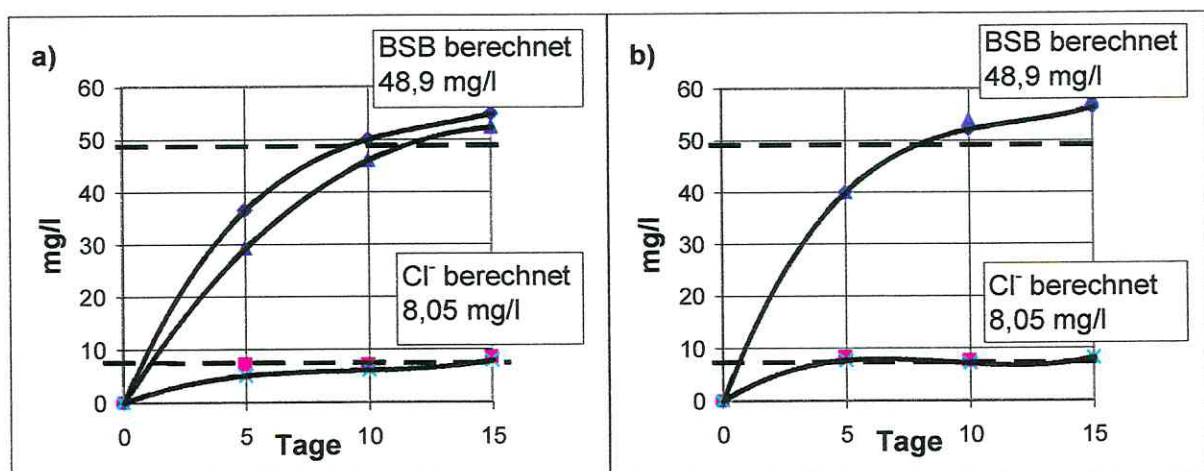
Ein weiterer Tracerversuch mit dem Grundwasser der Meßstelle Saf Bit 7/97 und  $^{14}\text{C}$ -markiertem 1,4-DCB als Tracer führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Es wurden 66,4% der eingesetzten Aktivität am  $\text{CO}_2$ -Fänger NaOH gebunden und 6

bzw. 2% als Metabolite im Wasser bzw. in der Biomasse wiedergefunden. Wegen der längeren Versuchszeit betrug die Wiederfindungsrate bei diesem Versuch nur 74%.

Aus Sicht der Kohlenstoffbilanz ist damit der experimentelle Nachweis für eine aerobe Degradation von Chlorbenzenen durch die im Grundwasser vorhandenen autochthonen Mikroorganismen erbracht worden.

#### *Chlorbilanz des Chlorbenzen-Abbaus*

Wegen des hohen Chlorid-Gehaltes im Grundwasser des Pegels Saf Bit 7 ist der analytische Nachweis der Chloridneubildung aus Chlorbenzen ungenau. Beim vollständigen Abbau von Chlorbenzen mit einer Konzentration von 30 mg/l liegt die theoretische Konzentrationszunahme nur in der Größenordnung von 2% des natürlichen Chloridgehaltes (450 - 470 mg/l). Deshalb erfolgte eine Absenkung des originären Chloridgehaltes auf weniger als ein Fünftel durch Verdünnung der Proben. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der BSB-Messungen und der Konzentrationserhöhung von Chlorid über drei Meßperioden.



**Abb. 2:** BSB (obere Kurve) und Chloridbildung (untere Kurve) mit Grundwasser Saf Bit 7/97 nach Zugabe von Chlorbenzen (25,5 mg/l)  
a) nach Verdünnung mit destilliertem Wasser  
b) nach Verdünnung mit Nährsalzlösung

Bei vollständigem Abbau des Chlorbenzens wäre ein BSB von 48,9 mg/l und eine Chlorid-Neubildung von 8,05 mg/l zu erwarten.

In beiden Fällen erreicht die Chloridbildung schon nach fünf Tagen den theoretischen Wert, während der Sauerstoffverbrauch erst nach mehr als 15 Tagen abgeschlossen ist. Das steht in Übereinstimmung mit den einleitend zitierten reaktionsmechanistischen Vorstellungen zur oxidativen Dehalogenierung von Chloraromaten, nach denen die Dechlorierung in einem frühen Stadium des Abbaus, als erster Schritt nach der Ringspaltung stattfindet.

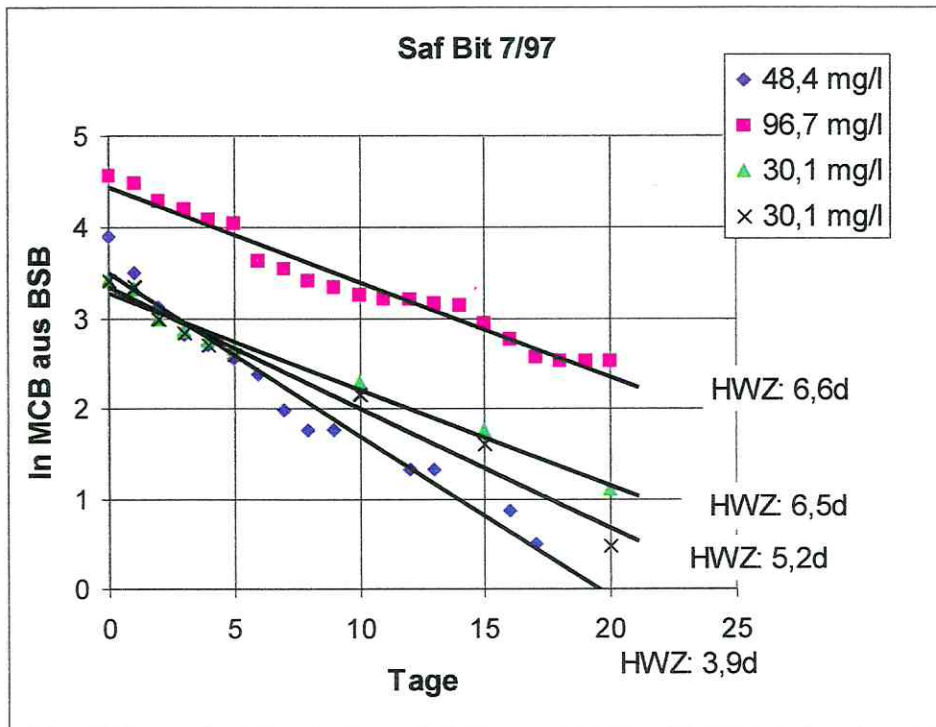
Es ist bemerkenswert, daß der Chlorbenzenabbau selbst nach einer Verdünnung der Originalprobe um den Faktor 5 (siehe Abb. 2a) nicht wesentlich langsamer abläuft als nach Zugabe von Nährsalzlösung (2b). Demnach ist die Degradation nicht durch den Mangel an essentiellen Elementen limitiert.

Analoge Versuche mit 1,4-DCB (6 mg/l) führten ebenfalls zu der erwarteten Chloridfreisetzung, die allerdings erst nach zwei Versuchsperioden (14 Tage) abgeschlossen war. Der Zusatz einer leicht metabolisierbaren Kohlenstoffquelle verzögerte die Chlorabspaltung aus 1,4-DCB zusätzlich, weil offenbar das leicht abbaubare Substrat bevorzugt verwertet wurde.

#### *Kinetik des Chlorbenzenabbaus*

Durch den Nachweis der Metabolite des im MCB gebundenen Kohlenstoffs und Chlors ist der kausale Zusammenhang zwischen Sauerstoffzehrung (BSB) und MCB-Abbau eindeutig nachgewiesen worden. Daher ist der Zeitverlauf der BSB-Werte als Kinetik des MCB-Abbaus interpretierbar, wenn man von der begründeten Annahme ausgeht, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der MCB-Abbausequenz Sauerstoff verbraucht wird. Die Umrechnung erfolgt mit Hilfe des stöchiometrischen Faktors: die Mineralisierung von 1 mg MCB benötigt 2 mg O<sub>2</sub>.

Aus dem zeitlichen Verlauf des Sauerstoffverbrauchs (Abb. 3) ist ableitbar, daß MCB in Konzentrationen zwischen 30 und 100 mg/l ohne Zusatz weiterer Hilfsstoffe bei 20°C nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 4 bis 7 Tagen abgebaut wird.



**Abb. 3:** Kinetik des aeroben Abbaus von MCB: Einfluß der Ausgangskonzentration

Für einen 'vollständigen' Abbau auf <1% der Ausgangskonzentration wären nach diesem Zeitgesetz sieben Halbwertszeiten, also 28 bis 49 Tage erforderlich. Versuche zum Temperatureinfluß haben gezeigt, daß die aktuelle Grundwassertemperatur von 14°C nur eine geringfügige Erniedrigung der Abbauraten bewirkt.

#### *Der Einfluß des Chlorierungsgrades auf den aeroben Chloraromatenabbau*

Der aerobe Abbau aromatischer Verbindungen erfordert die Ringspaltung durch enzymkatalysierten elektrophilen Angriff des Sauerstoffs. Dieser Schritt wird durch die elektronenziehende Wirkung elektronegativer Substituenten wie Chlor behindert. Mit steigendem Chlorierungsgrad ergibt sich eine herabgesetzte Elektronendichte am aromatischen Ring, die mit zunehmender Persistenz der Verbindung im aeroben Milieu einhergeht. Neben der Anzahl der Chlorsubstituenten spielt auch ihre Position eine Rolle. Je näher die Nachbarschaft, desto stärker wird der stabilisierende Effekt auf den aromatischen Ring.

Diese reaktionsmechanistischen Vorstellungen erklären den experimentellen Befund, daß es zwischen der Abbaubarkeit von MCB und 1,4-DCB nur geringfügige Unterschiede gibt. Die polarisierende Wirkung der beiden Chloratome in para-Stellung wird über den Ring verteilt und damit abgeschwächt.

Eine Ausweitung der Versuche auf 1,3-DCB, 1,2-DCB und 1,2,4-TCB zeigte dagegen, daß die autochthonen Mikroorganismen des Grundwassers der Meßstelle Saf Bit 7/97 diese Verbindungen nicht oder nur unvollständig verwerten können. Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Abbaureaktionen nahmen in dieser Reihenfolge ab. 1,2,4-Trichlorbenzen erwies sich innerhalb des Versuchszeitraumes als praktisch persistent.

#### *Versuchsergebnisse im mobilen Reaktor unter anaeroben Bedingungen*

Etwa sechs Wochen nach Beginn des Versuches hatten sich in der Säule stationäre Verhältnisse bezüglich der Schadstoffkonzentrationen eingestellt. Die Verringerung der Flußrate um den Faktor 3 im letzten Quartal 1998 hatte keine erkennbaren Auswirkungen. Die Zulaufkonzentrationen der Schadstoffe waren allerdings starken zeitlichen Schwankungen unterworfen (Abb. 4), so daß die Erkennung signifikanter Unterschiede zwischen den Zulauf- und Ablaufkonzentrationen erschwert war.

Die Trendlinien für die Quotienten der Ablauf-/Zulaufkonzentrationen von Benzen und Chlorbenzen zeigen einen weitgehend konstanten Verlauf und liegen

erwartungsgemäß nahe dem Wert 1 (bzw. 100%). Im Falle des 1,4-DCB stellte sich dagegen über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten zwischen Zulauf- und Ablaufkonzentrationen ein annähernd konstantes Verhältnis von 0,75 ein (Abb. 5).

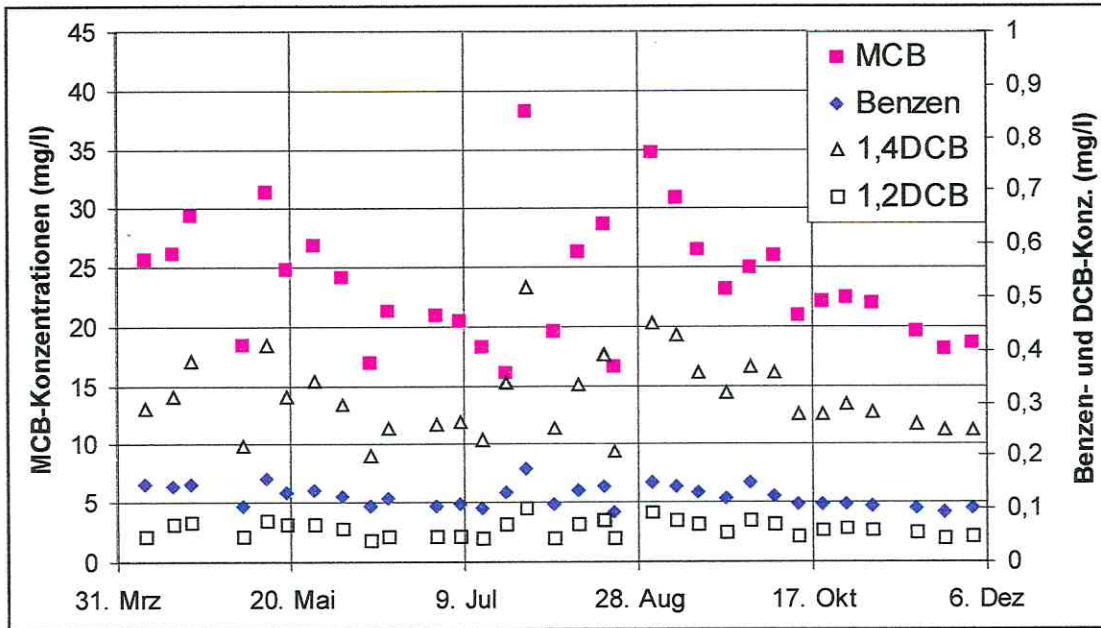


Abb. 4: Zeitverlauf der Zulaufkonzentrationen für Benzen, Monochlorbenzen und Dichlorbenzene

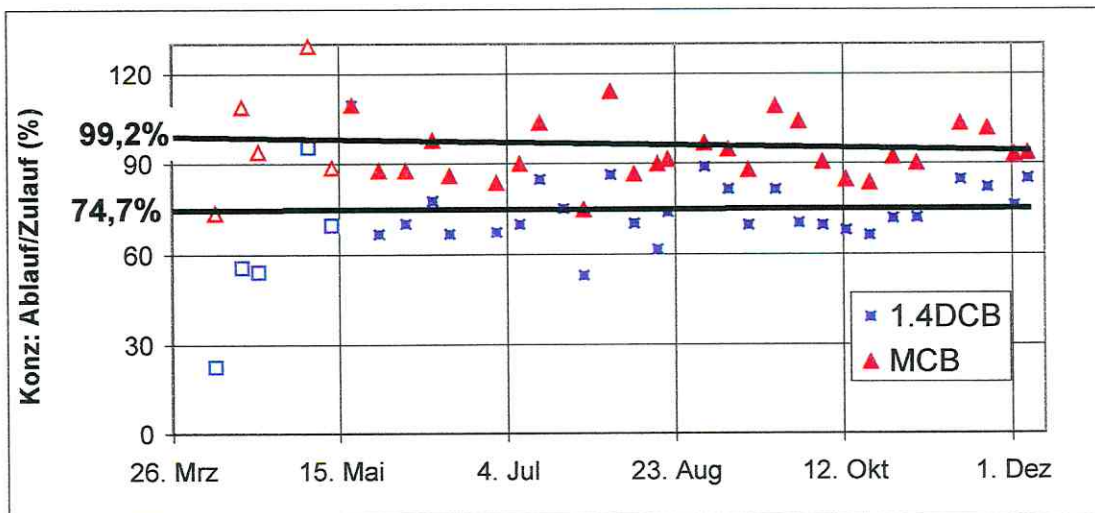


Abb. 5: Verhältnis Ablauf/Zulaufkonzentrationen für Monochlorbenzen und 1,4-Dichlorbenzen (Zulauf=100%)

Die aus unserer Sicht wahrscheinlichste Erklärung für die Abnahme der 1,4-DCB-Konzentration besteht darin, daß unter anaeroben Bedingungen im Aquifer eine Dechlorierung von Dichlorbenzenen zu Monochlorbenzen stattfindet.

Aus der Literatur ist bekannt, daß halogenierte Aromaten als terminale Elektronenakzeptoren dienen können, wenn verwertbare organische Moleküle als Wachstumssubstrat zur Verfügung stehen [13, 14]. Mit fallendem Chlorierungsgrad nimmt das Oxidationspotential polychlorierter Aromaten ab, so daß Monochlorbenzen als Endprodukt dieser Reaktionssequenz angesehen wird.

Im Bitterfelder Aquifer ist jedoch auffälligerweise Benzen in geringen Konzentrationen ein ständiger Begleiter des Chlorbenzens. Es ist daher nicht auszuschließen, daß es durch partielle Dechlorierung von Monochlorbenzen ständig nachgebildet wird. Der hohe Chloridgehalt des Grundwassers, für den es keine geogene Erklärung gibt, ist ein weiteres Indiz für mögliche Dechlorierungsreaktionen halogener organischer Moleküle.

Ob die postulierten Reaktionen wirklich ablaufen, kann nur durch zusätzliche Experimente entschieden werden, für die eine längere Säule erforderlich wäre.

#### *Versuchsergebnisse im mobilen Reaktor unter aeroben Bedingungen*

Wie im experimentellen Teil beschrieben, wurde Mitte Februar 1999 mit der Luftdosierung zur Herstellung aerober Bedingungen in der Säule begonnen. Um den Einfluß sauerstoffverbrauchender Konkurrenzreaktionen gering zu halten, wurde ein Volumenverhältnis Wasser/Luft=1:1, das entspricht etwa 200 ml gasförmiger Sauerstoff pro Liter Wasser, eingestellt. Nach zwei Wochen war die MCB-Konzentration im Säulenablauf auf = 0,1 mg/l und die aller übrigen Schadstoffe unter die Nachweisgrenze abgesunken. Dieser Betriebszustand wurde über acht Wochen beibehalten, ohne daß erkennbare Beeinträchtigungen des Fließregimes durch Verstopfung oder ähnliches auftraten. Das Überschußgas wurde allerdings nicht gleichmäßig, sondern schubweise mit dem Ablauf abgeführt. Nach Abstellen der Luftversorgung stellten sich wieder die ursprünglichen Konzentrationsverhältnisse im Ablaufwasser ein.

In weiteren Versuchsläufen wurde bei einem konstanten Wasser/Luft-Verhältnis (2:1) die Fließgeschwindigkeit variiert und neben den Zulauf- und Ablaufkonzentrationen, soweit möglich, das vertikale MCB-Konzentrationsprofil innerhalb der Säule gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 sowohl im linearen als auch im halblogarithmischen Maßstab dargestellt.

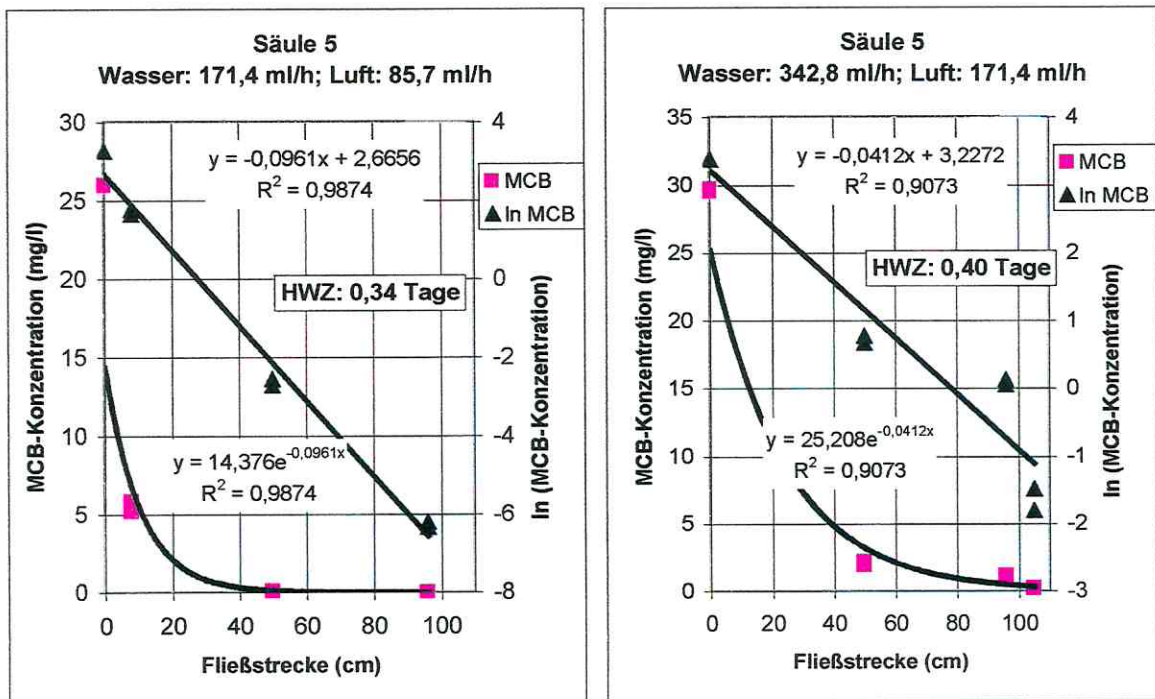


Abb. 6: Kinetik des aeroben MCB-Abbaus bei variiertem Fließgeschwindigkeit

Es ist erkennbar, daß sich das vertikale MCB-Konzentrationsprofil relativ gut durch eine Exponentialfunktion, bzw. im halblogarithmischen Maßstab durch eine Gerade anpassen läßt, das heißt, die Konzentrationsabnahme folgt, wie auch im Laborversuch, einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Da Porenvolumen und Fließgeschwindigkeit konstant sind, entspricht jeder Punkt der Fließstrecke einer definierten mittleren Verweilzeit. Daraus lassen sich Geschwindigkeitskonstante und Halbwertszeit (HWZ) der Reaktion abschätzen. Diese Parameter blieben bei einer Verdoppelung der Fließgeschwindigkeit praktisch konstant und lieferten damit die Bestätigung für die Richtigkeit des gefundenen Zeitgesetzes.



## Schlußfolgerungen

Die autochthone Biozönose des quartären Grundwasserleiters im Bitterfelder Untersuchungsgebiet enthält Spezialisten, die in der Lage sind, die dominierenden Schadstoffe Monochlorbenzen und 1,4-Dichlorbenzen aerob abzubauen.

Bei erneuter Zugabe von MCB (bis 100 mg/l) in das Grundwasser wird dieses als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle akzeptiert und nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit zwischen 4 und 7 Tagen quantitativ abgebaut. Der Verbleib des Kohlenstoffs konnte durch Isotopentracerexperimente nahezu vollständig aufgeklärt werden. Etwa zwei Drittel werden in Form von Kohlendioxid mineralisiert. Das organisch gebundene Chlor wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen im Rahmen der analytischen Fehlergrenze quantitativ als Chlorid wiedergefunden.

Der aerobe Abbau von 1,3- und 1,2- Dichlorbenzen ist bereits erschwert, während sich 1,2,4-Trichlorbenzen nahezu persistent verhält.

Die Ergebnisse des Referenzversuches im mobilen Reaktor entsprachen weitgehend den Erwartungen. Mit Ausnahme von 1,4-DCB wurden keine signifikanten Änderungen zwischen Zulauf- und Ablaufkonzentrationen beobachtet. Für 1,4-DCB konnte im Ablauf eine signifikante Konzentrationsabnahme nachgewiesen werden, die auf mikrobiologische Dechlorierungsreaktionen im Aquifermaterial schließen läßt.

Wie im Laborversuch genügte allein das Zudosieren von Luft in das belastete Grundwasser, um aerobe Abbaureaktionen zu stimulieren. Die Abnahme der MCB-Konzentration über die beobachtete Fließstrecke verläuft nach einem Zeitgesetz 1. Ordnung mit einer Halbwertszeit von etwa 0,4 Tagen. Das bedeutet, daß bereits auf einem Meter Fließstrecke nach der Luftinjektion bei realer Fließgeschwindigkeit (0,2 m/d) ein praktisch vollständiger Schadstoffabbau erreicht werden kann. Gegenüber den Laborversuchen wäre das eine Steigerung der Abbaurate um eine Größenordnung. Ein direkter Vergleich zwischen den kinetischen Daten aus Labor- und Säulenversuchen ist allerdings nicht zulässig, da im ersten Fall der Sauerstoffverbrauch und im zweiten Fall die MCB-Konzentrationsabnahme

gemessen wurden. Eine höhere Abbaurate in der Säule wäre aber durchaus plausibel, weil zwischen den auf den Sedimenten angesiedelten Bakterien und den im Porenwasser gelösten Schadstoffen ein intensiverer Stoffaustausch möglich ist als im freien Wasser.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Labor- und Säulenversuche im mobilen Reaktor zu konsistenten Ergebnissen führten. Diese lassen den Schluß zu, daß das aerobe Abbaupotential unter den realen Bedingungen im Aquifer praktisch nur durch den Mangel an Sauerstoff limitiert ist. Die Ergebnisse sind daher ermutigend für eine aerobe *in situ*-Sanierungsstrategie auf der Stufe des Chlorbenzens und (mit Einschränkungen) der Dichlorbenzene.

## Literatur

- [1] REINEKE, W. & KNACKMUSS, H.-J. (1984): Microbial metabolism of haloaromatics: isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium.-*Appl. Environ. Microbiol.* 47, 395-402
- [2] REINEKE, W. & KNACKMUSS, H. J. (1988): Microbial degradation of haloaromatics.-*Ann. Rev. Microbiol.* 42, 263-287.
- [3] MOHN, W. W. & TIEDJE, J. M. (1992): Microbial reductive dehalogenation.- *Microbiol. Rev.* 56, 482-507
- [4] RAMANAND, K., BALBA, M. T. & DUFFY, J. (1993): Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic conditions.- *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3266-3272
- [5] SAHM, H. (1986): Anaerobic degradation of halogenated aromatic compounds.- *Microbiol. Ecology* 12, 147-153
- [6] NOWAK, J., SCHÄFER, M., HEGEMANN, W., DILL, S., KIRSCH, N., STAN, H.J., KÄMPFER, P., DOTT, W., SOMMER, C., SPIEB, E. & GÖRISCH, H. (1993): Abbau chlorierter Benzole in Wirbelbettreaktoren unter Berücksichtigung der Populationszusammensetzung.- *gwf Wasser-Abwasser* 134, 379-385
- [7] MEIERLING, L. & HEGEMANN, W. (1997): Reinigung stark belasteter Grundwässer mit immobilisierten Mischkulturen im Wirbelschichtreaktor.- *Wasser & Boden* 49, 47-50
- [8] FRITSCH, W. (1998): *Umwelt-Mikrobiologie - Grundlagen und Anwendungen*, Gustav Fischer Verlag Jena, 1998, 85
- [9] HOLLIGER, C., SCHRAA, G., STAMS, A.J.M., & ZEHNDER, A.J.B. (1992): Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene.- *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1636-1644
- [10] WÜNSCHE, L., LORBEER, H., HARD, B, KRAUß, G., WENDTLAND, K. D., & FLACHOWSKY, J. (1997): Mikrobielle Besiedlungsdichten und Schadstoffabbaupotentiale autochthoner Bakterien belasteter Aquifere im Raum Bitterfeld. in Weiss, H., Teutsch,

- G. & Daus, B. (eds.): Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA). UFZ-Bericht Nr.27, 118-126
- [11] VAN DER MEER, J.R. (1997): Evolution of metabolic pathway for the degradation of chloroaromatic compounds.- *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 159-178
- [12] VAN DER MEER, J.R., WERLEN, C., NISHINO, S.F. & SPAIN, J.C. (1998): Evolution of pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater.- *Appl. Env. Microbiology* 64, 4185-4193
- [13] DEWEERD, K.A., MANDELCO, L., TANNER, R.S., WOESE, C.R. & SULFLITA, J.M. (1990): *Desulfomonile tiedjei* gen. Nov. And sp. Nov., a novel anaerobic sulfate-reducing bacterium.-*Arch. Microbiol.* 154, 23-30
- [14] SLATER, J., BULL, A.T. & HARDMAN, D.J. (1995): Microbial dehalogenation.- *Biodegradation* 6, 181-189

## 2.3 Sorptionsprozesse und biologischer Abbau von Chlororganika

B. WITTHUHN\*, E. KLUMPP\*, H.-D. NARRES\*,

P. KLAUTH\*\*, H. MARTINIUS\*\*, J. GROENEWEG\*\*

\* Institut für Angewandte Physikalische Chemie, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG7, 52425 Jülich

\*\* Institut für Biologie des Stoffaustauschs, Forschungszentrum Jülich, FZJ-ICG6, 52425 Jülich.

### Einleitung

Die biologische Verfügbarkeit von Schadstoffen wird durch physikalisch-chemische Wechselwirkungen mit Boden- oder Sedimentbestandteilen im Aquifer bestimmt.

Grundsätzliche Erkenntnisse über die Mechanismen, die beim Abbau sorbierter Schadstoffe entscheidend sind, führen einerseits zu einem detaillierteren Verständnis der gegenseitigen Beeinflussung physikochemischer und mikrobiologischer Prozesse, andererseits sind sie bei der Sanierung hochbelasteter Böden und Aquifere von Nutzen.

Diese Wechselbeziehungen und damit auch Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen werden anhand von Modellsystemen in Kooperation zwischen Mikrobiologen und Physikochemikern des FZJ untersucht.

Als abiotische Modellschadstoffe dienten Tonminerale, deren Oberfläche durch organische Moleküle (Kation-Tenside) hydrophobiert wurde. Die Experimente wurden zunächst mit 2,4-Dichlorphenol als Modellschadstoff und *Ralstonia eutropha* durchgeführt.

### Physikochemische Untersuchungen

Die Hydrophobierung der Tonmineraloberflächen wurde durch den vollständigen Austausch der mobilen Na-Ionen in Na-Montmorillonit (MM) durch Kation-Tenside erreicht. Es wurden drei quartäre Alkylammoniumverbindungen eingesetzt, die sich in Tensidkettenlänge bzw.-zahl unterscheiden:

Dodecyl-trimethylammonium(bromid) (C<sub>12</sub>)

Octadecyl-trimethylammonium(bromid) ( $C_{18}$ ),

Didodecyl-dimethylammonium(bromid) ( $2C_{12}$ ),

Bestimmt wurde die adsorbierte Menge Dichlorphenol und die Veränderung der Zwischenschichtabstände durch Dichlorphenol-Aufnahme. Die Kinetik der Sorptionsprozesse wird derzeit untersucht, des weiteren werden erste Studien zur Adsorption an Kohle durchgeführt.

Im Vergleich zum nicht modifizierten Tonmineral erhöhte sich die Adsorptionskapazität durch die Tensidbelegung drastisch. Bei sehr geringen Lösungskonzentrationen wurde eine lineare Abhängigkeit (bei  $C_{12}$ -MM) zwischen adsorbierter DCP-Menge und Gleichgewichtskonzentration gemessen.

Für einen Vergleich der Adsorptionseigenschaften der verschiedenen modifizierten Schichtsilikate müssen zwei Bereiche unterschieden werden: geringe Lösungskonzentrationen (bis 1,5 g/l bzw. ca. 30% d. max. Löslichkeit von DCP) und hohe Lösungskonzentrationen ( $c > 1,5$  g/l)

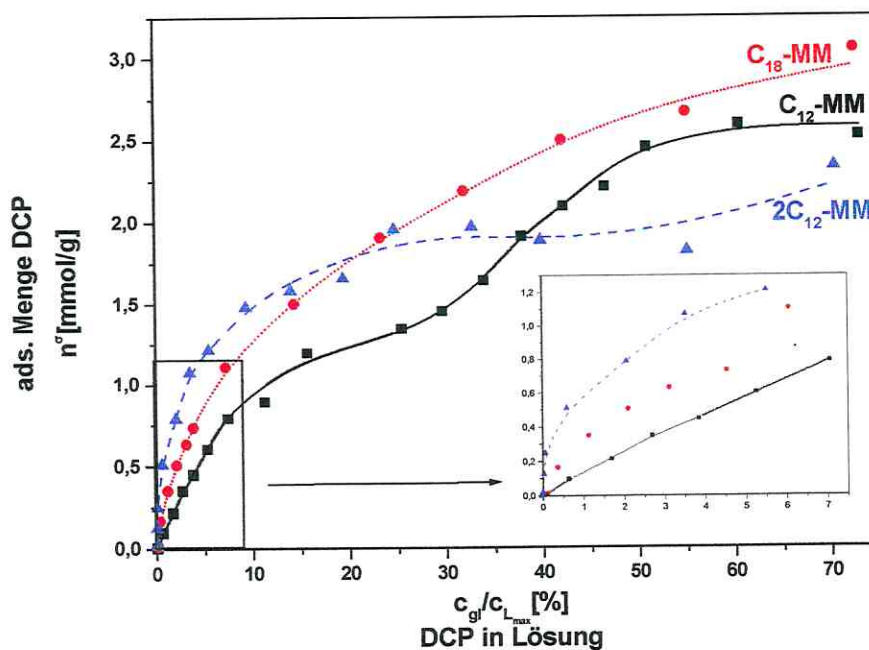


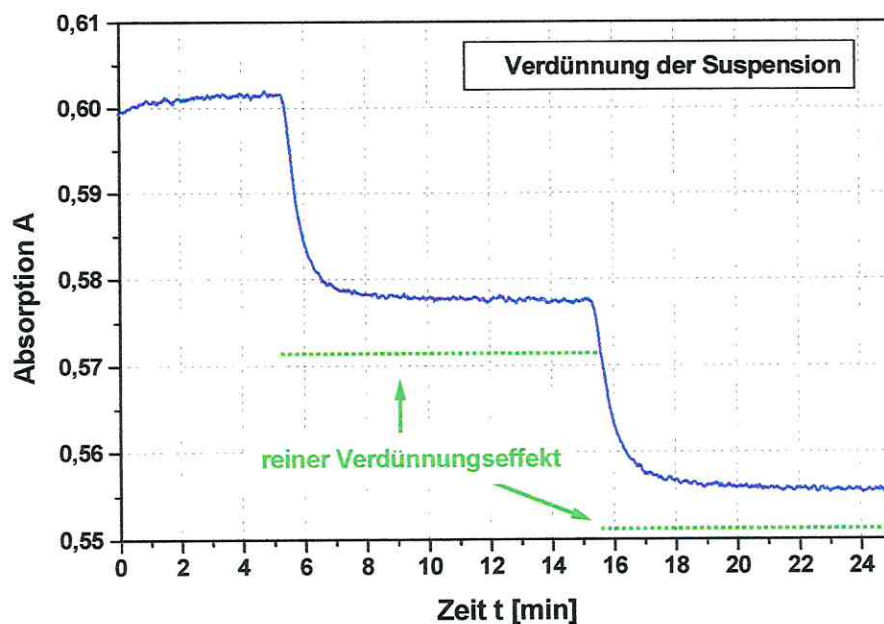
Abb.1: Adsorption von DCP an verschiedenen modifizierten Schichtsilikaten

Bei geringen Konzentrationen nahm die Adsorptionskapazität mit steigender Hydrophobizität der Oberfläche zu. (Zunahme der adsorbierten Menge DCP:  $C_{12} < C_{18} < 2C_{12}$ ). Höhere Konzentrationen führten dagegen zu einer Zunahme der adsorbierten Menge DCP gemäß:  $2C_{12} < C_{12} < C_{18}$ .

Die Desorption wurde durch Verdünnung einer vorgelegten DCP/Tonmineralsuspension bestimmt. Auch nach vier Wochen Adsorptionszeit verläuft die Desorption vollständig reversibel.

Die Betrachtung der Veränderung des Schichtabstandes bezogen auf die adsorbierte Menge DCP zeigte eine Aufweitung der Zwischenschichten durch die DCP-Aufnahme, d.h. Dichlorphenol interkaliert. Während die Zwischenschichtaufweitung der Monoalkyltensid-modifizierten Tonminerale kontinuierlich mit zunehmender Adsorption fortschritt, erreichte der Schichtabstand des Dialkyltensid-modifizierten Tonminerals bereits vor der "DCP-Sättigung" einen Maximalwert.

Untersuchungen zur Kinetik der Sorptionsprozesse ergaben unter den gewählten Bedingungen eine Zeitdauer von etwa 3 Minuten für die Adsorption und 4-5 Minuten für die Desorption.



**Abb. 2:** Desorptionskinetik - Einstellung des neuen Sorptionsgleichgewichtes nach Verdünnung

Die ersten Messungen an aktivierter Holzkohle zeigten eine deutlich erhöhte Aufnahmekapazität des Adsorbens im Vergleich zu den modifizierten Schichtsilikaten. Die Adsoptionsdauer lag bei etwa 60 Minuten. Der Prozess verlief also um eine Größenordnung langsamer als an modifiziertem Montmorillonit.

### **Mikrobiologische Untersuchungen**

Im für die mikrobiologischen Untersuchungen sinnvollen Konzentrationsbereich des 2,4-DCP weist einzig C<sub>12</sub> modifizierter MM ein lineares Adsorptionsverhalten von DCP auf, daher wurde C<sub>12</sub>-MM für die folgenden Untersuchungen eingesetzt.

Zur direkten Analyse des Systems Tonmineral-Bakterien war zunächst die Entwicklung eines neuen Färbeprotokolls zur fluoreszenzmikroskopischen Gesamtzellerfassung in Gegenwart von Tonmineralen notwendig. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde aufgrund der morphologischen sowie densitometrischen Ähnlichkeit von Bakterien und Tonmineralen im Phasenkontrast ausgewählt. Klassische Protokolle wie z.B. der Total Dapi/Acridinorange Count waren hierfür jedoch nicht geeignet. Die Bestimmung der Lebendzellzahl mittels KBE als mögliche Alternative war sowohl aufgrund der Aggregation der Bakterien als auch der Aggregatbildung von Bakterien und Tonmineralen, insbesondere in der Wachstumsphase, zu ungenau. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Sytox Green und dem daraus entwickelten Total Sytox Count (TSC) ist nun eine sehr gute Differenzierung zwischen Bakterien und Tonmineralen möglich, sogar wenn Bakterien mit Tonmineralen assoziiert sind. Die Wiederfindungsrate beträgt auch bei stoffwechselphysiologisch inaktiven Zellen 80-90 %.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Bakterien in Gegenwart von Tonmineralen werden zur Zeit 16s rRNA Sonden untersucht.

Mittels des TSC wurde der Einfluß des C<sub>12</sub>-MM auf die Bakterien untersucht, da frei in Lösung befindliches Kation-Tensid toxisch wirkt. Es wurde kein negativer Einfluß des C<sub>12</sub>-MM bei statischen sowie wachsenden Bakterienkulturen festgestellt. Zur Zeit laufen Langzeituntersuchungen bezüglich der Stabilität von C<sub>12</sub>-MM in Gegenwart von Bakterien.

*Ralstonia eutropha* wurde bezüglich Wachstumsraten und Erträgen beim Wachstum mit 2,4-Dichlorphenol (DCP) charakterisiert. *R. eutropha* wuchs mit DCP als alleiniger Kohlenstoffquelle ohne Zusatz von Vitaminen bis zu einer Konzentration von 70 mg/l DCP bei gleichbleibendem Biovolumenertrag (bezogen auf den Kohlenstoffgehalt). Oberhalb 70 mg/l DCP wurde das Bakterium jedoch gehemmt. Verglichen mit den Werten für ein nicht toxisches Substrat wie Citrat erreichte *R. eutropha* nur die Hälfte des maximal möglichen Ertrages. Der Ertrag, gemessen als KBE, zeigte das gleiche Ergebnis.

Um den toxischen Einfluß der alleinigen Kohlenstoffquelle DCP auf das Wachstum zu untersuchen wurden fluoreszenzmikroskopische Methoden zur Überprüfung der Membranintegrität angewendet. Für den Anteil an "toten" Zellen ergab sich allerdings kein Unterschied beim Wachstum mit DCP und Citrat.

DCP-Abbau und Wachstum verliefen nicht parallel, sondern das Wachstum begann, nachdem das DCP UV-Vis-spektroskopisch nicht mehr nachweisbar war. Erste Untersuchungen des Metabolitenspektrums ergaben einen mehr als 90 % igen Abbau des organischen Kohlenstoffs.

Nachdem die einzelnen Komponenten des Modellsystems charakterisiert worden sind, wird in nächster Zukunft in Zusammenarbeit der beteiligten Institute das vollständige Modellsystem bearbeitet. Wichtig dabei wird auch sein, ob die Bindung von möglichen Metaboliten am Tonmineral gezielt gesteuert oder zumindest bilanziert werden kann.

Die Relevanz des bisher untersuchten Systems soll im folgenden Jahr überprüft werden: dazu sollen Chlorbenzol als Schadstoff und ein autochthoner Bakterienstamm in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Letzterer wird vom UFZ Leipzig zur Verfügung gestellt.



### 3 Teilprojekt 3

#### **EINSATZ MEHRSKALIGER EXPERIMENTELLER SYSTEME ZUR LEISTUNGS- STEIGERUNG UND MODELLIERUNG BIOTECHNOLOGISCHER *IN SITU*- SANIERUNGSVERFAHREN**

M.G. HÖFLE

GBF- Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abt. Umweltmikrobiologie,  
Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig

#### **Zusammenfassung des Projektstandes**

Im ersten Projektjahr konzentrierten sich die Arbeiten auf den Aufbau der Kooperationsinfrastruktur, die Anpassung der analytischen Methoden auf Aquifer-material, die Durchführung gemeinsamer Messkampagnen am Bitterfelder Grundwasserleiter, und die Durchführung von Experimenten mit Grundwassermikrokosmen. Basierend auf zwei Messkampagnen im Oktober 1998 und im April 1999 am Standort Bitterfeld, die unter Beteiligung aller im Teilprojekt 3 teilnehmenden HGF-Zentren durchgeführt wurden, waren die Arbeiten im ersten Projektjahr auf folgende Themen fokussiert: 1.) die Erfassung der hydrologischen Rahmenbedingungen im Aquifer in bezug auf die Mikroorganismen, 2.) die Aufklärung der dreidimensionalen Mikrostruktur der bakteriellen Grundwasserbiozöten, und 3.) den Leistungsvergleich des mikrobiellen Abbaus der Chloraromaten bei unterschiedlichen Bedingungen in Mikrokosmen.

Die Bestimmung der hydrologischen Rahmenbedingungen (Beitrag Klotz et al.) zeigten, dass ein Transport von Bakterien durch den Bitterfelder Aquifer in den oberen 20m gut möglich ist, da hier die mittlere Porengröße zwischen 70µm und 500µm beträgt. Aus den 40 durchgeführten Messungen der Korngrößenverteilung aus 3 Bohrungen konnte geschlossen werden, dass Versuche zum Wanderungsverhalten von Bakterien im Grundwasserleiter in Fein-, Mittel-, und Grobsanden, sowie in Feinkies durchgeführt werden sollten. Die Untersuchung der räumlichen Struktur der bakteriellen Lebensgemeinschaften im Aquifer bzw. im Grundwasser (Beiträge

Mogge et al., Neu und Lünsdorf et al.) zeigte, dass es sich bei den im Grundwasser selbst lebenden Bakterien um sehr kleine, runde Zellen (maximaler Durchmesser 0.5µm) mit sehr geringer physiologischer Aktivität handelt. Hierbei wurde die niedrige physiologische Aktivität aus dem geringen Anteil (<1 bis 13% der Gesamtzellzahl) mit der universellen 16S rRNA-Sonde hybridisierbaren Zellen geschlossen. Der an festes Aquifermaterial gebundene Teil der Grundwassermikroflora zeigte dagegen einen wesentlich höheren Anteil (27-38%) hybridisierbarer Zellen, die oft in kleinen Zellhaufen bestehend aus stäbchenförmigen Zellen zu finden waren. Insgesamt kann für die Mikrostruktur der Grundwasserbakterien festgestellt werden, dass der Bitterfelder Grundwasserleiter zwei unterschiedliche Habitate für Bakterien aufweist: das Grundwasser selbst und die Sand- bzw. Kiesmatrix. In diesen beiden Habitaten hält sich eine physiologisch stark unterschiedlich aktive Mikroflora auf.

Die experimentellen Arbeiten konzentrierten sich planungsgemäß auf die kleinste Skala, d. h. Mikrokosmen mit einem Volumen bis zu 1 Liter. Hiermit wurden exemplarisch die reduktive Dehalogenierung von Chloraromaten im Boden (Beitrag Scheu- nert) und der Einfluss von Spezialkulturen auf den Chloraromatenabbau in Grundwassermikrokosmen (Beitrag Rosenbrock et al.) untersucht. In den Grundwassermikrokosmen wurden drei Spezialstämme hinsichtlich ihrer Abbaukapazität *in situ*, d.h. in Konkurrenz mit der autochthonen Mikroflora unter umweltnahen Bedingungen, untersucht (Bioaugmentationsversuche). Verglichen wurde der Abbau in diesen Bioaugmentationsversuchen mit dem Abbaupotential der autochthonen Mikroflora, die durch Zugabe der Elektronenakzeptoren Sauerstoff bzw. Nitrat, sowie durch Zugabe von Stickstoff und Phosphat, stimuliert wurden (Biostimulationsversuche). Diese Untersuchungen konnten belegen, dass sich der Einsatz von zwei der drei Spezialstämmen unter den gewählten, realitätsnahen Bedingungen, d. h. bei Anwesenheit der Grundwassermikroflora, leistungssteigernd auf den Chlorbenzol-Abbau auswirkte. Erwartungsgemäß wirkte sich der Zusatz des Elektronenakzeptors Sauerstoff leistungssteigernd aus. Allerdings, und dies war bislang nicht bekannt, wirkte sich auch die Zugabe von Nitrat leistungssteigernd aus, wenn auch mit einer Verzögerung von 2 bis 3 Tagen im Vergleich zur Zugabe von Sauerstoff. Vergleicht

man den Effekt von Biostimulation und Bioaugmentation, so zeigte sich, dass durch die Zugabe von Spezialkulturen der Chloraromatenabbau nochmals um den Faktor zwei beschleunigt werden kann, im Vergleich zur Zugabe von Elektronenakzeptoren alleine. Insgesamt gesehen sollen alle experimentellen Daten zum Chlororganikaabbau im Bitterfelder Grundwasserleiter in ein prozessorientiertes Modell eingehen zu dem die ersten konzeptionellen Vorarbeiten vorliegen (Beitrag Ma et al.).

Zusammenfassend lässt sich für Teilprojekt 3 sagen, dass alle beteiligten Zentren und Arbeitsgruppen die wesentlichen Ziele für das erste Projektjahr erreicht haben. Damit ist eine solide Grundlage für die Fortsetzung des Projektes im zweiten Jahr gegeben. Die Arbeiten im zweiten Jahr werden sich auf Experimente mit Aquifermikrokosmen und den *in situ* Reaktoren der SAFIRA-Anlage konzentrieren, so dass hier schon der Versuch gemacht werden kann über mehrere Skalen die Abbauprozesse im Bitterfelder Grundwasserleiter zu verstehen.

### **3.1 Bestimmung von bodenphysikalischen, hydraulischen, chemischen und mikrobiologischen Grundparametern der Sedimente der Bohrung SAF BIT 32**

D. KLOTZ, E. HOQUE, K.-P. SEILER

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Hydrologie, Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

#### **Einleitung**

Aufgabe des GSF-Instituts für Hydrologie im HGF-Strategiefondsprojekt „Systemintegrierte Umweltbiotechnologie zur Sanierung von organisch und anorganisch belasteten Grund- und Oberflächenwässern“ ist die Untersuchung des Migrationsverhaltens von speziellen, Chloraromaten abbauenden Bakterien in Systemen Sediment/Wasser aus Bitterfeld. Zur Auswahl der einzusetzenden Sedimente und zur späteren Modellierung der Ergebnisse ist die Kenntnis von bodenphysikalischen, hydraulischen, chemischen und mikrobiologischen Grundparametern der Lockersedimente aus dem Untergrund von Bitterfeld notwendig.

#### **Material und Methoden**

Für diese Untersuchungen lagen Sedimentproben (1 m lange Schlauchkerne) der Bohrung SAF BIT 32 aus einer Teufe von 6,0 bis 19,5 m vor. In diesen Schlauchkernen (PVC-Rohre) waren die Sedimente weitgehend ungestört in der Körnung, im chemischen und im mikrobiologischen Milieu, nicht aber in der Lagerung. Direkt nach Beendigung der Bohrung (15.10.1998) wurden die Schlauchkerne in PVC-Folie unter Stickstoffatmosphäre eingeschweißt und nach München transportiert. An den Schlauchkernenden wurde Sedimentmaterial zur Bestimmung von folgenden Grundparametern der Sedimente entnommen:

- bodenphysikalische Parameter (Korngrößen, Lagerungs- und Mikrostrukturparameter).
- hydraulische Parameter (Durchlässigkeit, effektive Porosität und Dispersivität)

- chemische Parameter (organischer Kohlenstoff- und Karbonatgehalt) und
- mikrobiologische Anfangsparameter (Keim- und Gesamt-Zellzahlen).

## Ergebnisse

### *Parameter zur Beschreibung des Korngerüstes*

Der Aufbau des Feststoffgerüsts von Lockersedimenten wird durch die Größe, die Form, das Gefüge und die Lagerung der Teilchen charakterisiert, die das Gerüst bilden.

Die **Korngrößenverteilungen** der Sedimente der Bohrung SAF BIT 32 sind sehr unterschiedlich (Tab. 1):

- Es sind Schluffe, Sande und Kiese im starken Wechsel.
- Die bindigen Materialien (Schluffe, Nr. 4, 5, 10) sind sehr ungleichförmig (Ungleichförmigkeitsgrad  $U > 20$ ), die nichtbindigen Materialien (Sande, Kiese) sind teils sehr gleichförmig ( $U < 3$ : Nr. 1, 8, 12, 16), teils sehr ungleichförmig ( $U > 10$ : Nr. 13, 14).
- Die Körner der Sande und Kiese können als kugelig abgerundet, die Partikel der Schluffe als plattig eingeordnet werden.

Die einzelnen Teilchen eines Sediments können unterschiedliche Anordnungen, sog. **Gefüge** aufweisen. Nichtbindige Materialien (Sande, Kiese) besitzen Einzelkorngefüge; bindige Materialien (Tone, Schluffe) weisen Aggregatgefüge auf. Das Gefüge hat Einfluß auf die natürliche Lagerung von Sedimenten, auf die Strömungsart und die hydraulischen Eigenschaften.

Die **Lagerungsparameter** der nichtbindigen Sedimente konnten nur bei versuchstechnisch dichtem Einbau in kleinskalige Säulen bestimmt werden (Tab. 1):

- Erfahrungsgemäß sind die totalen Porositäten der natürlich gelagerten Sande maximal 5 % größer als die totalen Porositäten bei versuchstechnisch dichter Lagerung dieser Sande.
- Die totalen Porositäten der Sande und Kiese nehmen mit dem Ungleichförmigkeitsgrad ab.
- Die totalen Porositäten der gleichförmigen Sande und Kiese (Ungleichförmigkeitsgrad  $U < 3$ ) liegen i.a. im Bereich  $>0,30$ , die der ungleichförmigen Sande und Kiese ( $U > 3$ ) i.a. im Bereich  $0,20$  bis  $0,25$ .

Körnung, Kornform und Lagerung bestimmen die **Mikrostrukturparameter** (spezifische Oberfläche und Porengrößenverteilung) eines Sediments.

Die Bestimmung der spezifischen Oberflächen, die das Ausmaß der Sorptionsreaktionen zwischen flüssiger und fester Phase bestimmt, erfolgt durch die BET-Methode, die Untersuchungen sind z.Z. noch nicht abgeschlossen. Die bisherigen Ergebnisse liegen im Bereich  $> 1 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Die Porengrößenverteilungen, die maßgebend sind für das Zustandekommen eines wassergetragenen Partikeltransports, wurden nur an Sanden und Kiesen bei versuchstechnisch dichter Lagerung in kleinskaligen Säulen nach der Tensiometermethode bestimmt:

- Die Porengrößenverteilungen sind stark abhängig von der Körnung und vom Ungleichförmigkeitsgrad.
- Die bestimmten Porengrößen liegen im Bereich  $\geq 1 \text{ }\mu\text{m}$ . Damit ist ein Transport von Bakterien (Größe ca.  $1 \text{ }\mu\text{m}$ ) möglich.
- Die durch statistische Auswertung der Verteilungen erhaltenen mittleren Porengrößen liegen im Bereich  $70 \text{ }\mu\text{m}$  bis  $500 \text{ }\mu\text{m}$  (Tab. 1).

#### *Hydraulische Parameter*

Die hydraulischen Parameter von Sediment-Wasser-Systemen werden beschrieben durch den Durchlässigkeitsbeiwert als Maß für den Widerstand, den das Feststoffgerüst dem strömenden Wasser entgegensetzt, die effektive Porosität als Maß für das Wasservolumen in den Poren, das am Fließvorgang teilnimmt und die hydrodynamische Dispersion als Maß für die mechanische Vermischung von Wasserinhaltsstoffen beim Fließvorgang.

Die hydraulischen Parameter wurden nur an den 11 nichtbindigen Sedimenten, die versuchstechnisch dicht in Säulen von 50 mm Durchmesser und 500 mm Länge eingebaut wurden, bestimmt. Nach 14tägigem Vorlauf zur Stabilisierung des Korngerüsts wurden drei Versuche im natürlichen Geschwindigkeitsbereich (Filtergeschwindigkeitsbereich ca.  $0,05 \text{ m/d}$  bis ca.  $1,0 \text{ m/d}$ ) durchgeführt (Tab. 1):

- Die Durchlässigkeiten der Sande und Kiese sind stark abhängig von der Körnung und dem Ungleichförmigkeitsgrad, sie liegen im Bereich  $2 \times 10^{-4}$  cm/s bis  $5 \times 10^{-2}$  cm/s.
- Die effektiven Porositäten sind kleiner als die totalen Porositäten, die Unterschiede wachsen mit zunehmendem Ungleichförmigkeitsgrad U: für gleichförmige Sande und Kiese ( $U < 3$ ) liegt die effektive Porosität etwa bei 0,3, für stark ungleichförmige Materialien ( $U > 10$ ) etwa bei 0,2.
- Die longitudinalen Dispersivitäten wurden an homogenen, in kleinskaligen Säulen eingebauten Sedimenten bestimmt und weisen deshalb nicht die natürliche Textur (Inhomogenitäten, Schichtungen) auf. Sie sind stark abhängig von der Körnung und dem Ungleichförmigkeitsgrad U: für gleichförmige Materialein ( $U < 3$ ) liegt die longitudinale Disperivität bei  $\leq 1$  cm, für ungleichförmige grobkörnige Materialien im Dezimeterbereich.

#### *Chemische Parameter*

Die Gehalte an organischem Kohlenstoff und an Karbonat („Pufferkapazität“) eines Sediments sind maßgebend für die Sorptionskapazität des Sediments gegenüber organischen und anorganischen Schadstoffen (Tab. 2):

- Bemerkenswert sind die hohen  $C_{org}$ -Werte in den feinkörnigen Sedimenten (Schluffe Nr. 4, 5, 10 und Feinsande Nr. 3, 7, 8), die um Größenordnungen über den vergleichbaren Materialien anderer Standorte liegen.
- Die Karbonatgehalte liegen unter 10 %, d.h. die Pufferkapazität der Sedimente sind gering.

#### *Mikrobiologische Parameter*

Der Abbau von Organika im Untergrund wird von der Gesamtzahl und der Diversität der mikrobiologischen Stämme geprägt. Bei Migrationsversuchen von speziellen Bakterien treten die natürlich im Sediment-System vorhandenen Bakterien in Konkurrenz zu den applizierten.

Aus den 16 Sedimenten wurden unter anaeroben Bedingungen die Bakterien isoliert, die Keimzahlen nach Platteninkubation und die Gesamtanzahl sowie Morphologie der Bakterien nach modifizierter Leifson-Färbung bestimmt (Tab. 2):

- Entgegen den Vorschriften werden die Keimzahlen nach 8 Tagen (nicht nach 2 Tagen) bestimmt.

- Weniger als 1 % der bestimmten Anaerobier keimen.
- I.a. korrelieren die über die Tiefe bestimmten Keimzahlen nicht mit der Gesamtanzahl der Bakterien.
- Maxima von Bakterien sind nicht einer bestimmten Körnungsklasse zuzuordnen.
- Polarmonotrische Bakterien (mit 1 oder 2 Geißeln) machen den größten Anteil der begeißelten Bakterien aus. Die Gesamtzahl der begeißelten Bakterien korreliert nicht mit der Bakteriengesamtzahl.



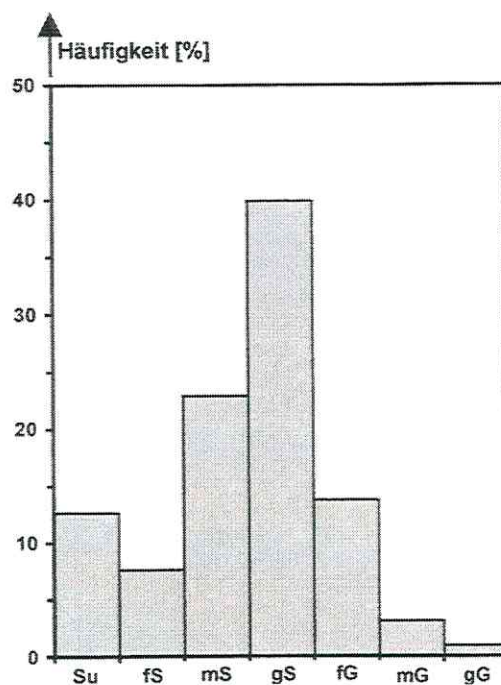
## Ausblick

Neben Sedimenten der Bohrung SAF BIT 32 standen Schlauchkerne der Bohrungen SAF BIT 29 und 30 zur Verfügung. Auch die Korngrößenverteilungen der Sedimente der Bohrungen SAF BIT 29 und 30 sind sehr unterschiedlich. Horizontal durchgehende, stärker mächtige Schichten sind nicht zu erkennen.

Aus den vorliegenden Korngrößenverteilungen der drei Bohrungen SAF BIT 29, 30 und 32 mit ca. 40 laufenden Metern folgt die in Abbildung 1 dargestellte Häufigkeitsverteilung der Körnungsklassen der Bitterfelder Sedimente. Für nichtbindige Materialien erhält man folgende Häufigkeits-Reihenfolge:

Grobsande > Mittelsande > Feinkiese > Feinsande > Mittelkiese > Grobkiese.

Daraus folgt, daß die im zweiten Jahr geplanten Bakterien-Migrationsversuche in Fein-, Mittel- und Grobsanden sowie in Feinkiesen durchgeführt werden sollten.



**Abb. 1:** Häufigkeit der im Untergrund von Bitterfeld (Bohrungen SAF BIT 32 29, 30, 32) auftretenden Körnungsklassen (Su = Schluff bis gG = Grobkies).

**Tab. 1:** Ansprache, Kennkorngrößen ( $d_i$ ,  $U$ ), Lagerungs-( $n$ ), Mikrostruktur-( $p$ ) und hydraulische Parameter ( $k_f$ ,  $n_{eff}$ ,  $\alpha$ ) der Sedimente der Bohrung SAF BIT 32

$d_{10}$  und  $d_{50}$ : wirksame und mittlere Korngröße,  $U$  = Ungleichförmigkeitsgrad,  $n$  = totale Porosität,  $p$  = mittlere Porengröße,  
 $k_f$  = Durchlässigkeit,  $n_{eff}$  = effektive Porosität,  $\alpha$  = Dispersivität  
 Körnungsklassen: Su = Schluff, fs = Feinsand, mS = Mittelsand, gS = Grobkieles, fg = Feinkies, mG = Mittelkies;  
 t = tonig, su = schluffig, fs, ms, gs = fein-, mittel-, grobsandig, fg, mg, gg = fein-, mittel-, grobkiesig

SAFBIT 32	Teufe [m]	Ansprache		$d_{10}$ [mm]	$d_{50}$ [mm]	$U = d_{60}/d_{10}$	$n$	$p$ [ $\mu\text{m}$ ]	$k_f$ [ $\text{cm/s}$ ]	$n_{eff}$	$\alpha$ [cm]
1	6,0	mS	fs, gs	0,135	0,28	2,4	0,326	240	$4,8 \cdot 10^{-3}$	0,301	0,57
2	7,0	mS-fG	mg	0,18	0,62	5,6	0,244	240	$3,8 \cdot 10^{-4}$	0,235	7,8
3	7,9	fS-mS	su	0,05	0,19	4,8		70			
4	9,0	Su	fs-fg	0,0028	0,008	82					
5	9,9	Su	fs-fg	0,0012	0,055	133					
6	11,0	mS-mG		0,24	0,82	6,0	0,248	230	$1,4 \cdot 10^{-2}$	0,229	0,65
7	12,0	fS-mS	gs	0,065	0,135	3,4	0,381	180	$2,3 \cdot 10^{-4}$	0,326	2,3
8	12,9	fS	su, ms, gs	0,038	0,075	2,4		115			
9	13,9	gS-fG	ms, mg	0,63	1,80	4,1	0,296	500	$3,5 \cdot 10^{-2}$	0,269	0,85
10	14,9	Su	t, fs	<0,001	0,015	>20					
11	15,1	gS-fG	fs, ms, mg	0,55	1,90	4,7	0,241	310	$4,9 \cdot 10^{-4}$	0,198	3,1
12	16,0	mS-gS	ms	0,33	0,65	2,2	0,293	360	$1,6 \cdot 10^{-2}$	0,247	1,20
13	17,0	mS-fG	fs, mg, gg	0,22	1,45	10,0	0,219	300	$8,3 \cdot 10^{-3}$	0,212	2,4
14	18,0	gS-fG	fs, ms, mg	0,17	2,10	17,6	0,255	230	$8,4 \cdot 10^{-3}$	0,186	12,7
15	19,0	mS-gS	fs, fg, mg	0,25	0,82	4,2	0,238	150	$2,6 \cdot 10^{-4}$	0,228	1,23
16	19,5	mS-gS	fs, fg	0,40	0,68	1,9	0,314		$1,3 \cdot 10^{-4}$	0,303	0,76

**Tab. 2:** Chemische Parameter (Karbonat- und Corg-Gehalt), Keimzahlen (nach 8 d Inkubationszeit) sowie Gesamtzellzahlen der Bakterien und Anzahl der begeißelten Bakterien, bestimmt an den Sedimenten der Bohrung SAF BIT 32. Die mikrobiologischen Parameter wurden unter anaeroben Bedingungen bestimmt.

SAFBIT 32	Teufe [m]	Ansprache		Karbonat [%]	C <sub>org</sub> [Massen-%]	Keim- zahlen [g <sup>-1</sup> ]	Gesamtzell- zahlen [g <sup>-1</sup> ]	begeißelt gesamt [g <sup>-1</sup> ]
1	6,0	mS	fs, gs	8,2	0,04	17	169.5	9.0
2	7,0	mS-fG	mg	6,8	0,05	48	505.5	3.0
3	7,9	fS-mS	su	5,5	0,94	137	162.0	9.0
4	9,0	Su	fs-fg	4,1	0,53	31	190.5	4.5
5	9,9	Su	fs-fg	6,8	0,56	105	99.0	63.0
6	11,0	mS-mG		1,4	0,05	147	309.0	21.0
7	12,0	fS-mS	gs	8,2	0,85	11	171.0	13.5
8	12,9	fS	su, ms, gs	9,5	0,55	2	193.5	1.5
9	13,9	gS-fG	ms, mg	4,1	0,13	54	111.0	7.5
10	14,9	Su	t, fs	6,8	0,12	41	82.5	25.5
11	15,1	gS-fG	fs, ms, mg	10,9	1,56	281	214.5	1.5
12	16,0	mS-gS	ms	5,5	0,22	51	76.5	6.0
13	17,0	mS-fG	fs, mg, gg	5,5	0,22	108	133.5	7.5
14	18,0	gS-fG	fs, ms, mg	1,4	0,26	142	88.5	45.0
15	19,0	mS-gS	fs, fg, mg	0,0	0,16	19	213.0	6.0
16	19,5	mS-gS	fs, fg	5,5	0,28	85	226.5	12.0

### **3.2 Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft in chlororganika-belastetem Grundwasser und Aquifer in Bitterfeld durch *in situ*-Hybridisierung mit phylogenetischen Sonden und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie**

B. MOGGE, A. HARTMANN, J.C. MUNCH

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie, Ingolstädter Landstr.1, 85764 Neuherberg

#### **Einleitung**

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die phylogenetische Charakterisierung der Bakterienpopulation von Aquifer- und Grundwasserproben unterschiedlicher Teufe bzw. Belastung mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM). In Anlehnung an die Ziele des TP 3, die u.a. ein funktional-organismisches Verständnis umweltmikrobiologischer Prozesse als essentielle Grundlage für den Schadstoffabbau beinhalten, sollte zunächst die Aktivität von Bakterien *in situ* und in den verschiedenen Habitaten und Teufen abgeschätzt werden. Das Arbeitsprogramm des ersten Förderungsjahres sah daher folgende Schwerpunkte vor:

1. Verhalten einzelner Bakterientaxa und deren Interaktionen mit der Boden- und Wassermatrix. Diese Arbeiten wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops *in situ* an Mikrohabitaten des Aquifermaterials durchgeführt.
2. Quantitative Analyse der mikrobiellen Population von Grundwasser und Aquifermaterial unterschiedlicher Teufe und Trophie (FISH). Diese Methode erlaubt durch die Hybridisierung der Sonden an ribosomale RNA eine Abschätzung aktiver Populationen (Poulsen et al., 1993).

#### **Material und Methoden**

Es wurden am 07.10.98 sowohl Aquifer- als auch Grundwasserproben und am 20.04.99 erneut Grundwasserproben aus verschiedenen Teufen entnommen und untersucht.

1. Bakterien in Grundwasserproben (7/97: 20,4-21,4 m; 10/97: 7,2-8,2 m; 27/98: 19,7-21,7 m) wurden mit 3% Formaldehyd über Nacht bei 4 °C fixiert, auf 0,2 µm Polycarbonatfilter ankonzentriert, in einer Ethanolreihe entwässert.
2. Aquifermaterial (10-11 m; 19-20m; 20.5-21 m) wurde direkt am konfokalen Laser Scanning Mikroskop untersucht (Fixierung in 3% PFA über Nacht bei 4 °C; 1x in PBS gewaschen und Aufnahme in PBS/Ethanol; Lagerung: -20°C). Aquifermaterial wurde auch dazu verwendet die Bakterien mit Na-Cholat und Ionenaustauschern zu extrahieren und phylogenetisch zu charakterisieren (5-maliges Extrahieren durch Schütteln mit 0.1% Na-Cholat+PEG+Chelex; Zentrifugation bei 10000g, 20 min; Waschen in PBS, erneute Zentrifugation und Aufnahme in PBS/EtOH; Filtration durch 5µm-Spritzenaufsatz, Ankonzentrieren auf 0,2 µm PC-Filter, Entwässerung).

Die auf Aquifer bzw. Polycarbonatfiltern vorliegenden Bakterien wurden anschließend mit Oligonukleotidsonden hybridisiert (Amann et al., 1990) und qualitativ (CLSM) bzw. quantitativ auf Filtern (Epifluoreszenzmikroskop) untersucht. Folgende Sonden wurden eingesetzt: a. domänenspezifisch Arch915, EUB338 (Archaea, Eubakteria). b. gruppenspezifisch ALF1b, BET42a, GAM42a, SRB385 (Vertreter der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Proteobakteria), CF319a, Pla5a, IROG2 (Vertreter des Cytophaga-Flavobacterium-Clusters, der Planctomyceten bzw. des Holophaga-Acidobacterium Phylums).

## Ergebnisse

### *Grundwasser*

In der unbelasteten Probe (10/97: 7,2-8,2 m) waren zu beiden Probenahmeterminen mehr als 95% aller Zellen coccoid (max. 500 nm; Eub338: 0%). In den schadstoffbelasteten Proben (SafBit 7/97 und 27/98, entnommen im Oktober 1998) waren hingegen bis zu 13% aller Zellen mit der Eub338 hybridisierbar (Tab. 1). Hybridisierungen mit gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden zeigten die Dominanz der Proteobakterien an, wobei nur geringfügige Unterschiede zwischen beiden Proben auftraten. Archaea wurden mit einem Anteil von 1,7% nur in der

Probe 7/97 nachgewiesen. Die Gesamtzellzahlen lagen für beide belasteten Grundwässer bei  $2,5 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ .

**Tab. 1:** Prozentuale Anteile spezifischer bakterieller Populationen an der Gesamtzellzahl [ $\text{ml}^{-1}$ ]. Grundwasserbakterien wurden mit gruppenspezifischen Sonden hybridisiert ( $X \pm$  Standardabweichung,  $n=10$ ; Probenahme vom: 07.10.98).

Sonden*	Grundwassermeßstelle		
	10/97	27/98	7/97
DAPI ( $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ )	1,9 ( $\pm 0,6$ )	2,6 ( $\pm 3,4$ )	2,5 ( $\pm 0,4$ )
DAPI	100	100	100
Eub338	<1	12,3 ( $\pm 3,7$ )	13,3 ( $\pm 3,5$ )
Arch918	0	0	1,7 ( $\pm 1,0$ )
Alf1b	n.b.	1,1 ( $\pm 1,9$ )	1,1 ( $\pm 1,1$ )
Bet42a	n.b.	1,4 ( $\pm 1,6$ )	2,7 ( $\pm 2,0$ )
Gam42a	n.b.	<0	1,1 ( $\pm 0,4$ )
SRB385	n.b.	1,1 ( $\pm 1,4$ )	1,1 ( $\pm 1,0$ )
% zugeordnet	n.b.	3,6	6,0

\* Werte der Sonden Pla5a, IROG2 und CF319a lagen immer unterhalb der Detektionsgrenze (<1%).  
n.b. nicht bestimmt

Im Vergleich hierzu waren in den Grundwasserproben vom April 1999 deutlich niedrigere Anteile an der Gesamtzellzahl hybridisierbar (ca. 5%; Tab. 2).

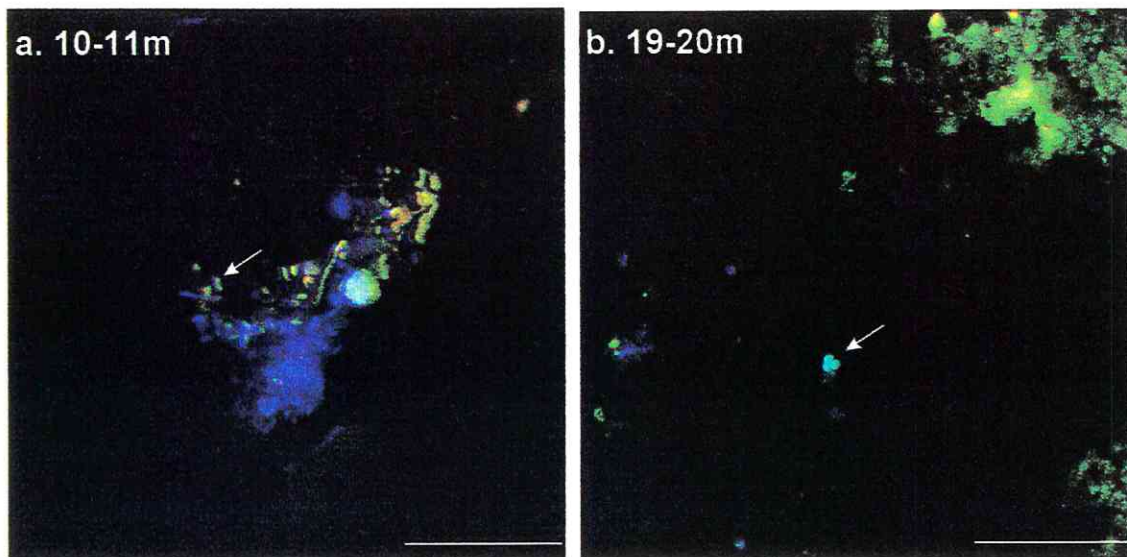
**Tab. 2:** Zellzahl [ $\text{ml}^{-1}$ ] und prozentuale Anteile hybridisierbarer Bakterien ( $n=30$ ). Probenahme vom 22.04.99.

GW-Meßstelle	Tiefe [m]	Zellzahl [ml]	Eub [%]	Archaea [%]
7/97	20,4-21,4	$2,7 \cdot 10^6$	3,1	0
8/97	15,3-16,3	$4,0 \cdot 10^5$	<1	0
10/97	7,2-8,2	$2,0 \cdot 10^6$	<1	0
27/98	19,7-21,7	$1,8 \cdot 10^6$	7,8	0

### *Aquifer*

Untersuchungen an unbelastetem Aquifermaterial aus 10-11 m Tiefe mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie und FISH deuteten darauf hin, daß der Aquifer, im Gegensatz zum Grundwasser, einen erheblich höheren Anteil aktiver Bakterien berherbergte (Abb.1a). Die in Abbildung 1a blau gefärbten Zellen im unteren Bildabschnitt waren hingegen nicht hybridisierbar, und daher mit großer

Wahrscheinlichkeit inaktiv. Der Aquifer bestand ausschließlich aus kiesig-sandigem Material.



**Abb. 1a-b:** Nachweis von  $\beta$ -Proteobakterien (a.) an Aquifermaterial aus 10-11 m bzw.  $\alpha$ -Proteobakterien aus 19-20 m Teufe (b.) mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie nach FISH. Färbungen: a. EUB-FL-Mix (488 nm, grün), BET42a-Cy3 (543 nm, rot), DAPI (364 nm, blau),  $\alpha$ -Pb. erschienen türkis-weiß (Pfeil); b. EUB-FL-Mix (488 nm, grün), GAM42a-Cy3 (543 nm, rot)  $\alpha$ -Pb. erscheinen türkis. Balken entspricht 20  $\mu$ m.

Vertreter der  $\gamma$ -Unterklasse der Proteobakterien wurden an belastetem Aquifermaterial aus 19-20 m Teufe direkt mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops nachgewiesen (Abb. 1b). Das Probenmaterial bestand dabei aus kiesig-sandigem Material mit geringen Kohle-Anteilen. An tiefer gelegenen Probenmaterial (20.5-21m) konnten auf Grund des hohen Anteils an Kohle (<40%), die die Detektion der Bakterien erheblich störten, bis dato keine Bakterien nachgewiesen werden. Daher wurden Untersuchungen der Aquiferextrakte durchgeführt welche Aufschluß über die prozentualen Anteile hybridisierbarer Bakterien geben sollten. Der Anteil hybridisierbarer Bakterien lag in 10-11m Teufe bei 38%, in 19-20m Teufe bei 27% und in 20.5-21.0m Teufe bei 38%. Die Gesamtzellzahlen waren gegenüber dem Grundwasser um bis zu einer Zehnerpotenz erhöht und lagen bei  $3,5 \cdot 10^6$ , bzw.  $1,4$  und  $3,8 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$  Aquifer-Trockensubstanz (in 10-11, 19-20 und 20,5-21m Teufe).

## Diskussion

### *Grundwasser*

Hybridisierungen mit domänenspezifischen Oligonukleotidsonden ergaben bei der Probenahme vom 07.10. 98 Werte zwischen <1 (7.2-8.2 m Teufe) und 13 % (20.4-21.4 m Teufe). Die Dominanz der Proteobacteria an beiden belasteten Grundwassermeßstellen spiegelt dabei in erster Linie die weite Verbreitung und die physiologische Vielfalt von Vertretern dieser Gruppen wider. Wenngleich es sich bei dem Einsatz der gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden um phylogenetische Sonden handelt, die i.d.R. keine bzw. geringe Rückschlüsse über die Physiologie der Zellen erlauben, deutet das Vorhandensein von hybridisierbaren Vertretern der  $\delta$ -Proteobakterien darauf hin, daß es im belasteten Grundwasser zu einer Sulfatreduktion *in situ* kommt. Im Unterschied zum belastetem Grundwasser waren mehr als 90 % der Zellen der Grundwasserhabitats 8/97 und 10/97 extrem klein (200-500 nm). Hybridisierungen dieser Bakterien führten zu keinerlei Signalen, was vermutlich auf den niedrigen Gehalt an Kohlenstoffdonatoren in dieser Teufe und einem niedrigen Aktivitätsgrad der Zellen zurückzuführen ist. Die Unterschiede zwischen den beiden Probenahmeterminen vom Oktober 1998 und April 1999 zeigen deutlich, daß auch im Grundwasser mit einer hohen zeitlichen Variabilität zu rechnen ist, die in bodenökologischen *in situ*-Untersuchungen oftmals nachgewiesen wurde (Mogge et al., 1999).

### *Aquifer*

Mit CLSM gelang der Nachweis aktiver Bakterien direkt im Habitat (z.B. 10-11 m Teufe:  $\beta$ -Proteobacteria; 19-20m:  $\gamma$ -Proteobacteria), was die Effizienz dieser Methode (Hartmann et al., 1998) auch für dieses Habitat bestätigt. An Aquifer aus 20.5-21m Teufe konnten bis dato mit CLSM keine Bakterien detektiert werden, was vermutlich am Absorptionsverhalten von Kohlepartikeln im Flöz lag. Untersuchungen des Aquiferextrakt bestätigten jedoch die Hypothese, daß grundsätzlich ein zum Grundwasser unterschiedliches Habitat vorliegt. Sowohl der erhöhte prozentuale Anteil hybridisierbarer Bakterien als auch die Gesamtzellzahl sind deutliche Indikatoren für einen wesentlich höhere Aktivität der Bakterien am Aquifer.



## Ausblick

Im zweiten Versuchsjahr wird der Schwerpunkt auf der Kooperation im Rahmen der SAFIRA-Untersuchungen liegen. Die erfolgreich eingesetzten Methoden sollen im Rahmen des Strategiefondsprojektes zur Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Dynamik der Grundwassermikroflora in den beiden Experimentaleinheiten (Kontrolle, Nitratadditionsexperiment) im Schacht 5 der *in situ*-Pilotanlage SAFIRA gemeinsam mit der Sektion Umweltmikrobiologie des UFZ und der GBF aufgeklärt werden.

## Literatur

- Amann RI, Krumholz L and Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* 172:762-770
- Hartmann A, Lawrence JR, Aßmus B, Schlöter M (1998) Detection of microbes by laser confocal microscopy. In: Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 4.1.10: 1-34
- Mogge B, Loferer C, Agerer R, Hutzler P, Hartmann A (1999) Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Mycorrhiza* (accepted)
- Poulsen LK, Ballard G, Stahl DA (1993) Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol* 59: 1354-1360

### 3.3 Untersuchungen zur Biofilmentwicklung in einem „rotating annular reactor“

T. NEU

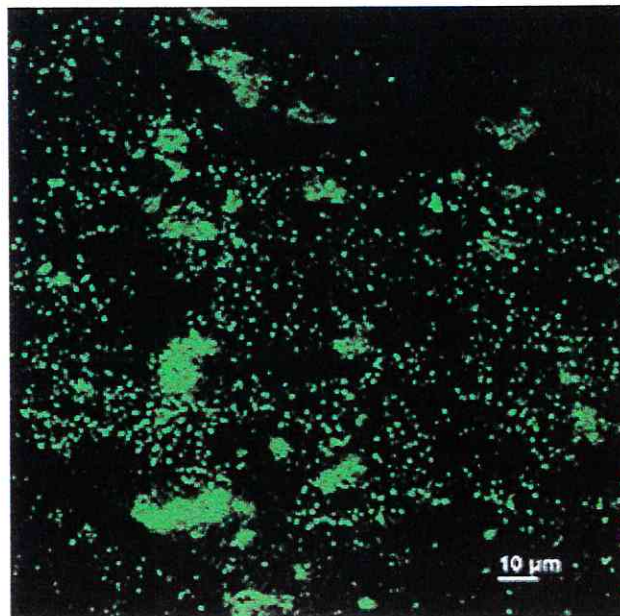
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH,  
Sektion Gewässerforschung, Brückstr. 3a, 39114 Magdeburg

Im Rahmen des Projektes wurde ein erstes, orientierendes Experiment zur Anreicherung von Bakterien aus belastetem Grundwasser durchgeführt. Hierbei wurde das Verhalten von Bakterien in extrem oligotrophen Systemen ausgenutzt. Die Bakterien in einem nährstoffarmen Habitat heften sich an Grenzflächen, um die wenigen, dort angereicherten Nährstoffe nutzen zu können. Ziel des Versuches war es, die im Grundwasser vorhandenen Bakterien an den Grenzflächen eines Reaktors in Form eines Biofilms anzureichern und mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zu dokumentieren.

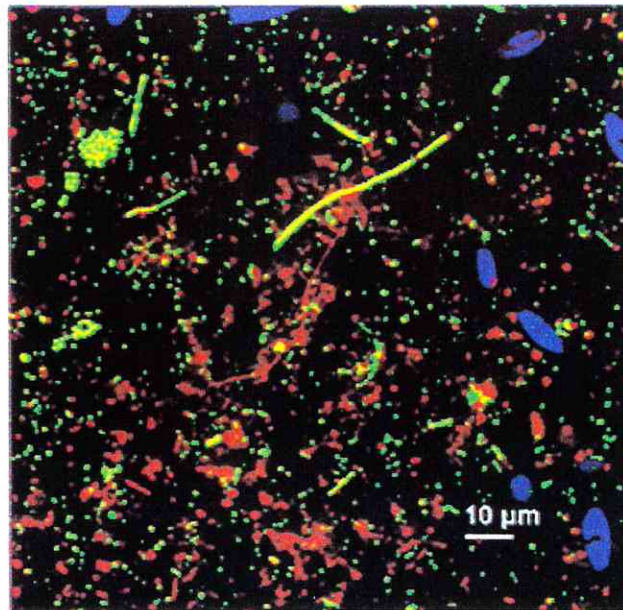
Der Biofilm-Reaktor, ein sogenannter "rotating annular reactor" (RAR), besteht aus einem Gefäß mit einem rotierenden inneren Zylinder. Durch entsprechende Bohrungen in dem Zylinder wird eine turbulente Strömung erzeugt. An der Innenwand des Gefäßes befinden sich "slides", welche von oben entnommen werden können. Sowohl der Reaktor als auch die "slides" bestehen aus Polycarbonat. Der Reaktor wurde mit dem Grundwasser ohne jegliche Zusätze im "batch"-Betrieb als geschlossenes System gefahren. Die Wasserprobe wurde am 20. 04. 99 aus dem SAFBIT Pegel 7/97 (Pollux) entnommen. Um den Sauerstoffpartialdruck niedrig zu halten, wurde bei den Reaktor-Experimenten während des Animpfens und der Probennahme mit Argon gespült.

Die mikroskopischen Untersuchungen der "slides" erfolgten nach 3 und 10 Tagen. Hierzu wurden die Bakterien mit einem allgemein nukleinsäure-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Die frischen, nicht-fixierten, lebenden Proben wurden anschließend mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Die Oberflächen zeigten nur einzelne angeheftete Bakterien in der Größenordnung von 1-2  $\mu\text{m}$ . Allerdings konnten ausgedehnte Bereiche gezeigt werden, welche vermutlich mit sogenannten „Minibakterien“ bewachsen waren (siehe Abbildung).

Ein kritischer Punkt bei diesem Ansatz stellt die Sauerstoffkonzentration im Reaktor dar. So erhöhte sich der Sauerstoffgehalt im Reaktor im Vergleich zum Probengefäß, welches für den Transport verwendet wurde, von 7% auf 40% Sättigung. Vermutlich wurden dadurch bestimmte Bakteriengruppen gehemmt. Deshalb soll in weiteren Untersuchungen der Biofilm-Reaktor zusammen mit Sediment bzw. mit Ultraschall behandeltem Sediment/Grundwasser gefahren werden. Es wird erwartet, daß sich aus den Biofilmen des Sediments mehr Bakterien ablösen, welche dann auf den Reaktor-Oberflächen Biofilme ausbilden können. Zusätzlich soll der Sauerstoffgehalt im Reaktor gesenkt werden. Die zu erwartenden, aus „Minibakterien“ bestehenden Biofilme werden wiederum mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie und zusätzlich mit Hilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie bei der GBF verifiziert. Des weiteren soll Sediment aus dem Aquifer mit derselben Fluoreszenz-lebend-Färbung mikroskopiert werden, um die Bakterien sowie deren Mikrokolonien und Biofilme *in situ* zu zeigen.



**Abb. 1:** Biofilm aus dem Mikrokosmen-Experiment mit Original-Grundwasser nach Anfärbung mit einem Nukleinsäure-spezifischen Farbstoff. Die Oberflächen zeigten nur wenige Bakterien der Grössenordnung von 1-2 µm, allerdings sind Bereiche mit sogenannten Minibakterien zu erkennen.



**Abb. 2:** Zum Vergleich ein Fließgewässer-Biofilm mit typischen Signalen nach Nukleinsäurefärbung der Bakterien (gelb-grün), Lektin-Markierung der Glycokonjugate (rot) und Autofluoreszenz der Grünalgen (blau). Die Probe wurde mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop im 3-Kanalmodus gescannt.

### 3.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur *in situ*-Situation autochthoner Bakterien im chlororganika-kontaminierten Aquifer

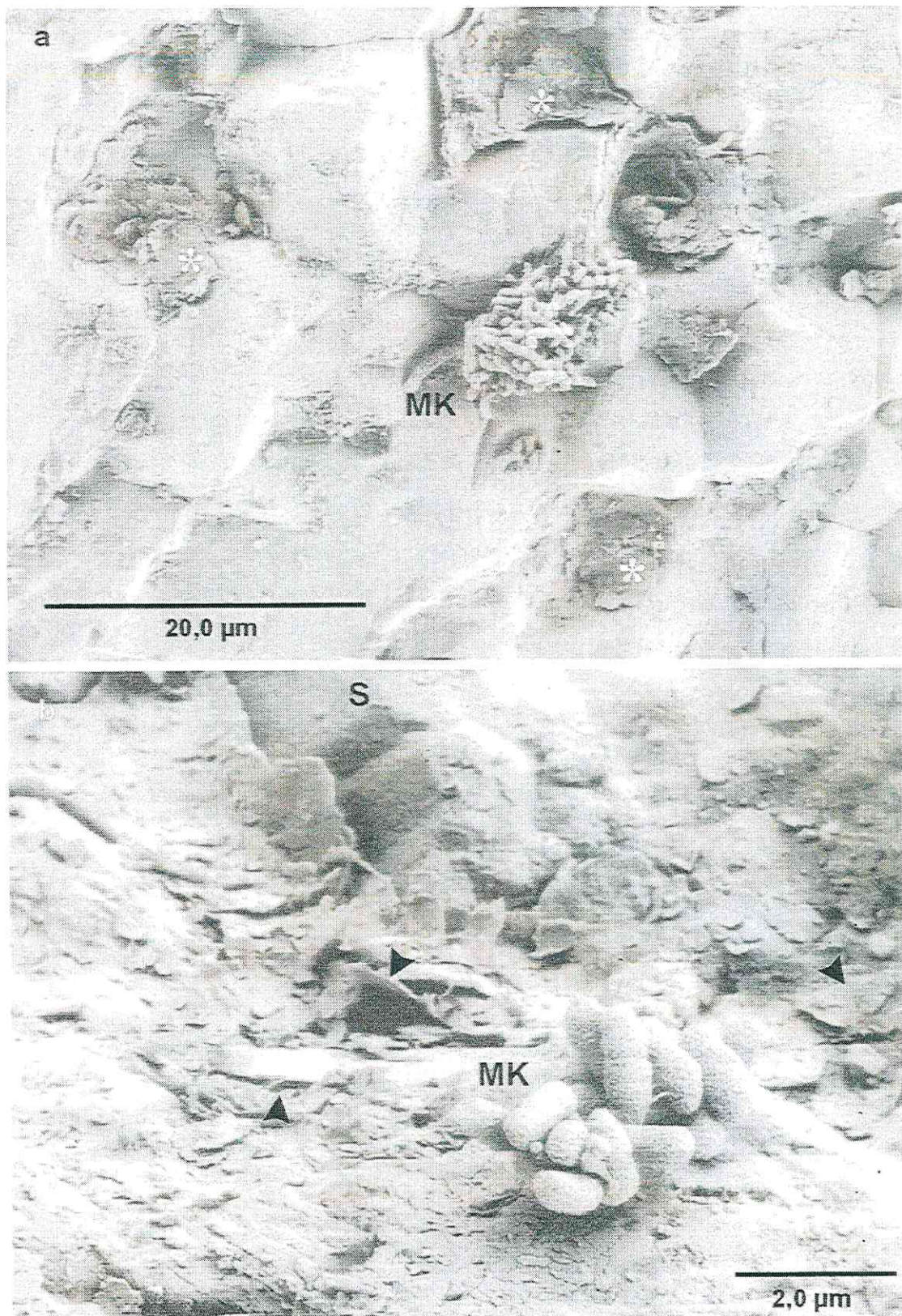
H. LÜNSDORF, D. F. WENDEROTH, W.-R. ABRAHAM

GBF - Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Arbeitsgruppen Mikrobielle Ökologie und Chemische Mikrobiologie, Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig

Chemische Analysen des in Bitterfeld am Standort der geplanten Pilotanlage SAFIRA vorkommenden Grundwasser zeigten vornehmlich eine Belastung mit chlorierten Aromaten, wobei Chlorbenzol hier die Hauptkomponente darstellte. Die Konzentration von Chlorbenzol war mit der Tiefe nicht uniform, sondern wies in etwa 20-21 m Tiefe ein Maximum auf, welches sich kurz über dem Braunkohleflöz befand und vermutlich durch die Desorption dieser organischen Verbindung aus der Braunkohle rührte (Dermetzel und Christoph, 1997). Es war daher von Interesse, ob sich bereits *in situ* Bakterien entlang des Tiefenprofils nachweisen lassen und in welchen Mikrohabitaten sie dort vorkommen.

Das Probenmaterial aus der Tiefe von 20 bis 21 m wurden auf das Vorkommen und die ultrastrukturellen Eigenschaften autochthoner Mikroorganismen entsprechend den *in situ*-Bedingungen näher untersucht. In dieser Tiefe liegt ein Übergang von einer Sandschicht in die ortsständige Braunkohle vor. Aus diesem geologischen Horizont konnten die meisten Bakterienstämme über einen Gesamtprofilverlauf von 1 m bis 27,7 m isoliert werden (Abraham *et al.*, 1998).

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine geringe Besiedlung der Sandkorn Oberflächen mit autochthoner Mikroflora, wie sie zuvor in einleitenden Untersuchungen gefunden worden war (Abraham *et al.*, 1997). Unter *in situ*-Bedingungen konnten Mikrokolonien gefunden werden, die als einheitliche Bakterien anzusprechen sind (siehe Abb. 1a, 1b: MK) und die eine Koloniegröße von



**Abb. 1:** *In situ* rasterelektronenmikroskopische Darstellung der autochthonen mikrobiellen Gemeinschaft auf Sandkörnern aus 20 m Tiefe. (a) Detailübersicht des Aufwuchses auf einem Sandkorn. Tonmineralauflagerungen (~) in der Nähe einer Mikrokolonie (MK) sind dargestellt. (b) Detail einer Mikrokolonie (MK), die auf einem Tonmineralüberzug angewachsen ist. Einzelne Tonmineralblättchen (Pfeilspitzen) sind zu erkennen, ebenso die Sandkornoberfläche (S).

11 bis 70 und mehr Zellen umfassen kann. Die Zellgröße der typischen Bakterien lag bei einer Länge von 1,0 µm bis 1,4 µm und einer Breite von ca. 0,55 µm. Ein geringer Anteil der Zellen zeigte Septenbildung und damit Teilung, woraus auf ein mäßiges aber signifikantes Wachstum geschlossen werden kann. Inwieweit Tonminerale als amorpher dünner Überzug des Sandkorns für das Wachstum der autochthonen Gemeinschaft notwendig ist, kann ultrastrukturell nicht weiter geklärt werden, da die Aufwuchsstellen stets in tonmineralhaltiger Umgebung liegen (Abb. 1a: Sternchen; 1b: Pfeilspitzen). Wir konnten an anderen mit Chlororganika belasteten Standorten eine aktive Wechselwirkung der Bakterien mit den schadstoffbeladenen Tonpartikeln nachweisen (Lünsdorf et al. 1999, Abraham et al. 1999).

### Literatur

- Abraham W.-R., H. Lünsdorf, B. Nogales, E. R. B. Moore und K. N. Timmis. 1999. Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaft in einem PCB-belasteten Heideboden. In: Biologische Sicherheit. Proceedings zum BMBF-Workshop 10./11.6.1999 in München. A. Hartmann (Ed.), im Druck.
- Abraham, W.-R., Tesar, M., Nogales, B. & Lünsdorf, H. (1997) Phylogenetische und funktionelle Vielfalt der Aromaten abbauenden Bakterien im kontaminierten Aquifer von Bitterfeld. In: Weiß, H., Teutsch, G. & Daus, B. (Hrsg.): Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA) - Bericht zur Machbarkeitsstudie für den Modellstandort Bitterfeld, UFZ-Bericht 27/1997, ISSN 0948-9452, Januar 1998, Leipzig, 131-136.
- Abraham, W.-R., Wenderoth, D, Jeschke, T. (1999) Physiologische Diversität Aromaten-abbauender Bakterien im kontaminierten Aquifer. In: Weiß, H., Daus, B. & Teutsch, G. (Hrsg.): SAFIRA - 2. Statusbericht, UFZ-Bericht 17/1999, ISSN 0948-9452, Leipzig, 43-47.
- Dermetzel J. und G. Christoph. 1997. Untersuchungen zur Wechselwirkung Braunkohle/Grundwasser. In: Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA), H. Weiß, G. Teutsch and B. Daus Eds., UFZ-Bericht 27/1997, ISSN 0948-9452, 99- 116.
- Lünsdorf H., R. W. Erb, W.-R. Abraham, und K. N. Timmis. 1999. "Clay hutchies": a novel interaction between bacteria and clay minerals. Environm. Microbiol., angenommen.

### 3.5 Vergleichende Untersuchungen des Chloraromatenabbaus im Bitterfelder Grundwasser durch Spezialkulturen und die autochthone Mikroflora

P. ROSENBROCK, S. LANGENER, W.-R. ABRAHAM, D. PIEPER.

GBF- Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abt. Umweltmikrobiologie,  
Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig

#### Einleitung

Im Rahmen der Untersuchungen zur biologischen Sanierung des quartären Aquifers im Raum Bitterfeld sollte die vorliegende Arbeit klären, inwiefern der Abbau der Leitschadstoffe Chlorbenzol (CB), 1,2- und 1,4-Dichlorbenzol (1,2- bzw. 1,4-DCB) durch die Inokulation von Spezialstämmen gesteigert werden kann. Hierbei sollten Bedingungen gewählt werden, die einer Sanierungsmaßnahme entsprechen. In einem Screening unter Laborbedingungen wurden geeignete Bakterienstämme ausgewählt, die aerob CB abbauen, darunter sowohl Wildstämme als auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus (GEM). In Grundwassermikrokosmen wurden diese Spezialstämmen hinsichtlich ihrer Abbaukapazität *in situ*, d.h. in Konkurrenz mit der autochthonen Mikroflora unter umweltnahen Bedingungen untersucht (Bioaugmentationsversuche). Ferner sollte die Persistenz der inokulierten Stämme nach Abbau der Schadstoffe bestimmt werden.

Verglichen wurde der Abbau in diesen Bioaugmentationsvarianten mit dem Abbaupotential der autochthonen Mikroflora, die durch Zugabe der Elektronenakzeptoren Sauerstoff bzw. Nitrat sowie durch Zugabe von Stickstoff und Phosphat stimuliert wurden (Biostimulationsvarianten).

#### Methodik

##### *Grundwassermikrokosmen*

Das Grundwasser für die Mikrokosmen wurde dem hochkontaminierten Pegel SafBit 7 aus 20 m Tiefe am 20.04.99 entnommen. Für die als *batch*-Kultur geführten Mikrokosmen dienten sterilisierte 1l-Schottflaschen, die vor Versuchsbeginn für 4 h bei 180°C ausgeheizt wurden. Die Flaschen waren mit gebohrten Deckeln, in die



Teflon-beschichtete Silikon-Septen eingelegt wurden, verschlossen, durch die alle Proben im Versuchsverlauf mit Hilfe von Spritzen entnommen werden konnten. Das Grundwasservolumen in den Mikrokosmen betrug zu Versuchsbeginn 800 ml (nach Probenahme  $t_0$ ). Die Grundwassermikrokosmen wurden statisch bei 13°C inkubiert.

Für Versuche unter anaeroben Bedingungen wurde der durch den Pumpvorgang und Mischung in das Grundwasser eingetragene Sauerstoff durch Einleiten von Stickstoff bis auf einen  $O_2$ -Gehalt von 0,1 - 0,4 mg  $l^{-1}$  ausgetrieben. Für Versuche unter aeroben Bedingungen dienten ca. 2 mg  $O_2$   $l^{-1}$  Grundwasser (eingetragen durch Pumpvorgang, Mischung, Abfüllen) sowie ca. 300 ml Luft (entspricht ca. 2,8 mmol  $O_2$ ) in den Mikrokosmen als Sauerstoffquelle.

Das Grundwasser wurde vor Beginn des Versuchs mit CB (30 mg  $l^{-1}$ ), 1,2- und 1,4-DCB (je 2 mg  $l^{-1}$ ) gespickt, da es durch die Vorbehandlung zu einer Ausgasung der Schadstoffe kam. Zu diesem Zweck wurden die DCBs im CB gelöst und das Gemisch mittels einer Spritze durch das Septum in den Mikrokosmos direkt appliziert.

Für die Mikrokosmenversuche wurden drei CB-abbauende Spezialstämme ausgesucht, die sich unter Laborbedingungen durch gute Abbauleistungen auszeichneten: *Pseudomonas aeruginosa* RHO1, *Pseudomonas putida* GJ31 (zur Verfügung gestellt von D. Janssen, Groningen, Niederlande), sowie der genetisch veränderte Stamm *Pseudomonas putida* F1 $\Delta$ CC (Lehning, 1998). Diese Spezialstämme wurden mit resultierenden Zelldichten von  $10^5$   $ml^{-1}$  und  $10^6$   $ml^{-1}$  in das Grundwasser inokuliert. Für die Inokulation der Spezialstämme wurden diese in Flüssigkulturen (30°C, 150 rpm) mit CB (Zugabe über die Gasphase, insgesamt 3,3 mM) als alleinige Kohlenstoffquelle angezogen, gegen Ende der exponentiellen Phase geerntet und zweimal in Phosphatpuffer (24 mM) gewaschen. Bis zum Beginn des Versuchs wurden die Zellen für 48 h bei 4 °C gelagert. Das Grundwasser in diesen Bioaugmentationsversuchen wurde mit  $NH_4^+$  (100  $\mu$ M) und  $PO_4^{3-}$  (25  $\mu$ M) versetzt.

Als Biostimulationsversuche wurden eine aerobe Variante ohne und mit  $NH_4^+$  (100  $\mu$ M) und  $PO_4^{3-}$  (25  $\mu$ M) Zugabe durchgeführt. Als anaerobe Varianten dienten

Versuche mit Zugabe von  $\text{NO}_3^-$  (2,14 mM) als Elektronenakzeptor ohne und mit  $\text{NH}_4^+$  (100  $\mu\text{M}$ ) und  $\text{PO}_4^{3-}$  (25  $\mu\text{M}$ ) Zugabe.

Der abiotische Verlust an CB während des Versuchs wurde mittels einer Variante mit sterilem Grundwasser (Druckfiltration < 0,2  $\mu\text{m}$ ) bestimmt. Alle Versuchsvarianten wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

#### *Bestimmung der Chlorbenzole*

Die Konzentration von CB, 1,2- und 1,4-DCB im Grundwasser während des Versuchsverlaufs wurde mittels HPLC bestimmt (Injektor Waters 712 WISP; Waters 510 HPLC pump; Waters 996 PAD, Detektion bei 217 nm; Säule Nucleosil 120-C8 5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm ID; Water Millenium Software; Laufmittel Methanol/Wasser 70/30, 0,1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; Säulentemperatur 20°C). Die Proben wurden mittels gasdichter Spritzen (SGE, Weiterstadt) durch die Septen genommen, in evakuierte HPLC-vials eingespritzt und sofort bei -22 °C bis zur Analyse gelagert.

#### *Bestimmung der Gesamtzellzahlen*

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl in den Grundwasserproben erfolgte nach Filtration (Anodisc 25, 0,2  $\mu\text{m}$ , 25 mm, Whatman; Trägerfilter Cellulose-Nitrat, 0,45  $\mu\text{m}$ , 25 mm, Satorius) und Färbung mit dem Farbstoff SYBR Green I (Molecular Probes) (Weinbauer *et al.*, 1998) durch Auszählen am Epifluoreszenz Mikroskop (Axiophot 135 TV, Filter 09, Zeiss).

#### *Spezifischer Nachweis der inokulierten Mikroorganismen*

Der inokulierte Stamm *P. putida* F1 $\Delta$ CC konnten innerhalb der autochthonen Mikroflora spezifisch mittels fluoreszierender *in situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen mit einer Art-spezifischen Oligonucleotid-Sonde für *Pseudomonas putida* hybridisiert (DuTeau *et al.*, 1998). Diese Sonde hybridisiert mit der variablen V4-Region der 16S rRNA und ist mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 gekoppelt. Die Immobilisierung und Hybridisierung auf Objektträgern erfolgte wie von Amann (1995) beschrieben. Die Zellen wurden für 1,5 h bei 45°C hybridisiert (Hybridisierungspuffer 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 % SDS) und anschließend für 20 min bei 45°C gewaschen. Die Sondenkonzentration in der Hybridisierungslösung betrug 8 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ . Anschließend

wurde eine Gesamtzellfärbung mit SYBR Green I durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Epifluoreszenz Mikroskop (Axiophot 135 TV, Zeiss; Filter 09, Zeiss; Filter HQCy3, AF Analysentechnik, Tübingen). Eine Kreuzreaktion der Sonde mit der autochthonen Mikroflora konnte in unbehandelten Grundwasserproben nicht beobachtet werden.

## Ergebnisse

In den Abbildungen 1 bis 6 ist die Konzentration an CB, 1,2- und 1,4-DCB im Verlauf der Abbauxperimente dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Parallelen. In den Diagrammen ist die jeweilige Standardabweichung (+ SD) angegeben.

Die Stimulation der autochthonen Mikroflora durch die O<sub>2</sub>-Zufuhr führte nach einer 5-tägigen *lag*-Phase zu einem vollständigen CB-Abbau innerhalb von insgesamt 13 Tagen. Durch die Zugabe der Nährstoffe NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> wurde der Abbau beschleunigt, so daß schon nach 9 Tagen kein CB mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 1).

Unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen (2,14 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) erfolgte der vollständige CB-Abbau sowohl mit als auch ohne NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-Zugabe innerhalb von 13 Tagen. Bei Zugabe von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> verlief der Abbau im Vergleich zur Variante ohne NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> etwas beschleunigt. In diesen Versuchen wurde eine *lag*-Phase von ca. 6 - 7 Tagen beobachtet (Abb. 1). In beiden Varianten konnte eine deutliche Abnahme der NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration im Grundwasser um 0,75 bis 1 mM nachgewiesen werden.

Für die Versuche zur Bioaugmentation unter aeroben Bedingungen wurde das Grundwasser wie in den Biostimulationsversuchen mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> versetzt. Die Inokulation der Spezialstämme beschleunigte den Abbau im Vergleich zu den Biostimulationsversuchen. So konnte bereits 4 Tage nach Inokulation der Spezialstämme *P. putida* F1ΔCC und *P. putida*. GJ31 in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> kein CB im nachgewiesen werden, wobei der Abbau bereits nach einer eintägigen *lag*-Phase einsetzte (Abb. 2). Die Inokulation dieser Spezialstämme in

einer Zelldichte von  $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  führte im Vergleich zur Variante mit Inokulation von  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  zu einer verlängerten *lag*-Phase von 2 - 3 Tagen, so daß erst nach 7 Tagen kein CB mehr nachgewiesen werden konnten (Abb. 2).

Die Inokulation des Spezialstamms *P. aeruginosa* RHO1 führte im Vergleich zur stimulierten ( $\text{NH}_4^+$  /  $\text{PO}_4^{3-}$ ) jedoch nicht inokulierten Variante zu einem verlangsamt CB-Abbau. Erst nach 13 Tagen konnte kein CB mehr nachgewiesen werden (Abb. 2). Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche negative Interaktion zwischen der autochthonen Mikroflora und diesem inokulierten Spezialstamm hin.

Der Abbau des 1,2- und 1,4-DCB verlief in den Biostimulationsversuchen ähnlich dem CB-Abbau. Lediglich in der aeroben Variante ohne Zugabe von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  konnte kein vollständiger Abbau der DCBs innerhalb von 13 Tagen nachgewiesen werden (Abb. 3, 5).

Auch in den Bioaugmentationsversuchen wurde der Abbau der DCB analog zu dem des CB beobachtet. Bei Inokulation von  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  des genetisch veränderte Stammes F1 $\Delta$ CC wurden die DCBs jedoch schneller abgebaut als bei Inokulation mit dem Stamm GJ31 in gleicher Zelldichte (Abb. 4, 6).

In den Abbildungen 7 bis 10 sind die Gesamtzellzahlen in den Biostimulationsversuchen und Bioaugmentationsversuchen (Mittelwerte aus 3 Parallelen, + SD) dargestellt. Zusätzlich ist für die Varianten mit Inokulation von F1 $\Delta$ CC der prozentuale Anteil des inokulierten Spezialstamms an der Gesamtmikroflora zu einigen Zeitpunkten als Balken dargestellt (Abb. 8).

Die Zellzahl im Grundwasser des Pegels SafBit 7 lag zum Zeitpunkt der Probenahme bei  $8 \times 10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ . Die Zunahme der Zelldichte begann nach einer *lag*-Phase von einem Tag, war unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen langsamer als unter aeroben und spiegelt somit den Verlauf der CB-Abnahme in den aeroben und anaeroben Varianten wider. In den aeroben Varianten wurden mit ca.  $4$  bis  $8 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  eine größere Zelldichte erreicht als in den anaeroben Varianten. Nach Abbau der CB fielen die Zellzahlen in den aeroben

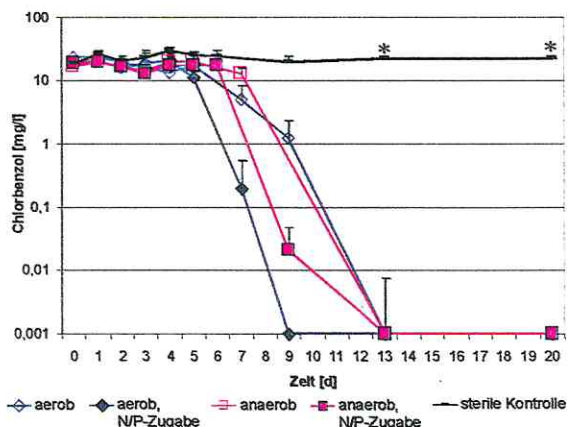


Abbildung 1: Chlorbenzol-Konzentration [mg l<sup>-1</sup>] im Grundwasser im Verlauf der Biostimulationsversuche (n=3; \* n=1).

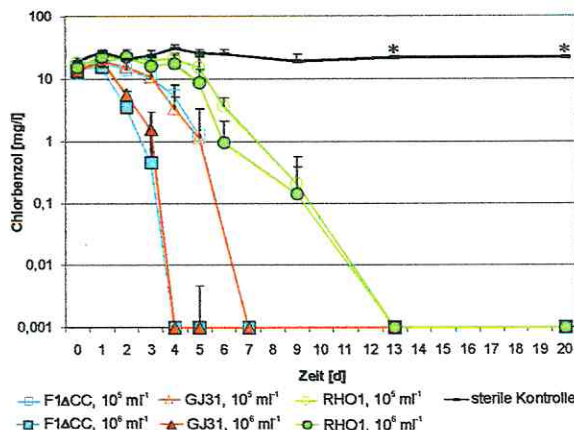


Abbildung 2: Chlorbenzol-Konzentration [mg l<sup>-1</sup>] im Grundwasser im Verlauf der Bioaugmentationsversuche (n=3; \* n=1).

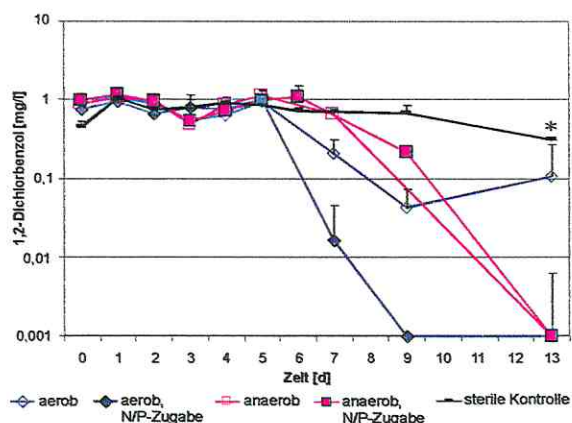


Abbildung 3: 1,2-Dichlorbenzol-Konzentration [mg l<sup>-1</sup>] im Grundwasser im Verlauf der Biostimulationsversuche (n=3; \* n=1).

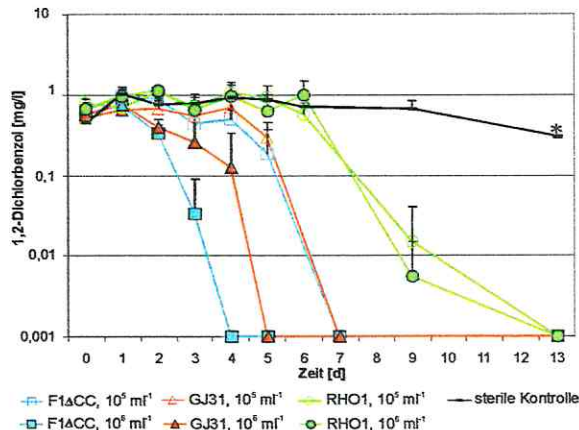


Abbildung 4: 1,2-Dichlorbenzol-Konzentration [mg l<sup>-1</sup>] im Grundwasser im Verlauf der Bioaugmentationsversuche (n=3; \* n=1).

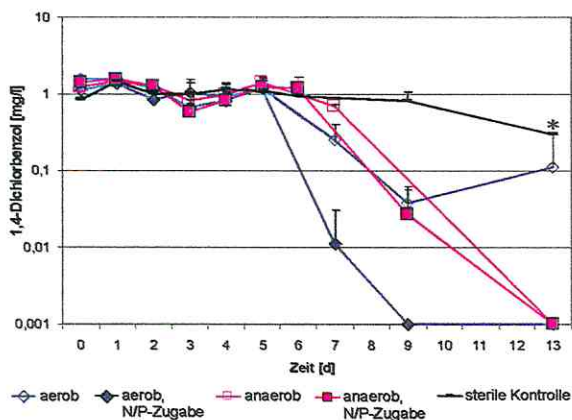


Abbildung 5: 1,4-Dichlorbenzol-Konzentration [mg l<sup>-1</sup>] im Grundwasser im Verlauf der Biostimulationsversuche (n=3; \* n=1).

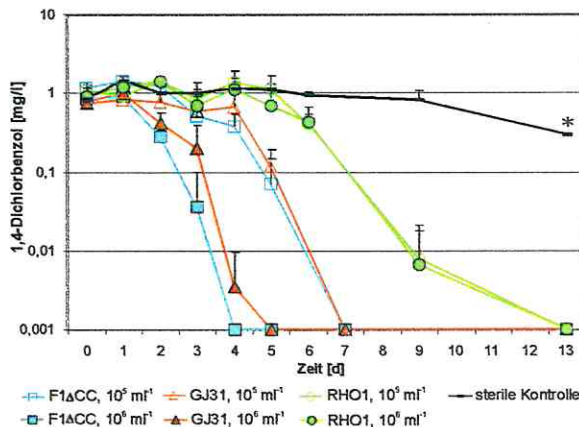


Abbildung 6: 1,4-Dichlorbenzol-Konzentration [mg l<sup>-1</sup>] im Grundwasser im Verlauf der Bioaugmentationsversuche (n=3; \* n=1).

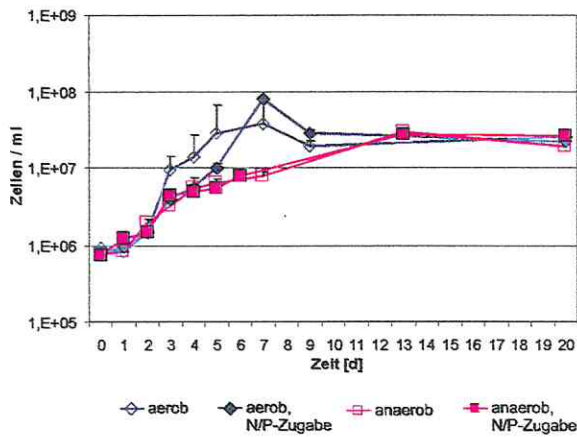


Abbildung 7: Verlauf der Gesamtzellzahlen im Grundwasser in den Biostimulationsversuchen.

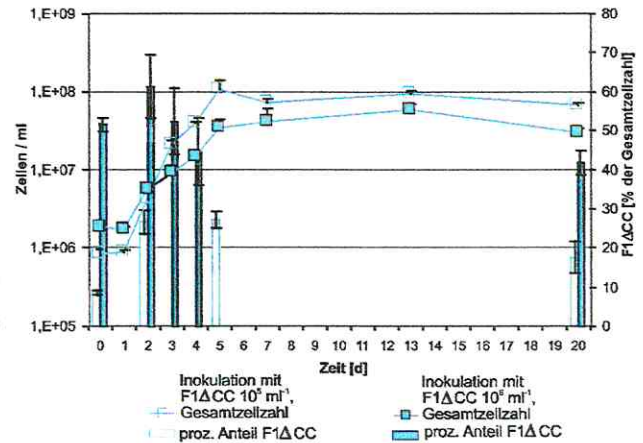


Abbildung 8: Verlauf der Gesamtzellzahlen im Grundwasser in den Versuchen mit Inokulation des Stammes *P. putida* F1ΔCC und der prozentuale des inokulierten Stammes an der Gesamtzellzahl.

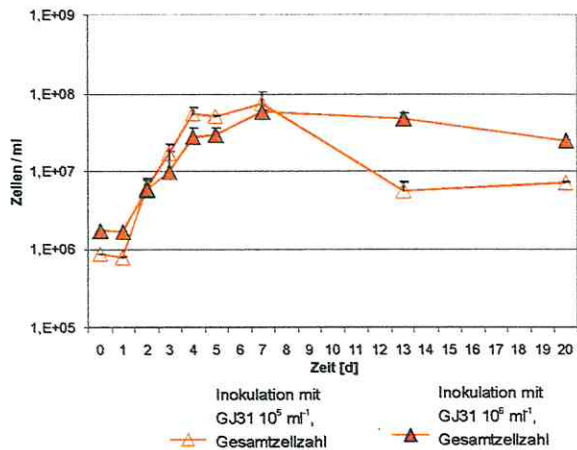


Abbildung 9: Verlauf der Gesamtzellzahlen im Grundwasser in den Versuchen mit Inokulation des Stammes *P. putida* GJ31.

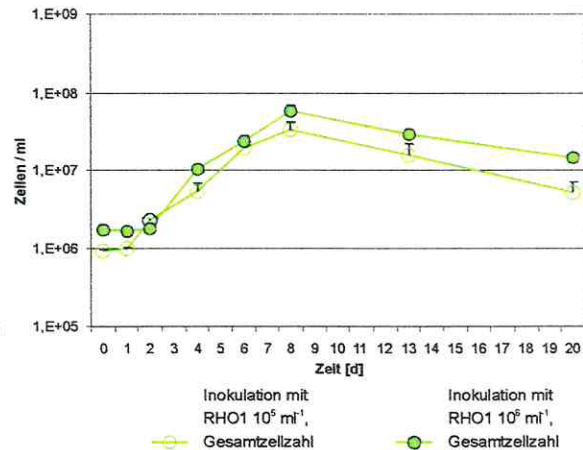


Abbildung 10: Verlauf der Gesamtzellzahlen im Grundwasser in den Versuchen mit Inokulation des Stammes *P. aeruginosa* RHO1.

Biostimulationsvarianten auf Werte um  $2 - 2,5 \times 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ , wie sie auch in den anaeroben Varianten erzielt wurden (Abb. 7).

Der Verlauf der Zellzunahme in den Bioaugmentationsversuchen mit F1ΔCC bzw. GJ31 verlief ähnlich wie in den aeroben Biostimulationsvarianten. Nach einer eintägigen *lag*-Phase stiegen die Zellzahlen exponentiell an. Der Rückgang der Zellzahlen setzte nach dem 7 bis 8 Tag ein (Abb. 8,9), d.h. in den Varianten mit Inokulation von  $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  direkt nach Verbrauch der CB/DCB, in den Varianten mit Inokulation von  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  deutlich nachdem die Substratquelle erschöpft war.

Der prozentuale Anteil des inokulierten Stamms F1 $\Delta$ CC an der Gesamtzellzahl stieg im Verlauf der Inkubation von 8,6 % (Inokulation mit  $10^5$  Zellen ml $^{-1}$ ) bzw. 51,6 % (Inokulation mit  $10^6$  Zellen ml $^{-1}$ ) in den ersten zwei Tagen der Inkubation auf 26 % bzw. 61 % an, fiel anschließend aber wieder und erreichte nach 20-tägiger Inkubation Werte von 17,5 % bzw. 42 % (Abb. 8).

Die deutlich langsamere Zunahme der Zellzahlen in der Variante mit Inokulation von *P. aeruginosa* RHO1 (Abb. 10) reflektiert den vergleichsweise langsamen Abbau der CB/DCBs (Abb. 2,4,6) und verstärkt die Annahme einer negativen Interaktion zwischen der autochthonen Mikroflora und dem inokulierten Spezialstamm RHO1.

### Diskussion

In den vorliegenden Mikrokosmenstudien konnte das Abbaupotential der autochthonen Mikroflora unter aeroben wie anaeroben Bedingungen mit  $\text{NO}_3^-$  als terminalem Elektronenakzeptor belegt werden. Diese Untersuchungen zur Biostimulation deuten darauf hin, daß die im Bitterfelder Aquifer beobachtete Persistenz der Chloraromaten in erster Linie auf das Fehlen von Elektronenakzeptoren zurückzuführen ist. Eine zum CB-Abbau befähigte Mikroflora ist im untersuchten Bitterfelder Grundwasser des Pegels SafBit 7 vorhanden. Die beobachtete lag-Phase von 5 bis 7 Tagen trotz Anstieg der Zellzahlen ist neben einer Phase der Induktion beteiligter Enzyme vermutlich hauptsächlich auf das Anwachsen auf eine für einen nachweisbaren Abbau ausreichende Zelldichte zurückzuführen. Des Weiteren scheint ein Defizit an verfügbarem  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  vorzuliegen, da die Zugabe von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  unter aeroben wie denitrifizierenden Bedingungen zu einer Beschleunigung des Abbaus führte.

Die Inokulation der Spezialstämmen *P. putida* F1 $\Delta$ CC und GJ31 in den Bioaugmentationsvarianten beschleunigte den Abbau der Chlorbenzole und erwies sich unter den gegebenen Bedingungen in Mikrokosmen, die als aerobe batch-Kulturen bei 13°C geführt wurden, als leistungssteigernde Behandlung. Die Beschleunigung des Abbaus resultierte in erster Linie aus einer Verkürzung der lag-Phase, für die es zwei Gründe gibt. Zum einen erfolgte die Inokulation der Spezialstämme mit induzierten Zellen, d.h. nach Anzucht auf Chlorbenzol und Ernte

in der späten exponentiellen Phase. Zum anderen wurde durch die Inokulation die Anzahl katalytisch aktiver Zellen im Grundwasser derart erhöht, daß schneller ein nachweisbarer Abbau der CB/DCB erfolgen konnte.

In den ersten zwei Tagen der Inkubation nahm der Anteil des inokulierten Stamms F1 $\Delta$ CC im Vergleich zur autochthonen Mikroflora überproportional zu (Abb. 8). Dies ist ein Hinweis dafür, daß der Stamm während des Wachstums mit CB nicht nur neben der autochthonen Mikroflora koexistiert, sondern zusätzlich aufgrund schnelleren Wachstums einen zunehmend größeren Anteil an der Gesamtmikroflora einnimmt. Der Rückgang des F1 $\Delta$ CC-Anteils im weiteren Verlauf ist auf den Verbrauch der Chloraromaten zurückzuführen.

Während die Inokulation von *P. putida* F1 $\Delta$ CC und GJ31 zu einer Leistungssteigerung in den Abbaubersuchen führte, wurde der CB/DCB-Abbau in den Bioaugmentationsvarianten mit *P. aeruginosa* RHO1 im Vergleich zur aeroben Biostimulationsvariante gehemmt. Ein möglicher Grund für diese negative Interaktion ist möglicherweise die Bildung von toxischen Zwischenverbindungen.

### **Ausblick**

Zusammenfassend konnten diese Untersuchungen belegen, daß sich der Einsatz von Spezialstämmen im Falle *P. putida* F1 $\Delta$ CC und GJ31 unter den gewählten, realitätsnahen Bedingungen in Anwesenheit der Grundwassermikroflora leistungssteigernd auf den CB-Abbau auswirkte. Es bleibt jedoch zu untersuchen, inwiefern sich die Leistungssteigerung lediglich durch die Verkürzung der *lag*-Phase ausdrückt oder ob auch die Umsatzleistungen der Spezialstämme die der autochthonen Mikroflora übertreffen. Zu diesem Zweck sind Versuche in kontinuierlich geführten Aquifermikrokosmen geplant. Diese Mikrokosmen werden in Kooperation mit dem Institut für Hydrologie der GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg, konstruiert.

Ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen wird die Persistenz der inokulierten Mikroorganismen nach Abschluß des Schadstoffabbaus sein. Zu diesem Zweck



werden sowohl die Methode der fluoreszierenden in situ Hybridisierung sowie der Immunofluoreszenz für weitergehende Untersuchungen optimiert.

## Literatur

- Amann, R. I. (1995). In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, 1-15.
- DuTeau, N.M., Rogers, J.D., Bartholomay, Ch. T., Reardon, K.F. (1998). Species-specific oligonucleotides for enumeration of *Pseudomonas putida* F1, *Burkholderia* sp. JS150, and *Bacillus subtilis* ATCC 7003 in biodegradation experiments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4994 – 4999.
- Lehning, A. (1998). Untersuchung zum Metabolismus von Chlortoluolen: Konstruktion Chlortoluol und Chlorbenzylalkohol verwertender Mikroorganismen. Dissertation, TU Braunschweig.
- Weinbauer, M., Beckmann, Ch., Höfle, M. (1998). Utilization of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminum oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 5000 – 5003.

### **3.6 Mehrskalige experimentelle Systeme zur Leistungssteigerung der Bodenmikroflora zum Abbau chlorierter Verbindungen**

I. SCHEUNERT

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie,  
Ingoldstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

#### **Einleitung**

Chlorierte organische Verbindungen sind nach Eintrag in Umweltkompartimente besonders persistent. Ursache ist die C-Cl-Bindung, die grundsätzlich die häufige Persistenz dieser Stoffklasse in der Umwelt bedingt (Müller und Lingens, 1986). In Anbetracht ihrer Toxizität ist es von erheblicher Bedeutung, die biologischen Mechanismen für den Abbau festzustellen. Obwohl die C-Cl-Bindung nicht völlig naturfremd ist, sondern auch von der Natur selbst produziert wird (Naumann, 1993), sind doch Mechanismen zu ihrer Spaltung in der Natur nicht weit verbreitet und kaum erforscht.

In den hier dargestellten Untersuchungen wurde Oberboden herangezogen, zumal er mikrobiell aktiv ist. Er dürfte das mikrobielle-biochemische Potential für die Abbaureaktionen besitzen. Die positiven Reaktionen werden es erlauben, die Prozesssteuerung zu verstehen und eine mathematische Beschreibung abzuleiten. Zudem wurden in früheren Jahren chlorierte Verbindungen in großen Mengen als Pestizide auf unsere Böden aufgebracht sowie unbeabsichtigt durch trockene und nasse atmosphärische Deposition, durch feste Abfälle und Abwässer. Die Forschungsansätze zur Klärung des Abbaus an solchem Material werden auf andere feste Umweltmaterialien wie Grundwasserleiter übertragbar sein.

Für den Abbau chlorierter organischer Verbindungen ist die Dechlorierung des Grundmoleküls eine Schlüsselreaktion. Nach erfolgter Dechlorierung sind die nicht oder niederchlorierten Stoffe der mikrobiellen Mineralisierung allgemein leicht zugänglich.

Unten den verschiedenen biologischen Dechlorierungsmechanismen (oxidative Dechlorierung, reduktive Dechlorierung, hydrolytische Dechlorierung, thiolytische

Dechlorierung; Scheunert, 1994) gilt die reduktive Dechlorierung, bei der in einem anaeroben Prozess das Chlor im Molekül entweder durch Wasserstoff ersetzt oder unter Ausbildung von Doppelbindungen abgespalten wird, als der bedeutendste Mechanismus zur Abspaltung von Chlor.

Ziel dieses Teilprojekt-Beitrags ist es deshalb, die Leistung der zur reduktiven Dechlorierung befähigten, natürlich im Boden vorkommenden Mikroorganismen durch Optimierung der erforderlichen Lebensbedingungen zu steigern. Das Redoxpotential des Bodens ist hierbei ein wichtiger Einflußfaktor. Als experimentelle Modelle werden mehrphasige Systeme eingesetzt. Erste Phase ist die Dechlorierung, zweite Phase die Mineralisierung des nieder- und unchlorierten Moleküls (völliger Abbau zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}^-$  und anderen kleinen Molekülen).

## **Methodik**

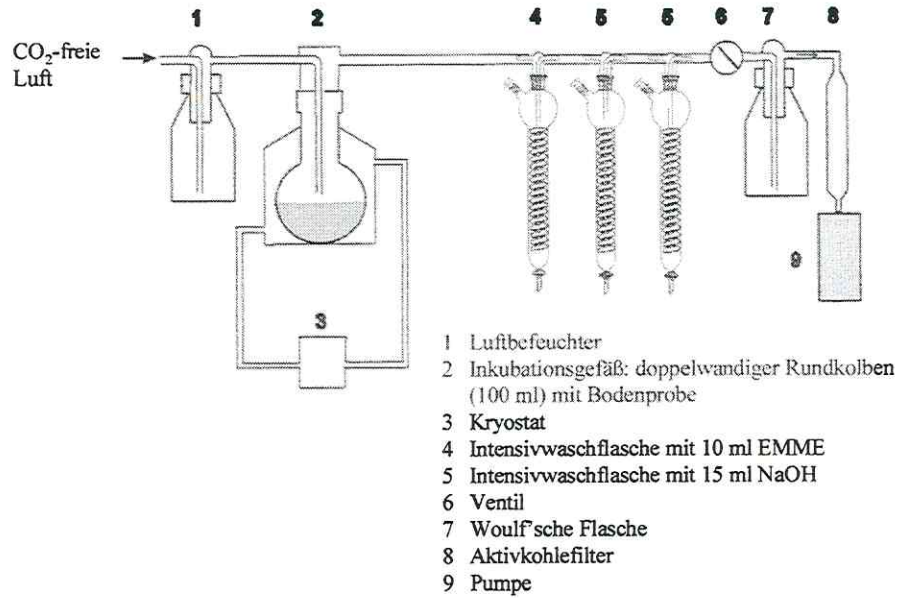
### *Labor- Skala*

Zur Quantifizierung der Dechlorierung wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt bzw. vorbereitet:

1. Quantifizierung in Bodenmaterial über die Bestimmung der Anreicherung von freiem  $^{36}\text{Cl}^-$  aus zugesetzten  $^{36}\text{Cl}$ -markiertem Hexachlorbenzol.
2. Identifizierung und Quantifizierung der entstandenen Dechlorierungsprodukte durch GC und / oder HPLC/MS.

Zur Quantifizierung der Mineralisierung werden  $^{14}\text{C}$ -markierte Modellsubstanzen eingesetzt.

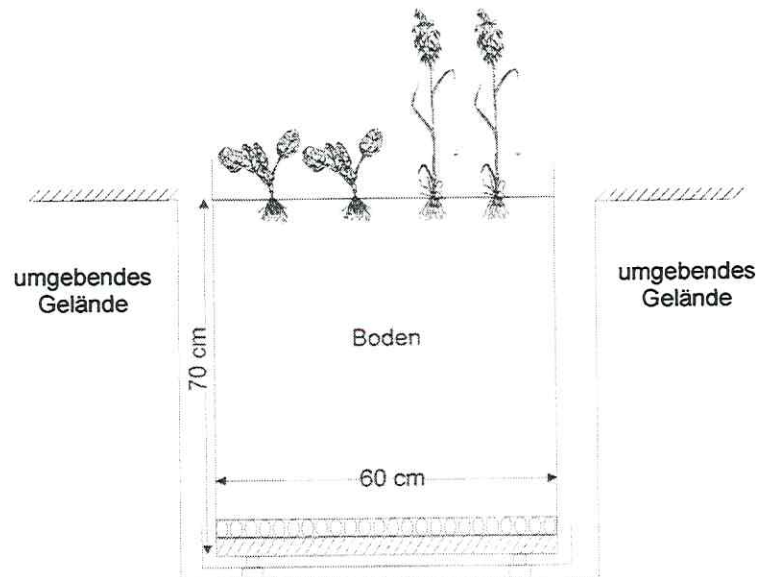
In einer geschlossenen Apparatur mit kontrollierter Atmosphäre werden die  $^{14}\text{C}$ -markierten Modellsubstanzen mit Bodenproben unter verschiedenen, kontrollierten Versuchsbedingungen inkubiert, das entstehende  $^{14}\text{CO}_2$  durch Belüftung in ein Fallensystem überführt, in einer alkalischen Szintillatorlösung absorbiert und durch Szintillationszählung quantifiziert (Scheunert et al., 1987; Reuter, 1998; Abb. 1). Die Bodenatmung wird ebenfalls über  $\text{CO}_2$ -Analyse gemessen.



**Abb. 1:** Inkubationssystem zur Bestimmung der Biomineralisierung  $^{14}\text{C}$ -markierter Umweltchemikalien sowie der Bodenatmung

### *Lysimeter-Skala*

Zur Übertragung der im Labor als optimal erwiesenen Versuchsbedingungen auf die Freilandebene stehen einfache Kleinlysimeter zur Verfügung, auf die vor 15-20 Jahren  $^{14}\text{C}$ -markierte hochchlorierte Verbindungen aufgebracht worden waren (Abb. 2). Diese Verbindungen stellen heute „gealterte“ Rückstände dar, die z. T. in nicht-extrahierbarer, bodengebundener Form vorliegen.



**Abb. 2:** Kleinlysimeter zur Untersuchung des Langzeitverhaltens  $^{14}\text{C}$ -markierter Umweltchemikalien im Boden-Pflanzen-System unter Freilandbedingungen

## Ergebnisse

*Quantifizierung der Dechlorierung durch Bestimmung von  $^{36}\text{Cl}^-$  aus  $^{36}\text{Cl}$ -Hexachlorbenzol*

$^{36}\text{Cl}$ -Hexachlorbenzol wurde 140 Tage lang anaerob in Proben des Oberbodens von drei verschiedenen Standorten mit unterschiedlichen organisch/energetischen Substraten und zum Teil Inokulum-Zugaben inkubiert. Die Freisetzung von  $^{36}\text{Cl}^-$  in % der applizierten Radioaktivität ist in Tabelle 1 dargestellt (Rosenbrock et al., 1999).

**Tab. 1:** Freisetzung von  $^{36}\text{Cl}$  - aus [U- $^{36}\text{Cl}$ ]-Hexachlorbenzol in Prozent der applizierten Radioaktivität nach 140 Tagen anaerober Inkubation mit unterschiedlichen Substrat- und Inokulumzugaben (BGRS: Biogasreaktorschlamm)

Behandlung	Versuchsböden		
	sLU (1,5% C <sub>org</sub> )	uS (2,1% C <sub>org</sub> )	uS (6,7% C <sub>org</sub> )
	[% $^{36}\text{Cl}$ ]	[% $^{36}\text{Cl}$ ]	[% $^{36}\text{Cl}$ ]
steril	0,0	0,0	0,0
ohne Substratzugabe	0,0	0,0	38,77
Glucose	6,37	0,0	37,13
Glucose + Tween80	0,94	0,0	38,39
Strohmehl	36,89	0,0	41,48
Grasschnitt	23,84	0,0	41,15
Laktat	1,87	0,0	38,39
Laktat + anaerobes Consortium	32,0	10,72	44,74
Rindermist	33,41	0,0	36,16
BRGS + Acetat	4,45	1,86	35,86
Faulschlamm	33,52	0,26	33,29

#### *Quantifizierung der Dechlorierung durch Bestimmung der entstandenen Produkte*

Bei der Messung der Dechlorierung ist nicht nur die Quantität des freigesetzten Chlorids von Bedeutung, sondern in noch höherem Maße die chemische Identität und Quantität der (teil-)dechlorierten Produkte wegen potentieller toxischer oder ökotoxischer Wirkungen. Hierzu sind die Experimente noch in Vorbereitung. In früheren Arbeiten wurde mit Hilfe der GC und GC/MS z. B. festgestellt, daß Pentachlorphenol in geflutetem Reisboden zu drei verschiedenen Tetrachlorphenol-Isomeren und sechs verschiedenen Trichlorphenol-Isomeren dechloriert wird (Weiß et al., 1982).

#### *Quantifizierung der Mineralisierung*

Um die Mineralisierung  $^{14}\text{C}$ -markierter Fremdstoffe unter aeroben und anaeroben Bedingungen vergleichen zu können, wurden Vorversuche mit 13 Umweltchemikalien in Bodensuspension, die entweder mit Sauerstoff oder Stickstoff begast wurden, durchgeführt. Obwohl diese Versuchsbedingungen nicht realen Umweltbedingungen entsprechen, konnte als Trend festgehalten werden, daß die

meisten Testsubstanzen unter aeroben Bedingungen deutlich besser mineralisiert wurden als unter anaeroben Bedingungen. Ausnahmen waren chlorierte Verbindungen wie Lindan (nach 42 Tagen aerob 1,9%, anaerob 3%), DDT (nach 5 Tagen aerob 0,1%, anaerob 0,3%) und 2,4-D (nach 14 Tagen aerob 0,5%, anaerob 0,7%).

### **Diskussion**

Die reduktive Dechlorierung des Hexachlorbenzols erfolgt mikrobiell. Sie ist möglich in Boden- und Sedimentmaterial, wenn organisches Material als Wasserstoffdonator vorhanden ist. Der Prozeß wird entsprechend durch organische Substrate unterschiedlich gesteigert. Die Mineralisierbarkeit der hochchlorierten Stoffe in Bodenmaterialien kann also dadurch erhöht werden, daß der Chlorierungsgrad *in situ* durch das vorhandene mikrobielle Potential vermindert wird.

### **Ausblick**

In Laborversuchen werden die optimalen Bedingungen für eine intensive reduktive Dechlorierung erarbeitet. Dies erfolgt nicht nur für Hexachlorbenzol, sondern auch für andere hochchlorierte Fremdstoffe (z.B. PCB). Die entstandenen niedriger chlorierten oder dechlorierten Produkte werden durch GC und/oder HPLC/MS identifiziert und quantifiziert. Die nach Dechlorierung erhaltenen Substanzgemische werden im Hinblick auf ihrer Mineralisierbarkeit im Laborsystem und die erforderlichen Bedingungen dafür untersucht. Die nachfolgende Analyse gilt den restlichen Abbauprodukten.

Neben dem Abbau frisch zugesetzter Verbindungen werden der Abbau gealterter Rückstände und die Optimierung der Bedingungen in Lysimetern untersucht, um das Basiswissen für die vollständige Mineralisierung in anderen Umweltmedien wie Grundwasserleiter zur Verfügung zu stellen.

## Literatur

Müller, R. und Lingens, F. (1986). Mikrobieller Abbau halogener Kohlenwasserstoffe: Ein Beitrag zur Lösung vieler Umweltprobleme? *Angew. Chem.* 98, 778-787.

Naumann, K. (1993). Chlorchemie der Natur. *Chem. unserer Zeit* 27, 33-41.

Reuter, S. (1998). Die Bildung und Stabilität von Abbauprodukten und gebundenen Rückständen des Herbizids Isoproturon in Gegenwart organischer Substrate. Dissertation, Technische Universität München.

Rosenbrock P., Martens M., Buscot F. and J.C. Munch (1999) - Two-step bioremediation of soils contaminated with chloroaromatics. In: *Proceedings 2nd Int. Symposium ISMOM96. Effect of Mineral-Organic-Microorganism Interactions in Soil and Freshwater Environments*, Nancy, France (in press).

Scheunert, I. (1994). Mikrobieller Abbau organischer Fremdstoffe im Boden. *Chem. unserer Zeit* 28, 68-78.

Scheunert, I., Vockel, D., Schmitzer, J. and Korte, F. (1987). Biomineralization rates of  $^{14}\text{C}$ -labelled organic chemicals in aerobic and anaerobic suspended soil. *Chemosphere* 16, 1031-1041.

Weiß, U.M., Scheunert, I., Klein, W. and Korte, F. (1982). Fate of pentachlorophenol- $^{14}\text{C}$  in soil under controlled conditions. *J. Agric. Food Chem.* 30, 1191-1194.



### **3.7 Entwicklung eines prozeßorientierten Modells zum mikrobiologischen Abbau von Chlororganika im Boden.**

K. MA, E. PRIESACK, J.C. MUNCH

GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Bodenökologie,  
Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

#### **Einleitung**

Ziel der in diesem Teilprojekt durchzuführenden Untersuchungen ist die Erarbeitung eines Simulationsmodells, das unter Berücksichtigung des vorherrschenden Redoxklimas den mikrobiellen Abbau von Chlororganika am Beispiel von Pentachlorbiphenyl und Hexachlorbenzol in Böden beschreibt. Dabei soll die dynamische Entwicklung von Aktivität und Wachstum der Schadstoff abbauenden Bakterienpopulationen explizit berücksichtigt werden. Auch sollen in geeigneter Form Bodenstrukturen, die die Redoxbedingungen beeinflussen modelliert werden. Darüber hinaus müssen die wichtigsten Eigenschaften des Stofftransports (Wasserflüsse, Dispersion, Sorption und Kotransport mit der gelösten organischen Substanz) beschrieben werden, um das dynamische Abbauverhalten der Chlororganika in den Böden simulieren zu können.

Das entwickelte Simulationsmodell zum mikrobiellen Chlororganikaabbau soll anhand der Laboruntersuchungen durch inverse Modellierung parametrisiert werden. Wenn auch die Transport- und Standortparameter erfaßt sind, kann das Modell angewandt und überprüft werden sowie schließlich für Prognose- und Szenariorechnungen herangezogen werden.

#### **Methodik und Modellentwicklung**

Das Modell basiert einerseits auf Modellen wie sie zur Beschreibung des Pestizidtransports in Ackerböden eingesetzt werden [Hutson & Wagenet 1993] und fußt andererseits auf Modellen des mikrobiellen Stoffabbaus und Wachstums in Bodenaggregaten bzw. aggregierten Böden [Priesack & Kisser-Priesack 1993, Priesack 1993, Priesack 1994, Augustin et al. 1995, Priesack & Beese 1995, Priesack 1996]. Die Weiterentwicklung des Modells beinhaltet die spezielle Berücksichtigung

mehrerer unterschiedlicher mikrobieller Populationen wie sie in unterschiedlichen Habitaten vorgefunden und charakterisiert werden. Die Populationen sind dabei hinsichtlich Biomasse, Aktivität, Wachstumsdynamik und ihres Beitrags zum Chlororganikaabbau unterschieden.

Da das Modell einer großen Anzahl von Eingangsparametern bedarf, die mit den durchgeführten Untersuchungen nur teilweise ermittelt werden können, müssen eine Reihe von Annahmen und Parameterschätzungen vor allem zu Bodenstruktur und Transportverhalten gemacht werden, um von den Schadstoffabbauverhältnissen in den untersuchten Mikrohabitaten auf das gesamte Bodensystem hochrechnen zu können. Hierzu soll auch die Heterogenität und Variabilität zwischen den Mikrohabitaten berücksichtigt werden.

## Ergebnisse

Als Ausgangspunkt für das zu erweiternde Modell wird ein Mikrostruktur-Modell zu Transport und mikrobiellem Abbau von Stoffen in ungesättigten aggregierten Böden gewählt:

### Modellbeschreibung

Die Modellgleichungen für den Wassertransport sind durch die Richards-Gleichung für den Wassergehalt des mobileren Bereichs  $\theta_m$ , d.h. des Makroporenbereichs zwischen den als kugelförmig angenommenen Bodenaggregaten

$$\frac{\partial \theta_m}{\partial t} + \frac{1 - \omega_m}{\omega_m} \frac{\partial \bar{\theta}_{im}}{\partial t} = C_m \frac{\partial h_m}{\partial t} + \frac{1 - \omega_m}{\omega_m} \frac{\partial \bar{\theta}_{im}}{\partial t} = K_m(h_m) \left( \frac{\partial h_m}{\partial x} - 1 \right) \quad (1)$$

und durch die Richards-Gleichung für den Wassergehalt  $\theta_{im}$  im mikroporösen Einzelaggregat gegeben:

$$\frac{\partial \theta_{im}}{\partial t} = C_{im} \frac{\partial h_{im}}{\partial t} = -\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} [r^2 q_{im}] = -\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} [r^2 (-K_{im} \frac{\partial h_{im}}{\partial r})] \quad (2)$$

wobei die durch die zeitliche Änderung des integralen Wassergehalts  $\bar{\theta}_{im}$  im Aggregat gegebenen Senke in Gleichung (1) durch

$$\bar{\theta}_{im}(t, x) = \frac{3}{a^3} \int_0^a \theta_{im}(t, x, r) r^2 dr \quad (3)$$

und durch das Verhältnis von Inter-Aggregatporenvolumen zu Gesamtporenvolumen  $\omega_m$  beschreiben ist.

Gleichungen (1) und (2) sind weiter durch die Annahme der Stetigkeit des Matrixpotentials am Übergang von Makro- und Mikro-Porenbereich durch eine Randbedingung gekoppelt:

$$h_m(t, x) = h_{im}(t, x), \quad r = a \quad (4)$$

Analog erhält man die Gleichungen für den Stofftransport im mobileren Bereich

$$\frac{\partial}{\partial t}(\theta_m c_m) + \frac{1 - \omega_m}{\omega_m} \frac{\partial}{\partial t}(\overline{\theta_{im} c_{im}}) = \frac{\partial}{\partial x} [D_m \theta_m \frac{\partial c_m}{\partial x} - q_m c_m] - \frac{1 - \omega_m}{Y \omega_m} \left[ \frac{\partial M}{\partial t} - \sigma(M - M_t) \right] \quad (5)$$

und im Aggregatbereich

$$\frac{\partial}{\partial t}(\theta_{im} c_{im}) = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial t} [r^2 (D_{im} \theta_{im} \frac{\partial c_{im}}{\partial r} - q_{im} c_{im})] - \frac{1}{Y} \frac{\partial M}{\partial t} - \sigma(M - M_t) \quad (6)$$

mit

$$\overline{\theta_{im} c_{im}}(t, x) = \frac{3}{a^3} \int_0^a \theta_{im}(t, x, r) c_{im}(t, x, r) r^2 dr \quad (7)$$

und einer durch die Wachstumsgleichung

$$\frac{\partial M}{\partial t} = \left[ \mu_{\max} \frac{c_{im}}{c_{im} + K_{c_{im}}} - \sigma Y \left( 1 - \frac{M_t}{M} \right) \right] M \quad (8)$$

beschriebenen mikrobiellen Stoffaufnahme.

Die Stofftransportgleichungen (5) und (6) werden analog zu den Wassertransportgleichungen durch eine Stetigkeitsannahme gekoppelt:

$$c_m(t, x) = c_{im}(t, x), \quad r = a \quad (9)$$

Um ein vollständig beschriebenes Anfangs- und Randwertproblem für

$$\theta_m(t, x), \quad \theta_{im}(t, x, r), \quad c_m(t, x), \quad c_{im}(t, x, r), \quad \text{und } M(t, x, r)$$

zu erhalten sind noch die Anfangs- und Randbedingungen anzugeben:

Zum Zeitpunkt  $t=0$  gelte:

$$\theta_m = \theta_{m0}, \quad \theta_{im} = \theta_{im0}, \quad c_m = c_{m0}, \quad c_{im} = c_{im0}, \quad M = M_I \quad (10)$$

und folgende Randbedingungen sind für  $t \geq 0$  zu erfüllen:

$$K_m \left( \frac{1}{C_m} \frac{\partial \theta_m}{\partial x} - 1 \right) = q_{m0} \quad \text{für } x = 0 \quad (11)$$

$$\frac{\partial \theta_m}{\partial x} = 0 \quad \text{für } x = L \quad (12)$$

$$\frac{\partial \theta_{im}}{\partial x} = 0 \quad \text{für alle } x \text{ und } r = 0 \quad (13)$$

$$c_m = c_{im} \quad \text{für } x = 0 \quad (14)$$

$$\frac{\partial c_m}{\partial x} = 0 \quad \text{für } x = L \quad (15)$$

$$\frac{\partial c_{im}}{\partial r} = 0 \quad \text{für alle } x \text{ und } r = 0 \quad (16)$$

Bezeichnungen:

$m$	Index für den mobileren Bereich,
$im$	Index für den immobilere Bereich,
$t$	Zeit (s),
$x$	Profiltiefe (cm) orientiert in Richtung der Erdbeschleunigung,
$r$	Abstand zum Mittelpunkt des Aggregats (cm),
$a$	Aggregatradius (cm),
$L$	Profillänge (cm),
$c$	Schadstoffkonzentration in der Bodenlösung ( $mg \text{ cm}^{-3}$ ),
$\theta$	volumetrischer Wassergehalt ( $cm^3 \text{ cm}^{-3}$ ),
$q$	Darcy-Fluß ( $cm^3 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ),
$h$	Bodenmatrixpotential (kPa),
$K$	Wasserleitfähigkeit ( $cm^2 \text{ s}^{-1}$ ),
$C$	Wasserkapazität ( $cm^3 \text{ cm}^{-3}$ ),
$D$	Diffusions- oder Dispersionskoeffizient ( $cm^2 \text{ s}^{-1}$ ),
$M$	mikrobielles Biomasse-C ( $mg \text{ cm}^{-3}$ ),
$\mu_{max}$	maximale spezifische Wachstumsrate ( $s^{-1}$ ),
$\sigma$	Erhaltungskoeffizient ( $s^{-1}$ ),
$Y$	Ertragskoeffizient ( $mg \text{ mg}^{-1}$ ),
$K_c$	Michaelis-Menten-Konstante ( $mg \text{ cm}^{-3}$ ),
$c_{in}$	Schadstoffkonzentration im Beregnungswasser ( $mg \text{ cm}^{-3}$ ).

Erste Simulationsrechnungen, die das Transport- und Sorptionsverhalten der Chlororganika im Boden bzw. in Bodenaggragaten beschreiben, zeigen die prinzipielle Anwendbarkeit eines Mikrostrukturmodells zur Simulation des Chlororganikaabbaus in strukturierten Böden auf. Die Ergebnisse der Simulationsrechnungen weisen auf sich entwickelnde Gradienten zwischen Inter- und Intra-Aggregatbereichen hin. Dies gilt sowohl für die Schadstoffkonzentrationen und Redoxbedingungen als auch für die Biomasse und Aktivität der Mikroorganismenpopulationen, die die Schadstoffe abbauen.

### **Diskussion**

Mit dem bisher entwickelten Modell steht ein grundlegendes Mikrostruktur-Modell zur Verfügung, das hinsichtlich der Berücksichtigung zusätzlicher, auch gasförmiger Stoffe (Stickstoff, Sauerstoff, gelöste organische Substanzen) und weiterer Mikroorganismenpopulationen erweiterbar ist. Dies kann abhängig von den zu Modellparametrisierung und Modelltest zur Verfügung stehenden experimentellen Datensätzen geschehen. Das Modell bietet somit eine Möglichkeit Erkenntnisse über funktionelle Eigenschaften Mikroorganismengruppen und deren lokaler Schadstoff-Abbauleistung aus dem Bereich der Mikrohabitate auf größere Bodenvolumina zu übertragen, wenn deren Bodenstruktur als äquivalent zur Struktur eines aggregierten Bodens angesehen werden kann.

### **Ausblick**

Im ersten Entwicklungsjahr liegt der Schwerpunkt auf der Programmierung, Implementierung und Erweiterung des Modellcodes, so daß Mehrstofftransport und um Substrate konkurrierende Mikroorganismenpopulationen beschrieben werden können. Im zweiten Jahr der Modellbildung steht die Modellparametrisierung im Vordergrund und damit die Bearbeitung der Frage, wie sich aus den bisherigen Erkenntnissen und Ergebnissen der experimentellen Untersuchungen Eingabedaten für das Modell ableiten lassen. Schließlich sollen die Möglichkeiten für einen Modelltest zur Anwendung auf verschiedene Böden und zur Übertragbarkeit auf Verhältnisse in der gesättigten Zone geprüft werden.

## Literatur

- Augustin, S., Jansen, M., Priesack, E., Beese, F.: Litter decomposition and matter transport in beds of soil aggregates. In :Advances in Soil Science: Soil Structure Its Development and Function. (Eds.: K.H. Hartge and B.H. Stewart). Boca Raton: CRC Lewis Publishers, (1995) 237-256.
- Priesack, E., Kisser-Priesack, G.M.: Modelling Diffusion and Microbial Uptake of  $^{13}\text{C}$ -Glucose in Soil Aggregates. *Geoderma* 56 (1993) 561-573.
- Priesack, E.: Simulation aeroben und anaeroben mikrobiellen Wachstums in wassergesättigten Bodenaggregaten. *Mitt. Dtsch. Bodenkd. Ges.* 72 (1993) 615-618.
- Priesack, E.: Ein Mikro-Struktur Modell zu Transport und mikrobiellem Abbau von Stoffen in ungesättigten aggregierten Böden. *Mitt. Dtsch. Bodenkd. Ges.* 74 (1994) 291-294.
- Priesack, E., Beese, F.: Changing modelling concepts and their relation to scenario studies. In: Environment and policy Vol.5: Scenario studies for the rural environment. (Eds.: J.F.Th. Schoute, P.A. Finke, F.R. Veeneklaas and H.P. Wolfert) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, (1995) 131-140.
- Priesack, E.: A microstructure-model for microbial growth in aggregated soils. *Z. angew. Math. Mech.* 76 (1996) 325-328.

---

## Anhang

### Veröffentlichungen Teilprojekt 1

- Bozau, E., Knöller, K., Strauch, G. (1999): Hydrogeochemische Untersuchungen zur Charakterisierung eines versauerten Tagebaurestloches in der Niederlausitz.-Poster, GUG-Tagung, 22. - 25.09.1999, MLU Halle.
- Göttlicher J., Pohlmann M. (1999): Mineralreaktionen in Braunkohlentagebaukippen: Ihre Bedeutung für die Versauerung von Grund- und Oberflächenwässern am Beispiel des ehemaligen Tagebaus Plessa (Lausitz). *Geowissenschaften und Umwelt, eingereicht*
- Gasharova B., Göttlicher J., Mihailova B., Pentinghaus H. (1999): Effect of the A-cations (K, Na, H<sub>3</sub>O) on the structure and vibrational spectra of jarosite (AFe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)(OH)<sub>6</sub>). *Amer. Mineral, submitted*
- Gasharova B., Göttlicher J., Pentinghaus H. (1999): Growth and dissolution on jarosite surfaces: an AFM study. *Beih. z. Eur. J. Mineral., Vol 11, No 1, 77*
- Göttlicher J., Gasharova B. (1999): Can jarosites be monoclinic? *Beih. z. Eur. J. Mineral., Vol 11, No 1, 86*
- Göttlicher J., Pohlmann M. (1999): Mineral reactions in a disused surface lignite mining pit in Lusatia / Germany. *Beih. z. Eur. J. Mineral., Vol 11, No 1, 87*
- Göttlicher J., Pohlmann M. (1999): Mineralreaktionen in Braunkohlentagebaukippen: Ihre Bedeutung für die Versauerung von Grund- und Oberflächenwässern am Beispiel des ehemaligen Tagebaus Plessa (Lausitz). 1. *Workshop zum HGF-Strategiefondsprojekt: Systemintegrierte Umweltbiotechnologie zur Sanierung von organisch und anorganisch belasteten Grund- und Oberflächenwässern, 7. und 8. Juli 1999 UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Vortrag*
- Pohlmann M., Göttlicher J. (1999): Distribution of sulfur bearing minerals in a disused surface lignite mining pit in Lusatia / Germany. *Beih. z. Eur. J. Mineral., Vol 11, No 1, 179*

### Veröffentlichungen Teilprojekt 2

- Daus, B.; Weiß, H.; Wünsche, L.; Kopinke, F.-D.; Popp, P.; Lorbeer, H.; Mackenzie, K. & Köhler, R. (1998): Groundwater remediation research at the test site Bitterfeld (Germany) - first results and perspectives. Proceedings of Warsaw '98, NATO/CCMS Pilot Study, 14.-17.09.98, Warsaw.
- Lorbeer, H., Seifert, K., Wünsche, L., Vogt, C., Popp, P. & Babel, W. (1999): Monochlorobenzene degradation by autochthonous bacteriocenoses of a contaminated aquifer. Abstracts Jahrestagung VAAM 7.-10.3.1999, Göttingen. Biospektrum Sonderausgabe 1999, 89.
- Lorbeer, H., Vogt, C. & Wünsche, L. (1999): Anaerober Abbau von Chlorbenzenen unter halbtechnischen Bedingungen in der mobilen Testeinheit. In: Weiß, H.,

- Daus, B., Teutsch, G. (Hrsg): SAFIRA 2. Statusbericht. Modellstandort, Mobile Testeinheit, Pilotanlage. UFZ-Bericht 17/1999, 138-145.
- Lorbeer, H.; Wünsche, L.; Hard, B.C.; Krauß, G.; Flachowsky, J.; Dermietzel, J. & Babel, W. (1998): Degradation of chlorobenzenes by autochthonous bacteria from a polluted aquifer. In: Becker, P.M. (ed.): Microbiology of polluted aquatic ecosystems. Proceedings of the Workshop held on the 4th and 5th December 1997 at the UFZ. UFZ-Bericht 10/1998 50-57.
- Weiß, H.; Daus, B.; Fritz, P.; Kopinke, F.-D.; Popp, P. & Wünsche, L. (1998): In situ groundwater remediation research in the Bitterfeld region in eastern Germany (SAFIRA). In: Herbert, M. and K. Kovar (eds.): Groundwater quality: Remediation and protection. IAHS Publication 250 443-450.
- Weiß, H.; Kopinke, F.-D.; Popp, P. & Wünsche, L. (1998): In situ remediation research in a complexly contaminated aquifer: The SAFIRA test site at Bitterfeld, Germany. NATO/CCMS Pilot study, 1998 Special Session, Number 229, EPA 542-R-98-003, 1998, 84-91.
- Witthuhn, B.; Klumpp, E.; Narres, H.-D.; Schwuger, M. J.(1999): Sorptionsverhalten von Dichlorphenol an Kationensid-modifizierten Schichtsilikaten. 9. Wolfgang Ostwald Colloquium und 4. Nachwuchstage der Kolloid- und Grenzflächenforschung, Basel (Schweiz), 23./24. April und 21./22. April 1999, Poster
- Witthuhn, B.; Klumpp, E.; Narres, H.-D., Klauth, P.; Martinius, H.; Groeneweg, J. (1999): Organisch modifizierte Bodenminerale als temporäre, reversible Schadstoffdepots. Jahrestagung Deutsche Bodenkundliche Gesellschaft, Hannover, 6.-11.9.1999, Vortrag
- Wünsche, L.; Lorbeer, H.; Hard, B.C.; Krauß, G.; Dermietzel, J.; Flachowsky, J. & Babel, W. (1998): Degradation of chloroorganics by the autochthonous bacteriocenosis of a polluted ground water. Abstracts Jahrestagung VAAM 22.-25.3.1998, Frankfurt/Main. Biospektrum Sonderausgabe 1998, 68.
- Wünsche, L.; Lorbeer, H.; Hard, B.; Krauß, G.; Wendlandt, K.-D. & Flachowsky, J. (1997): Mikrobielle Besiedlungsdichten und Schadstoffabbaupotentiale autochthoner Bakterien belasteter Aquifere im Raum Bitterfeld. In: Weiß, H.; Teutsch, G.; Daus, B. (eds.): Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA). UFZ-Bericht 27/1997 118-126.

### **Veröffentlichungen Teilprojekt 3**

- Müller, E., Assmus, B., Hartmann, A. Seiler, K.-P. (1999): Neuste Entwicklungen in der in situ-Charakterisierung mikrobieller Biozönesen in Abwasser, Oberflächengewässern, Grund- und Fröhwasser. - In: Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie, Bd. 52 (Hrsg.: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München) 145-162



Hendry, M.J., Lawrence, J.R., Maloszewski, P. (1997): The role of sorption in the transport of *Klebsiella oxytoca* through saturated silica sand. *Ground Water*, Vol. 35, No. 4., 574-584

Hendry, M.J., Lawrence, J.R., Maloszewski, P. (1999): Effects of velocity on the transport of two bacteria through saturated sand. *Ground Water*, Vol. 37, No. 1, 103-112

## **Ausblick**

Göttlicher J., Gasharova B. (2000): Interactions of iron and sulfur bearing solid phases with water in surface coal mining pits and acidic mining lakes. *6<sup>th</sup> International Congress on Applied mineralogy ICAM 2000, Göttingen, Germany 13-21 July 2000, (Abstract submitted)*

Göttlicher J., Gasharova B., Wendt-Potthoff K., Hard B., Koschorreck M. (2000): The jarosite - water interface: surface reactions implying microbial influence. *6<sup>th</sup> International Congress on Applied mineralogy ICAM 2000, Göttingen, Germany 13-21 July 2000, (Abstract submitted)*

Göttlicher J., Gasharova B., Wendt-Potthoff K., Hard B., Koschorreck M. (2000): The jarosite - water interface: surface reactions implying microbial influence. *6<sup>th</sup> International Congress on Applied mineralogy ICAM 2000, Göttingen, Germany 13-21 July 2000, (Abstract submitted)*

Göttlicher J., Pohlmann M. (2000): Mineral reactions in surface lignite mining pits: their influence on sulfate contents in surface water and groundwater in a disused mining pit in Lusatia / Germany. *The 31<sup>st</sup> International Geological Congress, Rio de Janeiro, Brasilia, 6-17 August 2000 (Abstract submitted)*

Pohlmann M., Bozau E., Göttlicher J., Strauch G. (2000): The fate of sulfur in lignite mining dumps and its role for an *in situ*-remediation of acidic mining lakes. *6<sup>th</sup> International Congress on Applied mineralogy ICAM 2000, Göttingen, Germany 13-21 July 2000, (Abstract submitted)*

Schmidt, N., Stottmeister, U. (2000): System integrated environmental biotechnology: remediation of polluted groundwater and surface water, Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, 2<sup>nd</sup> Int. Conf., Monterey, California, 22-25 May 2000 (Poster accepted)

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
Sektion Sanierungsforschung  
Permoserstraße 15  
D-04318 Leipzig  
Telefon 0341/235-2220  
Telefax 0341/235-2492