

7.1 Mikrobielle Besiedlungsdichten und Schadstoffabbaupotentiale autochthoner Bakterien belasteter Aquifere im Raum Bitterfeld

L. WÜNSCHE¹, H. LORBEER¹, B. HARD¹, G. KRAUß², K.-D. WENDLANDT³,
J. FLACHOWSKY⁴

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektionen Umweltmikrobiologie¹,
Hydrogeologie², Sanierungsforschung³ und Analytik⁴, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig

Voraussetzungen für die Erarbeitung von Entscheidungen zur prinzipiellen Anwendbarkeit mikrobiologischer *in situ*-Sanierungsverfahren, zur Auswahl der günstigsten Verfahrensvariante und zur Abschätzung der Erfolgsaussichten sind:

- Bestimmung der mikrobiellen Besiedlungsdichte der Standorte
- Bestimmung der Schadstoffabbauleistungen der autochthonen mikrobiellen Biozöosen unter *in situ*-Bedingungen
- Prüfung von Möglichkeiten zur Steigerung der Abbauleistungen der autochthonen mikrobiellen Biozöosen *in situ* durch technisch und ökonomisch realisierbare Maßnahmen

Neben dem Schadstoffgehalt (Kap. 4.1) sind die Aquifere am Standort als mikrobielle Habitate durch bestimmte Kombinationen mikrobiologisch relevanter abiotischer Milieufaktoren charakterisiert. Im quartären Aquifer fehlt Sauerstoff. Von den potentiellen Elektronenakzeptoren für anaerobe Prozesse ist Sulfat in einer Konzentration von ca. 700 mg/l Grundwasser vorhanden, Nitrat mit maximal 1,5 mg/kg Sediment. Beurteilt nach dem DOC-Gehalt (10 - 30 mg/kg Sediment) ist die Menge an verfügbaren organischen Substanzen für Wachstums- und cometabolische Prozesse minimal; in den kohleführenden Schichten erreicht der DOC-Gehalt jedoch Werte bis 400 mg/kg. Während Ammoniumstickstoff in Konzentrationen von ca. 15 mg/kg Sediment verfügbar ist, liegt der Phosphatgehalt im Bereich der Nachweisgrenze und dürfte einen wachstumslimitierenden Faktor im Ökosystem darstellen. Schwermetalle sind weder in limitierenden noch inhibierenden Konzentrationen vorhanden (siehe Kap. 4.2). Die pH-Werte liegen bei ca. 7, die Temperaturen bei 13°C und ändern sich nur geringfügig über das Tiefenprofil. Im wesentlichen prägt diese Milieufaktorenkombination auch das Ökosystem tertiärer Aquifer. Wie im quartären Grundwasserleiter steht der Elektronenakzeptor Sulfat mit 750 mg/l Grundwasser zur Verfügung, deutlich ist auch hier der Mangel an C-Verbindungen (TOC 6-8 mg/l Grundwasser) und Nitrat. Temperaturen (durchgehend 15,5-16,0°C) und pH-Werte (durchgehend um 6,5) liegen in günstigen Bereichen für das Bakterienwachstum.

Besiedlungsdichte der Grundwässer und Aquifere mit Mikroorganismen/ Mikroorganismengruppen

Für die Untersuchung der mikrobiellen Besiedlungsdichten wurden Liner der Bohrungen SafBit 1/96 und 2/96 sowie die nach dem Ausbau beider Pegel geförderten Grundwässer genutzt. Die Dichte der Meßpunkte in den Sedimenten wurde von der Schadstoffmenge bestimmt: Untersucht wurden Sedimente des quartären Aquifers in Abständen von 2 m, aus dem tertiären Aquifer in Abständen von 4 m und aus der am höchsten mit Chloraromaten kontaminierten Zone zwischen 16 und 23 m in Meterabständen.

Bis zur maximalen Bohrtiefe waren Grundwässer (bis 10^5 Zellen/ml) und Aquifere (bis 10^6 cfu/g Sediment) mit Bakterien besiedelt (Abb. 1). In den autochthonen Biozönosen dominierten denitrifizierende, eisen- und manganreduzierende Bakterien, daneben wurden auch überraschend hohe Besiedlungsdichten mit aeroben Bakterien gefunden. Sulfatreduzierende Bakterien konnten aus allen Sedimenten angereichert werden, die Besiedlungsdichte war trotz hoher Sulfatkonzentrationen am Standort unerwartet niedrig. Hefen und mycelbildende Pilze fehlten erwartungsgemäß in den meisten Sediment-Horizonten.

Abbauleistungen der ökophysiologischen Hauptgruppen unter in situ-nahen und optimierten Bedingungen

Die Untersuchung des Abbaupotentials erfolgte mit Bakteriozönosen aus zwei Mischproben mit unterschiedlicher Schadstoffbelastung:

- Sedimente des quartären Aquifers mit der stärksten Kontamination (14 - 18 m)
- Sedimente der Grenzschicht von quartärem Aquifer und Braunkohle (19 - 23 m)

In den Experimenten wurden die im quartären Aquifer dominierenden Schadstoffe in über den in situ-Konzentrationen liegenden Mengen eingesetzt: Monochlorbenzen (MCB, 30 mg/l), 1,2-Dichlorbenzen (1,2-DCB, 10 mg/l) und 1,4-Dichlorbenzen (1,4-DCB, 10 mg/l). Darüber hinaus wurde Benzen (100 mg/l) als erwartetes Produkt einer abiotischen Dehalogenierung von Chlorbenzenen in die Untersuchung einbezogen.

Die Bestimmung der Schadstoffabbau-Leistungen der im quartären Aquifer und in der Grenzschicht quartärer Aquifer/Braunkohle am Standort Bitterfeld nachgewiesenen ökophysiologischen Bakteriengruppen erfolgte nach selektiver Stimulierung durch Zugabe der entsprechenden Elektronenakzeptoren im Verband der gesamten Biozönose. Im Rahmen dieser Vorstudie wird Schadstoffabbau über die Abnahme der Initialkonzentration beurteilt. Aufstellung von Bilanzen und Nachweise von Zwischen-

und Endprodukten werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

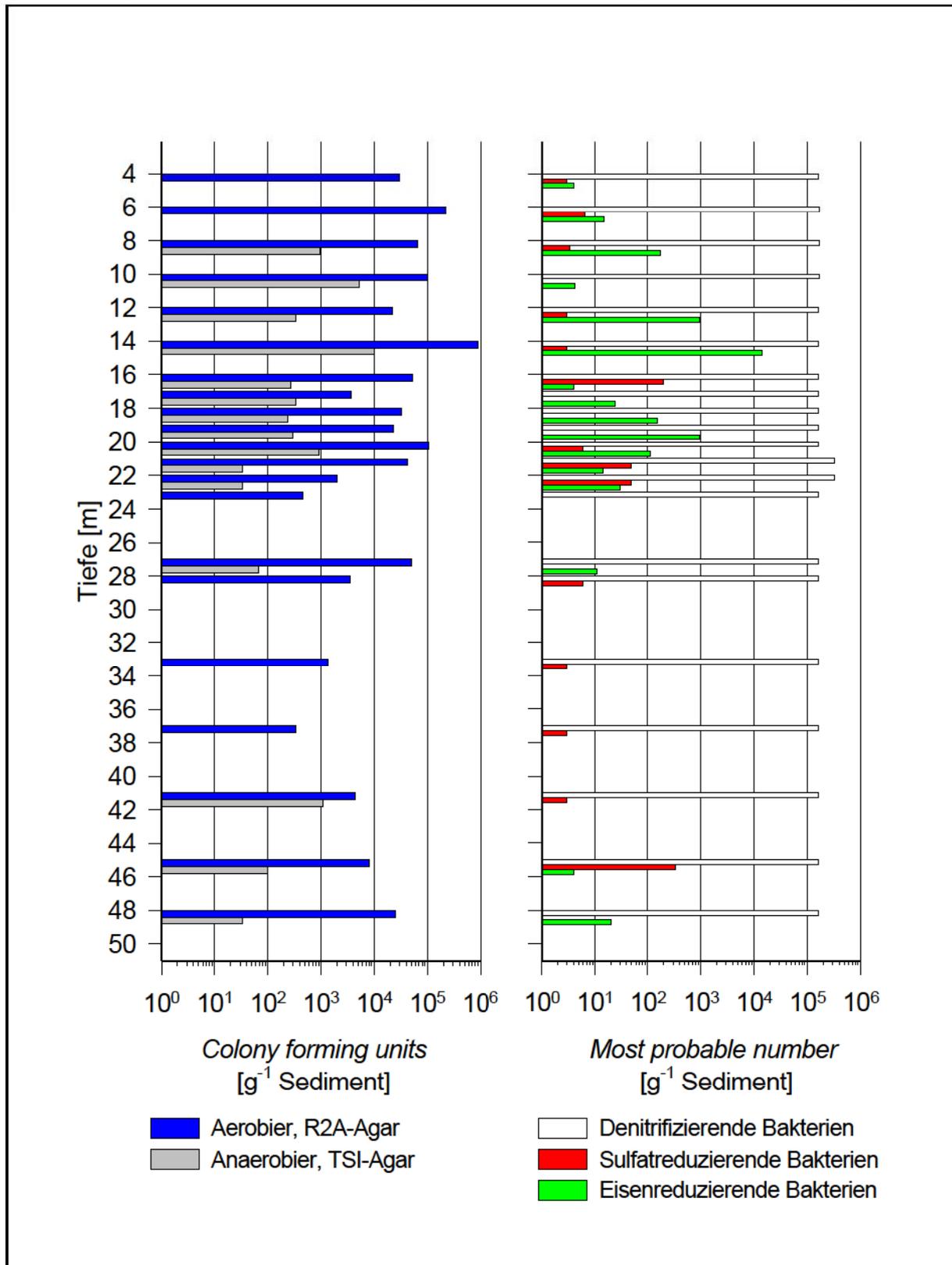


Abb. 1: Populationsdichte ausgewählter Bakteriengruppen in quartären und tertiären Sedimenten des Untersuchungsgebietes

Bewertung von Substanzverlusten durch abiotische Einflußfaktoren (Kontrollansätze)

Um zwischen biotischen und abiotischen Abbau- bzw. Eliminierungsprozessen unterscheiden zu können, wurden zu jeder Versuchsreihe Kontrollansätze mitgeführt, in denen durch Autoklavieren biotische Abbauprozesse durch die autochthonen Biozönosen ausgeschlossen wurden. Alle Kontrollansätze zeigten im Prinzip gleichartigen, nahezu linearen Abfall der Konzentration aller Schadstoffe mit der Zeit. Nach 40 Tagen waren lediglich ca. 60 % der Ausgangskonzentrationen nachweisbar. Nach den Ergebnissen des Kontrollversuches wurde festgelegt, daß die aktuelle Schadstoffmenge im Versuchsansatz, unabhängig von der Verteilung auf die feste, flüssige oder Gasphase, nach 40 Tagen Versuchsdauer unter 50 % des Ausgangswertes liegen muß, um einen mikrobiologischen Abbau anzuzeigen. Ursachen für die erheblichen Substanzverluste ohne Einwirkung des biologischen Systems müssen in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden.

Schadstoffabbau durch die autochthonen Bakteriozönosen der untersuchten Sedimente

Die Ergebnisse der orientierenden Screeningversuche zeigten, daß die primären Schadstoffe MCB, 1,2- und 1,4-DCB unter den *in situ*-Verhältnissen nahekommenden Bedingungen mikrobiell abbaubar sind. Abbaugrad und -geschwindigkeit unterschieden sich jedoch in Abhängigkeit von der chemischen Struktur der Schadstoffe, dem Stoffwechsellyp der beteiligten ökophysiologischen Gruppen sowie der Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren und zusätzlichen organischen Materials (Hilfssubstrate).

Die Bakteriozönosen aus dem quartären Aquifer, Entnahmetiefe 14 - 18 m unter Geländeoberkante (Abb. 2) und aus der Grenzschicht quartärer Aquifer/Braunkohlenflöz (Abb. 3), zeigten in den Grundzügen ähnliche Abbauleistungen, wiesen jedoch auch einige deutliche Unterschiede in dieser Hinsicht auf.

Es ist anzunehmen, daß diese Differenzen auf die unterschiedlichen Besiedlungsdichten und die damit möglicherweise auch voneinander abweichende taxonomische und physiologische Diversität beider Biozönosen zurückzuführen sind. Mit genetischen Fingerprint-Untersuchungen (Temperaturgradienten-Gelelektrophorese) konnten die postulierten Unterschiede in der taxonomischen Diversität beider Biozönosen bisher nicht belegt werden. Unter den drei Chloraromaten erwies sich 1,2-DCB als die mit Abstand am schwersten abbaubare Verbindung.

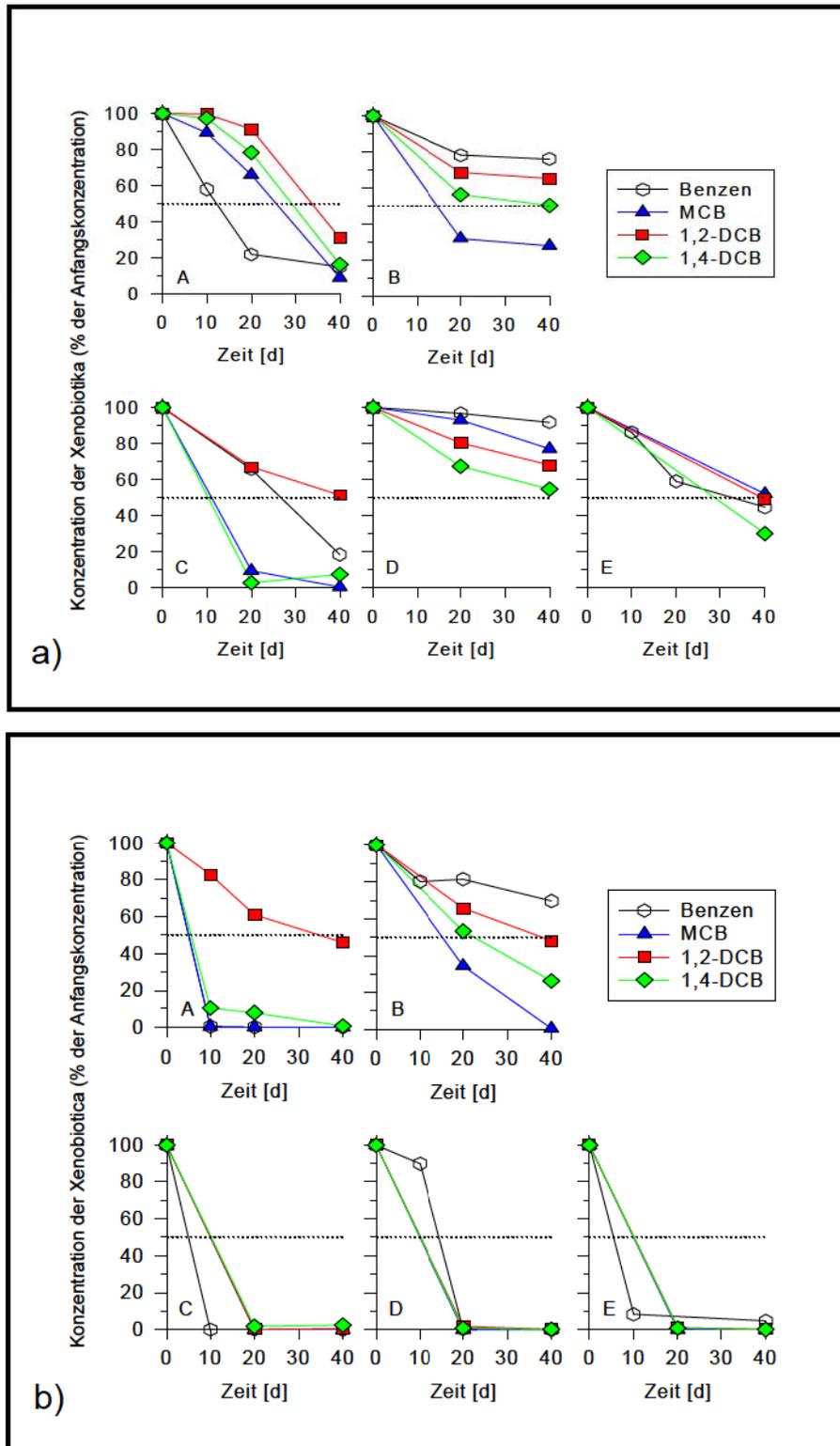


Abb. 2: Abbau von Chlorbenzenen und Benzen durch autochthone Bakteriengruppen des quartären Aquifers (14-18 m unter Geländeoberkante)

- a) Ohne Zusatz von Substraten (A aerob, B–E anaerob; B ohne zusätzliche Elektronenakzeptoren, C Nitrat, D Sulfat, E Eisenoxyhydroxid)
 b) Mit Zusatz von Substraten (Lactat, Acetat, Hefeextrakt, Ammonium und Phosphat), A-E wie unter a)

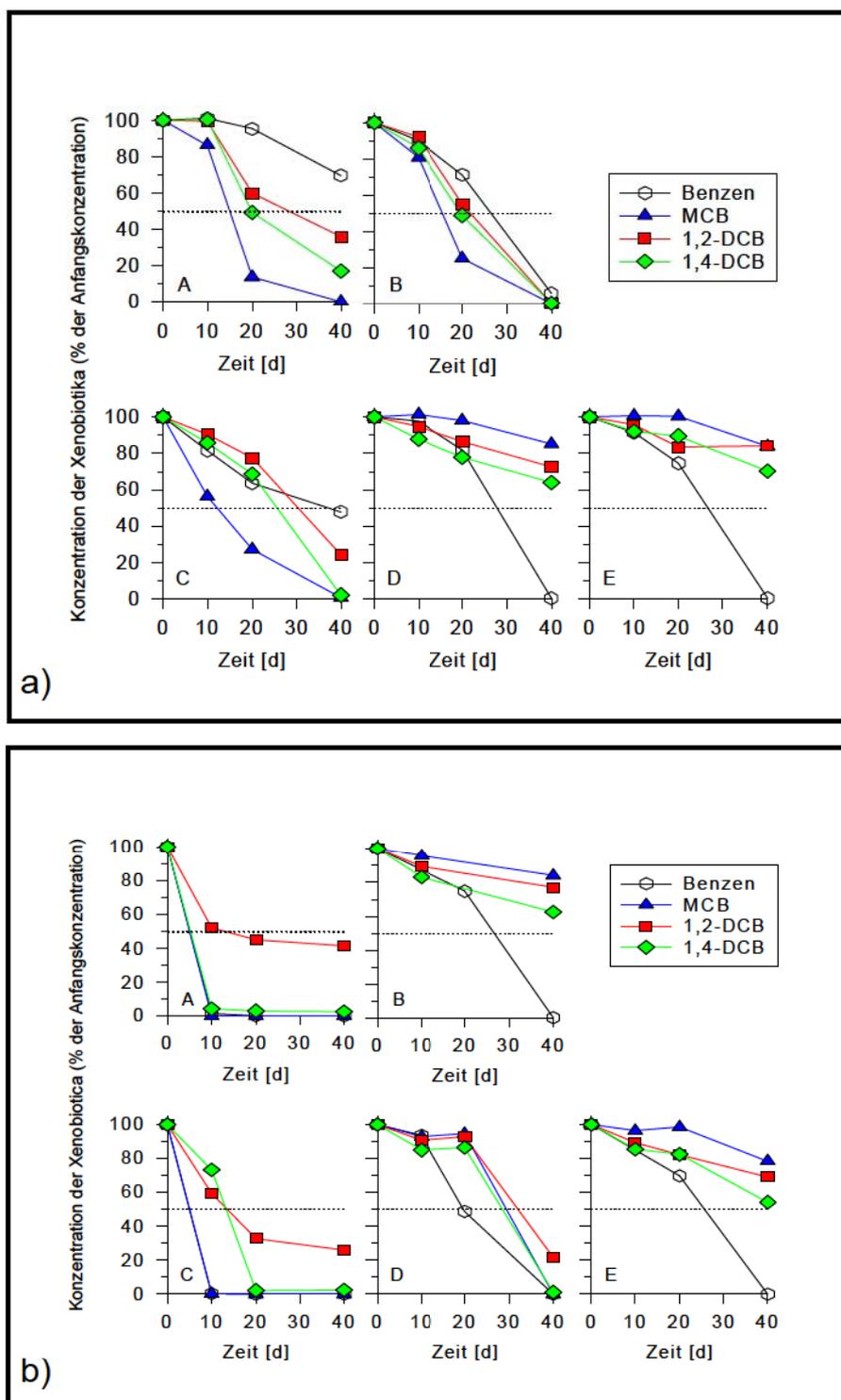


Abb. 3: Abbau von Chlorbenzenen und Benzen durch autochthone Bakteriengruppen der Grenzschicht von quartärem Aquifer und Kohle (19 - 23 m unter Geländeoberkante).

- a) Ohne Zusatz von Substraten (A aerob, B-E anaerob; B ohne zusätzliche Elektronenakzeptoren, C Nitrat, D Sulfat, E Eisenoxyhydroxid)
 b) Mit Zusatz von Substraten (Lactat, Acetat, Hefeextrakt, Ammonium und Phosphat), A-E wie unter a)

Ohne Verfügbarkeit von Hilfssubstraten war unter anaeroben Bedingungen kein Abbau nachweisbar. Das scheinbar von diesem Befund abweichende Ergebnis der

ohne Zusätze von Elektronenakzeptoren und Kohlenstoffquellen durchgeführten Versuchsvariante mit der Biozönose aus der Grenzschicht Aquifer/Braunkohle (Abb. 3a, Variante B) könnte auf die mit dem Sediment eingebrachte organische Substanz und damit auf die Verfügbarkeit einer vom Schadstoff verschiedenen C-Quelle zurückzuführen sein. Diese Annahme könnte auch die relativ hohe Abbaugeschwindigkeit der übrigen Schadstoffe in dieser Versuchsvariante erklären. Nach Zusatz systemfremder Hilfssubstrate (Gemisch aus Acetat und Lactat) war jedoch unter nitrat-, sulfat- und eisenreduzierenden Bedingungen, zumindest im Fall der Bakteriozönose aus dem quartären Aquifer, das 1,2-DCB bereits nach 20 Tagen nahezu restlos abgebaut (Abb. 2b, Varianten C-E). Bei diesen Varianten waren auch die übrigen Schadstoffe zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Für die schlechteren Abbauleistungen dieser Bakteriengruppen aus der Grenzschicht Aquifer/Kohle sind gegenwärtig keine gesicherten Erklärungen möglich.

Unter aeroben Bedingungen wurde 1,2-DCB in allen Versuchsvarianten, wenn überhaupt, nur mit sehr geringer Geschwindigkeit abgebaut: nach 40 Tagen Inkubationszeit waren noch Restkonzentrationen nachweisbar (zwischen 40 und 50 %, nur in einem Fall ca. 30 % der Initialkonzentration), die nur wenig unter der als Bewertungsgrenze für einen biologischen Abbau definierten Restkonzentration von 50 % lagen.

Zwischen MCB und 1,4-DCB gab es in bezug auf die Abbaubarkeit keine deutlichen Unterschiede. Beide Substanzen wurden, wenn unter den jeweiligen Bedingungen überhaupt, mit ähnlicher Geschwindigkeit abgebaut.

Wie zu erwarten, wurde Benzen unter aeroben Bedingungen rasch utilized, lediglich für die Biozönose aus der Grenzschicht Aquifer/Braunkohle konnte ohne Zusatz anderer C-Quellen überraschenderweise kein Benzenabbau (im Gegensatz zum raschen Abbau des MCB und 1,4-DCB) nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen wurde ein schneller und nahezu vollständiger Abbau in der Regel dann erreicht, wenn Elektronenakzeptoren zugesetzt und Hilfssubstrate verfügbar waren: letztere wurden entweder als definierte Verbindungen zugegeben (Abb. 2b und Abb. 3b, Varianten C-E) oder möglicherweise bereits mit den Sedimentproben mit hohem Gehalt an organischen Verbindungen eingebracht (Abb. 3a).

Die Abbauleistungen der durch Zugabe entsprechender terminaler Elektronenakzeptoren im Verbund der Gesamtbakteriozönose selektiv geförderten ökophysiologischen Gruppen differierten untereinander, aber auch in Abhängigkeit vom ursprünglichen Standort. Die Standortabhängigkeit könnte auf bereits postulierte, bisher noch nicht nachgewiesene Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung der autochthonen Bakteriengruppen, aber auch auf abweichende abiotische Milieufaktoren zurückzuführen sein. Bei allen Bakteriengruppen aus dem quartären Aquifer (enthält neben den Chlororganika nur Spuren anderer organischer Substanzen) wurden die Abbauleistungen durch den Zusatz von Acetat und Lactat

erhöht. Als Ursachen kommen grundsätzlich zwei Effekte in Betracht, zwischen denen bisher nicht unterschieden werden kann: Die Zugabe dieser Stoffe kann auf der einen Seite einen cometabolischen Abbau der Schadstoffe ermöglichen, andererseits zu einer Erhöhung der Bakteriendichte, d.h. der Konzentration der die Metabolisierung der Schadstoffe katalysierenden biologischen Systeme, führen.

Verfügbarkeit ausreichender Mengen terminaler Elektronenakzeptoren und Hilfssubstrate vorausgesetzt, wurden die Schadstoffe überraschenderweise im anaeroben Milieu unter nitrat-, sulfat- und eisenreduzierenden Bedingungen mit relativ hoher Geschwindigkeit abgebaut. Das wurde besonders deutlich in den Untersuchungen an den ökophysiologischen Gruppen aus dem quartären Aquifer (Abb. 2b): Bei der ersten Bestimmung der Abbauleistungen (nach 10 bzw. 20 Tagen) waren die Schadstoffe in diesen Versuchsansätzen praktisch nicht mehr nachweisbar; die Abbauleistungen waren zumindest gleich, im Falle des 1,2-DCB sogar deutlich höher als unter aeroben Bedingungen. Die gleichen Tendenzen, jedoch mit in der Regel längeren Abbauzeiten, wurden auch für diese Bakteriengruppen aus der Grenzschicht quartärer Aquifer/Kohle gefunden, lediglich bei Anwesenheit von Fe^{3+} war keine stimulierende Wirkung erkennbar (Abb. 3b), möglicherweise durch die geringe Abundanz eisenreduzierender Bakterien.

Die durch Nitratzugabe selektiv geförderten Denitrifizierer zeigten ein weitgehend ähnliches Abbauverhalten verglichen mit den aeroben Versuchsvarianten. Dieser Befund ist insofern nicht überraschend, da mit der Replikatechnik gezeigt werden konnte, daß die Aerobierfraktion der Bakteriozösen zumindest zu einem Teil aus fakultativ anaeroben Denitrifizierern besteht. Die Abbauleistung der Denitrifizierer konnte ebenfalls durch Zugabe systemfremder C-Quellen deutlich gesteigert werden, sogar das generell schwer abbaubare 1,2-DCB war im Falle der Denitrifiziererfraktion der Bakteriozönose aus dem quartären Aquifer bereits nach 20 Tagen nahezu vollständig verschwunden, bei den Denitrifizierern der Bakteriozönose aus der Grenzschicht Aquifer/Kohle waren zu diesem Zeitpunkt noch 33 % der Initialkonzentration nachweisbar.

Wie bei einem zur ersten Abschätzung der Abbauleistungen konzipierten Screeningprogramm nicht anders zu erwarten, sind die erhaltenen Ergebnisse nicht frei von Widersprüchen und unerwarteten Effekten. Die Ursachen dafür werden in weiterführenden detaillierten Experimenten untersucht.

Isolierung und Charakterisierung von Misch- und Reinkulturen aus den autochthonen Biozöosen

Sulfat- und eisenreduzierende Bakterien

Gleichzeitig mit der Untersuchung der bakteriellen Besiedlungsdichten der Sedimente und Grundwässer wurde begonnen, sulfat- und eisenreduzierende Mischkulturen in Flüssigkultur anzureichern. Diese Kulturen bilden gegenwärtig die Grundlage für die Isolierung schadstoffverwertender Konsortien bzw. Reinkulturen. Sulfatreduzierende Bakterien sind aus allen untersuchten Sedimentproben anreicherbar, während der Nachweis der Bildung von Fe^{2+} aus Eisenoxyhydroxid nur bei einigen Proben gelang. Die weitere Subkultivierung muß darüber Aufschluß geben, inwiefern die nachgewiesene Eisenreduktion tatsächlich auf biologischem Wege erfolgte.

Nitrat- und manganreduzierenden Bakterien

Die Anreicherung von diesen Bakterien wurde ebenfalls begonnen; Ergebnisse liegen noch nicht vor.

Methanotrophe Bakterien

Aus den Sediment- und Grundwasserproben der Bohrungen SafBit 1/96 und 2/96 konnten bisher keine methanotropen Reinkulturen isoliert werden. Es wurden einige unterschiedliche methanotrophe Mischkulturen angereichert, in denen jedoch das für den Abbau von chlororganischen Verbindungen verantwortliche Enzym, eine unspezifische lösliche Methanmonooxygenase (sMMO), nicht nachgewiesen werden konnte. Mit einem sMMO-positiven Modellorganismus (Isolat aus Abwasser/Gülle) konnte jedoch ein unvollständiger Abbau von Monochlorbenzen und die Mineralisierung von Trichlorethen nachgewiesen werden.

Schlußfolgerungen

Die Ergebnisse des Screeningprogramms weisen darauf hin, daß eine mikrobiologische *in situ*-Sanierung der kontaminierten Aquifere unter den am Standort herrschenden anaeroben Verhältnissen möglich sein könnte. Eine Erhöhung der *in situ*-Abbauleistungen kann über eine Stimulierung autochthoner Anaerobiergruppen durch Zugabe von Elektronenakzeptoren und Hilfssubstraten erreicht werden. Diese Ergebnisse müssen durch vertiefte Untersuchungen bestätigt und gesichert werden.

Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA)

Bericht zur Machbarkeitsstudie für den Modellstandort Bitterfeld

Holger Weiß¹⁾, Georg Teutsch²⁾, Birgit Daus¹⁾ (Hrsg.)

1) UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
PB Industrie- und Bergbaufolgelandschaften
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig

2) Eberhard-Karls-Universität
Geologisches Institut
Sigwartstraße 10, 72076 Tübingen