

5 Erarbeitung von Grundlagen für die mikrobiologische *in situ*-Sanierung chlororganisch belasteter Aquifere am Modellstandort Bitterfeld durch autochthone Bakterien

CARSTEN VOGT¹, ALBIN ALFREIDER¹, HELMUT LORBEER², WOLFGANG BABEL¹,
LOTHAR WÜNSCHE¹

¹UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig Halle GmbH, Department Umweltmikrobiologie,
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, e-mail: carsten.vogt@ufz.de

²Technische Universität Dresden, Institut für Abfallwirtschaft und Altlasten, Praschwitzer Str. 15,
01796 Pirna

5.1 Einführung

Aufgabenstellung

Innerhalb des TP B2.1 wurde der mikrobielle *in situ* Abbau von Chlorbenzol durch autochthone Bakterien in Langzeitversuchen im Pilotmaßstab untersucht. Im Projektvorlauf war ein anaerober Abbau von Chlorbenzol unter denitrifizierenden Bedingungen in Laborversuchen und *on site* im halbtechnischen Maßstab festgestellt worden (LORBEER et al., 1998, 1999), so dass diese Verfahrensvariante das ursprüngliche Projektziel darstellte. Der Abbau unter anoxischen Bedingungen ließ sich jedoch im Pilotmaßstab nicht reproduzieren. Deshalb konzentrierten sich die Untersuchungen im weiteren auf den Abbau von Chlorbenzol unter gemischten Elektronenakzeptorbedingungen (Nitrat und Sauerstoff). Als sauerstoffspendendes Agens wurde Wasserstoffperoxid eingesetzt. Es sollte insbesondere herausgefunden werden, wie viel Sauerstoff der Abbau *in situ* benötigt, um dem Anspruch eines möglichst passiven Sanierungsverfahrens gerecht zu werden. Des Weiteren sollte (mittels überwiegend molekularbiologischer Methoden) die strukturelle und funktionelle mikrobielle Diversität im Sediment und Grundwasser der *in situ*-Reaktoren bestimmt werden.

Ein zweiter Arbeitsschwerpunkt waren mikrobiologische Begleituntersuchungen an abiotisch betriebenen Reaktoren der Pilotanlage. Diese Arbeiten waren ein Service für die anderen Reaktorbetreiber; im Projektverlauf kam es in den abiotisch betriebenen Reaktoren häufiger zu mikrobiell bedingten Störungen. Auf die Ergebnisse dieser Begleituntersuchungen wird in diesem Bericht nicht näher eingegangen (siehe hierzu VOGT und ALFREIDER, 2003).

Mikrobieller Abbau von Chlorbenzol

Die anfänglich im Forschungsvorhaben konzipierte *in situ*-Detoxifikation des Chlorbenzol-belasteten Bitterfelder Grundwasserleiters unter anoxischen denitrifizierenden Bedingungen wäre wissenschaftliches Neuland und mit großen Vorteilen (minimaler

Eingriff in das Aquifersystem, kostengünstig) verbunden gewesen. In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche aromatische Verbindungen – z.T. auch halogenierte – als mikrobiologisch abbaubar unter anoxischen denitrifizierenden Bedingungen beschrieben: Benzol (BURLAND und EDWARDS, 1999; COATES et al., 2001), Toluol (DOLFING et al., 1990), Ethylbenzol (RABUS und WIDDEL, 1995), Xylol-Isomere (DOLFING et al., 1990; RABUS und WIDDEL, 1995), Phenole (SCHINK et al., 2000), 3-Chlorbenzoat und 4-Chlorbenzoat (HÄGGBLOM et al., 1993, HÄGGBLOM und YOUNG, 1999). Ein Verschwinden von Chlorbenzol unter anoxischen denitrifizierenden Bedingungen beobachteten neben unserer Arbeitsgruppe weitere Forschungsteams (DIJK et al., 2000; ROSENBROCK et al., 2000; WENDEROTH et al., 2003); ein anaerober Abbau mit anderen Elektronenakzeptoren (z.B. Fe(III), Mn(IV), SO_4^{2-} , HCO_3^-) ist bislang nicht bekannt. NOWAK et al. (1996) beschrieben allerdings eine reduktive Dehalogenierung von Chlorbenzol zu Benzol in einer methanogenen Anreicherungskultur.

Im Gegensatz zum Abbau unter Sauerstoffausschluss ist der aerobe produktive Abbau von Chlorbenzol gut untersucht. Die ersten, die eine Mineralisierung von Chlorbenzol durch ein bakterielles Isolat in Gegenwart von Sauerstoff publizierten, waren REINEKE und KNACKMUSS (1984). In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Chlorbenzol-mineralisierende Bakterien isoliert (DE BONT et al., 1986; SCHRAA et al., 1986; SPAIN and NISHINO, 1987; HAIGLER et al., 1988; SANDER et al., 1991; STOECKER et al., 1994; ZAITSEV et al., 1995; KIERNICKA et al., 1999). In allen bisher untersuchten Isolaten beginnt der Abbauweg mit dem Einbau eines Sauerstoffmoleküls in das Ringsystem des Chlorbenzols und einer darauffolgenden Dehydrierung; es entsteht 3-Chlorbrenzcatechin, welches dann von den meisten Isolaten in *ortho*-Stellung gespalten wird (via Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase), gefolgt von weiteren Abbaureaktionen und Chlorid-Eliminierung (REINEKE und KNACKMUSS, 1984; DE BONT et al., 1986; SCHRAA et al., 1986; SPAIN und NISHINO, 1987; HAIGLER et al., 1988; SANDER et al., 1991; SCHLÖMANN, 1994; STOECKER et al., 1994). Es galt lange Zeit als Regel, dass Chlorbenzol nicht in *meta*-Stellung gespalten werden kann, weil das für diese Reaktion verantwortlich zeichnende Enzym, die Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase, negativ beeinflusst wird durch 3-Chlorbrenzcatechin (KLĚČKA und GIBSON, 1981) oder dem Produkt der *meta*-Spaltung des 3-Chlorbrenzcatechins, einem reaktiven Acylchlorid (BARTELS et al., 1984). MARS et al. (1997) beschrieben jedoch einen *Pseudomonas*-Stamm, der Chlorbenzol über den *meta*-Weg mineralisiert, ohne toxische Zwischenprodukte anzuhäufen. Mittlerweile wurden weitere Bakterienstämme isoliert, die Chlorbenzol via *meta*-Spaltung produktiv abbauen (REINEKE, 2002), so dass dieser Stoffwechselweg weiter verbreitet zu sein scheint als bisher angenommen. Die Expression von Genen, die das Schlüsselenzym des *meta*-Abbauweges für Chlorbenzol, die Chlorbrenzcatechin-2,3-Dioxygenase, kodieren, wurde auch in Reaktorwasser und –sedimenten eines der *in situ*-Reaktoren innerhalb des TP B2.1 nachgewiesen (ALFREIDER et al., 2003a).

Die meisten Chlorbenzol-metabolisierende Bakterienstämme wurden von Standorten isoliert, die mit Chlorbenzol belastet sind. NISHINO et al. (1994) untersuchten Chlorbenzol-belastete und unbelastete Proben und fanden nur in den Chlorbenzol-belasteten Proben Chlorbenzol-Abbauer. VAN DER MEER et al. (1998) wiesen nach, dass horizontaler Gentransfer und die genetische Rekombination existierender Gene zwischen autochthonen Mikroorganismen die Mechanismen waren für die Evolution von Chlorbenzol-metabolisierenden Bakterienstämmen an einem Chlorbenzol-belasteten Standort.

Mikrobielle Sanierungsverfahren für Chlorbenzol-kontaminierte Grundwässer

NISHINO et al. (1994) und KLECKA et al. (1996) behandelten Chlorbenzol-kontaminiertes Grundwasser erfolgreich über ‚pump-and-treat‘ in aeroben Bioreaktoren. Einen aeroben *in situ* Abbau von Chlorbenzol in kontaminierten Aquiferen beschrieben WILLIAMS et al. (1997), KAO und PROSSER (1999) sowie HERRINGTON et al. (2000). Über ‚Enhanced Natural Attenuation‘-Sanierungstechnologien für Chlorbenzol-kontaminierte Aquifere existieren unseres Wissens keine Berichte.

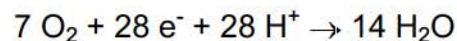
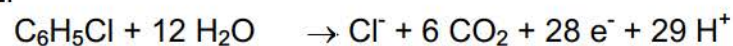
Im Rahmen des TP B2.1 wurde Wasserstoffperoxid als Sauerstoffspender für mikrobielle *in situ*-Abbauprozesse verwendet. Wasserstoffperoxid zerfällt in der ungesättigten und gesättigten Zone eines Aquifers zu Sauerstoff und Wasser (Reaktionsgleichung 1), hauptsächlich katalysiert durch Enzyme (Katalase, Peroxidasen) oder anorganische Ionen wie Fe^{2+} , wobei die Reaktion der Katalase als die wichtigste dieser Reaktionen angesehen wird (SPAIN et al., 1989; PARDIECK et al., 1992; ANID et al., 1993; FIORENZA und WARD, 1997; ZAPPI et al., 2000).

Reaktionsgleichung 1: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Wasserstoffperoxid lässt sich aufgrund seiner guten Wassermischbarkeit leicht dosieren. Nachteilig kann sich allerdings eine zu schnelle Zerfallsreaktion auswirken, da sich Sauerstoffblasen bilden und diese ausgasen können.

Für den dissimilatorischen aeroben Abbau eines Mols Chlorbenzol werden theoretisch sieben Mol Sauerstoff gebraucht:

Reaktionsgleichung 2:



Gesamtgleichung: $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl} + 7 \text{O}_2 \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{HCl}$

Nicht in dieser allgemeinen Gleichung berücksichtigt ist, dass beim produktiven aeroben Abbau von Chlorbenzol durch die autochthone Bakteriengemeinschaft etwa 30 % des organischen Kohlenstoffs assimiliert und nicht veratmet wird (DERMIETZEL et al., 1999, WÜNSCHE et al., 2000), so dass die tatsächlich benötigte Sauerstoffmenge geringer ist. Unter dieser Voraussetzung sind für den aeroben Abbau von einem Molekül Chlorbenzol etwa 5 Moleküle Sauerstoff nötig, für deren Entstehen

dann mindestens die doppelte Menge Wasserstoffperoxid benötigt wird (siehe Reaktionsgleichung 1), also wenigstens 10 Moleküle Wasserstoffperoxid pro Molekül Chlorbenzol.

Abbau von Schadstoffen unter Sauerstofflimitation – das Konzept der gemischten Elektronenakzeptoren Nitrat und Sauerstoff

Die Nutzung des Elektronenakzeptors Nitrat sollte insbesondere in Zonen geringer Sauerstoffkonzentration dazu beitragen, dass weniger Sauerstoff in mikrobiologischen Atmungsprozessen verbraucht wird; die simultane Verwertung der Elektronenakzeptoren Sauerstoff und Nitrat durch Boden- und Grundwasserbakterien wurde oft beschrieben (z.B. THOMAS et al., 1994; CARTER et al., 1995; BERGWALL und BENGSSON, 1999). Auch ist Nitrat eine für die meisten Bakterien assimilierbare Stickstoffverbindung. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass der Abbau von aromatischen Verbindungen (z.B. BTEX-Verbindungen) bei geringen Sauerstoffkonzentrationen durch die Zugabe von Nitrat verbessert werden kann (MIKESSELL et al., 1993; KUKOR und OLSEN, 1996; WILSON und BOUWER, 1997; LEAHY und OLSEN, 1997; WILSON DURANT et al., 1999). Augenscheinlich kommen unter diesen Bedingungen Organismen zum Zuge, deren Abbaustoffwechsel an geringe Sauerstoffkonzentrationen angepasst ist, wie das beispielweise für den Abbau von 3-Chlorbenzoat beschrieben wurde (KROONEMANN et al., 1996). Die Anwesenheit von Nitrat hemmt darüber hinaus die mögliche mikrobiologische Sulfatreduktion in anoxischen Reaktorbereichen (LONDROY und SUFLITA, 1999; MYHR et al., 2002; PERCHERON et al., 1999), was die unerwünschte Freisetzung von Schwefelwasserstoff verhindert. Das Bitterfelder Grundwasser enthält im Reaktorzulauf bis zu 9 mM Sulfat.

Untersuchungen zur funktionellen und strukturellen Diversität des Reaktor-Aquifermaterials

Um die ablaufenden mikrobiell katalysierten Prozesse eines *in situ*-Sanierungsverfahren besser einzuschätzen bzw. bewerten zu können, sollte die strukturelle und funktionelle Diversität der autochthonen Bakteriengemeinschaften so gut wie möglich charakterisiert werden. Dies zu tun ist nicht trivial. Mit kultivierungsabhängigen Methoden werden in der Regel nur Teile der tatsächlich vorhandenen Bakterien erfasst (z.B. TORSVIK et al., 1990; WAGNER et al., 1993; WATANABE et al., 2000). Most Probable Number (MPN)-Verfahren ermöglichen es allerdings, Hinweise auf dominante ökologische Gruppen oder auf die Verteilung und Anzahl von Bakterien zu bekommen, die bestimmte Schadstoffe metabolisieren. Kultivierungsunabhängige Methoden eignen sich daher besser zur Bestandsaufnahme von komplexen mikrobiellen Gemeinschaften in Umweltproben; diese Methoden beruhen in der Regel auf dem Nachweis bzw. der Vervielfältigung von spezifischen RNA- oder DNA-Sequenzen (DOJKA et al., 2000; RÖLING et al., 2001; THERON und CLOETE, 2000; WATANABE et al., 2000). Im SAFIRA Projekt B2.1 wurden beide Methoden – kultivierungsabhängige und kultivierungsunabhängige – verwendet, um die

strukturelle und funktionelle mikrobielle Diversität in Reaktorsedimenten und im ein- und ausfließendem Grundwasser zu ermitteln. Mittels (kultivierungsunabhängiger) 16S rDNA-Sequenzanalyse sowie (kultivierungsabhängigen) MPN-Zellzahlbestimmungen von ökophysiologisch relevanten Mikroorganismengruppen wurde die strukturelle mikrobielle Diversität bestimmt (ALFREIDER et al., 2002; VOGT et al., 2002a). Die funktionelle Diversität wurde (kultivierungsabhängig) mittels MPN-Zellzahlbestimmungen aerober Chlorbenzol-metabolisierender Bakterien (VOGT et al., 2002a; 2004a) und (kultivierungsunabhängig) mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sowie konventioneller PCR bestimmt (ALFREIDER et al., 2003a, b). Mittels RT-PCR wurde aus Reaktorwässern und –sedimenten direkt extrahierte messenger RNA von Schlüsselenzymen des aeroben Chlorbenzol-Abbaus in DNA umgeschrieben, vervielfältigt und die Sequenzen der entsprechenden Gene im weiteren Verlauf ermittelt; dies erlaubte Aussagen über die Anzahl der *in situ* exprimierten Abbaenzyme und deren phylogenetische Einordnung (ALFREIDER et al., 2003a).

Zur Rolle der Braunkohle

Die Geologie der Bitterfelder Region ist geprägt von Braunkohleflözen, die an der Basis des quartären Grundwasserleiters liegen. Braunkohle kann große Mengen an organischen Schadstoffen aufnehmen und so als Puffer agieren, im Gegenzug aber auch – im Falle der Sättigung - Schadstoffe abgeben und als Schadstoffquelle fungieren. Beide Prozesse spielen in Bitterfeld eine Rolle und beeinflussen so die Schadstoffkonzentrationen im Grundwasserleiter (CHRISTOPH und DERMIETZEL, 2000; DERMIETZEL und CHRISTOPH, 2001; DERMIETZEL, 2003).

Das als Reaktorfüllmaterial verwendete Sediment wurde aus den unteren quartären Schichten gewonnen und enthielt eine erhebliche, heterogen verteilte Braunkohlefraktion (VOGT et al., 2002a; VOGT und ALFREIDER, 2003). Diese verzögerte den Transport des Chlorbenzols durch die Reaktorsäule und erschwerte somit den Nachweis mikrobieller Abbauprozesse im Reaktor. Die im Reaktor gemessenen Chlorbenzol-Daten stimmten recht gut mit einem Modell des reaktiven Transports für braunkohlehaltige Sedimente überein, welches an der Universität Tübingen entwickelt wurde (MOLINERA GARCIA, 2002; BIRK et al., Manuskript eingereicht, siehe auch Kapitel 10 dieses Bandes). Mit einer Desorption aus Braunkohle ließen sich auch die im Vergleich zum Zulaufgrundwasser für lange Zeit erhöhten Konzentrationen an 1,2-Dichlorbenzol und 1,4-Dichlorbenzol im Ablauf der Reaktoren erklären.

5.2 Ergebnisse

Im folgenden werden die im Teilprojekt B2.1 erarbeiteten Ergebnisse in zusammenfassender Form dargestellt.

Aufbau des Reaktorsystems

Die zwei Reaktoren (Reaktor 1a und Reaktor 1b) zur mikrobiologischen Dekontamination des Grundwassers stehen im Schacht 5 der SAFIRA-Pilotanlage. Sie sind aus Edelstahl, jeweils 12 m lang und haben einen Durchmesser von 600 mm (Abb. 5.1). Als Füllung wurde natives quartäres Aquifersediment verwendet; der Braunkohleanteil des Materials beträgt bis zu 12,5 Massenprozent im Reaktor 1b und bis zu 4,4 Massenprozent im Reaktor 1a (VOGT et al., 2002a; VOGT und ALFREIDER, 2003). Vor der Befüllung wurde das Sediment für sechs Wochen in einem Container gelagert, überschichtet mit Grundwasser aus dem Bereich knapp oberhalb der Braunkohleschicht des Quartären Aquifers und zusätzlich abgedichtet durch eine Folie aus Polyethylen. Die Flußrate des zulaufenden Grundwassers betrug 4,7 l/h; daraus ergab sich eine Verweilzeit des Wassers von etwa 10 Tagen in den Reaktoren, wie anhand eines Leitfähigkeitstracertests ermittelt wurde (VOGT und ALFREIDER, 2003). Zu dosierende Substanzen (konzentrierte Wasserstoffperoxid- und/oder Natriumnitratlösung) wurden in Edelstahltanks gelagert (Füllvolumen: 60 l) und in das einfließende Grundwasser mittels einer Schlauchpumpe (Rate: 0,043 l/h) und Zuleitungen aus Edelstahl eingebracht.

Das Grundwasser wurde aus dem Horizontalbrunnen 5 des Testgeländes aus etwa 19,5 m Tiefe in den Reaktor 1b gepumpt. Es ist reich an Sulfat (7 bis 9 mM) und Chlorid (bis zu 13 mM), enthält die mikrobiellen Nährstoffe Ammonium (300 bis 400 μM) und Phosphat (80 bis 120 μM), aber kein Nitrat sowie kaum Sauerstoff (weniger als 1 μM). Bis in die zweite Hälfte des Jahres 2001 war Schwefelwasserstoff nicht nachweisbar, anschließend bis Projektende unregelmäßig in geringen Konzentrationen ($\leq 5 \mu\text{M}$). Die durchschnittliche Temperatur betrug 14°C, der pH-Wert schwankte zwischen 6,6 bis 6,8 (VOGT et al., 2002a). Hauptschadstoff des Grundwassers ist Chlorbenzol. In den ersten 565 Versuchstagen schwankten die Chlorbenzol-Konzentrationen zwischen 200 und 300 μM . Zwischen Versuchstag 565 und 610 fielen die Konzentrationen ab auf Werte um 120 μM Chlorbenzol, um dann ab Versuchstag 650 wieder leicht anzusteigen, ohne das vorherige Niveau zu erreichen. Neben Chlorbenzol enthält das Grundwasser des Horizontalbrunnens 5 noch 1,2-Dichlorbenzol, 1,4-Dichlorbenzol und Benzol in geringen Konzentrationen ($< 3 \mu\text{M}$) (VOGT et al., 2002a). Generell enthält das Grundwasser des Horizontalbrunnens 5 mehr Chlorbenzol als die Grundwässer der Horizontalbrunnen 1 bis 4 der Pilotanlage.

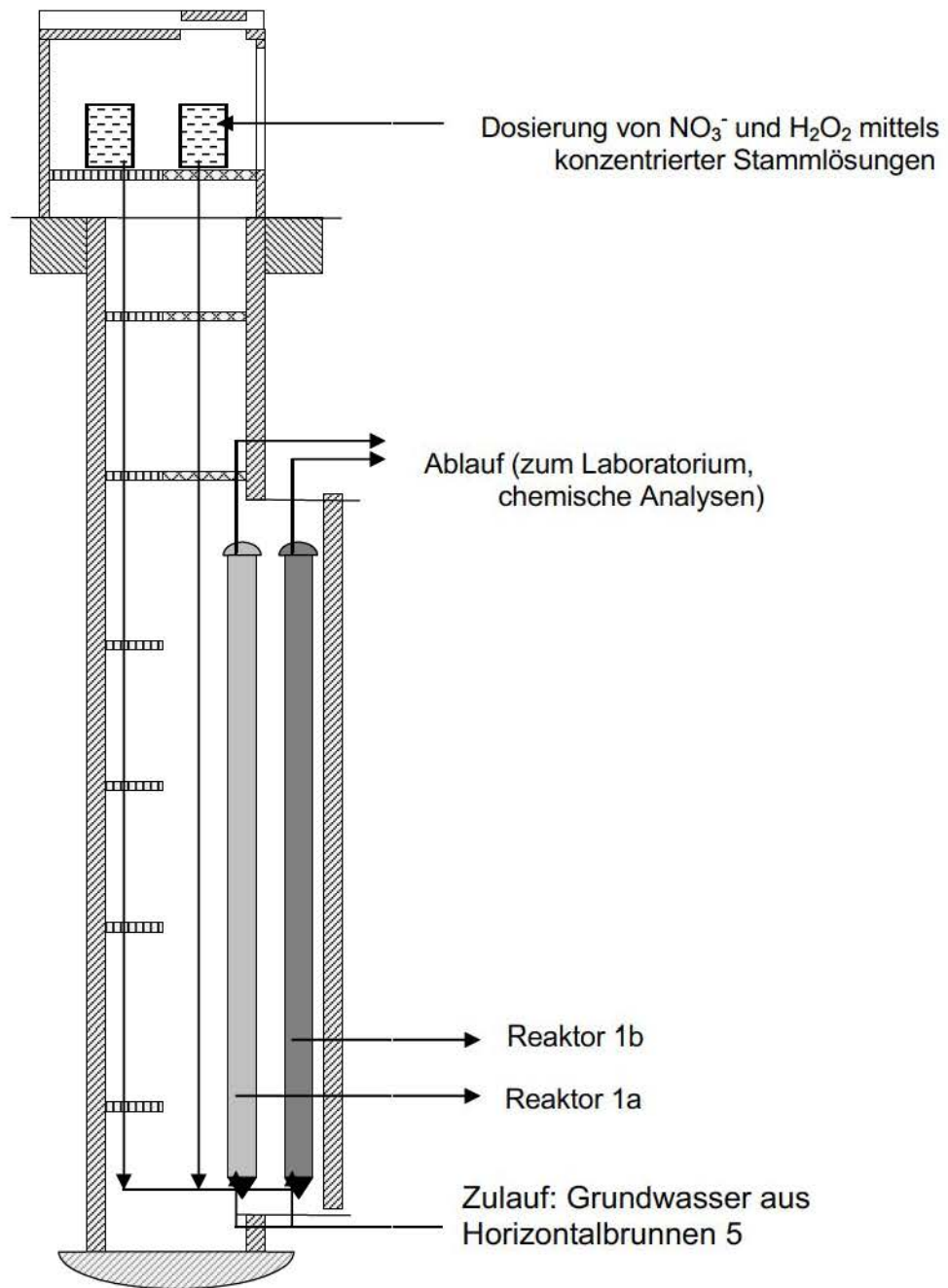


Abbildung 5.1: Schema der Anordnung der Reaktoren 1a und 1b im Schacht 5 der SAFIRA-Pilotanlage in Bitterfeld.

Einspülphase

Im Oktober 1999 wurde der Versuchsbetrieb mit der kontinuierlichen Zuführung des Grundwassers aufgenommen. Voraussetzung für die Gewinnung auswertbarer Daten war das Vorliegen eines stabilen Prozesszustandes in beiden Reaktoren; als *steady state*-Kriterium wurde das Erreichen eines gleichbleibenden Chlorbenzol-Gehaltes im Grundwasserabstrom beider Reaktoren festgelegt. Aufgrund des hohen Braunkohleanteils des Reaktormaterials stellte sich dieser Zustand in beiden Reaktoren erst nach ca. 230 Tagen Einspülzeit ein (VOGT et al., 2002a). Als überraschender Effekt wurden in den Reaktorabläufen 1,4- und 1,2- Dichlorbenzol-Konzentrationen gemessen, die die Zulauf-Konzentrationen um das bis zu 6fache überstiegen. Vermutlich desorbierten beide Dichlorbenzole aus der im Aquifer-material befindlichen Braunkohle. Die Zu- und Ablauf-Konzentrationen der Dichlorbenzole glichen sich unabhängig von den einzelnen Versuchsphasen in den Reaktoren im weiteren Versuchsverlauf an. In der ersten Phase der Durchspülung wurden außerdem im Ablauf im Vergleich zum Zulauf erhöhte Sulfatkonzentrationen und starke Eisenausfällungen (Fe-Hydroxide) beobachtet (VOGT et al., 2002a).

Mikrobielle Diversität in Reaktorsedimenten und im Grundwasser

Nach Erreichen des *steady state*-Zustandes wurde die mikrobielle Diversität in Reaktorsedimenten aus unterschiedlichen Reaktorbereichen und im einfließenden Grundwassers mittels kultivierungsunabhängiger 16S rDNA-Sequenzanalyse und mittels kultivierungsabhängiger Most Probable Number (MPN) -Technik bestimmt. Eine Gesamtmenge von 87 bakteriellen 16S rDNA-Genen wurde sequenziert und phylogenetisch analysiert (Alfreider et al., 2002). Im einfließenden Grundwasser des Horizontalbrunnens 5 wurden zahlreicher Mitglieder der Klasse der Proteobakterien, einige sporulierende und nicht-sporulierende Sulfatreduzierer sowie einige Bakterien nachgewiesen, die keiner der bisher bekannten bakteriellen Phyla zugeordnet werden konnten. Die meisten Bakterien, die in den Sedimentproben nachgewiesen wurden, gehören der Klasse der β -Proteobakterien an; es dominierten nahe Verwandte des ubiquitär vorhandenen Bakteriums *Alcaligenes faecalis* und Verwandte von Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C -Gehalt. In oberen Reaktorbereichen wurden gehäuft Bakterien nachgewiesen, die mit *Acidithiobacillus ferrooxidans* (γ -Unterklasse der Proteobakterien) verwandt sind. In den Ausläufen beider Reaktoren wurden ebenfalls Bakterien gefunden, die taxonomisch in verschiedene Untergruppen der Proteobakterien und der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C -Gehalt eingeordnet werden können; die meisten dieser Sequenzen waren aber phylogenetisch deutlich von den aus den Reaktorsedimenten gewonnenen Sequenzen abgegrenzt. Mittels MPN-Verfahren wurde nachgewiesen, dass die Sedimente stark mit denitrifizierenden, eisenreduzierenden und aeroben Bakterien besiedelt waren, weniger mit sulfatreduzierenden. In allen Sedimentproben wie auch im Grundwasser wurden ferner aerobe Chlorbenzol-metabolisierende

Bakterien gefunden (VOGT et al., 2002a). Aus den höchsten bewachsenen Verdünnungsstufen der MPN-Reihen wurden zahlreiche Chlorbenzol-metabolisierende Reinkulturen isoliert und phylogenetisch eingeordnet, am häufigsten wurden Stämme der Gattungen *Pseudomonas* und *Rhodococcus* gefunden (VOGT et al., 2004a). Darüber hinaus wurden im Reaktorsediment zahlreiche unterschiedliche DNA-Sequenzen nachgewiesen und phylogenetisch charakterisiert, die für eine Unter-einheit der RuBisCO codieren (siehe 1.5; ALFREIDER et al., 2003b).

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Im Aquifer siedeln taxonomisch unterschiedliche Bakterien, die in der Lage sind, Chlorbenzol mit Hilfe von Sauerstoff vollständig abzubauen. Auf Bioaugmentation (Einbringen von im Labor gezüchteten Chlorbenzol-abbauenden Bakterien in den Aquifer) kann daher verzichtet werden.
- Im Aquifer siedeln neben Chlorbenzol-Abbauern zahlreiche ökophysiologisch unterschiedliche Bakteriengemeinschaften. Es können deshalb neben dem eigentlichen Schadstoffabbau auch immer noch andere, den Schadstoffabbau eventuell positiv oder negativ beeinflussende biochemische Reaktionen ablaufen. Dies sollte beachtet werden.
- Obwohl das Grundwasser anoxisch ist und sehr viel Sulfat enthält, spielt mikrobiell katalysierte Sulfatreduktion zu Schwefelwasserstoff kaum eine Rolle im natürlichen Aquifermaterial. Diese Situation bevorteilt aerobe Sanierungsstrategien (denn Schwefelwasserstoff würde Sauerstoff zehren).
- Die Bakteriengemeinschaften im Grundwasser und auf den besiedelten Reaktorsedimenten unterscheiden sich phylogenetisch; dies weist darauf hin, dass das Aquifersediment spezifisch besiedelt wird und sich *in situ* Biofilme bilden.

Reaktorbetrieb unter anoxischen denitrifizierenden Bedingungen

Nach 286 Versuchstagen wurde begonnen, in beide Versuchsreaktoren Nitrat (1 mM) einzubringen. In den folgenden 77 Tagen wurde in beiden Reaktoren Chlorbenzol nicht abgebaut. In der letzten Versuchsphase verschwand allerdings mehr als 95% des zugesetzten Nitrats; Nitrit wurde im Ablauf nicht detektiert. Reaktor 1a wurde in einer späteren Versuchsphase über 500 Tage unter anoxischen denitrifizierenden Bedingungen betrieben, ohne dass der Chlorbenzol-Gehalt während des Reaktordurchlaufs signifikant abnahm. Parallel zum Reaktorbetrieb wurden Anreicherungen mit Sedimenten aus Reaktor 1a und Grundwasser aus Horizontalbrunnen 5 unter nitratreduzierenden, sulfatreduzierenden sowie chlorat-reduzierenden Bedingungen angesetzt. In keinem dieser Ansätze wurde ein eindeutiger, reproduzierbarer Abbau von Chlorbenzol beobachtet (VOGT und ALFREIDER, 2003).

Betrieb des Reaktors 1b

Ab Versuchstag 363 wurde schwerpunkthaft der Abbau von Chlorbenzol unter gemischten Elektronenakzeptorbedingungen (Nitrat und Sauerstoff) untersucht; als Versuchsreaktor diente hierfür Reaktor 1b. Als Sauerstoffträger wurde Wasserstoffperoxid verwendet. Aufgrund des fast vollständigen Verbrauchs von Nitrat in der vorherigen Versuchsphase (Versuchstage 286-363) wurde die Nitrat-Konzentration von 1 mM auf 2 mM erhöht. Ungefähr 130 Tage nach Beginn der Dosierung begannen die Chlorbenzol-Konzentrationen im Ablauf des Reaktors 1b kontinuierlich zu sinken. Anschließend wurde nachgewiesen, dass (I) in Wasserproben aus dem untersten Reaktorbereich (0,1 m Reaktorhöhe) zugesetztes Wasserstoffperoxid (2,94 mM) innerhalb kurzer Zeit (< 15 Minuten) vollständig zu Sauerstoff (und Wasser) zerfiel, dass (II) die Anzahl Chlorbenzol-metabolisierender Bakterien in Wasserproben aus dem untersten Reaktorbereich signifikant zunahm, und dass (III) Chlorbenzol im untersten Reaktorbereich nicht mehr nachweisbar war (VOGT et al., 2002b, 2004a). Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass sich infolge der Dosierung von Wasserstoffperoxid und Nitrat im unteren Reaktorbereich eine reaktive Zone ausgebildet hatte, in der die gesamte zufließende Menge Chlorbenzol mikrobiologisch metabolisiert wurde. Die Chlorbenzol-Konzentrationen stiegen innerhalb des Reaktors an, was mit der Desorption von Chlorbenzol aus Braunkohle erklärt werden kann (MOLINERO GARCÍA, 2002; BIRK et al., Manuskript eingereicht). Am Versuchstag 719 wurde die Dosierung des Reaktors 1b auf 0,88 mM Wasserstoffperoxid und 2 mM Nitrat umgestellt (Abb. 5.2). Für den aeroben Chlorbenzol-Abbau standen somit maximal nur noch 0,44 mM Sauerstoff zur Verfügung. Nach der Umstellung stiegen die Chlorbenzol-Konzentrationen im Reaktorwasser des unteren Reaktorbereichs (0,35 m) an von 0,6 µM auf maximal 82,1 µM (Versuchstag 784, 65 Tage nach der Umstellung; Abb. 5.2); die reduzierte Menge Sauerstoff reichte also anfangs für einen vollständigen Abbau des Chlorbenzol nicht aus. Etwa 100 Tage nach der Umstellung auf Dosierung von 0,88 mM Wasserstoffperoxid fielen die Chlorbenzol-Konzentrationen im unteren Reaktorbereich (0,35 m) wieder ab, kurze Zeit später auch im Reaktorbereich 0,8 m. Am Versuchstag 924 war bis 0,8 m Reaktorhöhe kein Chlorbenzol mehr nachweisbar. Die Chlorbenzol-Konzentrationen der Wasserproben aus höheren Reaktorbereichen (0,8 m – 2,5 m – 5,5 m) verliefen ähnlich wie die Konzentrationen des unteren Reaktorbereichs, allerdings verzögert; die Konzentrationen stiegen an auf Werte bis maximal 92,7 µM, verweilten eine gewisse Zeit auf diesem Niveau und sanken anschließend wieder. Die Chlorbenzol-Konzentrationen des Reaktorablaufs blieben hingegen während der gesamten Versuchsphase auf einem Niveau zwischen 32,2 µM und 51,8 µM. Bezogen auf die gesamte Länge des Reaktors (Ablaufkonzentrationen geteilt durch Zulaufkonzentrationen) belief sich der Chlorbenzol-Abbau in der Versuchsphase mit Dosierung von 0,88 M mM Wasserstoffperoxid und 2 mM Nitrat somit auf 60 bis 78 %. Im unteren Reaktorbereich (bis 0,8 m Reaktorhöhe) ergaben sich jedoch am Versuchstag 924

Abbauwerte von 100 %. Der niedrige Sauerstoffbedarf des *in situ*-Abbaus weist darauf hin, dass der aus der Disproportionierung von Wasserstoffperoxid ins System strömende Sauerstoff nach etwa 870 Versuchstagen nahezu vollständig in den Abbau von Chlorbenzol einging. Vergleicht man die eingeflossenen Chlorbenzol-Mengen, die zwischen 112 und 157 μM betragen, mit der zur Verfügung gestandenen Menge Sauerstoff (maximal 440 μM), ergibt sich ein maximales molares Verhältnis Sauerstoff zu Chlorbenzol von 2,8-3,9 zu 1. Dies reichte für eine Metabolisierung des Chlorbenzol gerade aus, wenn angenommen wird, dass Chlorbenzol über die bisher bekannten aeroben Abbauege verstoffwechselt wird.

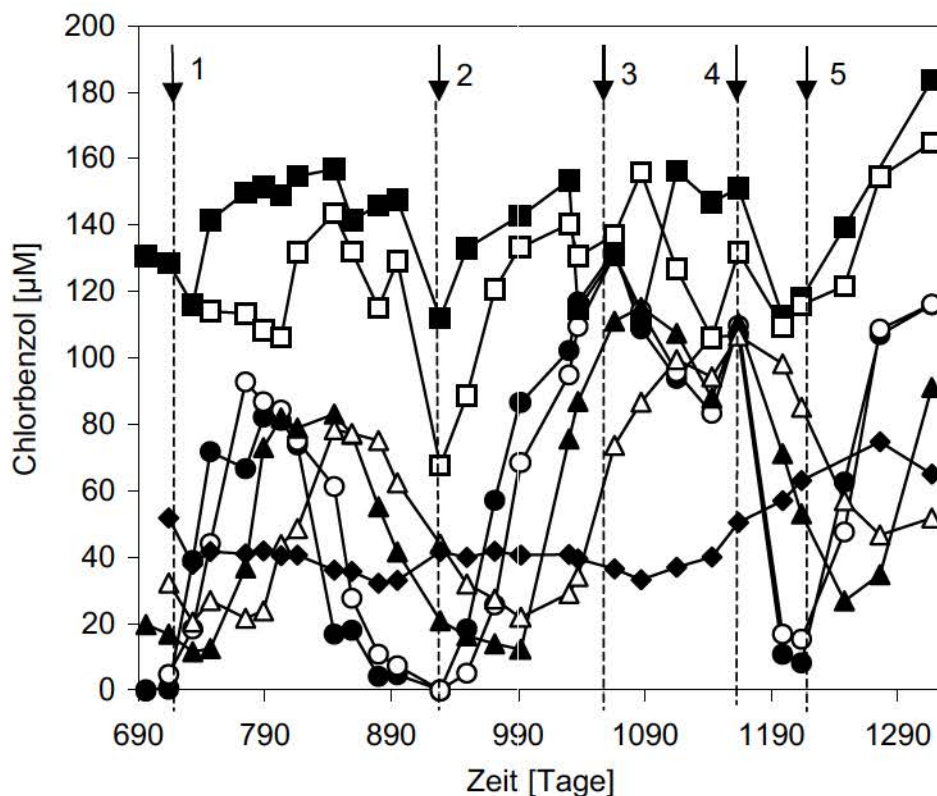


Abbildung 5.2: Zeitabhängige Chlorbenzol-Konzentrationen in verschiedenen Höhen des Reaktors 1b, Versuchszeitraum 714-1317 Operationstage. Pfeile zeigen jeweils den Beginn eines neuen Dosierungsregimes an. ↓1 (Tag 719): 0,88 mM H_2O_2 , 2 mM NO_3^- ; ↓2 (Tag 930): 0,44 mM H_2O_2 , 2 mM NO_3^- ; ↓3 (Tag 1061): 0,88 mM H_2O_2 ; 2 mM NO_3^- ; ↓4 (Tag 1165): 2,92 mM H_2O_2 ; 2 mM NO_3^- ; ↓5 (Tag 1221): 0,88 mM H_2O_2 , 2 mM NO_3^- . ■ Horizontalbrunnen 5 (Zulauf); □ 'Z' (kurz vor dem Reaktoreintritt); ● 0,35 m; ○ 0,8 m; ▲ 2,5 m; △ 5,5 m; ◆ Ablauf (verändert nach VOGT et al., 2004a)

3-Chlorbrenzcatechin wurde über den gesamten Versuchszeitraum in keiner Wasserprobe der Reaktorhöhen 0,1 m – 0,35 m – 0,8 m – 2,5 m – 5,5 m nachgewiesen. Auch eine Braunfärbung des Reaktorwassers, verursacht durch autoxidiertes 3-Chlorbrenzcatechin (FARRELL und QUILTY, 1999), wurde nicht beobachtet. In Laborversuchen mit Chlorbenzol-metabolisierenden autochthonen Isolaten war zuvor festgestellt worden, dass die Organismen im Zuge des Chlorbenzol-Abbaus 3-

Chlorbrenzcatechin im Medium akkumulierten, wenn die Sauerstoffkonzentration unter einen Schwellenwert, der bei etwa 37,5 μM lag, fiel (VOGT et al., 2004b). Das Fehlen von 3-Chlorbrenzcatechin ist somit ein Hinweis, dass der *in situ* Abbau von Chlorbenzol keiner Sauerstofflimitation unterlag und über die Stufe des ‚Engpasses‘ 3-Chlorbrenzcatechin hinauslief. Nicht ausgeschlossen werden kann allerdings, dass das reaktive 3-Chlorbrenzcatechin sehr schnell mit Bestandteilen des Aquifermaterials oder mit in der unteren Reaktorzone gebildeten Nitrit (VOGT et al., 2004b) chemisch reagierte und deshalb nicht nachgewiesen werden konnte.

Welche metabolischen Abbauewege die Chlorbenzol-metabolisierenden Bakterien *in situ* verwendeten, wurde in der Phase zwischen Versuchstag 733 und 895 mit einem molekularbiologischen Ansatz untersucht (RT-PCR; ALFREIDER et al., 2003a). Transkripte für die Schlüsselenzyme der beiden bekannten Chlorbenzol-Abbauewege, Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase und Chlorbrenzcatechin-2,3-Dioxygenase, wurden in Grundwasserproben kurz vor dem Reaktoreingang und in Reaktorsedimentproben aus dem unteren Reaktorbereich nachgewiesen. Transkripte für die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase wurden auch in Reaktorsedimenten aus höherliegenden Reaktorbereichen gefunden (ALFREIDER et al., 2003a). Die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase-Sequenzen ließen sich in zwei separate Cluster einteilen, während die Chlorbrenzcatechin-2,3-Dioxygenase-Sequenzen alle sehr stark der Sequenz einer Chlorbrenzcatechin-2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* GJ31 ähnelten, einem Stamm, der Chlorbenzol über den *meta*-Weg metabolisiert (MARS et al., 1997). Die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen zeigen, dass die Chlorbenzol-abbauende Bakteriengemeinschaft des Reaktors divers zusammengesetzt war und diese vermutlich zwei unterschiedliche Abbauewege (modifizierter *ortho*- und *meta*-Weg) *in situ* zur Metabolisierung des Chlorbenzols einsetzte.

Am Versuchstag 924 wurde die Wasserstoffperoxid-Konzentration nochmals um die Hälfte reduziert, so dass theoretisch weniger als 2 Moleküle Sauerstoff pro Molekül einfließendem Chlorbenzols verfügbar waren. Die Chlorbenzol-Konzentrationen stiegen daraufhin in den untersten Reaktorzonen sofort an, bis sie das Niveau der einfließenden Chlorbenzol-Konzentrationen erreicht hatten (Abb. 5.2): Der Abbau des Chlorbenzols war unter den eingestellten Bedingungen völlig zusammengebrochen. Anschließend wurde die Wasserstoffperoxid-Konzentration wieder auf 880 μM erhöht. Die Chlorbenzol-Konzentrationen sanken anschließend im unteren Reaktorbereich, stiegen aber später wieder leicht an; der vorher unter diesen Bedingungen beobachtete vollständige Abbau von Chlorbenzol stellte sich jetzt nicht mehr ein. Die Ursache war Sauerstofflimitation, wie der sofortige Abfall der Chlorbenzol-Konzentrationen im unteren Reaktorbereich nach erhöhter Zugabe an Wasserstoffperoxid belegte (Abb. 5.2).

Nach dem Zusammenbruch des Chlorbenzol-Abbaus infolge zu geringer Dosierung von Wasserstoffperoxid (Sauerstoffmangel!) hatte sich also in den anschließenden

Versuchsphasen der Sauerstoffbedarf des Chlorbenzol-Abbaus erhöht; eventuell wurde die Chlorbenzol-abbauende Kultur durch den Sauerstoffmangel geschädigt. Längere Phasen der Sauerstoffunterversorgung sollten in aeroben *in situ*-Sanierungsverfahren am Standort Bitterfeld daher vermieden werden.

Betrieb des Reaktors 1a

Reaktor 1a diente für die Untersuchungen unter gemischten Elektronenakzeptorbedingungen als Kontrollreaktor. Folgende Dosierungsregimes wurden für Reaktor 1a eingestellt:

Operationstag 363-445: + 2,94 mM H₂O₂

Operationstag 445-948 + 2 mM NO₃⁻

Die Ergebnisse dieser Versuchsphasen sind in Abbildung 5.3 dargestellt. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid führte zuerst nicht zu einer signifikanten Abnahme der Chlorbenzol-Konzentrationen im Reaktorablauf. Die Nitrat-Konzentrationen im Ablauf sanken erwartungsgemäß auf Restkonzentrationen von $\leq 50 \mu\text{M}$ Nitrat. Nach 445 Operationstagen wurde Reaktor 1a wieder auf eine anoxische Betriebsweise mit Nitrat (2 mM) als Elektronenakzeptor umgestellt und diente ab hier für die restliche Projektlaufzeit als anoxischer Kontrollreaktor. Die Chlorbenzol-Konzentrationen im Ablauf begannen in der Folge auf ein Minimum von 54% der Eingangskonzentration zu fallen (nach 493 Operationstagen), stiegen aber anschließend langsam wieder an. Die Abnahme der Chlorbenzol-Konzentrationen beruhte vermutlich auf einem aeroben Abbau des Chlorbenzols im unteren Reaktorbereich während der Phase der Wasserstoffperoxid-Dosierung, der zeitlich stark verzögert im Ablauf sichtbar wurde, bedingt durch Sorption des Chlorbenzols an der im Reaktormaterial vorhandenen Braunkohle. In den folgenden mehr als 500 Tagen wurde Chlorbenzol nicht signifikant abgebaut (Abb. 5.3). Nitrat verschwand anfänglich zu über 95% innerhalb des Reaktors. Ab Versuchstag 770 begannen die Nitrat-Konzentrationen im Ablauf des Reaktors zu steigen und erreichten am Operationstag 948 ein Maximum von 0,51 mM Nitrat (25,5% der dosierten Menge); die Nitratreduktionskapazität von Reaktor 1a war somit geringer als die von Reaktor 1b (siehe 5.3). Anschließend wurde der Versuch in Reaktor 1a beendet.

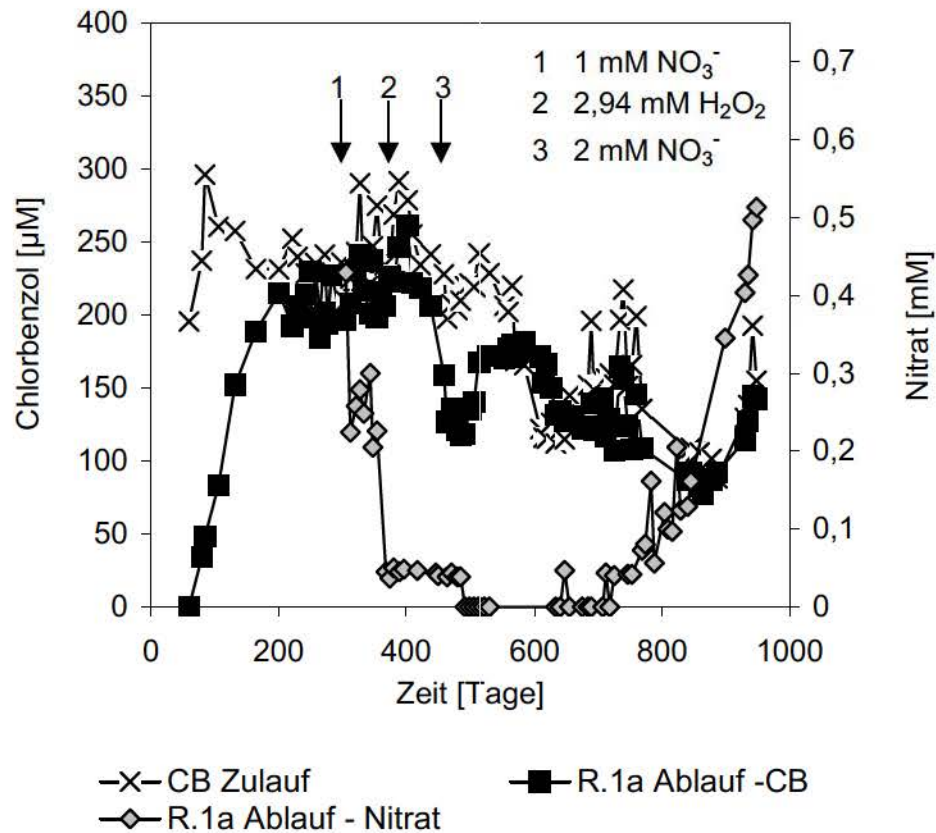


Abbildung 5.3: Chlorbenzol (CB)- und Nitrat-Konzentrationen im Ablauf des Reaktors 1a, gesamtens Versuchszeitraum (0-969 Tage). Die unterschiedlichen Dosierungsregimes sind angezeigt.

Zur Rolle des Nitrats

Nicht eindeutig beantwortet werden konnte im Projektverlauf die Frage, ob die Zugabe von Nitrat den *in situ*-Abbau von Chlorbenzol signifikant förderte, da nur zwei Reaktoren zur Verfügung standen und der zweite Reaktor über weite Strecken der zweiten Projekthälfte als Nitrat-dosierter anaerober Kontrollreaktor benötigt wurde (Abb. 5.3). Der im Projektverlauf beobachtete extrem niedrige Sauerstoffbedarf des Chlorbenzol-Abbaus bei Dosierung von Wasserstoffperoxid und Nitrat wäre theoretisch auch ohne Nitratdosierung möglich; hier sind weitere Untersuchungen nötig. Bei einigen aus Grundwasser und Aquifersediment isolierten Chlorbenzol-metabolisierenden Bakterien stimulierte die Zugabe von Nitrat den aeroben Abbau von Chlorbenzol unter sauerstofflimitierenden Bedingungen nicht (VOGT et al., 2004b). Während des gesamten Projektverlaufs wurde allerdings ein kontinuierlicher, von Wasserstoffperoxid dosierung und Chlorbenzol-Abbau unabhängiger Nitratverbrauch in beiden Versuchsreaktoren festgestellt (VOGT et al. 2002b, 2004a). Da abiotische Reaktionen des sehr gut wasserlöslichen, reaktionsträgen Nitrat-Ions auszuschließen sind, kommt als nitratverbrauchende Reaktion nur ein mikrobiologischer Prozess in Frage; vermutlich wird das meiste Nitrat dissimilatorisch reduziert. Korrespondierend

wurden in verschiedenen Reaktorbereichen geringe Mengen Nitrit (Intermediat der Nitratreduktion) nachgewiesen, auch waren in der Phase des Einspülens alle daraufhin untersuchten Reaktorsedimente z.T. zahlreich mit lebenden nitratreduzierenden Bakterien besiedelt (VOGT et al., 2002a). Im Laufe des Versuchs ansteigende Nitrat-Konzentrationen in den verschiedenen Reaktorhöhen und erste Durchbrüche des Nitrats in den Abläufen beider Reaktoren nach mehr als 850 Versuchstagen weisen darauf hin, dass sich die Menge des (unbekannten) Elektronendonors der Nitratreduktion langsam erschöpfte (Abb. 5.3, Reaktor 1a). Als mögliche Elektronendonoren der Nitratreduktion fungieren vermutlich Bestandteile des Aquifersediments und nicht des Grundwassers, da der Gesamtkohlenstoff (Total organic carbon, TOC) des letzteren zum größten Teil aus Chlorbenzol besteht (WÜNSCHE et al., 2000), dieses aber nicht anoxisch umgesetzt wurde. Eventuell spielt die Oxidation von Fe(II) eine Rolle: Das Aquifersediment enthält bis zu 0,65 Massenprozent Gesamteisen (VOGT et al., 2002a), und eisenoxidierende nitratreduzierende Bakterien sind ubiquitär verbreitet (STRAUB und BUCHHOLZ-CLEVEN, 1998), auch in Aquiferen (EMERSON und MOYER, 1997). Eine zweite mögliche Elektronenquelle für die Nitratreduktion ist die in den Reaktorsedimenten in großer Menge vorkommende Braunkohle. Über den anoxischen biologischen Abbau von Braunkohle liegen kaum Literaturdaten vor (FAKOUSSA und HOFRICHTER, 1999). Braunkohle enthält allerdings generell Pyrit in größeren Mengen, welches von autochthonen Grundwasserbakterien mit Nitrat als Elektronenakzeptor oxidiert werden könnte (KÖLLE et al., 1983; POSTMA et al., 1991; PAUWELS et al., 1998). Im Rahmen des TP B2.1 wurden einige Experimente zur Eisenoxidation mit Nitrat als Elektronenakzeptor durchgeführt. In Mikrokosmenexperimenten mit Grundwasser aus Horizontalbrunnen 5 stimulierte Fe(II) die Reduktion von Nitrat, insbesondere in Ansätzen mit Acetat (VOGT und ALFREIDER, 2003). Es ist aus der Literatur bekannt, dass viele eisenoxidierende Nitratreduzierer auf Acetat als Kohlenstoff und/oder Energiequelle angewiesen sind (BENZ et al., 1998). Ziel der weiteren Untersuchungen war, aus dem Zulaufgrundwasser oder aus Reaktorwasser Anreicherungen zu etablieren, die stabil Fe(II) mit Nitrat ohne Zusatz von Acetat oxidieren, also chemolithoautotroph leben können. Solche stabilen Anreicherungen ließen sich jedoch nicht gewinnen.

5.3 Schlußfolgerungen

Im Teilprojekt B2.1 konnte gezeigt werden, dass Chlorbenzol unter *in situ*-nahen Bedingungen vollständig abgebaut wird, wenn geringe Mengen Wasserstoffperoxid und Nitrat in das Aquifermaterial appliziert werden; andere Hilfsstoffe als die genannten sind für den Abbau nicht notwendig. Es ist in weiteren Untersuchungen zu klären, ob der Abbau des Chlorbenzols mit ähnlich geringen Mengen Sauerstoff auskommt, wenn auf die Dosierung von Nitrat verzichtet wird. Wasserstoffperoxid eignete sich sehr gut als sauerstofflieferndes Agens. Den Abbau bewältigten Chlorbenzol-metabolisierende autochthone Grundwasserbakterien, die in hoher

Diversität am Standort vorkommen und die *in situ* vermutlich zwei unterschiedliche aerobe Abbauwege verwenden. Zukünftige mikrobiologische Untersuchungen sollten zum Ziel haben, an niedrige Sauerstoffkonzentrationen angepasste autochthone Chlorbenzol-metabolisierende Bakterien anzureichern und zu charakterisieren. Während des Reaktorversuchs reduzierten autochthone denitrifizierende Bakterien überschüssiges Nitrat mit im Aquifersediment bzw. Grundwasser vorhandenen Elektronendonoren, so dass sich Nitrat im Falle einer Sanierung nicht im Grundwasser anreichern sollte. Die rückstandsfreie *in situ*-Sanierung Chlorbenzol-haltiger Bitterfelder Aquifere sollte mit diesem Verfahren also prinzipiell möglich sein. Da in der Bitterfelder Region in Braunkohleflözen enorme Mengen Chlorbenzol (und andere organische bzw. chlororganische Verbindungen) *in situ* festgelegt sind, werden für eine auf der Injektion von Wasserstoffperoxid und Nitrat basierende Sanierungstechnologien allerdings enorme Mengen Wasserstoffperoxid und Nitrat benötigt.

Die im Projekt erarbeiteten Ergebnisse sind auch hilfreich für die Beurteilung der mikrobiologischen Prozesse einer passiven Sanierungstechnik, deren Erprobung für den Bitterfelder Raum angedacht wird: den Angelegten Auenlandschaften (Constructed Wetlands). In diesen soll Chlorbenzol-haltiges Grundwasser zu Tage treten und *in situ* von autochthonen Chlorbenzol-metabolisierenden Bakterien abgebaut werden. Ein Vorteil dieser Sanierungstechnik ist, dass Sauerstoff unbegrenzt zur Verfügung stünde; limitierender Schritt des mikrobiologischen Abbaus von Chlorbenzol (und anderen aerob abbaubaren Schadstoffen) in solchen Landschaften sollte allein die Geschwindigkeit des Übergang des Sauerstoff aus der atmosphärischen in die wässrige Phase sein. Eine solche Sanierungsvariante wird derzeit auf dem Gelände der Pilotanlage Bitterfeld im kleinen Maßstab getestet.

Danksagung

Wir bedanken uns beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Finanzierung des Projekts (Förderkennzeichen 02WT9939/2). Darüber hinaus danken wir Dr. Holger Weiß und dem Team der Pilotanlage Bitterfeld für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung vor Ort.

Literatur

- ALFREIDER, A., VOGT, C., BABEL, W. (2002): Microbial colonization of an *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *J. Syst. Appl. Microbiol.* 25: 232-240.
- ALFREIDER, A., VOGT, C., BABEL, W. (2003a): Expression of chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in chlorobenzene-contaminated subsurface systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1372-1376.
- ALFREIDER, A., VOGT, C., HOFFMANN, D., BABEL, W. (2003b): Diversity of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large-Subunit Genes from Groundwater and Aquifer Microorganisms. *Microb. Ecol.* 45: 317-328.

- ANID, P.J., ALVAREZ, P.J.J., VOGEL, T.M. (1993): Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. *Wat. Res.* 27: 685-691.
- BARTELS, I., KNACKMUSS, H.J., REINEKE, W. (1984): Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 500-505.
- BENZ, M., BRUNE, A., SCHINK, B. (1998): Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria. *Arch. Microbiol.* 169: 159-165.
- BERGWALL, C., BENGTTSSON, G. (1999): Phenotypic plasticity in groundwater denitrifiers. *Oikos* 87: 123-128.
- BIRK, S., MOLINERO GARCÍA, A., KLEINEIDAM, S., BOLD, S., VOGT, C., LIEDL, R.: Schadstofffreisetzung und -transport in braunkohlehaltigen Sedimenten. *Grundwasser*, Manuskript eingereicht.
- BURLAND, S.M., EDWARDS, E.A. (1999): Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 529-533.
- CARTER, J.P., HSIAO Y.H., SPIRO, S., RICHARDSON, D.J. (1995): Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2852-2858.
- Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.G., O'Connor, S.M., Cole, K.A., Bender, K.S., Achenbach, L.A., 2001. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* 411: 1039-1043.
- CHRISTOPH, G., DERMETZEL, J. (2000): The impact of a contaminated lignite seam on groundwater quality in the aquifer system of the Bitterfeld region – modelling of groundwater contamination. *Wat. Air Soil Pollut.* 122: 421-431.
- DE BONT, J.A.M., VORAGE, M.J.A.W., HARTMANS, S., VAN DEN TWEEL, W.J.J. (1986): Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 677-680.
- DERMETZEL, J. (2003): Zur Kinetik der Schadstoffdesorption aus kontaminierter Braunkohle in das Grundwasser. *Grundwasser* 8: 75-80.
- DERMETZEL, J., CHRISTOPH, G. (2001): The impact of a lignite seam on contaminated groundwater in the aquifer system of the Bitterfeld region. *Wat. Air Soil Pollut.* 125: 157-170.
- DERMITZEL, J., KRAUß, G., SEIFERT, K. (1999): Untersuchungen zum Abbau von Chloraromaten im Grundwasser und im Aquifer. SAFIRA, 2. Statusbericht, Modellstandort, Mobile Testanlage, Pilotanlage, S. 147-156. - UFZ-Bericht 17/1999.
- DIJK, J., DE BONT, J.M., LU, X., BECKER, P.M., BOSMA, T.N.P., RIJNAARTS, H.H.M., GERRITSE, J. (2000): Anaerobic Oxidation of (Chlorinated) Hydrocarbons. In: G.B. Wickramanayake (Editor), *Bioremediation and Phytoremediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*, C2-4. Proceedings of the Second International Conference on Remediation of Chlorinated and Realcitrant Compounds, Monterey, USA, S. 63-70.
- DOJKA, M.A., HUGENHOLTZ, P., HAACK, S.K., PACE, N.R. (1998): Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3192-3204.
- DOLFING, J., ZEYER, J., BINDER-EICHER, P., SCHWARZENBACH, R.P. (1990): Isolation and characterization of a bacterium that mineralizes toluene in the absence of molecular oxygen. *Arch. Microbiol.* 154: 336-341.
- EMERSON, D., MOYER, C. (1997): Isolation and characterization of novel iron-oxidizing bacteria that grow at circumneutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4784-4792.
- FAKOUSA, R.M., HOFRICHTER, M. (1999): Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 25-40.
- FARRELL, A., QUILTY, B. (1999): Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta-cleavage pathway. *Biodegradation* 10: 353-362.

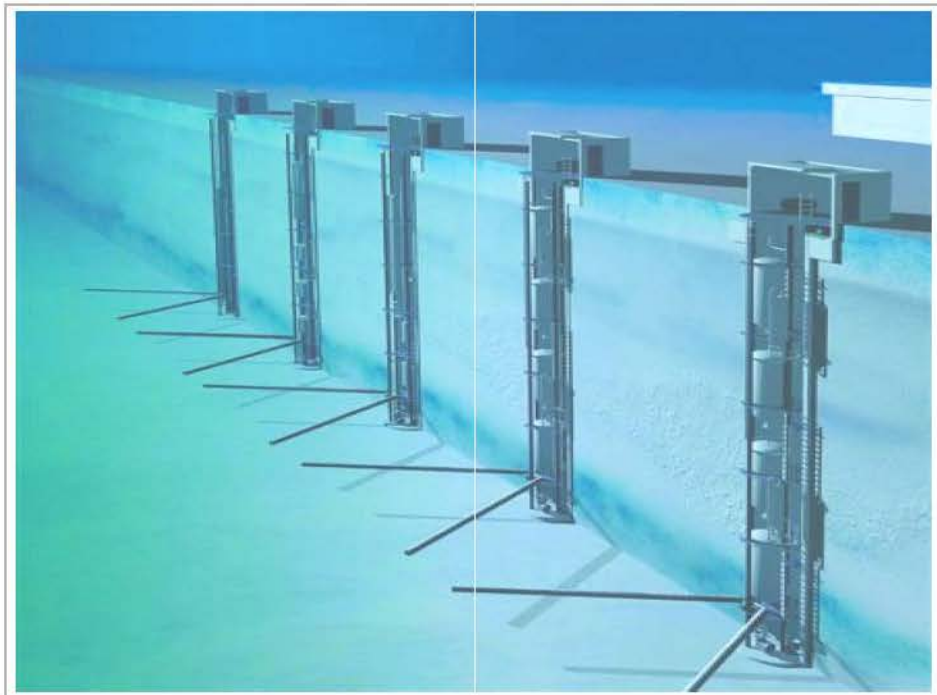
- FIORENZA, S., WARD, C.H. (1997): Microbial adaption to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 140-151.
- HÄGGBLUM, M.M., RIVERA, M.D., YOUNG, L.Y. (1993): Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1162-1167.
- HÄGGBLUM, M.M., YOUNG, L.Y. (1999): Anaerobic degradation of 3-halobenzoates by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* 171: 230-236.
- HAIGLER, B.E., NISHINO, S.F., SPAIN, J.C. (1988): Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 294-301.
- HERRINGTON, R.T., HICKS, J., DOWNEY, D., SPAIN, J., NISHINO, S., BECVAR, E., GOSSETT, J. (2000): Natural attenuation of chlorinated benzenes at a former disposal site. Proceedings of the second international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds, Monterey, USA, C2-3, S.175-185.
- KAO, C.M., PROSSER, J. (1999): Intrinsic bioremediation of trichloroethylene and chlorobenzene: field and laboratory studies. *J. Hazard. Mater.* 69: 67-79.
- KIERNICKA, J., SEIGNEZ, C., PERINGER, P. (1999): *Escherichia hermannii* – a new bacterial strain for chlorobenzene degradation. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 27-30.
- KLĚČKA, G.M., GIBSON, D.T. (1981): Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1159-1165.
- KLĚČKA, G.M., MCDANIEL, S.G., WILSON, P.S., CARPENTER, C.L., CLARK, J.E., THOMAS, A., SPAIN, J.C. (1996): Field evaluation of a granular activated carbon fluid-bed bioreactor for treatment of chlorobenzene in groundwater. *Environ. Prog.* 15: 93-107.
- KÖLLE, W., WERNER, P., STREBEL, O., BÖTTCHER, J. (1983): Denitrifikation in einem reduzierenden Grundwasserleiter. *Vom Wasser* 61: 125-147.
- KROONEMANN, J., WIERINGA, E.B.A., MOORE, E.R.B., GERRITSE, J., PRINS, R.A., GOTTSCHAL, J.C. (1996): Isolation of *Alcaligenes* sp. strain L6 at low oxygen concentrations and degradation of 3-chlorobenzoate via a pathway not involving (chloro)catechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2427-2434.
- KUKOR, J.J., OLSEN, R.H. (1996): Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1728-1740.
- LEAHY, J.G., OLSEN, R.H. (1997): Kinetics of toluene degradation by toluene-oxidizing bacteria as a function of oxygen concentration, and the effect of nitrate. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 23-30.
- LONDY, K.L., SUFLITA, J.M. (1999): Use of nitrate to control sulfide generation by sulfate-reducing bacteria associated with oily waste. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22: 582-589.
- LORBEER, H., WÜNSCHE, L., HARD, B.C., KRAUß, G., FLACHOWSKY, J., DERMETZEL, J., BABEL, W. (1998): Degradation of chlorobenzenes by autochthonous bacteria from a polluted aquifer. *Microbiology of polluted aquatic ecosystems. UFZ-Bericht 10/1998*, S. 50-57.
- LORBEER, H., VOGT, C., WÜNSCHE, L. (1999): Anaerober Abbau von Chlorbenzenen unter halbtechnischen Bedingungen in der mobilen Testeinheit. *SAFIRA, 2. Statusbericht. UFZ-Bericht 17/1999*, S. 139-146, ISSN.
- MARS, A.E., KASBERG, T., KASCHBAREK, R.S., VAN AGTEREN, M.H., JANSSEN, D.B., REINEKE, W. (1997): Microbial degradation of chloroaromatics: use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J. Bacteriol.* 179: 4530-4537.
- MIKESSELL, M.D., KUKOR J.J., OLSEN, R. (1993): Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation* 4: 249-259.
- MOLINERO GARCÍA, A. (2002): Numerical Simulation of Coupled Sorption / Desorption and Biodegradation Processes in a Groundwater Treatment Reactor. Master Thesis, Institut für Geowissenschaften, Universität Tübingen.

- MYHR, S., LILLEBØ, B.-L.P., SUNDE, E., BEEDER, J., TORSVIK, T. (2002): Inhibition of microbial H₂S production in an oil reservoir model column by nitrate injection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 400-408.
- NISHINO, S.F., SPAIN, J.C., PETTIGREW, C.A. (1994): Biodegradation of chlorobenzene by indigenous bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 871-877.
- NOWAK, J., KIRSCH, N.H., HEGEMANN, W., STAN, H.-J. (1996): Totale reductive dehalogenation of chlorobenzene to benzene by a methanogenic mixed culture enriched from Saale river sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 700-709.
- PARDIECK, D.L., BOUWER, E.J., STONE, A.T. (1992): Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: a review. *J. Cont. Hydrol.* 9: 221-242.
- PAUWELS, H., KLOPPMANN, W., FOUCHER, J.C., MARTELAT, A., FRITSCHÉ, V. (1998): Field tracer test for denitrification in a pyrite-bearing schist aquifer. *Appl. Geochem.* 13: 767-778.
- PERCHERON, G., BERNET, N., MOLETTA, R. (1999): Interactions between methanogenic and nitrate reducing bacteria during the anaerobic digestion of an industrial sulfate rich wastewater. *Microb. Ecol.* 29: 341-350.
- POSTMA, D., BOESEN, C., KRISTIANSEN, H., LARSEN, F. (1991): Nitrate reduction in an unconfined sandy aquifer: water chemistry, reduction processes, and geochemical modelling. *Wat. Resources Res.* 27: 2027-2045.
- RABUS, R., WIDDEL, F. (1995): Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 96-103.
- REINEKE, W. (2002): Vortrag, Universität Halle, 25.11. 2002.
- REINEKE, W., KNACKMUSS, H.J. (1984): Microbial metabolism of haloaromatics: isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 395-402.
- RÖLING, W.F., VAN BREUKELN, B.M., BRASTER, M., LIN, B., VAN VERSEFELD, H.W. (2000): Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4619-4629.
- ROSENBROCK, P., LANGENER, S., ABRAHAM, W.-R., PIEPER, D. (2000): Vergleichende Untersuchungen des Chloraromatenabbaus im Bitterfelder Grundwasser durch Spezialkulturen und die autochthone Mikroflora. *UFZ Bericht 4/2000*, S. 132-141.
- SANDER, P., WITTICH, R.M., FORTNAGEL, P., WILKES, H., FRANCKE, W. (1991): Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1430-1440.
- SCHINK, B., PHILIPP, B., MÜLLER, J. (2000): Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* 87: 12-23.
- SCHLÖMANN, M. (1994): Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. *Biodegradation* 5: 301-321.
- SCHRAA, G., BOONE, M.L., JETTEN, M.S.M., VAN NEERVEN, A.R.W., COLBERG, P.J., ZEHNDER, A.J.B. (1986): Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1374-1381.
- Spain, J.C., Milligan, J.D., Downey, D.C., Slaughter, J.K., 1989. Excessive bacterial decomposition of hydrogen peroxide during enhanced biodegradation. *Ground water* 27: 163-167.
- SPAIN, J.C., NISHINO, S.F. (1987): Degradation of 1,4-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1010-1019.
- STOECKER, M.A., HERWIG, R.P., STALEY, J.T. (1994): *Rhodococcus zopfii* sp. nov., a toxicant degrading bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 106-110.

- STRAUB, K.L., BUCHHOLZ-CLEVEN, B.E.E. (1998): Enumeration and detection of anaerobic ferrous-iron oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4846-4856.
- THERON, J., CLOETE, T.E. (2000): Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology* 26: 37-57.
- THOMAS, K.L., LLOYD, D., BODDY, L. (1994): Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 181-186.
- TORSVIK, V., SALTE, K., SORHEIM, R., GOKSOYR, J. (1990): Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 776-781.
- VAN DER MEER, J.R., WERLEN, C., NISHINO, S.F., SPAIN, J.C. (1998): Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4185-4193.
- VOGT, C., ALFREIDER, A. (2003): Abschlussbericht zum SAFIRA Teilprojekt B2.1.
- VOGT, C., ALFREIDER, A., LORBEER, H., AHLHEIM, J., FEIST, B., BÖHME, O., WEIß, H., BABEL, W., WÜNSCHE, L. (2002a): Two pilot plant reactors designed for the in situ bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water: hydro-geological and chemical characteristics and bacterial consortia. *Wat. Air Soil Pollut. Focus* 2: 161-170.
- VOGT, C., ALFREIDER, A., LORBEER, H., WÜNSCHE, L., BABEL, W. (2002b): Optimierter mikrobiologischer Abbau von Chlorbenzenen in in situ-Grundwasserreaktoren (SAFIRA). *Grundwasser* 3: 156-164.
- VOGT, C., ALFREIDER, A., LORBEER, H., HOFFMANN, D., WÜNSCHE, L., BABEL, W. (2004a): Bioremediation of chlorobenzene-contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide. *J. Cont. Hydrol.* 68: 121-141.
- VOGT, C., SIMON, D., ALFREIDER, A., BABEL, W. (2004b): Microbial degradation of chlorobenzene under oxygen-limited conditions leads to accumulation of 3-chlorocatechol. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 265-270.
- WAGNER, M., AMANN, R., LEMMER, H., SCHLEIFER, K.H. (1993): Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1520-1525.
- WATANABE, K., WATANABE, K., KODAMA, Y., SYOTSUBO, K., HARAYAMA, S. (2000): Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4803-4809
- WENDEROTH, D.F., ROSENBROCK, P., ABRAHAM, W.R., PIEPER, D.H., HÖFLE, H.G. (2003): Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microb. Ecol.* 46: 161-176.
- WILLIAMS, R.A., SHUTTLE, K.A., KUNKLER, J.L., MADSEN, E.L., HOOPER, S.W. (1997): Intrinsic bioremediation in a solvent-contaminated alluvial groundwater. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 177-188.
- WILSON, L.P., BOUWER, E.J. (1997): Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 116-130.
- WILSON DURANT, L.P., D'ADAMO, P.C., BOUWER, E.J. (1999): Aromatic hydrocarbon biodegradation with mixtures of O₂ and NO₃⁻ as electron acceptors. *Environ. Eng. Sci.* 16: 487-499.
- WÜNSCHE, L., LORBEER, H., VOGT, C., SEIFERT, K., JORKS, S., HARD, B.C., BABEL, W. (2000): Microbial colonization of the subsurface at the test site and degradation of chlorobenzenes by autochthonous bacteria of the quarternary aquifer. SAFIRA, Abstracts of the Workshop of November 17-18, 1999, S. 13-25. UFZ-Bericht 23/2000.

-
- ZAITSEV, G.M., UOTILA, J.S., TSITKO, I.V., LOBANOK, A.G., SALKINOJA-SALONEN, M.S. (1995): Utilization of halogenated benzenes, phenols, and benzoates by *Rhodococcus opacus* GM-14. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4191-4201.
- ZAPPI, M., WHITE, K., HWANG, H.M., BAJPAI, R., QASIM, M. (2000): The fate of hydrogen peroxide as an oxygen source for bioremediation activities within saturated aquifer systems. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 50: 1818-1830.

Zusammenfassender Abschlussbericht -
Projektverbund



(Quelle: wda)

Herausgeber:
Holger Weiß, Georg Teutsch, Birgit Daus

*UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH in der Helmholtz-Gemeinschaft,
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig*