

BIOLOGISCHE PROZESSE IN REAKTIVEN SYSTEMEN MIT ELEMENTAREM EISEN UND TETRACHLORETHEN

vorgelegt von

Diplom Biologin

Heidrun Rosenthal

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Michael Möser

Berichter: Prof. Dr. med. Henning Rüden

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Rotard

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10.05.2004

Berlin, 2004

D83

Rosenthal, Heidrun:

Biologische Prozesse in reaktiven Systemen mit elementarem Eisen und Tetrachlorethen / Heidrun Rosenthal. – Als Ms. gedr.. –

Berlin : dissertation.de – Verlag im Internet GmbH, 2004

Zugl.: Berlin, Techn. Univ., Diss., 2004

ISBN 3-89825-901-3

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

dissertation.de – Verlag im Internet GmbH 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, auf Datenträgern oder im Internet und der Übersetzung, vorbehalten.

Es wird ausschließlich chlorfrei gebleichtes Papier (TCF) nach DIN-ISO 9706 verwendet.
Printed in Germany.

dissertation.de - Verlag im Internet GmbH
Pestalozzistraße 9
10 625 Berlin

URL: <http://www.dissertation.de>

1	EINLEITUNG & ZIELSETZUNG.....	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	5
2.1	Produktion, Verwendung und Eigenschaften von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen	5
2.2	Passive In-Situ Sanierungsverfahren	8
2.3	Physikochemische Prozesse in Fe ⁰ -Reaktiven Wänden.....	9
2.3.1	Anaerobe Korrosion des Eisens	10
2.3.2	Bildung von Deckschichten	11
2.3.3	Reduktive Dechlorierung von LCKW durch Eisen	12
2.4	Biotische Reaktionen in Fe ⁰ -Reaktiven Wänden	14
2.4.1	Hydrogenotrophe Mikroorganismen	14
2.4.2	Biokorrosion	16
2.4.3	Mikrobielle Dechlorierung von Tetrachlorethen (PCE).....	17
2.4.4	Enzymatische Dechlorierung von PCE	19
3	MATERIAL & METHODEN	21
3.1	Eisensorten, Chemikalien, Gase und Oligonukleotide.....	21
3.2	Die Fe ⁰ -Reaktive Wand in Rheine	21
3.3	Probenahme und Aufbereitung von Eisenproben.....	22
3.4	Kultivierung	24
3.4.1	Verwendete Lösungen	24
3.4.2	Medienzubereitung für die Batchversuche	25
3.4.3	Medienzubereitung für die Säulenversuche	26
3.4.4	Kultivierung einer dechlorierenden Mischkultur	26
3.4.5	Batch-Ansätze	27
3.4.6	Säulenversuche.....	28
3.5	Mikro- und molekularbiologische Methoden.....	30
3.5.1	Proteinbestimmung.....	30
3.5.2	MPN-Bestimmung.....	30
3.5.3	DNA-Quantifizierung.....	31
3.5.4	Amplifizierung der 16S rRNA-Gene und Klonierung.....	31
3.5.5	Restriktionsanalyse der amplifizierten Produkte	34
3.5.6	Gelelektrophorese	34
3.5.7	Vergleichende PCR.....	34

3.6	Chemische Analytik	35
3.6.1	Gaschromatographische Bestimmung von Wasserstoff und Sauerstoff	35
3.6.2	Gaschromatographische Bestimmung von Ethen, Ethan, Methan sowie von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen.....	35
3.6.3	Ionenchromatographische Bestimmung von Acetat, Nitrit, Nitrat und Sulfat	36
3.6.4	Photometrische Bestimmung von Ammonium	37
3.6.5	pH-Wert Messung	38
4	ERGEBNISSE.....	39
4.1	Nachweis von Mikroorganismen auf reaktivem Material.....	39
4.1.1	Nachweis einer mikrobiologischen Besiedlung des GGs.....	41
4.1.1.1	Sulfatreduzierende Bakterien	42
4.1.1.2	Denitrifizierende Bakterien	45
4.1.1.3	Acetogene Bakterien	49
4.1.1.4	Methanogene	52
4.1.1.5	Dechlorierende Bakterien	54
4.1.2	Nachweis einer mikrobiologischen Besiedlung von Eisenschwamm	59
4.1.3	Bakterien im Grundwasser	63
4.2	Untersuchungen mit einer reduktiv dechlorierenden Mischkultur	65
4.2.1	Optimierung der Kultivierungsbedingungen.....	65
4.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen.....	67
4.2.2.1	Nachweis von <i>Dehalococcoides</i> Spezies	68
4.2.2.2	Restriktionsanalyse der amplifizierten Produkte	68
4.2.3	Dechlorierung von PCE durch die DMC mit GG als Elektronendonator	70
4.2.4	Wachstum der DMC mit GG als Elektronendonator	71
4.2.5	Einflussfaktoren auf die Dechlorierung von PCE durch die DMC	73
4.2.5.1	Einfluss von acetogenen Bakterien	73
4.2.5.2	Einfluss der Eisenmenge.....	76
4.2.5.3	Einfluss der Eisensorte.....	78
4.2.5.4	Einfluss des pH-Wertes.....	79
4.2.5.5	Einfluss von Sulfat und Nitrat	81
4.3	Säulenversuche.....	84
4.3.1	Säulenversuche mit einem Eingangs-pH-Wert von 8,7	85
4.3.2	Säulenversuche mit Eingangs-pH-Wert von ca. 7,0	89
5	DISKUSSION.....	93
5.1	Ökophysiologische Gruppen des reaktiven Materials.....	93
5.1.1	Biologische Besiedlung des Graugusseisengranulat-Kies-Gemisches.....	95
5.1.1.1	Sulfatreduzierende Bakterien (SRB)	95
5.1.1.2	Denitrifizierer	96

5.1.1.3	Dechlorierende Bakterien	97
5.1.1.4	Acetogene und Methanogene	99
5.1.2	Nachweis einer mikrobiologischen Besiedlung des Eisenschwamms	102
5.1.3	Vergleich der Eisensorten in Hinblick auf ihre Reaktivität und eine mikrobiologische Besiedlung	103
5.1.4	Mikroorganismen im Grundwasser	105
5.1.5	Desorption von Mikroorganismen von der Eisenoberfläche	106
5.1.6	Eignung des Batch-Systems für mikrobiologische Untersuchungen	106
5.1.7	Auswirkungen von Mikroorganismen auf das Langzeitverhalten einer Reaktiven Wand	107
5.2	Einfluss einer reduktiv dechlorierenden Mischkultur auf die PCE- Dechlorierung in Eisen-Systemen	113
5.2.1	Optimierung der biologischen Dechlorierung von PCE.....	113
5.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	116
5.2.3	Fe ⁰ als Elektronendonator	118
5.2.4	Wachstum von <i>Dehalococcoides</i> Spezies mit Fe ⁰	120
5.2.5	Einfluss von Acetat bzw. Acetogenen	121
5.2.6	Einfluss der Eisenmenge und Eisensorte	122
5.2.7	Einfluss des pH-Wertes	124
5.2.8	Einfluss von Sulfat und Nitrat	125
5.2.9	Nachweis von <i>Dehalococcoides</i> Spezies in Säulen	127
5.2.10	Bioaugmentation der Fe ⁰ -Reaktiven Wand in Rheine	130
5.3	Ausblick	132
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	135
7	LITERATURVERZEICHNIS	137
8	ANHANG	
8.1	Eigenschaften der Schüttung in Säule A und B	
8.2	Eigenschaften der Schüttung in Säule C und D	
8.3	Übersicht über die zeitliche Variation der Betriebsparameter des Säulenexperiments	
8.4	Standardherstellung	

Abb.	Abbildung
ARDRA	„amplified ribosomal restriction analysis“
BES	Bromethansulfonat
BET	Bestimmung der spezifischen Oberfläche eines Festkörpers nach B runauer, E mmett und T eller; berechnet aus der N-Adsorptions-Isotherme, die bei dem Kochpunkt von flüssigem Stickstoff beobachtet wird.
cDCE	cis-1,2-Dichlorethen
CH ₄	Methan
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlendioxid
C _{org}	organischer Kohlenstoff
d	Tage
<i>D.</i>	<i>Dehalococcoides</i>
DMC	dechlorierende Mischkultur
E ₀ '	Redoxpotenzial
ES	Eisenschwamm
Fe ⁰	Elementares Eisen
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
Gew.	Gewicht
GG	Graugusseisengranulat
GOK	Geländeoberkante
H ₂	Wasserstoff
H _{ads}	adsorbierter atomarer Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCl	Salzsäure
HS-GC	Headspace-Gaschromatograph
IC	Ionenchromatograph
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Konz.	Konzentration
K _{ow}	Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LCKW	leicht flüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MeOH	Methanol
MPN	höchst wahrscheinliche Zellzahl
MIC	mikrobiell beeinflusste Korrosion
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
O ₂	Sauerstoff
PCE	Tetrachlorethen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SRB	Sulfat reduzierende Bakterien
Tab.	Tabelle
TCE	Trichlorethen
TEAP	Terminale Elektronen-Akzeptor-Prozesse
tDCE	trans-1,2-Dichlorethen
VC	Vinylchlorid, Monochlorethen
Vol.	Volumen
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid

1 Einleitung & Zielsetzung

Reaktive Wände sind eine Form von Reinigungswänden, bei denen in der Regel elementares Eisen (Fe^0) zur in-situ-Sanierung von kontaminiertem Grundwasser eingesetzt wird. Diese sogenannten Fe^0 -Reaktiven Wände wurden erstmals 1991 und 1994 in Form von Feldprojekten an den Standorten Borden (Ontario, Kanada) und Sunnyvale (Kalifornien, USA) als passives Verfahren eingesetzt. Bis 2003 stieg die Zahl der Anwendungsfälle in den USA auf ca. 60 bis 70, in Westeuropa auf ca. 20 bis 30 an [BIRKE et al., 2003].

Vom Verfahrensprinzip her reagiert das in den Grundwasserleiter eingebrachte reaktive Material mit den im Grundwasserstrom transportierten Schadstoffen. Eine aufwendige und kostenintensive Förderung des belasteten Grundwassers mit anschließender Reinigung entfällt. Prognostiziert wurden hohe Langzeitstabilitäten dieser Reaktiven Wände, wobei erst in letzter Zeit einige Untersuchungen auf das Langzeitverhalten dieser Wände abzielen [KAMOLPORNWIJIT et al., 2003; KLAUSEN et al., 2003; VIKESLAND et al., 2003]. Als mögliche Faktoren, die die Langzeitstabilität einer Reaktiven Wand negativ beeinflussen können, werden neben der Bildung von mineralischen Präzipitaten auch mikrobiologische Effekte beschrieben [SCHERER et al., 2000]. Abhängig von der Zusammensetzung des Grundwassers kann eine gesteigerte mikrobielle Aktivität die Porosität, infolge einer Biofilmbildung und der Bildung von Präzipitaten aus mikrobiologischen Stoffwechselprodukten, und somit die hydraulische Leitfähigkeit der Fe^0 -Reaktiven Wand herabsetzen. Positiv wäre der Verbrauch des durch die abiotische Eisenkorrosion gebildeten Wasserstoffs (H_2), während die Entwicklung von Methan (CH_4) und molekularem Stickstoff (N_2) zur Bildung von Gasblasen und somit ebenfalls zu einer Herabsetzung der hydraulischen Leitfähigkeit führen kann. Eine Kombination von mikrobieller Aktivität und Präzipitation auf der Eisenoberfläche könnte zu einer verringerten Reaktivität führen und somit das Langzeitverhalten bezüglich Abbaubarkeit von Schadstoffen negativ beeinflussen [TRATNYEK et al., 1997]. Untersuchungen zeigten, dass bereits nach relativ kurzer Standzeit mikrobiologische Prozesse in einer Fe^0 -Reaktiven Wand einsetzen [DAHMKE, 1997]. Inzwischen wurden u.a. denitrifizierende und sulfatreduzierende Bakterien in Fe^0 -Reaktiven Wänden nachgewiesen [GANDHI et al., 2002; GU et al., 2002].

In Deutschland wurde 1998 die durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt finanzierte Reaktive Wand in Rheine (Westfalen) gebaut. Diese Wand stellte den ersten Feldversuch in Deutschland dar, bei dem dieses passive Verfahren mit Fe^0 als reaktivem Material eingesetzt wurde. Als Anwendungsfall wurde ein mit chlorierten Ethenen kontaminiertes Grundwasser ausgewählt. Der Kontaminationsherd liegt unter einer ehemaligen Wäscherei in einem Wohngebiet und verursacht im Abstrom Konzentrationen von bis zu 22 mg/l Tetrachlorethen (PCE) sowie 0,5 mg/l cis-Dichlorethen (cDCE). Entsprechend der Fließrichtung des Grundwassers wurde zwischen dem Kontaminationsherd und dem Vorfluter, der Ems, die Reaktive Wand positioniert. Es wurden zwei Eisenmaterialien eingesetzt. Eine Wandhälfte wurde mit einem Gemisch aus Graugusseisengranulat (GG) und Perlkies (1:2 Gew.%), die andere Wandhälfte mit 100 % Eisenschwamm (ES) verfüllt [MÖLLER, 1998]. Während eine Einhaltung der Reinigungsleistung im ES-haltigen Bereich bis heute gewährleistet wird, sinkt die Dechlorierungsleistung im mit GG verfüllten Bereich kontinuierlich ab, so dass die Sanierungszielwerte in diesem Abschnitt nicht erreicht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Mikroorganismen die Reaktive Wand in Rheine besiedelt haben und ob diese die Langzeitstabilität der Reaktiven Wand beeinflussen. Dazu wurden die Gruppen der Denitrifizierer, Sulfatreduzierer, Methanogene, Acetogene und Dechlorierer ausgewählt. Insbesondere der Nachweis und Einfluss von dechlorierenden Bakterien auf die Dechlorierung von PCE in der Reaktiven Wand sollte untersucht werden.

Parallel dazu wurden grundlegende Untersuchungen zum Einfluss einer dechlorierenden Mischkultur (DMC) auf die Dechlorierung von PCE in Fe^0 -Reaktiven Systemen durchgeführt.

Folgende Aspekte sollten untersucht werden:

- Kann die DMC PCE vollständig zu Ethen dechlorieren?
- Welche Bakterien sind an der Dechlorierung zu Ethen beteiligt?
- Kann Fe^0 als Elektronendonator für die mikrobielle Dechlorierung dienen und ist die DMC in der Lage mittels dieses Elektronendonators zu wachsen?
- Welchen Einfluss haben Eisensorten bzw. -mengen auf die mikrobielle Dechlorierung von PCE?

-
- Wie wirken sich die durch die anaerobe Korrosion des Eisens stark ansteigenden pH-Werte auf die mikrobielle Dechlorierung aus?
 - Welchen Einfluss haben weitere terminale Elektronenakzeptor-Prozesse wie Denitrifikation oder Sulfatreduktion auf die Dechlorierung von PCE?

Während die grundlegenden Versuche in statischen, sogenannten Batch-Systemen durchgeführt werden, erfolgen abschließende Untersuchungen in einem kontinuierlich betriebenen Säulensystem.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Produktion, Verwendung und Eigenschaften von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen

Ein Großteil des in der Bundesrepublik Deutschland gewonnenen Chlors wird zur Synthese von organischen Chlorverbindungen genutzt (Tab. 2.1). Leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (LCKW) werden überwiegend als Lösungsmittel, zur Metallentfettung und in der Kunststoffherstellung wie z.B. Vinylchlorid (VC) eingesetzt [BLUME, 1990]. Hauptanwendungsgebiete für LCKWs als Lösungsmittel sind in der Farbenindustrie, Lackindustrie, im Malergewerbe und in der chemischen Industrie zu finden [BOLT, 1997].

Tab. 2.1 Verwendung von Chlor in der Bundesrepublik Deutschland (Stand 1990), aus BLIEFERT, 1997)

Einsatzbereich	Anteil (in %)
Sauerstoffhaltige Organika (z. B. Phosgen)	35,1
Vinylchlorid (VC; monomer)	25,2
C ₁ -Derivate (z. B. Monochlormethan, Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlormethan)	9,5
C ₂ -Derivate (außer VC; z. B. 1,1,1-Trichlorethan, TCE, PCE, Dichloracetat)	8,7
Anorganika (z. B. AlCl ₃ , PCl ₃ , FeCl ₃ , TiCl ₄ , SiCl ₄)	8,7
C ₃ - und C ₄ -Derivate (z. B. Monochlor-2-propen, 1,3-Dichlor-2-propen)	7,3
Sonstige Derivate (z. B. chlorierte Aromaten wie Chlorbenzol, Chlortoluole)	4,7
Wasseraufbereitung, Zellstoff/Papier	0,8

Der höchste Verbrauch von chlorierten Lösungsmitteln fand bis Mitte der 90er Jahre statt. 1986 wurden beispielsweise 180.000 Tonnen in den alten Bundesländern verwendet. Seit 1986 hat sich der Verbrauch durch gesetzliche Vorgaben (2. Bundes-Immissionsschutzverordnung, Halogenkohlenwasserstoffe-Rücknahme-verordnung, Anhang IV der Gefahrstoffverordnung), wie durch emissionsarme Anlagentechnik, die Handhabung in Sicherheitsgebinden und Wiederverwertung um rund 84 % reduziert. 1997 lag der Verbrauch bei 29.000 Tonnen (bezogen auf die Bundesrepublik Deutschland) [BOLT, 1997; NADER, 1998]. Während früher häufig Chloroform und

Tetrachlormethan als Lösungsmittel verwendet wurden, konzentriert sich heute der Einsatz auf die Stoffe Dichlormethan, 1,1,1-Trichlorethan, Trichlorethen (TCE) und Tetrachlorethen (PCE) [BOLT, 1997].

Aufgrund der hohen Anwendungsmengen, der vielfältigen Einsatzbereiche und ihrer großen Persistenz sind chlorierte Ethene auch heute noch in der Umwelt weit verbreitet. Eine große Gefährdung geht von Altlasten bzw. Altstandorten aus. Einige physikalische und chemische Eigenschaften von PCE und Metaboliten sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab 2.2).

Tab. 2.2 Ausgewählte physikalische und chemische Eigenschaften von PCE und seinen Metaboliten

Stoff	Molekulargewicht [g/mol] ^a	Wasserlöslichkeit [g/l] ^a	Dampfdruck bei 25°C [Pa] ^a	Henrykoeffizient bei 25°C, 1013 mbar [-]	Siedepunkt bei 1013 mbar [°C] ^a	Dichte bei 20°C [g/ml] ^a
PCE	165,83	0,14(0-30°C)	2480	0,723 ^b	121,1	1,62
TCE	131,39	1,1(10-25°C)	9900	0,392 ^b	86,6	1,46
cDCE	96,94	5,1(10-25°C)	28000	0,167 ^b	60,0	1,28
tDCE	96,94	6,3 (25°C)	41000	0,384 ^b	48,0	1,26
VC	62,50	1,6(20-25°C)	355000	1,137 ^b	-13,7	0,91
Ethen	28,05	0,13 (25°C)	6,07*10 ⁶	8,7 ^a	-103,7	1,26
Ethan	30,07	0,06(20-25°C)	3,99*10 ⁶	20 ^a	- 88,6	1,36

^a Rippen, 1997; ^b Gossett, 1987

Den in der Industrie erwünschten Eigenschaften wie einer hohen Fettlöslichkeit und geringen Brennbarkeit stehen Eigenschaften, die nachteilige Wirkungen auf Mensch und Natur zeigen, gegenüber. Die mit dem hohen Dampfdruck verbundene hohe Flüchtigkeit sowie die geringe Wasserlöslichkeit bestimmen maßgeblich das Verhalten von PCE und Metaboliten in der Umwelt [KOCH, 1991].

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit gelangen schätzungsweise bis zu 90 % an Lösungsmitteln in die Atmosphäre. Die Beständigkeit von LCKW in der Atmosphäre ist unterschiedlich. Eine photolytische Stoffumwandlung von PCE erfolgt unter Bildung von Phosgen und Trichloracetylchlorid. Die Halbwertszeiten dieser Reaktionen liegen zwischen 3 und 6 Monaten, so dass eine weite Verbreitung in und über die Atmosphäre erfolgen kann. TCE reagiert unter Licht-, Luft- und Wärmeeinwirkung zu Phosgen, Chlorwasserstoff und Kohlenmonoxid. Der Transport und die Verteilung von VC erfolgt fast ausschließlich über die Luft. [BLUME, 1990; KOCH, 1991].

In der gesättigten Bodenlösung sinken LCKW aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und einer im Vergleich zu Wasser höheren Dichte auf die Aquifersohle ab. Selbst Betonschichten bilden dabei keine Barriere [SCHOLZ-MURAMATSU & FLEMING, 1991]. Eine Sorption von gelösten LCKW an Bodenbestandteile ist abhängig vom Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_{ow}) sowie von der Bodenart, insbesondere deren Gehalt an organisch gebundenem Kohlenstoff. Eine geringere Wasserlöslichkeit bedingt eine stärkere Sorption an den Boden. Auswaschungsverluste können zur Ausbildung von langgestreckten Fahnen in Grundwasserfließrichtung führen [LANDESAMT FÜR UMWELTSCHUTZ BADEN-WÜRTEMBERG, 1995]. An der Grundwasseroberfläche kann es zudem begünstigt durch hohe Dampfdrücke zu einem Übertritt in die Bodenluft kommen [BLUME, 1990].

Die toxikologischen Effekte von LCKW werden ebenfalls durch ihren hohen Dampfdruck und ihre Lipidlöslichkeit bestimmt [BOLT, 1997]. Eine schnelle Resorption erfolgt über den Respirations- und Digestionstrakt sowie über die intakte Haut. Bei dermalen Anwendung wirken LCKW entfettend [KOCH, 1991]. Eine Anreicherung wurde in Organen wie dem Gehirn festgestellt, was zu narkotischen Effekten führen kann. Wesentliche toxikologische Effekte dieser Stoffklasse werden jedoch durch die im Körper gebildeten Metabolite hervorgerufen [BOLT, 1997].

Alle chlorierten Ethenderivate werden im Körper des Menschen oxidativ aktiviert, wobei die entstehenden Metabolite akut und chronisch toxische Wirkungen sowie genotoxische Effekte zeigen können. Eine Schlüsselrolle spielen dabei chlorierte Oxirane. Diese elektrophilen Intermediate können direkt Makromoleküle wie DNA alkylieren. Beim oxidativen Abbau von TCE beispielsweise entsteht das intermediäre Epoxid Trichloroxiran. Dieses kann über Trichloracetaldehyd (Chloral) zu Trichlorethanol reagieren, welches zum Teil als Glucuronid im Harn ausgeschieden wird, sowie zu Trichloressigsäure. Als Produkte der Umsetzung von Trichloroxiran sind zudem Dichloressigsäure, Oxalsäure, Glyoxylsäure und N-(Hydroxyacetyl)aminoethanol beschrieben worden [HENSCHLER, 1994; BOLT, 1997].

PCE und TCE können zudem über eine enzymatische Kopplung mittels Glutathionyltransferasen an Glutathion aktiviert werden. Weitere enzymatische Umsetzungen führen dabei zu Intermediaten, die wie chlorierte Oxirane die DNA alkylieren. Mittels des Enzyms Beta-Lyase der Niere werden toxische Metabolite im Nierenparenchym gebildet, die eine mutagene und kanzerogene Wirkung an

Nierentubuli entfalten können [BOLT, 1997]. Neben der Mutagenität von VC selber ist die mutagene Wirkung möglicher Metabolite wie Chlorethylenoxid und Chloracetaldehyd beschrieben [KOCH, 1991]. Vinylchlorid ist ein starkes Kanzerogen, während TCE und PCE eine schwache kanzerogene Wirkung zeigen [HENSCHLER, 1994].

Nur in Anwesenheit von Glutathion und Glutathionyltransferasen sind TCE und PCE eindeutig mutagen. Ethen besitzt zentraldepressorische Wirkungen, die stärker als bei Ethan ausgeprägt sind und zum versuchsweisen Einsatz von Ethen als Narkosemittel führten. Diese Wirkung wird durch Einführung von Chloratomen verstärkt. TCE wurde zeitweise als Voll- bzw. Rauschnarkotikum eingesetzt [HENSCHLER, 1994].

2.2 Passive In-Situ Sanierungsverfahren

Bei herkömmlichen Verfahren zur Grundwassersanierung wird das kontaminierte Grundwasser in der Regel an die Erdoberfläche gepumpt und gereinigt („pump-and-treat“-Verfahren). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von chlorierten Ethenen sowie ihrer Tendenz, an die Bodenmatrix zu adsorbieren sind lange Laufzeiten für diese Art der Sanierung einzuplanen. Zudem besteht bei Verunreinigungen mit leichtflüchtigen Schadstoffen die Gefahr des Ausgasens während des Pumpvorganges. Der Einsatz von durchströmten Reinigungswänden bietet den Vorteil, dass die Sanierung von Grundwasserschadensfällen direkt im Aquifer (in-situ) ohne nennenswerten bzw. ohne Energieeintrag von außen erfolgt [DAHMKKE, 1997; BIRKE et al., 2003].

In Abhängigkeit von den hydrologischen Gegebenheiten wurden vielfältige Konstruktionskonzepte für den Einsatz von Reinigungswänden entwickelt, wobei überwiegend zwei Bautypen zur Anwendung kommen. Bei einer vollflächig durchströmten Wand wird das reaktive Material über die gesamte Breite der Schadstofffahne eingebracht. Das sogenannte „funnel-and-gate“-System besteht aus einem mit geringdurchlässigem Material gefüllten Trichter („funnel“), der das kontaminierte Grundwasser in die permeable reaktive Zone („gate“) leitet [STARR & CHERRY, 1996; DAHMKE, 1997]. Als weitere Entwicklung sind Schacht- oder Brunnenbauwerke zu nennen, bei denen in versenkbaren Reaktoren das reaktive Material eingebracht wird [BIRKE et al., 2003].

Entscheidend für den Reinigungserfolg einer Reaktiven Wand ist eine genaue Kenntnis der hydrologischen Untergrundverhältnisse. So muss gewährleistet werden, dass der

Durchlässigkeitsbeiwert (k_f -Wert) des reaktiven Materials höher ist als im umgebenden Boden und somit eine Durch- und nicht Umströmung der Reaktiven Wand erfolgt [DAHMKKE, 1997].

In geringem Umfang werden Reinigungswände für die Sanierung von Grundwasserschadstoffen wie Schwermetallen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), aromatischen Verbindungen wie Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol (BETX) sowie Mineralölkohlenwasserstoffen eingesetzt. Reaktive Materialien, die geeignet sind, auch Mischkontaminationen zu sanieren, sind noch in der Entwicklung bzw. Erprobung. Überwiegend kommen derzeit Reinigungswände zur Sanierung von LCKW-belasteten Grundwässern zum Einsatz. Mit 45 % ist elementares Eisen das am häufigsten eingesetzte Material [DAHMKKE, 2000; SCHERER et al., 2000; BIRKE et al., 2003].

2.3 Physikochemische Prozesse in Fe^0 -Reaktiven Wänden

In Fe^0 -Reaktiven Wänden finden geochemische Prozesse wie Redoxreaktionen, Sorptionen und Fällungen statt. Diese Reaktionen sind neben der verwendeten Eisensorte von der Zusammensetzung des Grundwassers abhängig. Durch die Ausbildung von Präzipitaten auf der Eisenoberfläche kann die Reaktivität des Eisens vermindert, durch Ausfüllen der Porenräume die Permeabilität der Wand verringert werden (ROH et al., 2000).

Sorptionseffekte von chlorierten Ethenen treten in der Regel nur nach Inbetriebnahme einer Reaktiven Wand auf. Die Oberfläche des Eisens besteht aus reaktiven und nicht reaktiven Plätzen. Während Redoxreaktionen an den reaktiven Plätzen stattfinden, können die nicht reaktiven Plätze chlorierte Ethene adsorptiv binden [BURRIS et al., 1995].

Redoxreaktionen wie die anaerobe Korrosion des Eisens sind erwünscht, da eine Dechlorierung von PCE stattfindet. Parallel auftretende negative Effekte wie die Bildung von Präzipitaten müssen in Kauf genommen werden. Die mit der Korrosion einhergehende Freisetzung von H_2 kann zur Bildung von Gasblasen führen und somit eine Verringerung der hydraulischen Leitfähigkeit nach sich ziehen [ROH et al., 2000].

2.3.1 Anaerobe Korrosion des Eisens

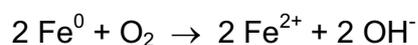
Unter anaeroben Bedingungen reagiert Fe^0 mit Wasser unter Bildung von Wasserstoff. In der anodischen Halbreaktion wird Fe^0 oxidiert und es werden Fe^{2+} -Ionen freigesetzt. Dabei freigesetzte Elektronen werden in der kathodischen Halbreaktion auf Hydronium-Ionen übertragen. Die aus der Hydrolyse des Wassers entstehenden Hydroxid-Ionen können dabei zu einem Anstieg des pH-Wertes führen. [TRATNYEK et al., 1997].



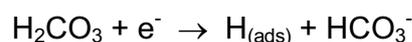
An der Eisenoberfläche bildet sich ein Film adsorbierter Wasserstoffatome, der einen Schutz vor weiterer Korrosion darstellt. Die anaerobe Korrosion des Eisens ist pH-Wert abhängig. Bei niedrigen pH-Werten ist eine Reduktion von H_2O durch Fe^0 thermodynamisch begünstigt, so dass die Korrosion des Fe^0 gefördert wird [REARDON, 1995].

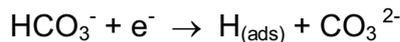
Die anodische und kathodische Halbreaktion können räumlich getrennt ablaufen. Die Oxidation des Eisens kann z. B. in Spalten in der Oxidschicht, an Korngrenzen oder Verunreinigungen stattfinden. Die freiwerdenden Elektronen wandern durch das Metall in anodische Bereiche, z. B. zu Oxiden oder edleren Verunreinigungen, wo diese an der kathodischen Halbreaktion teilnehmen. Voraussetzung ist das Vorhandensein eines ionischen Leiters (z. B. Wasser), der mit dem anodischen und dem kathodischen Bereich in Kontakt steht [SIGG & STUMM, 1996].

Im Grundwasser herrschen in der Regel keine anaeroben Bedingungen, so dass im Anstrom einer Fe^0 -Reaktiven Wand Sauerstoff als Oxidationsmittel in der kathodischen Halbreaktion dient. Während bei dieser Form der Korrosion ebenfalls ein Anstieg des pH-Wertes erfolgt, entsteht kein Wasserstoff.

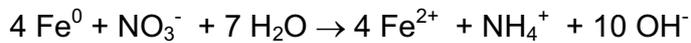


Die Korrosion des Eisens wird durch das Vorhandensein von Hydrogencarbonat im Grundwasser beeinflusst. Durch Pufferung erfolgt eine indirekte Förderung, da bei niedrigeren pH-Werten eine Korrosion thermodynamisch begünstigt wird [REARDON, 1995]. H_2CO_3 und HCO_3^- können durch Aufnahme der Elektronen in der kathodischen Reaktion neben Hydronium-Ionen als zusätzliche Oxidationsmittel dienen und somit die Korrosion des Fe^0 fördern [GRAY et al., 1989]:





Nitrat kann anstelle von H_2O oder Hydrogencarbonat als Elektronenakzeptor genutzt werden und wird dabei zu Ammonium reduziert [TILL et al., 1998; KIELEMOES et al., 2000; WESTERHOFF & JAMES, 2003]:



2.3.2 Bildung von Deckschichten

Die in der anodischen Halbreaktion freigesetzten Fe^{2+} -Ionen bilden mit den in der kathodischen Reaktion gebildeten Hydroxid-Ionen Eisenhydroxide ($\text{Fe}(\text{OH})_2$). Diese sind in anoxischem Wasser und bei niedrigen Temperaturen stabil und können als Amakinit ($(\text{Fe},\text{Mg})(\text{OH})_2$) ausfallen [ROH et al., 2000]. Zudem ist das Löslichkeitsprodukt dieser Eisenhydroxide sehr niedrig, so dass eine Übersättigung der Lösung ebenfalls zur Ausfällung führen kann [LIANG et al., 2000]. Durch Disproportionierung kann Magnetit (Fe_3O_4) entstehen [REARDON, 1995]. Während elektrisch leitfähiges Magnetit in der Lage ist, in Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen chlorierte Ethene zu dechlorieren, kann durch Oxidation Maghämmit (Fe_2O_3) gebildet werden, welches als passivierendes Oxid gilt. Auf elementarem Eisen wurden Oxidschichten nachgewiesen, die aus einer inneren Magnetit- und einer äußeren Maghämmit-Schicht bestehen [FARRELL et al., 2000 a].

Als weitere Oxidationsprodukte können die aufgrund ihrer grünen Färbung genannten „Green rusts“ auftreten. Diese bestehen aus unterschiedlichen Anteilen an Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Hydroxiden sowie den Anionen Sulfat, Chlorid oder Carbonat. Bei hohen pH-Werten können Green Rusts auch chlorierte Ethene reaktiv dechlorieren, jedoch sind diese weniger reaktiv als Fe^0 . Green Rusts sind relativ stabile Intermediate, die letztendlich zu Endprodukten wie Maghämmit, Magnetit, Goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$) und Lepidocrit ($\gamma\text{-FeOOH}$) oxidiert werden [ROH et al., 2000].

Vivianit ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \times 8 \text{H}_2\text{O}$) wird in phosphathaltigem Grundwasser, Troilit oder amorphes Eisensulfid (FeS) bei der Freisetzung von Schwefelwasserstoff (H_2S) durch eine bakterielle Sulfatreduktion gebildet [SCHLICKER et al., 1998]. Siderit (FeCO_3) sowie Calcit und Aragonit (CaCO_3) entstehen, wenn carbonathaltiges Grundwasser vorliegt. Diese bilden eine weißliche, passivierend wirkende Schicht auf der Eisenoberfläche [GU et al., 1999].

2.3.3 Reduktive Dechlorierung von LCKW durch Eisen

Elementares Eisen dient in Reaktiven Wänden als Reduktionsmittel zur Dechlorierung chlorierter Verbindungen [GILLHAM & HANNESIN, 1994]. Die Reduktion kann dabei über einen direkten Elektronentransfer von der Eisenoberfläche oder von atomarem Wasserstoff aus der Reduktion von Wasser erfolgen [MATHESON & TRATNYEK, 1994]. Die am häufigsten auftretenden Produkte bei der Reaktion von PCE und TCE mit Fe^0 sind Ethen und Ethan mit nur einem unbedeutenden Anteil an chlorierten Zwischenprodukten [BURRIS et al., 1995; ORTH & GILLHAM, 1996; ROBERTS et al., 1996; ARNOLD & ROBERTS, 2000; FARRELL et al., 2000 b].

Der von MATHESON & TRATNYEK [1994] postulierte Mechanismus ist eine sequentielle Hydrogenolyse, wie für Tetrachlormethan durch den Nachweis der Zwischenprodukte Chloroform und Dichlormethan belegt wurde. Die Abwesenheit chlorierter Zwischenprodukte bei der Reduktion von Chloralkenen wird einer Chemisorption zugeschrieben, bei der die Verbindungen bis zur vollständigen Dechlorierung auf der Oberfläche des Eisens gebunden bleiben [ORTH & GILLHAM, 1996].

Als weitaus bedeutenderer Mechanismus bei der Reduktion von Chloralkenen wurde die reduktive β -Eliminierung von ROBERTS et al. [1996] beschrieben, bei dem zwei Chloratome gleichzeitig unter Bildung einer weiteren C-C-Bindung abgespalten werden (Abb. 2.1). ARNOLD & ROBERTS [2000] postulierten als Mechanismus die Bildung von di- σ -Bindungen zwischen Kohlenstoffatomen und der Eisenoberfläche. PCE geht dabei zunächst eine kovalente Bindung mit dem Eisen über sein π -Orbital ein (Abb. 2.1 a), aus dem ein di- σ -gebundenes Molekül entsteht (Abb. 2.1 b). Durch reduktive Eliminierung entsteht dann zunächst ein mono- σ -gebundenes Molekül, wobei ein Chloratom abgespalten wird (Abb. 2.1 c). Unter Freisetzung eines weiteren Chloratoms erfolgt die Desorption als Dichlorethin (Abb. 2.1 d). Statt einer reduktiven Eliminierung kann auch eine Hydrogenolyse stattfinden. Dabei reagiert das di- σ -gebundene Molekül mit adsorbiertem Wasserstoff. Es entsteht ein mono- σ -gebundenes Molekül (Abb. 2.1 e), welches unter Abspaltung eines Chloratoms als TCE freigesetzt wird (Abb. 2.1 f).

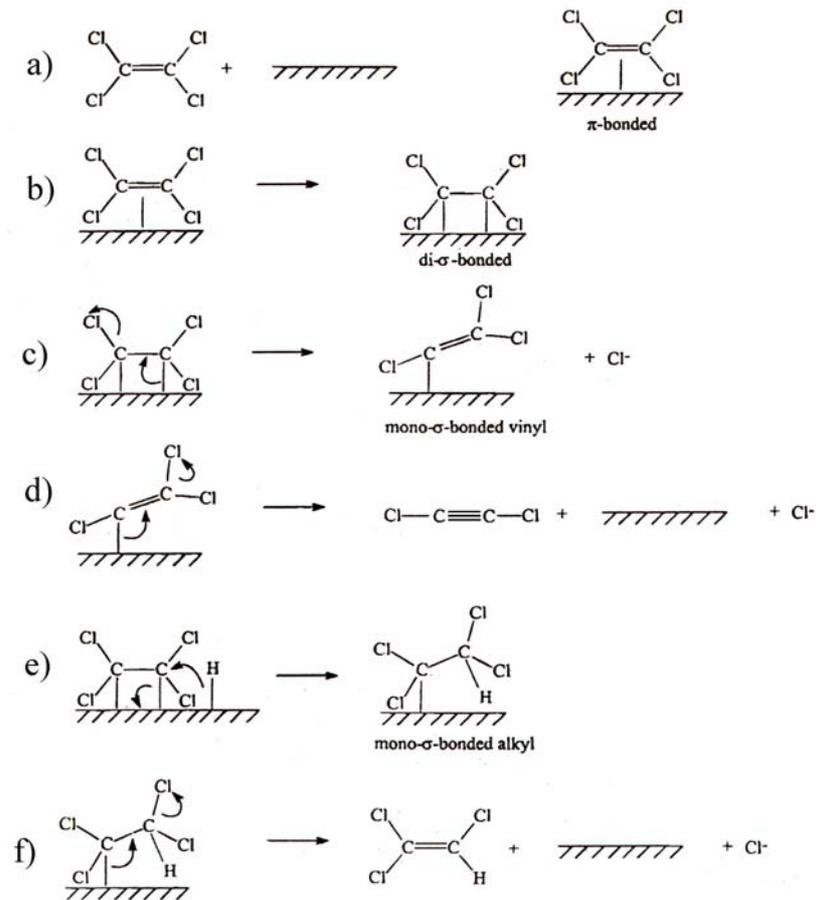


Abb. 2.1 Von ARNOLDS & ROBERTS [2000] vorgeschlagener Mechanismus für die reduktive Dechlorierung von PCE mit elementarem Eisen

Durch die reduktive β -Eliminierung von PCE und TCE entstehen Dichlorethin und Chlorethin, die dann durch sequentielle Hydrogenolyse zu Ethin dechloriert werden. Während Dichlorethin und Ethin zu Ethen bzw. Ethen zu Ethan hydrogeniert werden können, findet dieser Mechanismus für Chlorethin nicht statt, so dass die Bildung von VC umgangen wird. Da chlorierte Ethene wie VC und cDCE kein trans- α,β -Halogenpaar besitzen, werden diese schlechter dechloriert.

WANG & FARRELL [2003] untersuchten die Bedeutung von atomarem Wasserstoff auf die Dechlorierung von TCE und PCE. Entsprechend des Modells von ARNOLD & Roberts [2000] erfolgt nach der Chemisorption von TCE oder PCE die Bildung eines di- σ -gebundenen Moleküls. Die nächstfolgenden Reaktionsschritte (Abb. 2.1 c und d) können prinzipiell durch Elektronen oder atomaren Wasserstoff erfolgen. WANG & FARRELL [2003] konnten zeigen, dass bei neutralem pH-Wert die Reduktion von TCE über eine kombinierte Reaktion von atomarem Wasserstoff und einem direkten Elektronentransfer abläuft, während PCE ausschließlich über einen direkten Elektronentransfer reduziert wird.

Die Voraussetzung für die Reduktion von LCKW durch Reaktionen, die einer Chemisorption bedürfen, ist der Zugang zur metallischen Oberfläche. GASPAR et al. [2002] konnten zeigen, dass die Reduktion von Tetrachlormethan vor allem an Defekten in der Oxidschicht stattfand. FARRELL et al. [2000 a] und LI & FARRELL [2000] beschrieben, dass die TCE-Reaktionsraten mit kathodisch geschütztem Eisen zwei- bis dreimal höher sind, als bei Eisen, dessen Oberfläche durch eine Oxidschicht belegt ist. Bei Eisen, welches mit elektrisch leitfähigem Magnetit oder relativ gut leitfähigen Fe(III)-Oxiden ummantelt ist, kann ein Elektronentransfer durch diese Oxide stattfinden. Ebenso denkbar ist die Reduktion durch an der Oberfläche adsorbiertes, koordiniertes Fe(II) [SCHERER et al., 1998]. Müssen die Elektronen allerdings erst durch Schichten zu den physikalisch adsorbierten Chlorethenen geleitet werden, so ist als Mechanismus der Reduktion eine sequentielle Hydrogenolyse wahrscheinlich [ROBERTS et al., 1996].

2.4 Biotische Reaktionen in Fe⁰-Reaktiven Wänden

Die Brücke zwischen abiotischen und biotischen Prozessen bildet der bei der anaeroben Korrosion freigesetzte Wasserstoff. Durch mikrobiell katalysierte Reaktionen kann es zu einer Beschleunigung der Eisenkorrosion kommen, wenn dabei die Schutzschicht aus adsorbiertem Wasserstoff entfernt wird. Die Pufferkapazität kann durch Bildung von mikrobiell produzierten Stoffen wie Acetat erhöht werden. Im ungünstigsten Fall wird durch Biofouling und Bildung von Präzipitaten aus mikrobiellen Metaboliten die Standzeit einer Fe⁰-Reaktiven Wand herabgesetzt [LIANG et al., 2000].

2.4.1 Hydrogenotrophe Mikroorganismen

Hydrogenotrophe Bakterien sind in der Lage, H₂ als Elektronendonator für Atmungsprozesse zu nutzen [LOVLEY et al., 1994]. Die Fähigkeit von H₂, die Cytoplasmamembran der mikrobiellen Zelle zu penetrieren, sowie die geringe Energie, die zur Aktivierung benötigt wird, machen H₂ zu einem der besten Energie-Lieferanten für einen bakteriellen Stoffwechsel [MORITA, 1999]. Bei der Zersetzung von organischem Material führen anaerobe Bakterien überschüssige Reduktionskraft ab, indem sie H₂ freisetzen und Kohlendioxid (CO₂) produzieren. Eine Vielzahl an Mikroorganismen wächst mit H₂ als Energie- und Elektronenquelle. Photolithotrophe wie auch chemolithotrophe Organismen konkurrieren um den verfügbaren Wasserstoff [MORITA, 1999]. In anaeroben Sedimenten wie in anoxischem Grundwasser wird die Oxidation von

H₂ mit der Reduktion von Sulfat, Nitrat, Mangan(IV), Eisen(III) und CO₂ gekoppelt. Diese Prozesse werden nach der Art des verwendeten terminalen Elektronenakzeptors unterschieden (TEAP, „terminal electron accepting process“). In Abhängigkeit des zur Verfügung stehenden Elektronenakzeptors kann H₂ bis zu einer bestimmten Konzentration (Schwellenwert) für Wachstumsprozesse genutzt werden. Die freie Energie $\Delta G^{0'}$ gibt dabei den Energiegewinn für die beteiligten Bakterien an. Welche TEA-Prozesse ablaufen werden, hängt im Aquifer von der Konzentration des gelösten Wasserstoffs und von den vorhandenen Elektronenakzeptoren ab. Für einige Rein- und Mischkulturen wurden die in Tab. 2.3 dargestellten Wasserstoff-Schwellenwerte bestimmt.

Tab. 2.3 Wasserstoff-Schwellenwert-Konzentration, freie Energie ($\Delta G^{0'}$) und Redoxpotenziale (E_0') für TEA-Prozesse mit H₂ als Elektronendonator [aus LÖFFLER et al., 1999]

TEAP	Wasserstoff-Schwellenwert-Konzentration [nM] ^a	$\Delta G^{0'}$ [kJ/mol H ₂] ^b	E_0' [mV] ^c
Homo-Acetogenese	336-3640	- 26,1	- 280
Methanogenese	5-95	-33,9	- 240
Sulfatreduktion	1-15	-38,0	- 220
Nitratreduktion (Produkt: N ₂)	< 0,05	- 240,0	+790
Fe(III)-Reduktion	0,1-0,8	- 228,3	+770

^a Quellen: CORD-RUWISCH et al., 1988; LOVLEY, 1985; LOVLEY & GOODWIN, 1988; BREZNAK, 1994; LOVLEY et al., 1994; CONRAD, 1996.

^b $\Delta G^{0'}$ -Werte aus THAUER et al., 1977; DOLFING & HARRISON, 1992; DOLFING & JANSSEN, 1994; DOLFING & BEURSKENS, 1995 oder berechnet.

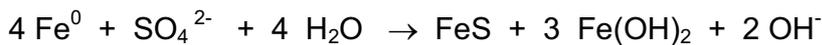
^c Berechnet nach: $E_0' = (\Delta G^{0'}/-0,193) - 414$ (WIDDEL, 1988; DOLFING & JANSSEN, 1994; DOLFING & BEURSKENS, 1995)

Werden fermentative Bakterien, die H₂ aus der Vergärung von Methanol, Lactat oder anderen organischen Substraten freisetzen, mit H₂-verbrauchenden anaeroben Bakterien kultiviert, so zeigt sich, dass die mikrobielle Reduktion von Nitrat bevorzugt gegenüber der Sulfatreduktion oder der Methanogenese abläuft. Ist H₂ nicht der limitierende Faktor, so findet auch Acetogenese statt. Ursache sind die für die jeweiligen TEA-Prozesse unterschiedlichen H₂-Schwellenwert-Konzentrationen, bei der eine Oxidation von H₂ thermodynamisch günstig ist. Bei Acetogenen liegt dieser Schwellenwert so hoch, dass bei H₂-Konzentrationen, die unter diesem Wert liegen, andere TEA-Prozesse dominieren [CORD-RUWISCH et al., 1988]. Sulfatreduzierende

Bakterien setzen sich beispielsweise gegen Methanogene durch, wenn Sulfat kein limitierender Faktor ist [KRISTJANSSON et al., 1982].

2.4.2 Biokorrosion

Die Biokorrosion ist eine durch Mikroorganismen beeinflusste Korrosion. Dabei werden metallische Strukturen entweder durch direkte Beteiligung an den elektrochemischen Reaktionen auf der Eisenoberfläche, durch Freisetzung von aggressiven Metaboliten oder durch Schaffung von korrosiven Bedingungen angegriffen [HEITZ et al., 1996]. Die Biokorrosion ist abhängig von der Grundwasserbeschaffenheit, welche wiederum die Zusammensetzung der Biozönose beeinflusst. Die Entfernung des kathodisch gebildeten Wasserstoffs durch hydrogenotrophe Mikroorganismen ist dabei unter anaeroben Bedingungen primäre Ursache für die Korrosion [POTEKHINA, 1999]. Eine Biokorrosion durch sulfatreduzierende Bakterien (SRB) ist seit langem bekannt [CORD-RUWISCH, 2000].



Sulfat wird dabei zu Eisensulfid (FeS) reduziert, welches in Form von Troilit oder als amorphes FeS ausfallen kann [SCHLICKER et al., 1998].

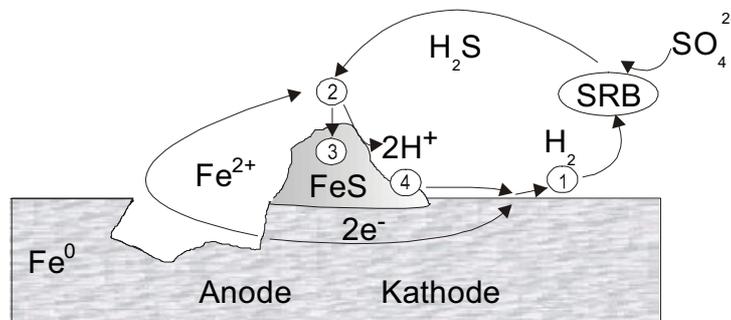


Abb. 2.2 Beteiligung von hydrogenotrophen sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) an der anaeroben Korrosion von Stahl. Vier korrosionsfördernde Prozesse können prinzipiell ablaufen: 1. die kathodische Depolarisierung, 2. die anodische Depolarisierung (Entfernung von Fe^{2+}), 3. die Bildung einer FeS-Schicht, die kathodisch wirken kann, 4. die Versorgung mit Protonen für die kathodische Reaktion; SRB: sulfatreduzierende Bakterien [nach CORD-RUWISCH, 2000].

Die Verwertung von Wasserstoff aus der anaeroben Eisenkorrosion wurde für Nitratreduzierer [TILL et al., 1998], Sulfatreduzierer [HARDY, 1983; CORD-RUWISCH und WIDDEL, 1986], Homoacetogene [RAJAGOPAL & LEGALL, 1989], Methanogene

[RAJAGOPAL & LEGALL, 1989; LOROWITZ et al., 1992; DANIELS et al., 1987; GU et al., 1999] sowie für Fe(III) reduzierende Bakterien nachgewiesen [GERLACH et al., 2000].

2.4.3 Mikrobielle Dechlorierung von Tetrachlorethen (PCE)

Obwohl chlorierte Ethene als toxische Verbindungen mit persistenten Eigenschaften beschrieben wurden, werden sie unter anaeroben Bedingungen mit H_2 als Elektronendonator mit Energiegewinn mikrobiologisch umgesetzt. Bedingt durch das hohe Redoxpotenzial von PCE läuft mit H_2 als Elektronendonator ein exergoner Prozess ab, bei dem ein Energiegewinn in Form von Adenosintriphosphat (ATP) möglich ist [EL FANTROUSSI et al., 1998]. LÖFFLER et al. [1999] bestimmte für die reduktive Dechlorierung von PCE H_2 -Schwellenwert-Konzentrationen von $< 0,3$ nM, mit freien Energien von -130 bis -187 kJ/mol H_2 und Redoxpotenzialen von $0,3$ bis $0,55$ V.

Die reduktive Dechlorierung kann cometabolisch oder unter Nutzung der Verbindungen als Wachstumssubstrat stattfinden. Bei einer cometabolischen Umsetzung werden die chlorierten Ethene neben den eigentlichen primären Substraten ohne Vorteil für die Zelle in Nebenreaktionen umgesetzt, weshalb die Dechlorierung dann häufig langsam und unvollständig stattfindet [FATHEPURE & BOYD, 1988; TERZENBACH & BLAUT, 1994; EL FANTROUSSI et al., 1998; VAN EEKERT & SCHRAA, 2001].

Höhere Umsatzraten werden durch respiratorische Dechlorierer erreicht, die chlorierte Ethene als Elektronenakzeptor im Energiestoffwechsel nutzen. Bei diesem als Dehalorespiration benannten Prozess erfolgt Wachstum durch reduktive Dechlorierung [EL FANTROUSSI et al., 1998; HOLLIGER et al., 1999]. Eine Zusammenfassung einiger isolierter Dehalorespirierer ist in Tab: 2.4 dargestellt.

Dehalococcoides ethenogenes Stamm 195 ist bislang der einzige beschriebene Organismus, der in der Lage ist, PCE durch reduktive Dechlorierung zu Ethen umzusetzen. Während die Dechlorierung von PCE zu VC mit Energiegewinn erfolgt, wird angenommen, dass die Bildung von Ethen cometabolisch stattfindet [MAYMÓ-GATELL, 1997]. Inzwischen sind auch VC-dechlorierende Mischkulturen beschrieben, wobei ein Wachstum von *Dehalococcoides* Spezies mit VC als einzigem Elektronenakzeptor durch kompetitive bzw. mittels Real-Time PCR nachgewiesen wurde [CUPPLES et al., 2003; HE et al., 2003].

Tab. 2.4 Reduktive Dechlorierung von PCE durch bakterielle Reinkulturen

Stamm	Dechlorierungs-Produkt	Elektronendonatoren	pH-Optimum	Temperatur-Optimum (°C)	Referenz
<i>Desulfitobacterium</i> sp. Stamm PCE1	TCE	H ₂ , Lactat, Pyruvat, Butyrat, Formiat, Succinat, Ethanol	7,2 – 7,8 (6,2 – 8,8)	34 - 38 (19 – 42) ²	GERRITSE et al., 1996
<i>Desulfitobacterium</i> sp. Stamm PCE-S	cDCE	H ₂ , Pyruvat	7,5 – 7,8	37	MILLER et al., 1996
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	TCE	H ₂ , Formiat, Pyruvat	7,5 (6 - 9) ¹	38 (13 - 45) ²	UTKIN et al., 1994
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> Stamm TT4B	cDCE	Acetat, Pyruvat	7,4 (6,5 - 7,4)	(21 - 31) ²	Krumholz, 1997
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> BB1/BRS1	cDCE	Acetat, Lactat, Pyruvat, Succinat, Fumarat, Malat	7,0- 7,5 (6,8 - 8,0)	(10 - 35) ²	SUNG et al., 2003
<i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	cDCE	H ₂	6,8 – 7,6	25 - 30	HOLLIGER et al., 1998
<i>Dehalobacter restrictus</i> Stamm TEA	cDCE	H ₂	k.A.	k.A.	WILD et al., 1996
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	cDCE	H ₂ , Formiat, Pyruvat	7,0 – 7,5	30	Scholz-Muramatsu et al., 1995
<i>Enterobacter</i> sp. Stamm MS-1	cDCE	Acetat, Formiat, Pyruvat	7,0	37	Sharma & McCarty, 1996
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> Stamm 195	VC (Ethen)	H ₂	k.A.	k.A.	MAYMO-GATELL et al., 1997

¹ pH-Bereich, bei dem bzw. ² Temperatur, bei der noch Wachstum erfolgt.

Grundlegende Untersuchungen von LAMPRON et al. [1998] zeigten, dass in Ansätzen mit Fe⁰ eine Dechlorierung von TCE durch eine dechlorierende Mischkultur beschleunigt werden kann. Eine simultane abiotisch und biologisch induzierte Dechlorierung von PCE mit Fe⁰ als Elektronendonator konnte für die Reinkultur *Desulfitobacterium* sp. Stamm Y-51 nachgewiesen werden [LEE et al., 2001]. In beiden Fällen ging eine schnellere Dechlorierung mit der Bildung der Endprodukte VC bzw. cDCE einher. Eine vollständige Dechlorierung bis zum Ethen erfolgte nicht.

Eine grundsätzliche Besiedlung von Fe⁰-Reaktiven Wänden durch dechlorierende Organismen ist durch die kontinuierliche Bereitstellung von H₂ bzw. von Acetat durch

hydrogenotrophe Acetogene denkbar. Bisher konnten nur in einer Reaktiven Wand TCE dechlorierende Bakterien nachgewiesen werden [LIANG et al., 2000].

2.4.4 Enzymatische Dechlorierung von PCE

Eine biogene Dechlorierung findet statt, wenn biologisch gebildete Substanzen wie Enzyme und/oder Cofaktoren an der Dechlorierung beteiligt sind. Die reduktive Dechlorierung in Bakterien wird durch sogenannte reduktive Dehalogenasen (RDasen) katalysiert. Die bislang isolierten RDasen sind monomere Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 45 bis 65 kiloDalton (kDa) und in der Regel membrangebunden mit einer Orientierung nach außen [SCHUMACHER et al., 1997; MAGNUSON et al., 2000; VAN DE PAS, 2001; SUYAMA et al., 2002]. Eine Ausnahme bildet die RDase von *Dehalospirillum multivorans*, die im Cytosol vorliegt [MILLER et al., 1996; 1998].

Für den Transfer der Elektronen sind Corrinoiden als Cofaktoren notwendig. Zu den Corrinoiden zählt u.a. Vitamin B₁₂, auch als Cyanocobalamin bezeichnet, welches aus einem Ribonukleotid und einem Tetrapyrrolringssystem besteht. Im Zentrum des Ringsystems ist ein Cobalt-Ion gebunden, welches im reduzierten Zustand als Cob(II)alamin und im superreduzierten Zustand als Cob(I)alamin an Dehalogenierungsreaktionen teilnehmen kann [LEHNINGER, 1985]. Das auf Stufe des Cob(I)alamin reduzierte Vitamin B₁₂ führt einen nukleophilen Angriff auf chlorierte Ethene aus. Es entsteht ein oxidiertes B₁₂-Cofaktor, der wieder zum Cob(I)alamin reduziert werden muss, um erneut für die Reduktion von chlorierten Ethenen zur Verfügung zu stehen. Da das Standardredoxpotenzial des Paares Cob(II)alamin/Cob(I)alamin bei ca. – 350 mV liegt, ist eine Reduktion des Cob(II)alamins für die Zelle ein Problem, das möglicherweise durch einen rückläufigen Elektronentransport gelöst wird. Weitere tetrapyrrolhaltige Cofaktoren, die an Dehalogenierungsreaktionen teilnehmen können, sind Eisenporphyrine und Coenzym F430 [GLOD et al., 1997]. Coenzym F430 ist in Methanogenen an der Methanogenese beteiligt. Als redoxaktives Zentrum wirkt ein Nickel-Ion. Eisenporphyrine bilden das Grundgerüst für z. B. Hämoglobin [LEHNINGER, 1985].

Der bei der Dechlorierung von PCE mittels Cobalamin zugrundeliegende Mechanismus ist nicht einheitlich beschrieben. Während GANTZER & WACKETT [1991, zitiert in Glod et al., 1997] eine Reduktion von PCE und TCE über eine sequentielle Hydrogenolyse beschrieben, bei der Vinylchlorid als Intermediat auftrat, zeigten GLOD et al. [1997] eine

Reduktion von PCE und TCE über einen Mechanismus, bei dem kein VC freigesetzt wird. PCE wird dabei in einer pH-unabhängigen Reaktion quantitativ in TCE umgesetzt. Es wurde ein Ein-Elektronen-Transfer angenommen, da Cob(I)alamin nicht zu Cob(III)alamin, sondern zu Cob(II)alamin umgesetzt wurde. Die Produktverteilung der TCE-Dechlorierung war dabei vom pH-Wert abhängig. Als Produkte entstanden tDCE, cDCE, Ethen und Ethin. Als Elektronendonator diente jeweils Titan(III)-Citrat. LESAGE et al. [1998] postulierten als weiteren Mechanismus eine sequentielle Dechlorierung von PCE, wobei die Intermediate am Cobalamin gebunden bleiben. Titan(III)-Citrat wurde dabei eine wichtige Rolle zugeordnet. Während der Versuche lag stets eine gesättigte PCE-Lösung durch Vorhalten von PCE in Phase vor. Nach einer homolytischen Spaltung würden die Intermediate vom Cobalamin abgespalten werden und müssten mit noch vorhandenem PCE um eine Bindung an das Cobalamin-Molekül konkurrieren. Ethen und Ethin würden erst gebildet werden, wenn PCE vollständig reduziert worden wäre. Durch den simultanen Nachweis von Dichlorethenyl-, Chlorethenyl- und Ethylencobalamin sowie von Ethin und PCE liegt es jedoch nahe, dass PCE während der sequentiellen Dechlorierung am Cobalamin gebunden bleibt und erst in einer abschließenden Eliminierungsreaktion freigesetzt wird. Der prozentuale Anteil an Ethin war dabei mit PCE höher als mit TCE als Ausgangssubstanz, was mit dem Vorliegen von zwei verfügbaren Chloratomen am β -Kohlenstoffatom begründet wurde. Die Art der freigesetzten Produkte ist darüber hinaus auch abhängig vom pH-Wert, der Art und Konzentration des Reduktionsmittels. Mit Reduktionsmitteln mit niedrigem Redoxpotenzial wie Titan(III)-Ascorbat werden schnellere Umsatzraten erreicht als mit Reduktionsmitteln mit hohem Redoxpotenzial wie Titan(III)-Nitrilotriacetat (NTA).

3 Material & Methoden

3.1 Eisensorten, Chemikalien, Gase und Oligonukleotide

Für die Untersuchungen wurde splinterförmiges Graugusseisengranulat (GG) der Fa. Gotthardt Maier Metallpulver GmbH Rheinfelden mit einer BET-spezifischen Oberfläche von 0,6 m²/g und Eisenschwamm der Fa. ISPAT Hamburger Stahlwerke mit einer BET-spezifischen Oberfläche von 0,63 m²/g eingesetzt. Eisenschwamm ist ein Zwischenprodukt in der Stahlerzeugung mit einem Eisengehalt von 90 bis 92 % bei einem Mineralisierungsgrad von 91 bis 93 % [RENZ et al., 1995]. Es wird im Direktreduktionsverfahren im Gasgegenstrom erzeugt (sog. Midrex[®]-Verfahren).

Die verwendeten Chemikalien waren von p.a.-Qualität und wurden von der Fa. Merck (Darmstadt), Fa. Aldrich (Steinhofen), Fa. Sigma (Deisenhofen) oder Fa. Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Titan(III)-Chlorid wurde in technischer Reinheit bezogen (Fa. Merck-Schuchard, Darmstadt). Das verwendete Antibiotikum Vancomycin und der Hemmstoff 2-Bromethansulfonat BES waren Produkte der Fa. Sigma (Deisenhofen).

Methan 4.5 (Fa. Messer-Griesheim, Krefeld), Ethen 2.8 und Ethan 2.5 (Fa. Linde AG, Unterschleißheim) wurden zur Herstellung von Gasstandards verwendet. Zum anaeroben Arbeiten und für die Herstellung von Gasstandards wurde Inertal, ein Gasgemisch aus 80 Vol.-% N₂ und 20 Vol.-% CO₂ 2.8, eingesetzt. Carbonatpuffer wurde mit CO₂ einer Reinheit von 4.5 angesetzt. Für die Gaschromatographie wurde Synthetische Luft, N₂, Helium und H₂ mit einer Reinheit von 5.0 verwendet.

Die DNA-Synthese von Primern für PCR und Sequenzierung wurden von der Fa. Tib MolBiol (Berlin) durchgeführt.

3.2 Die Fe⁰-Reaktive Wand in Rheine

Die Reaktionswand in Rheine wurde 1998 als überschnittene Bohrpfahlwand (60 bis 88 cm Durchmesser) quer zur Grundwasserfließrichtung in der Mitte der Schadstofffahne installiert. Zum Vergleich verschiedener Eisenmaterialien wurde in einem 12,5 m Abschnitt ES und in einem 10 m langen Abschnitt eine Mischung aus Perlkies und GG verwendet. Die Reaktive Wand ist in die Aquifersohle eingebunden, die bei ca. 6 m unter GOK liegt. Der Grundwasser-Flurabstand beträgt 3 m. Das reaktive Material wurde ab

2,5 m bis 6 m unter GOK eingebracht. Die beiden Abschnitte der Reaktionswand wurden durch einen mit Beton verfüllten Bohrpfahl hydraulisch voneinander getrennt [MÖLLER, 1998].

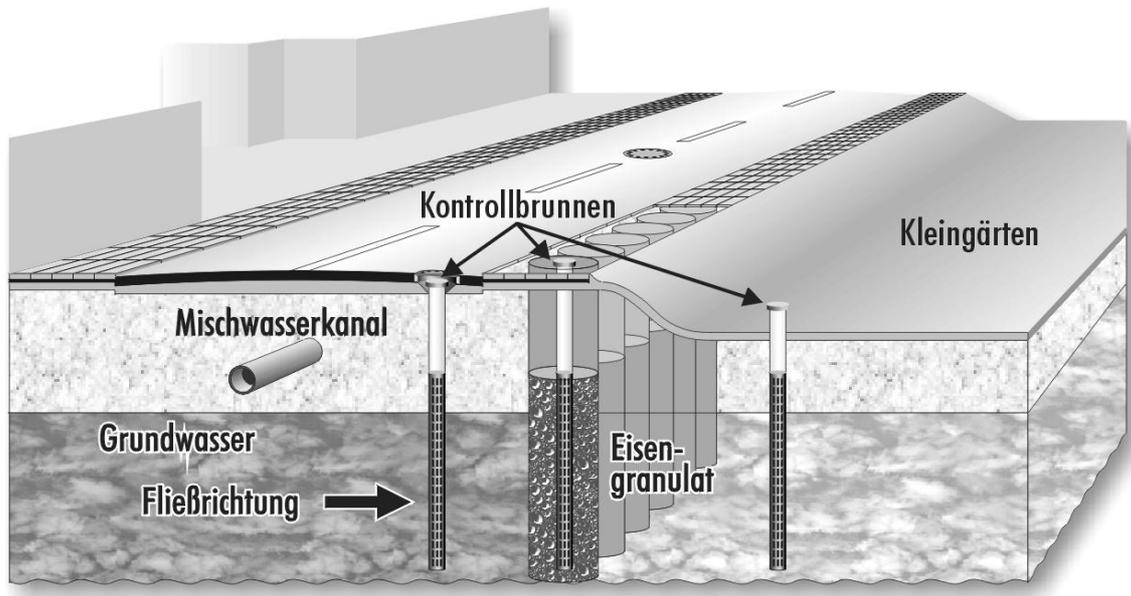


Abb. 3.1 Prinzipskizze der Reaktiven Wand in Rheine (mit Genehmigung der Fa. M&P Ingenieurgesellschaft, Garbsen)

3.3 Probenahme und Aufbereitung von Eisenproben

Es wurden zwei zeitlich versetzte Probenahmen durchgeführt. Dadurch sollten Alterungsprozesse der Reaktiven Wand mit Eisen festgestellt und mögliche Auswirkungen auf mikrobiologische Effekte untersucht werden. Die erste Probenahme erfolgte aus der Reaktiven Wand in Rheine. Da eine zweite Probenahme direkt aus der Reaktiven Wand nicht möglich war, wurden Proben aus Säulen entnommen, die mit Material aus dem Anstrombereich von 2 bis 5 m unter GOK aus der Reaktiven Wand in Rheine befüllt worden waren.

Tab. 3.1 Entnahme von Eisenproben

	1. Probenahme	2. Probenahme
Eisenmaterial aus	Reaktive Wand	Säulen in Kiel
Ort	Rheine	Kiel
Datum	06.-07.11.01	07.05.02
Entnahme aus	Anstrombereich der Wand	GG-Anstrom-Säule
	GG: 4-5 m u. GOK	ES-Anstrom-Säule
	ES: 4,2-5,2 m u. GOK	
Zusammensetzung der Probe	1:2 Gew.-% GG/Kies- Gemisch	GG: prozentualer Anteil an Kies höher als bei 1.Probenahme
	100 % ES	100 % ES

Die erste Probenahme wurde von Mitarbeitern der Universität Kiel durchgeführt. In einer Argonbox wurde Eisenmaterial aus den Bohrkernen in Probengefäße überführt, mit Grundwasser aufgefüllt und bei 4°C gelagert. Die Probenaufarbeitung (Desorption) erfolgte schnellstmöglich nach Ankunft im Labor (bei ES-Proben ca. 36 h nach Probenahme, bei Proben mit GG-Kies-Gemisch ca. 10 h nach Probenahme). Dabei wurde das Grundwasser mit anaerobem Carbonatpuffer ausgetauscht. Die Desorption fand bei Raumtemperatur mittels eines Überkopfschüttlers für 1 h bei 50 rpm statt. Der pH-Wert wurde überprüft und gegebenenfalls mit 1 M HCl auf ca. 7 bis 7,5 eingestellt.

Die zweite Probenahme fand aus den Anstrom-Säulen in Kiel statt, die mit Anstrommaterial der Reaktiven Wand befüllt waren. Vor dem Einbau in die Säulen wurde das aus der Reaktiven Wand in Rheine stammende Material ca. 2 Wochen anaerob gelagert. Aufgrund von Permeabilitätsproblemen musste das GG-Kies-Gemisch für die Säulen gesiebt werden, wobei der prozentuale Eisenanteil möglicherweise kleiner war als in der Reaktiven Wand in Rheine [EBERT, 2002]. Bei der Probenahme wurde jeweils aus den Anstrom-Säulen unter einem Argonstrom Probenmaterial entnommen, anaerob in Probengefäße überführt und mit anaerobem Carbonatpuffer versetzt. Während das entnommene GG-Kies-Gemisch zum Teil sehr verfestigt war, wies der entnommene ES stark bräunliche Verfärbungen auf, die auf oxidative Prozesse hinwiesen. Der Transport erfolgte am gleichen Tag gekühlt, die Probenaufarbeitung am folgenden Tag.

In den Säulenversuchen in Kiel wurde bis zur zweiten Probenahme für GG-Kies-Gemisch der vorderen Bohrung (1. Säule) ein Fluss von 1,18 ml/min eingestellt, was 84 ausgetauschten Porenvolumen entspricht und somit einen Zeitraum von ca. 4 Jahren Alterung unter Feldbedingungen simuliert. Für den ES betrug der Fluss 1,02 ml/min, was einem ausgetauschten Porenvolumen von 58 entspricht und damit ca. 2,7 Jahre Alterung simuliert [EBERT, 2002].

Bei den Untersuchungen mit Material der zweiten Probenahme wurde auf eine Desorption der ES-Probe verzichtet, nachdem die Ergebnisse der ersten Probenahme mit Ausnahme an acetogenen und denitrifizierenden Bakterien keine nennenswerte Besiedelung zeigten. Stattdessen wurde Desorbat vom GG-Kies-Gemisch als Animpfmaterial für Batch-Ansätze mit ES verwendet, um festzustellen, ob ES prinzipiell von Bakterien besiedelt werden kann. Zudem wurde ES aus den Säulen in Kiel eingesetzt, ohne eine Desorption durchzuführen. Dieses Material wurde als gealtertes ES bezeichnet.

Eisen aus der Reaktiven Wand in Rheine bzw. aus den Säulen (gealtert) wurde in einem Inertgas-Strom getrocknet. Für das GG-Kies-Gemisch wurde dazu im Vorfeld der Kies vom GG unter anaeroben Bedingungen abgetrennt. Anschließend wurde ES anaerob bei 80°C für 24 Stunden, GG für 12 Stunden vorinkubiert. In Vorversuchen konnte nach Zugabe von Medium und anaerober Inkubation über 6 Wochen keine mikrobiologische Aktivität festgestellt werden.

„Frisches“ Eisen als Elektronendonator für die Batch-Ansätze wurde thermisch mindestens 4 h bei 80°C vorbehandelt.

3.4 Kultivierung

3.4.1 Verwendete Lösungen

Die Versuche wurden in einem kohlenstoff- und chloridarmen sowie carbonatgepuffertem Medium mit einem Zusatz von Spurenelementen und Vitaminen durchgeführt [ADRIAN, 1999]. Bei Bedarf wurden Reduktionsmittel wie 1 mM Natriumsulfid (Na_2S), Titan(III)-NTA, oder Titan(III)-Citrat [ZEHNDER & WUHRMANN, 1976] eingesetzt. In Ansätzen mit Fe^0 wurde auf die Zugabe von Reduktionsmitteln verzichtet, da durch die anaerobe Korrosion des Eisens das Redoxpotenzial für eine anaerobe Kultivierung ausreichend abgesenkt wird.

Tab. 3.2 Zusammensetzung des Carbonatmediums mit Spurenelemente- und Vitaminzusatz [nach ADRIAN, 1999]¹

Basallösung			
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g/l		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,11 g/l	Sterilisation durch Autoklavieren	
NH ₄ Cl ₂	0,27 g/l		
Bicarbonatlösung			
KHCO ₃	0,70 g/l		
NaHCO ₃	1,92 g/l	Sterilisation durch Autoklavieren	
Phosphatlösung			
KH ₂ PO ₄	0,2g g/l	Sterilisation durch Autoklavieren	
Spurenelemente		Vitamine	
ZnCl ₂	0,14 mg/l	D(+)-Biotin	0,010 mg/l
MnCl ₂ x 5 H ₂ O	0,16 mg/l	Thiaminchlorid-dihydrochlorid	0,100 mg/l
H ₃ BO ₃	0,012 mg/l	Nicotinsäure	0,100 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,28 mg/l	Ca-D (+) Pantothenat	0,050 mg/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,004 mg/l	p-Aminobenzoessäure (THF)	0,040 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,048 mg/l	Pyridoxinhydrochlorid	0,150 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,072 mg/l		
EDTA	25,6 mg/l		
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	2 mg/l	Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	0,05 mg/l

¹Angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen im fertigen Medium; die Mineralsalze werden in drei verschiedenen Lösungen, bezeichnet als Basallösung, Carbonatlösung und Phosphatlösung getrennt angesetzt; ² nicht zugesetzt beim Nachweis von Denitrifikanten/Rheine-Ansätze

3.4.2 Medienzubereitung für die Batchversuche

Die Herstellung des Carbonatmediums erfolgte in einem 3 l Widdelkolben. Die Basallösung wurde vor Gebrauch frisch hergestellt, mit CO₂ gesättigt und verschlossen unter einer CO₂-Atmosphäre autoklaviert. Die Phosphatlösung wurde getrennt angesetzt und autoklaviert. Die Spurenelementelösung sowie FeCl₂ wurden in 1000-facher Konzentration in Millipore®-Wasser angesetzt und getrennt autoklaviert. Das 2000-fache Konzentrat der Vitaminlösung und das 1000-fache Konzentrat der Vitamin B₁₂-Lösung wurde steriltrifert sowie kühl und dunkel gelagert.

Die Basallösung wurde im Widdelkolben mit 2900 ml Millipore®-Wasser angesetzt und autoklaviert. Bei ca. 50°C wurde der Widdelkolben aus dem Autoklaven genommen und unter einem Inertal-Strom bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden die noch fehlenden Bestandteile sowie 2 mg/l Resazurin (Stammlösung: 1 mg/ml) zur Basallösung gegeben und gegebenenfalls der pH-Wert mit 2 M HCl eingestellt.

Das Medium wurde in 300 ml Schottgefäße abgefüllt und je nach Bedarf mit 10 bis 15 µl PCE, 50 mg Nitrat/l (Stammlösung 8,15 g KNO₃/50 ml), 100 mg Sulfat/l (Stammlösung: 7,4 g Na₂SO₄/50 ml), 4 mM BES (Stammlösung 2,11 g/10 ml) oder 50 mg Vancomycin/l (Stammlösung 62,5 mg/5 ml) versetzt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von PCE erfolgte bei PCE-haltigem Medium ein zweiwöchiges Lösen bei 120 rpm.

3.4.3 Medienzubereitung für die Säulenversuche

Das in den Säulenversuchen verwendete Medium entsprach anfangs dem Medium für die Batchversuche. Aufgrund von Carbonatausfällungen wurde in Folge die Carbonatmenge auf ein Drittel reduziert. Auf die Zugabe von Resazurin und Phosphatlösung sowie Ammoniumchlorid wurde verzichtet. Zur Herstellung des Mediums wurden Calcium- und Magnesiumchlorid in 9,5 l Millipore® gelöst und autoklaviert. Die Carbonatlösung wurde getrennt davon in einer geschlossenen 500 ml-Schottflasche autoklaviert und nach Abkühlung zugegeben, um Carbonat-Ausfällungen zu vermeiden. Anschließend wurden die Vitamine, Spurenelemente und Acetat zugegeben. Ab dem 176. Tag wurde das Medium entsprechend der Zusammensetzung für die Batch-Ansätze verwendet, um einen Eingangs-pH-Wert von ca. 7,0 bis 7,5 gewährleisten zu können. Ab dem 184. Tag wurden zusätzlich 0,27 g NH₄Cl/l dem Medium zugegeben.

3.4.4 Kultivierung einer dechlorierenden Mischkultur

Das Inokulum der PCE-dechlorierenden Mischkultur (DMC) wurde 1997 vom Institute of Environmental Science and Engineering der Rice University (Houston, Texas, USA) zur Verfügung gestellt [CARR & HUGHES, 1998]. Diese Kultur dechlorierte 300 µmol PCE/l wässrige Konzentration (ca. 50 mg PCE/l) innerhalb von einer Woche zu ca. 80 % VC und 20 % Ethen [CARR & HUGHES, 1998; KUHLMANN, 1998].

Die Kultivierung der DMC erfolgte in 5 l Schottflaschen (Fa. Schott, Mainz) mit 4 l Medium (Gesamtvolumen 5,8 l). Die Kulturflaschen wurden mit einem Schraubdeckel, der mit einer Silikondichtung mit zusätzlicher PTFE-Beschichtung (Fa. Machery-Nagel, Düren) versehen war, luftdicht verschlossen. Im Schraubdeckel waren drei Bohrungen gesetzt für einen Injektionsblock mit einem teflonbeschichteten Butyl-Septum (Fa. Wöhlecke, Hildesheim), einer Kanüle (2 mm \varnothing , 30 cm Länge) für Entnahme bzw. Zugabe von Medium sowie Probenahme, eine weitere Kanüle (1,5 mm \varnothing , 15 cm Länge) für den Austausch der Gasphase und Gas-probenahme. Die Kanülen waren mit Luer-Lock-Hähnen aus Edelstahl (Fa. Ochs, Bovenden) versehen.

Der DMC wurden im wöchentlichen Rhythmus 240 ml Medium (6 % des Ansatzes) entnommen und verworfen. Anschließend wurde im Wechsel mit jeweils 30-minütigen Pausen je 3 x 30 Minuten mit Inertgas gespült, um Ethen, Methan und Metabolite der PCE-Dechlorierung zu entfernen. Nach Zugabe von 250 ml anaeroben Mediums wurde der pH-Wert auf ca. 7,0, der Druck auf ca. 1060 mbar eingestellt. Anschließend wurden 1040 μ l einer PCE-Stammlösung (1,54 ml PCE ad 10 ml Methanol) sowie 100 μ l Hefeextrakt-Lösung (Stammlösung: 100 mg/ml) über den Injektionsblock zugegeben. Nach drei Tagen wurden 220 μ l Methanol nachdosiert [KUHLMANN, 1998].

Um eine vollständige Dechlorierung zu Ethen zu erreichen, wurde die Substrat-Zusammensetzung verändert. Nach Zugabe des anaeroben Mediums sowie der Einstellung des pH-Wertes wurden 155 μ l PCE (entspricht ca. 50 mg/l wässrige Konzentration) und 120 ml H₂ zudosiert. Nach drei Tagen wurden 110 μ l Methanol zugegeben und bei Bedarf wurde H₂ (60 ml) nachdosiert sowie der pH-Wert eingestellt.

Um die mikrobiologische Dechlorierung von PCE in den Mischkulturen zu verfolgen, wurden direkt vor dem Entgasen, nach einem Tag und nach ca. drei Tagen der Inkubation eine Headspace-Probe genommen. H₂-Messungen erfolgten nach drei und sieben Tagen Inkubation.

3.4.5 Batch-Ansätze

Batch-Ansätze wurden stets als Triplets angelegt. Für Ansätze mit Fe⁰ erfolgte die Einwaage entsprechender Mengen in sterile, mit Millipore® gespülte und bei 100°C getrocknete Injektionsflaschen (Fa. Ochs, Göttingen) oder Schottflaschen (100 ml, Fa. Schott, Mainz). Für molekulare Untersuchungen wurden Batch-Ansätze in 20 ml, für MPN-Bestimmungen in 30 ml Injektionsflaschen angesetzt. Für alle weiteren Versuche

wurden 50 ml Medium in 100 ml Injektionsflaschen oder Schottflaschen mittels einer 50 ml Dispensette (Fa. Hirschmann, Eberstadt) abgefüllt und je nach Bedarf mit Reduktionsmittel versetzt. Die Injektionsflaschen wurden mit Aluminium-Bördelkappen mit teflonbeschichteten Butyl-Septen (R20-L/CS-Chromatographie Service, Langerwehe), die Schottflaschen mit in die Lochschraubdeckel (GL 25, Fa. Schott, Mainz) eingelegten Dichtscheiben aus Butylgummi (\varnothing 23 mm, Fa. Machery-Nagel, Düren) sowie einem Teflon-Septum (\varnothing 23 mm, Fa. Wöhlecke, Hildesheim) luftdicht abgeschlossen. Anschließend wurde der Luftraum mittels eines Begasungsautomaten durch Inertgas ausgetauscht [ADRIAN, 1999]. Dieser besteht aus einer Steuereinheit, einem Begasungsrechen und einem 3-Wege-Ventil, das durch die Steuereinheit abhängig vom Druck geschaltet wird. Durch abwechselndes Anlegen eines Unterdruckes von ca. 145 mbar und eines Überdruckes von 1100 mbar wurde ein definierter schneller und vollständiger Austausch der Gasphase ermöglicht.

Um eine Verteilung des im Mediums vorgelösten, leichtflüchtigen PCE in Gas- und Flüssigphase gewährleisten zu können, wurden die Proben vor Zugabe von Acetat, H₂ und Inokulum 1 h bei 120 rpm geschüttelt. Die Bestimmung von H₂ bzw. Entnahme von Ionen- und Headspace-Proben erfolgte anschließend. Die Batch-Ansätze wurden bei 24°C und 120 rpm geschüttelt.

3.4.6 Säulenversuche

Für die Säulenexperimente wurden vier Glassäulen parallel betrieben (Abb. 3.2, H). Zur Probenahme standen je Säule 9 Ports zur Verfügung. Port 0 lag direkt vor dem Einlauf in die Säulen. In der reaktiven Schüttung waren Port 1 bis 3 mit einem Abstand von jeweils 5 cm, Port 3 bis 8 mit Abständen von 10 cm eingelassen. Säule A und B waren mit GG von Port 1 bis 5 und ab Port 5 mit Kies (Kristall-Quarzsand Dorsilit, 1,0 bis 2,5 mm, Fa. Interseroh, Köln) befüllt, so dass die reaktive Schüttung ausschließlich aus GG bestand. Die Säulen C und D enthielten von Port 1 bis 8 ein GG-Kies-Gemisch (siehe Anhang 8.1, 8.2). Vor der reaktiven Schüttung, also vom Einlauf in die Säule bis zum Port 1, waren alle vier Säulen mit Kies befüllt. Während Säule A und C als abiotische Kontrollen dienten, wurden Säule B und D mit der DMC inokuliert.

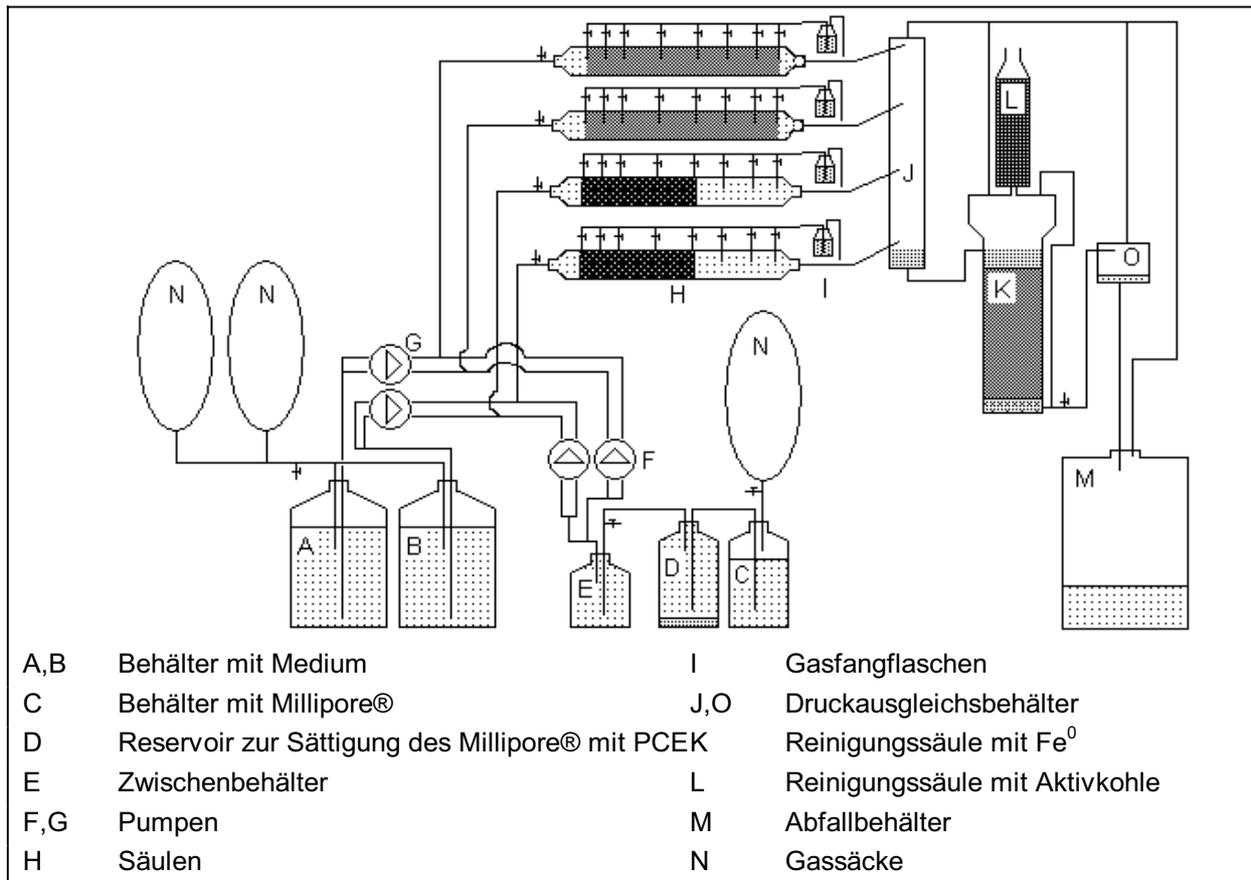


Abb. 3.2 Schema des Säulenaufbaus (BLOTEVOGEL, 2003).

Die Säulen wurden mit PCE-haltigem Medium kontinuierlich versorgt. Dabei erfolgte eine Mischung des Mediums mit einer PCE gesättigten Lösung direkt vor dem Einlauf in die Säulen in einem T-Stück (P633 Tee ETFE, Fa. Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). Eine gesättigte PCE-Lösung wurde in einer 2 l-Schottflasche (E) vorgehalten. Vorgesaltet war eine 5 l-Schottflasche (D), in der PCE als Phase in Millipore® vorlag und sich bis zur maximalen Löslichkeit löste. Eine kontinuierliche Zuleitung von Millipore® erfolgte durch eine nachgeschaltete zweite 5 l-Schottflasche (C). Das Medium wurde in zwei 10 l-Schottflaschen vorgehalten (A, B), die abwechselnd angeschlossen werden konnten. Ein durch den Verbrauch von Medium bzw. PCE-Lösung notwendiger Druckausgleich in den Schottflaschen erfolgte über mit N₂ gefüllte Gassäcke (Plastigas, Fa. Linde, Unterschleißheim). Zur Förderung der Lösungen wurden Ismatec Reglo Digital Pumpen (4 Kanäle, 12 Rollen, Fa. Ismatec, Wertheim) eingesetzt (F, G). Als Schlauchmaterial dienten sauerstoffdichte No-Ox-Schläuche (Fa. Upchurch Scientific), sowie LCKW-undurchlässige Tygon- und Viton-Schläuche (Fa. Ismatec, Wertheim).

Die Probenahme erfolgte an den Ports 0 bis 8 durch bis in die Mitte der Säule reichende stumpfe Kanülen (neoLab-Kanüle mit Luer-Lock-Anschluss, Fa. neoLab, Heidelberg).

Durch eine weitere kürzere Kanüle pro Port wurde entstehendes Gas in die Gasfangflaschen (I) abgeleitet.

Am Ende der vier Säulen wurde die Lösung in eine als Auffangbehälter und Druckausgleichsbehälter dienende Säule geleitet (J). Vom unteren Ende der Druckausgleichssäule wurde die Lösung von oben in eine Reinigungssäule, die nullwertiges Eisen auf einer Schicht aus Glasperlen enthielt, geleitet (K). Diese diente zur Restreinigung der PCE-Lösung. Schließlich wurden noch die Gasräume der Druckausgleichsbehälter (J, O) und des Abfallbehälters (M), an der die Reinigungssäule angeschlossen war, über eine mit Aktivkohle gefüllte Säule abgeleitet.

Das 270-tägige Säulenexperiment fand unter variierenden Bedingungen statt, die in Anhang 8.3 dargestellt sind. Aufgrund der unzureichenden PCE-Dechlorierung in Säulen C und D, in denen sich insgesamt nur rund 20 % Eisen im Vergleich zu den Säulen A und B befand (siehe Anhang 8.1, 8.2), wurde nach 29 Tagen die Eingangskonzentration des Schadstoffs gesenkt, da die Reinigungssäule das im Auslauf befindliche PCE und cDCE nicht mehr vollständig entfernen konnte. Nach 83 Tagen wurde die Eingangskonzentration dann wieder auf das alte Niveau angehoben, da sich die Dehalogenierung in den Säulen verbessert hatte.

3.5 Mikro- und molekularbiologische Methoden

3.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry [HERBERT et al., 1971]. Die Kalibrierung wurde mit Rinderserumalbumin durchgeführt. In den Ansätzen mit Eisen konnte die Proteinbestimmung aufgrund von falsch positiven Werten nicht eingesetzt werden.

3.5.2 MPN-Bestimmung

Die MPN-Bestimmungen für die methanogenen und acetogenen Bakterien wurden in Anlehnung an MAYMÓ-GATELL et al. [1995] in 30 ml Injektionsflaschen im Dreifachansatz durchgeführt. Dabei wurden jeweils 18 ml Medium abgefüllt, mit 0,1 mM Na₂S versetzt, mit teflonbeschichteten Butylgummisepten verschlossen und begast. Nach frühestens einem Tag wurden die Fläschchen mit 2 ml Probe beimpft. Nach dem Vermischen des Inokulums wurde ein entsprechendes Volumen in ein neues Fläschchen für die nächste

Verdünnungsstufe überführt. Für die Bestimmung von acetogenen Bakterien wurden 4 mM BES, für methanogenen Bakterien 50 mg/l Vancomycin eingesetzt.

Die Zellzahl-Bestimmung für sulfatreduzierende Bakterien erfolgte nach STEIOF [1993], für denitrifizierende Bakterien nach KÖLBEL-BOELKE et al. [1988].

3.5.3 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung erfolgte nach SAMBROOK et al. [1989]. Dabei wurde die doppelsträngige DNA durch das Verhältnis der photometrischen Absorption bei 260 zu 280 nm identifiziert und über die Absorption bei 260 nm quantifiziert.

3.5.4 Amplifizierung der 16S rRNA-Gene und Klonierung

Die Sequenzen der 16S rRNA-Gene von Bakterien aus der dechlorierenden Mischkultur sollten mit den Sequenzen von *Dehalococcoides* Spezies verglichen werden.

Dazu wurden die 16S rRNA-Gene mittels PCR amplifiziert. Als Primer wurden die bakteriellen Primer 616V oder 1492R [KALMBACH et al., 1997] mit den von LÖFFLER et al. [2000] beschriebenen für *Dehalococcoides* spezifischen Primern DHC1172R und DHC728V kombiniert (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Bezeichnungen, Positionen und Sequenzen der verwendeten Primer

Primer	16S rDNA-Position (bp) ^a	5'-Sequenz-3'
Bacteria-spezifische Primer		
616V	8 - 25	AGA GTT TGA TC/TA/C TGG CTC AG
1492R	1493-1511	CGG C/TTA CCT TGT TAC GAC
DHC-Primer		
DHC728V	728-750	AAG GCG GTT TTC TAG GTT GTC AC
DHC1172R	1172-1155	CGT TTC GCG GGG CAG TCT

^a Für die DHC Primer bezieht sich die Basenposition auf die 16S rDNS-Sequenz von *D. ethenogenes*, bei den universellen Primern auf die 16S rDNA-Sequenz von *E.coli*.

Als Matrize (Template oder zu amplifizierende DNA) wurden unbehandelte Proben aus der Mischkultur genutzt. Die Amplifizierung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl mittels eines Kits (Fa. Eppendorf, Hamburg), in dem 1 µl Kultur, 2,5 µl 10facher Reaktionspuffer, 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl), 200 µM jedes Deoxynukleotids, 1 Vol.-% Dimethylsulfoxid und 200 nM der Primer vorlagen. Die PCR wurde mit einem Master

Cycler Gradient (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte für 3 Minuten bei 95°C. Anschließend wurden 30 Zyklen mit folgenden Inkubationszeiten und Temperaturstufen durchlaufen: 90 Sekunden bei 94°C, 60 Sekunden bei 56°C, 150 Sekunden bei 72°C. Am Ende wurde 10 Minuten bei 72°C inkubiert und bis zur Entnahme wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Amplikons wurden durch Gelelektrophorese auf Reinheit und Länge überprüft. Zur weiteren Verarbeitung wurde der PCR-Ansatz mit einem PCR-Reinigungskit (Fa. Quiagen, Hilden) aufgereinigt und in *E. coli* mittels eines TA-Klonierungskits (Fa. Invitrogen, De Schelp, Niederlande) kloniert.

Das Prinzip des TA-Klonierungskits beruhte auf der Verwendung des 3,9 kb großen Plasmides pCR[®]2.1.

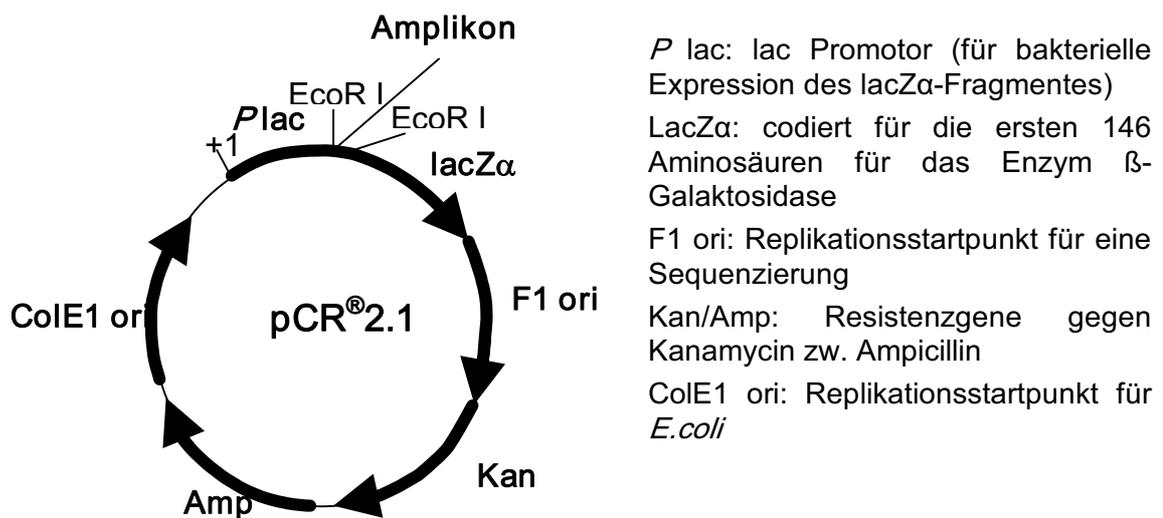


Abb. 3.3 Die wichtigsten Funktionsmerkmale des pCR[®]2.1-Plasmides. Mittels dieses Plasmides war eine Selektion positiver Klone anhand eines Blau-Weiß-Screenings möglich. Das Amplikon wurde von EcoR I-Schnittstellen flankiert.

Wie in Abb. 3.3 ersichtlich, wurde das PCR-Produkt in das lacZ-Gen kloniert. Für die PCR wurde dazu eine Taq-Polymerase verwendet, die ein überstehendes Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produktes anheftete. Dies war die Voraussetzung für eine Ligation des PCR-Produktes mit den überstehenden 3'-Desoxythymidin (T) des linearisierten Plasmides. Die danach wieder zirkulären Plasmide wurden in *E. coli* (TOP10F') transformiert.

Zur Transformation wurden ca. 50 bis 100 μ l auf LB-Agarplatten (10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto Hefeextrakt, 10 g NaCl, 1,5 Gew. % Agarose, pH 7,5, ad 1l) mit 100 μ g/ml

Ampicillin, 0,5 mM IPTG (als Induktor) und 80 µg/ml X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein positiver Nachweis beruhte darauf, dass ein PCR-Produkt (Amplikon) in das β-Galaktosidase-Operon des Plasmides eingebaut wurde. Das β-Galaktosidase-Operon des Plasmides codierte die ersten 146 Aminosäuren der β-Galaktosidase. Zur Komplementierung und somit Bildung einer intakten β-Galaktosidase waren das chromosomale lacZ-Fragment des *E.coli*-Wirtsstammes notwendig. Somit konnten nur transformierte Klone durch Bildung des intakten Enzyms x-Gal zu einem blauen Farbstoff spalten, so dass Kolonien blau gefärbt waren. Klone, die das Plasmid mit dem Amplikon im lacZα-Gen enthielten, konnten den ersten Teil der β-Galaktosidase nicht bilden, so dass x-Gal nicht gespalten wurde und die Kolonien weiß gefärbt waren. Bei nicht erfolgreicher Transformation, das heißt, die *E.coli*-Zellen enthielten kein pCR[®]2.1-Plasmid und somit kein Ampicillin-Resistenzgen, war ein Wachstum auf Ampicillin-haltigen Nährmedien nicht möglich.

Farblose Einzelkolonien wurden in 3 ml LB-Bouillon (LB-Medium ohne Agarose) mit Ampicillin überführt und über Nacht angezogen. Aus je 1 ml dieser Bouillon wurden die Plasmide mittels Mini-Präp-Methode isoliert. Dazu wurden die Zellen bei 10.000 Upm sedimentiert, anschließend in 50 µl sterilem TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0 mit 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 0,2 N NaOH/1 % SDS-Lösung wurde vorsichtig geschwenkt und der Ansatz für 5 Minuten auf Eis gelagert. Dann wurden 40 µl einer Natriumacetat/NaCl-Lösung (1 M Natriumacetat pH 4,8, 0,5 M NaCl) zugefügt, erneut gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann 15 min bei 12.000 Upm zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 360 µl eisgekühltem Isopropanol wurde die DNA für 15 Minuten bei -20°C gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min bei 12.000 Upm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde 10 Minuten in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

Inserts von aufgereinigten Plasmiden (Plasmid Mini Kit, Fa. Quiagen, Hilden) wurden mittels eines ABI-Sequencer (M. Meixner Sequenzierservice, Berlin) sequenziert. Eine Einordnung auf Grundlage der erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen erfolgte mittels der Blast-Suchoption des US National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.5.5 Restriktionsanalyse der amplifizierten Produkte

Eine Methode zur Charakterisierung von mikrobiologischen Gemeinschaften ist die „Amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA) von mittels PCR amplifizierter 16S rDNA. Durch Verwendung von spezies- oder gruppenspezifischen statt universellen Primern für die PCR ist damit eine selektive Analyse bestimmter Spezies oder Gruppen möglich. Die Amplifikate werden dazu im Anschluss an die PCR mit Restriktionsenzymen verdaut und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Aus den dabei entstandenen Bandenmustern können Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Bakterien oder Gruppen gezogen werden.

Die amplifizierten Fragmente bzw. die Insert enthaltenden Plasmide wurden mit den Restriktions-Endonukleasen EcoRI und FauNDI (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) an den spezifischen Erkennungsstellen der DNA geschnitten. Dazu wurden in 20 µl Ansätzen je 8 bis 10 µl PCR-Produkt bzw. aufgereinigte Plasmide, 2 µl des empfohlenen Puffers und 1 µl Enzym (10 U/µl) bei 37°C für 120 Minuten inkubiert.

3.5.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophoresen wurden mit 1- bis 1,2%igen Agarosegelen in 0,5fachen TAE-Puffer (2,42 g Tris, 0,7 ml Eisessig, 1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1l) durchgeführt. Als Ladepuffer für die Proben wurde 5fach konzentrierter Blue-Run (Fa. Promega, Mannheim) verwendet. Aufgetragen wurden jeweils maximal 6 µl PCR-Produkt. Die Auftrennung erfolgte ca. 20 bis 60 Minuten bei 90 V. Als Standard wurde mit HindIII und EcoRI verdaute λ-DNA (eigene Herstellung) oder der Standard λ-HindIII / ΦX174-HaeIII (Fa. Finnzymes, Espoo, Finnland). verwendet. Nach Behandlung mit 0,005 % Ethidiumbromid erfolgte die photographische Dokumentation.

3.5.7 Vergleichende PCR

Von Batch-Kulturen mit der dechlorierenden Mischkultur und 0,4 g Fe⁰ sowie 1 mM Acetat in PCE-haltigem Medium wurden nach vollständiger Dechlorierung zu Ethen Proben entnommen. Zum gleichen Zeitpunkt erfolgte die Probenahme von abiotischen Kontrollansätzen mit Fe⁰ und PCE, von biotischen Kontrollansätzen mit Mischkultur und / oder PCE. Von Verdünnungsreihen (1:10 bis 1:1000) wurden je 1 µl direkt als Template für den *Dehalococcoides* spezifischen PCR Assay eingesetzt.

3.6 Chemische Analytik

3.6.1 Gaschromatographische Bestimmung von Wasserstoff und Sauerstoff

Die Batch-Ansätze waren als Zwei-Phasen-System angelegt, so dass eine Probenahme aus der Gasphase erfolgen konnte. Zur Berechnung des Wasserstoff-Gehaltes des Gesamtansatzes wurde der Henry-Koeffizient miteinbezogen.

Die Gasprobenahme und Injektion des Gases wurde mit einer gasdichten Spritze mit Ventil (Pressure-Lok A-2, Fa. VICI Precision Sampling, Inc., Baton Rouge, LA, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Spritze zunächst mit dem Probegas gespült.

Die Nachweisgrenze von H₂ betrug 0,3%.

Gerät	GC-14A, Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan
Injektion	manuell
Injektionsvolumen	100 µl
Injektortemperatur	30°C
Säule	CTRI, 182,88 cm, Fa. Alltech GmbH, Unterhaching Innere Säule: Ø 0,42 cm, poröse Polymermatrix Porapak Äußere Säule: Ø 0,625 cm, aktiviertes Molekularsieb 5 Å
Säulentemperatur	30°C isotherm
Trägergas	Stickstoff 5.0 (H ₂ -Messung), Helium 5.0 (O ₂ -Messung)
Trägergasstrom	65 ml/min
Detektor	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)
Brückenstrom des Detektors	80 mA (H ₂ -Messung), 180 mA (O ₂ -Messung)
Temperatur des Detektors	35°C
Integration	PeakNet 5.1, Fa. Dionex, Sunnyvale, Kalifornien, USA
Methodendauer	2 min

Sauerstoff-Messungen wurden durchgeführt, um die Effektivität der Begasungsanlage zu kontrollieren sowie Undichtigkeiten von Ansätzen zu dokumentieren. Als Standard wurde hier Luft verwendet.

3.6.2 Gaschromatographische Bestimmung von Ethen, Ethan, Methan sowie von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen

PCE sowie dessen Abbauprodukte TCE, cDCE, tDCE, VC, Ethen und Ethan sowie Methan aus der Methanogenese wurden mittels Headspace-Analytik am Gaschromatographen gemessen. Dazu wurde ein PE 8700 mit einer GSGasPro

Kapillarsäule ausgestattet. In einem Analysengang konnten sowohl die Gase als auch die chlorierten Komponenten voneinander getrennt werden.

Gerät	GC 8700 (Fa. Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)
Probengeber	Dampfrauminjektor HS-101 (Fa. Perkin Elmer Corp.)
Thermostasierzeit	50 min
Probentemperatur	50°C
Transfertemperatur	56°C
Injektortemperatur	58°C
Zeit des Druckaufbaus	1,5 min
Druck	120 kPa
Injektionszeit	0,08 min
Säule	GS Gas-Pro 30 m (Fa. J&W Scientific, Köln)
Trägergas	Helium 5.0
Temperaturprogramm	Gase: 40°C, 10°C/min auf 60°C für 1 min LCKW und Gase: 40°C, 5°C/min auf 200°C für 1 min
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektortemperatur	250°C
Methodendauer	Gase: 10 min; LCKW und Gase: 26 min
Integration	Peaknet 5.1 (Fa. Dionex, Sunnyvale, Kalifornien, USA)

Die Herstellung der Standards ist in Anhang 8.4 beschrieben. Da sowohl die Kultivierung der Mischkultur als auch die Batch-Ansätze in einem Zwei-Phasen-System erfolgte, war für die Bestimmung der umgesetzten Stoffmenge die Einbeziehung der Henry-Koeffizienten notwendig.

Mittels der Henry-Koeffizienten konnte die gemessene Konzentration an LCKW in der flüssigen Phase auf die Gesamtmenge in dem Injektionsgefäß ermittelt werden:

$$n = c_f \left(V_f + \left(V_g \cdot H_c \right) \right)$$

n = Stoffmenge [mol]
 c_f = Konzentration in der flüssigen Phase [mol/l]
 v_f = Volumen der flüssigen Phase [l]
 v_g = Volumen der gasförmigen Phase [l]
 H_c = Henry-Koeffizient [-]

3.6.3 Ionenchromatographische Bestimmung von Acetat, Nitrit, Nitrat und Sulfat

Die Messung der Ionen erfolgte mit einem Ionenchromatographen ausgestattet mit einem Detektor zur temperierten Leitfähigkeitsmesszelle.

Gerät	DX-120 Ion (Fa. Dionex, Sunnyvale, Kalifornien, USA)
Vorsäule	IonPac [®] AG 14 Guard (4 x 50 mm), Fa. Dionex
Anionenaustauschsäule	IonPac [®] AS 14 Analytical (4 x 250 mm), Fa. Dionex
Detektor	CD4, Fa. Dionex
Laufmittel	0,35 mM Na ₂ CO ₃ , 0,1 mM NaHCO ₃ in Millipore [®]
Fluss	1,2 ml/min
Suppressor	ASRA-Ultra (Fa. Dionex)
Probengeber	Autosampler P/N 37077 (Fa. Dionex)
Probenschleife	50 µl
Integration	PeakNet 5.1 (Fa. Dionex)
Methodendauer	11 min

Die Entnahme der Flüssigprobe (0,5 ml) erfolgte mit 2 ml-Einwegspritzen (Omnifix[®] 2 ml, Fa. Braun, Melsungen) und entsprechenden Injektionskanülen (0,4 x 21 mm, Rose GmbH, Trier) sowie anschließender Sterilfiltrierung mit Filterhaltern von Minisart (Fa. Sartorius, Göttingen) in 2 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Proben wurden zur Analyse verdünnt und in 5 ml Vials (Fa. Dionex, Sunnyvale, Kalifornien, USA) gefüllt und mit Filtercaps (Fa. Dionex) verschlossen.

Eine Kalibrierung wurde für 1 bis 10 ppm Nitrat, 1 bis 10 ppm Sulfat, 0,1 bis 1 ppm Nitrit sowie 1 bis 10 ppm Acetat erstellt.

3.6.4 Photometrische Bestimmung von Ammonium

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration erfolgte in Anlehnung an DIN 38406-E5 [DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 1983]. Die verwendeten Glasgeräte wurden vor Benutzung in KOH-Ethanol-Reinigungslösung gelegt und anschließend mit Millipore[®] gespült. Die Entnahme der Flüssigprobe erfolgte mit 2 ml-Einwegspritzen und entsprechenden Injektionskanülen (0,4 x 21 mm, Fa. Rose, Trier) sowie anschließender Filtrierung mit Spritzenvorsatzfiltern Spartan[®] 13/0,2, (Schleicher & Schuell, Dassel) in 2 ml Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (Fa. Eppendorf, Hamburg). Je 100 µl der filtrierten Probe wurde in eine Halbmikroküvette (Plastibrand[®], Fa. Brand, Wertheim) pipettiert und mit 900 µl Millipore[®] aufgefüllt. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde aus einer Ammoniumsulfat-Stammlösung (0,4717 g getrocknetes Ammoniumsulfat/l) durch eine 1:100 Verdünnung eine Standardlösung mit 1 mg/l NH₄⁺-N vorbereitet. Aus dieser Standardlösung wurde in Halbmikroküvetten eine Standardreihe von 0 bis 1 mg NH₄⁺-N/l hergestellt. Zu den verdünnten Proben und Standards wurden 100 µl einer Salicylat-Citrat-Lösung pipettiert und die Küvetten ausgiebig geschüttelt.

Nach Zugabe von 100 µl Reagenzlösung wurde erneut geschüttelt. Nach 1 bis 3 Stunden konnte die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 655 nm in einem Photometer (UV-1201, Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) gemessen werden.

Zur Herstellung der Salicylat-Citrat-Lösung wurden 13 g Natriumsalicylat und 13 g Trinatriumcitrat in Millipore® vorgelöst und nach Zugabe von 0,097 g Nitroprussid ad 100 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln für ca. zwei Wochen. Die Reagenzlösung wurde täglich frisch angesetzt (3,2 g NaOH, 0,2 g Natriumdichloroisocyanurat ad 100 ml Millipore®).

3.6.5 pH-Wert Messung

Die pH-Wert Messung erfolgte mit einem Digital pH-Meter (Fa. Knick, Berlin) sowie einer pH-Einstabmesskette (HI 2020 S, Fa. Hanna Instruments, Karlsruhe). Kalibriert wurde über einen pH-Bereich von 4 bis 9. Zur Messung wurde 1 ml Flüssigprobe in ein 2 ml Reaktionsgefäß aus Polypropylen (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von Mikroorganismen auf reaktivem Material

Ziel des Projektes war es, eine mikrobiologische Besiedlung der 1998 gebauten Reaktiven Wand in Rheine durch Sulfatreduzierer, Denitrifikanten, Acetogene, Methanogene und Dechlorierer festzustellen. Insbesondere der Einfluss von dechlorierenden Bakterien auf die abiotische Dechlorierung von PCE durch elementares Eisen sollte untersucht werden. Da für den Bau eine Wandhälfte der Reaktiven Wand mit Eisenschwamm (ES), die andere mit einem Graugusseisengranulat-(GG)-Kies-Gemisch befüllt waren, wurden jeweils aus dem Anstrombereich beider Wandhälften Proben entnommen. Bei dem Probenmaterial handelte es sich um „gealtertes“ Material, da die Wand zum Zeitpunkt der Probenahme bereits seit ca. drei Jahren in Betrieb war. Für vergleichende Untersuchungen erfolgte nach ca. 6 Monaten eine zweite Probenahme. Diese Proben wurden nicht aus der Reaktiven Wand in Rheine entnommen. Stattdessen wurde Eisenmaterial aus Säulen zur Verfügung gestellt, die unmittelbar nach der ersten Probenahme mit Material aus dem Anstrombereich der Reaktiven Wand befüllt worden waren.

Bakterien können mit dem Grundwasserstrom in die Reaktive Wand gelangen. In entsprechenden Versuchen sollte nachgewiesen werden, ob Mikroorganismen im Grundwasser vorhanden sind, die den durch die anaerobe Korrosion der Eisensorten ES und GG freiwerdenden H_2 verwerten können.

Im Folgenden werden die Ergebnisse getrennt nach dem Probenmaterial ES und GG-Kies-Gemisch und dem Inokulum Grundwasser ausgeführt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden für die einzelnen Ansätze in Anlehnung an FENNELL et al. [1997] die Anzahl der transferierten Elektronen und soweit möglich Elektronenbilanzen berechnet. Die Zahl der übertragenen Elektronen wird als Äquivalente in der Einheit [μequiv] angegeben. Je höher die Zahl an Äquivalenten ist, desto mehr Elektronen werden folglich übertragen. Durch die anaerobe Korrosion des Eisens werden Elektronen vom Fe^0 auf Wasserstoffionen (H^+) transferiert, wobei H_2 entsteht. Dabei gilt, je größer die Anzahl der übertragenen Elektronen pro Zeiteinheit ist, desto reaktiver ist das Eisen. Viele Mikroorganismen können wiederum H_2 als Elektronendonator nutzen, wobei Sulfat, Nitrat, PCE oder CO_2 als Elektronenakzeptor genutzt werden. Abiotische und biotische

Prozesse lassen sich durch diese Vorgehensweise miteinander verknüpfen. Da es inzwischen Hinweise gibt, dass die Elektronen direkt dem Eisen entzogen werden, und nicht über H₂ oder Hydroniumionen in biologische Prozesse eingeschleust werden [DINH et al., 2004], wird in dieser Arbeit Fe⁰ vereinfachend als Elektronendonator bezeichnet.

Folgende Ansätze wurden jeweils als Triplets angelegt:

- a. Ansätze mit H₂ und Desorbat: Nachweis der biologischen Umsetzung von Sulfat, Nitrat, PCE und CO₂ mit H₂ als Elektronendonator durch Bakterien des Desorbates
- b. Ansätze mit „frischem“ Eisen (sowohl mit ES als auch GG): Nachweis der abiotischen Produktion von Wasserstoff sowie Einfluss des Eisens auf die Reduktion von Elektronenakzeptoren
- c. Ansätze mit „frischem“ Eisen und Desorbat (sowohl mit ES als auch mit GG): Nachweis der abiotisch/biologischen Reduktion von Elektronenakzeptoren sowie Einfluss auf die H₂-Entwicklung durch Fe.

Durch Voruntersuchungen wurde deutlich, dass Bakterien stark an der Eisenoberfläche haften und somit nur eine teilweise Desorption erreicht werden konnte. Um zu überprüfen, ob an „gealtertem“ Eisen nach der Desorption noch Bakterien metabolisch aktiv sind, wurden folgende Ansätze mitgeführt:

- d. GG vor der Desorption
- e. GG nach der Desorption

In einigen Ansätzen wurde gealtertes, steriles GG eingesetzt, um Reaktivitätsverluste durch eine Eisenalterung erfassen zu können.

Um Wechselwirkungen von Medienbestandteilen mit dem Desorbat zu erfassen, wurden stets Kontrollen mitgeführt, denen kein Elektronendonator zugefügt wurde:

- f. Ansätze nur mit Desorbat

Entsprechende Untersuchungen wurden mit Grundwasser als Inokulum durchgeführt.

Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit als Mittelwerte von Triplets mit Standardabweichung angegeben.

4.1.1 Nachweis einer mikrobiologischen Besiedlung des GGs

Für diese Untersuchungen wurde Eisenmaterial aus zwei Probenahmen verwendet. Bei der ersten Probenahme wurde eine 1:2 Gew.-% mit Kies vermischte GG-Probe aus 4 bis 5 m Tiefe des Anstrombereiches der Reaktiven Wand in Rheine entnommen. Der pH-Wert der Probe betrug 7,5. Das Desorbat, mit dem die Ansätze beimpft wurden, zeigte ebenfalls einen pH-Wert von 7,5. Die zweite Probenahme erfolgte aus einer Säule, die mit GG-Kies-Material aus dem Anstrombereich der Reaktiven Wand in Rheine befüllt worden war. Dabei wurde nicht nur Probe aus 4 bis 5 m Tiefe sondern ein Gemisch aus 2 bis 5 m Tiefe verarbeitet. Beim Aufbau der Säule mit Material der ersten Probenahme wurde das bereits mit 1:2 Gew.-% mit Kies vermischte GG gesiebt, wodurch feiner Eisenstaub und feinere Eisenbestandteile ausgesiebt wurden. Damit verringerte sich der prozentuale Eisenanteil [EBERT, 2002]. Der pH-Wert des Säulen-Desorbates betrug 7,5.

Die pH-Werte der Batch-Ansätze wurden am Ende der Inkubationszeit gemessen. Die abiotischen Ansätze mit GG ergaben End-pH-Werte von 7,2 bis 7,6 und bestätigten, dass das gewählte Carbonatpuffersystem den Entzug von Protonen durch die Korrosion des Eisens abpuffern konnte. Die Ausnahme bildeten die Ansätze mit Nitrat der ersten Probenahme. Durch Begasung mit Helium statt mit N_2/CO_2 wurde vermutlich CO_2 aus der Lösung entfernt, wodurch die Pufferkapazität abnahm. In den biotischen und abiotischen Ansätzen mit GG und Nitrat wurden End-pH-Werte von bis zu 9,4 erreicht.

Weitere biotische Ansätze mit H_2 bzw. Kontrollansätze mit Medium oder Desorbat zeigten für beide Probenahmen den zu Beginn der Versuche eingestellten pH-Wert von ca. 7,0 bis 7,2. Der pH-Wert stieg in den biotischen Ansätzen mit GG und Desorbat auf ca. 7,4 bis 7,9 an. „Gealtertes“ erhitztes GG aus der Reaktiven Wand in Rheine zeigte mit bis zu 9,5 die höchsten pH-Werte, während Material aus den Säulenaufbauten in Kiel (2. Probenahme) nur pH-Werte von bis zu 7,8 erreichte.

4.1.1.1 Sulfatreduzierende Bakterien

Besiedlung der Reaktiven Wand in Rheine

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse als prozentuale Abnahme des Sulfatgehaltes, als H₂-Produktion oder Dosierung von H₂ sowie als gebildetes Acetat dargestellt. Zudem werden, soweit möglich, die Elektronenbilanzen der verschiedenen Ansätze angegeben.

Tab. 4.1 Nachweis einer biologischen Sulfatreduktion im GG-Kies-Gemisch aus der Reaktiven Wand in Rheine bei einer Konzentration von 120 mg Sulfat/l

Tripletts ^a (Proben aus Rheine)	Abnahme des Sulfatgehaltes (%)	H ₂ -Produktion bzw. Verbrauch (µmol)	Acetatbildung (µmol)	Übertragene Elektronen (µequiv) ^c (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	0	<5	<1	<10
GG	0	354 ± 24	<1	710
GG + Desorbat	100	11 ± 2	38 ± 5	980
Desorbat + H ₂	98	-1005	141 ± 7	1700
gealtertes GG nach Desorption	100	<5	29 ± 10	(dosiert: 2010) 920 (+ 245 für Methan ^b)
gealtertes GG steril	0	406 ± 43	<1	810
gealtertes GG steril + Desorbat	100	7 ± 1	36 ± 2	935

^a Inkubationszeit 54 Tage; ^b Methanproduktion: 31 ± 10 µmol; ^c Annahme für die Berechnung der Äquivalente (µequiv/µmol): Acetat: 8, H₂ : 2, Methan: 8, Sulfat: 8 Elektronen

In den Versuchen der ersten Probenahme war in den abiotischen Ansätzen mit sterilem frischem oder gealtertem GG keine Sulfatreduktion und Bildung von Acetat festzustellen, während Wasserstoff freigesetzt wurde (Abb 4.1). Eine vergleichbare H₂-Freisetzung erfolgte sowohl mit frischem als auch mit gealtertem GG.

Im Desorbat wurde nach der MPN-Methode eine Zellzahl von 6,6*10²/g GG-Kies-Gemisch an Sulfatreduzieren ermittelt. In den Batch-Ansätzen mit Desorbat vom GG-Kies-Gemisch aus der Reaktiven Wand konnte eine Sulfatreduktion und Acetatbildung festgestellt werden, wenn GG oder H₂ als Elektronendonator zur Verfügung standen.

Gealtertes GG (ohne Kiesanteil) aus der Reaktiven Wand zeigte entsprechende Ergebnisse.

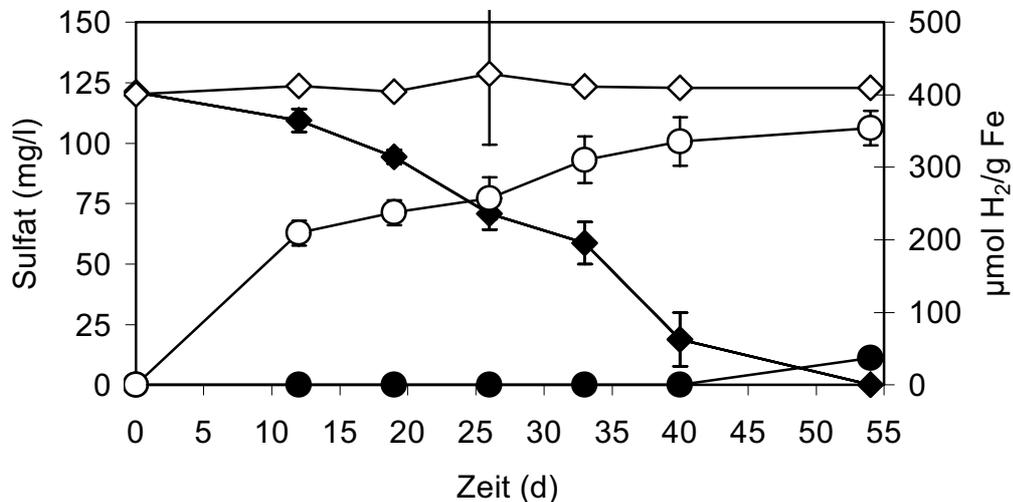


Abb. 4.1 Nachweis einer biologischen Sulfatreduktion im GG-Desorbat von Proben der Reaktiven Wand in Rheine. Dargestellt sind die Sulfatkonzentration (♦) und der Gehalt an H₂ (●) von Versuchsansätzen mit 2 Vol.-% Desorbat und 2 Gew.-% GG als Elektronendonator sowie die Sulfatkonzentration (◇) und der Gehalt an H₂ (○) von abiotischen Kontrollansätzen mit 2 Gew.-% GG.

In den Ansätzen mit H₂ als Elektronendonator wurde dieser bei vollständigem Verbrauch nachdosiert, so dass sich in einer Elektronenbilanz eine Zugabe von 2010 µequiv und ein Verbrauch durch Sulfatreduktion und Acetatbildung von 1700 µequiv berechnen ließen. In Ansätzen mit 2 Gew.-% GG wurden für die abiotischen Ansätze Werte von 710 bis 810 µequiv durch die H₂-Freisetzung und für die biotischen Ansätze von 935 bis 1165 µequiv durch Sulfatreduktion und Acetatbildung ermittelt. In allen Ansätzen mit Desorbat und GG wurde kein oder gegen Ende der Inkubationszeit nur sehr wenig H₂ freigesetzt (Abb 4.1). In Kontrollen, die nur Desorbat aber keine Elektronendonatoren enthielten, erfolgte weder eine Sulfatreduktion noch eine Acetatbildung.

Eine Methanogenese konnte nur in Ansätzen mit gealtertem GG nach erfolgter Desorption nachgewiesen werden.

Eine vollständige Desorption der Mikroorganismen vom GG-Kies-Gemisch erfolgte nicht. Mit gealtertem GG, welches nach vorheriger Desorption für Batch-Ansätze eingesetzt wurde, fand ebenfalls noch eine vollständige Sulfatreduktion sowie Bildung von Acetat

während der Inkubationszeit statt. Eine entsprechende Sulfatreduktion wurde auch mit sterilem gealtertem GG, welches mit Desorbat inkubiert wurde, erreicht.

Besiedlung der Säule in Kiel

Entsprechende Untersuchungen wurden mit Probenmaterial aus der Säule in Kiel durchgeführt. Die Kontrollen mit Desorbat aber ohne Elektronendonator zeigten weder eine Sulfatreduktion noch eine Acetatbildung. In abiotischen Ansätzen mit GG wurde H₂ (870 µequiv) freigesetzt, während keine Acetatbildung und Sulfatreduktion erfolgte (Tab 4.2).

Tab. 4.2 Nachweis einer biologischen Sulfatreduktion im GG-Kies-Gemisch aus der Säule in Kiel bei einer Konzentration von 115 mg Sulfat/l

Triplets ^a (Proben aus Kiel)	Abnahme des Sulfatgehaltes (%)	H ₂ -Produktion bzw. Verbrauch (µmol)	Acetatbildung (µmol)	Übertragene Elektronen (µequiv) ^b (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	0	<5	<1	<10
GG	0	436 ± 26	<1	870
GG + Desorbat	99,8	<5	4 ± 4	650
Desorbat + H ₂	100	- 660	84 ± 2	1270 (dosiert: 1320)
gealtertes GG vor Desorption	83	<5	<1	500
gealtertes GG nach Desorption	66	<5	10 ± 11	480

^a Inkubationszeit 50 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente (µequiv/µmol): Acetat: 8, H₂: 2, Methan: 8, Sulfat: 8 Elektronen

In Ansätzen mit Desorbat und GG als Elektronendonator fand eine fast vollständige Sulfatreduktion innerhalb von 50 Tagen Inkubation statt, während kaum Acetat gebildet wurde. Im Gegensatz zur Probenahme aus Rheine ($6,6 \cdot 10^2$ Zellen/g GG-Kies-Gemisch) war die Zellzahl mit 0,7/g GG-Kies-Gemisch an Sulfatreduzierern sehr niedrig.

Wurde statt GG direkt H₂ als Elektronendonator dosiert, so konnte entsprechend den Ergebnissen der ersten Probenahme eine Acetatbildung und eine vollständige Sulfatreduktion festgestellt werden, wobei eine Zugabe von H₂ mit 1320 µequiv an Elektronen einem Verbrauch von 1270 µequiv an Elektronen für Acetogenese und Sulfatreduktion gegenüberstanden.

Zur Überprüfung der Methode zur Desorption wurden Ansätze mit gealtertem GG vor und nach der Desorption mitgeführt. Die Sulfatreduktion lag für die Ansätze vor der Desorption bei 83 %, nach der Desorption bei 66 % innerhalb des Versuchszeitraums. Eine Acetatbildung für letztere Ansätze war nur in einem von drei Triplets feststellbar. Entsprechend niedrige Werte an übertragenen Elektronen von 480 bis 500 μequiv wurden ermittelt.

4.1.1.2 Denitrifizierende Bakterien

Besiedlung der Reaktiven Wand in Rheine

In der folgenden Tabelle werden die Bildung von Acetat, die prozentuale Abnahme der Nitratmenge und prozentuale Bildung von Ammonium dargestellt. Da die Gasphase Helium enthielt und mit dem verwendeten Chromatographie-System keine Trennung möglich ist, konnte H_2 nicht analysiert werden.

Tab. 4.3 Nachweis der Nitratreduktion im GG-Kies-Gemisch der Reaktiven Wand in Rheine bei einer Konzentration von ca. 60 mg Nitrat/l

Triplets ^{a,b} (Proben aus Rheine)	Abnahme der Nitratmenge (%)	Ammonium- bildung (%)	Acetatbildung (μmol)
Kontrolle: nur Desorbat	0	0	<1
GG	89	89	<1
GG + Desorbat	100	41	11 \pm 9
Desorbat + H_2	100	2,4	<1
gealtertes GG nach Desorption	100	44	<1

^a keine H_2 -Bestimmung möglich, da Helium als Gasphase verwendet wurde;

^b Inkubationszeit 52 Tage

Nitrat wurde sowohl in Ansätzen mit Desorbat als auch in abiotischen Ansätzen mit GG reduziert. Die als Kontrolle mitgeführten Ansätze nur mit Desorbat zeigten, dass ohne Elektronendonator keine biologische Nitrat-Reduktion erfolgte. In Ansätzen mit Desorbat und GG konnte eine wesentlich schnellere Nitrat-Reduktion als in abiotischen Ansätzen mit GG nachgewiesen werden, in denen diese auch nach 52 Tagen nicht vollständig war (Abb 4.2).

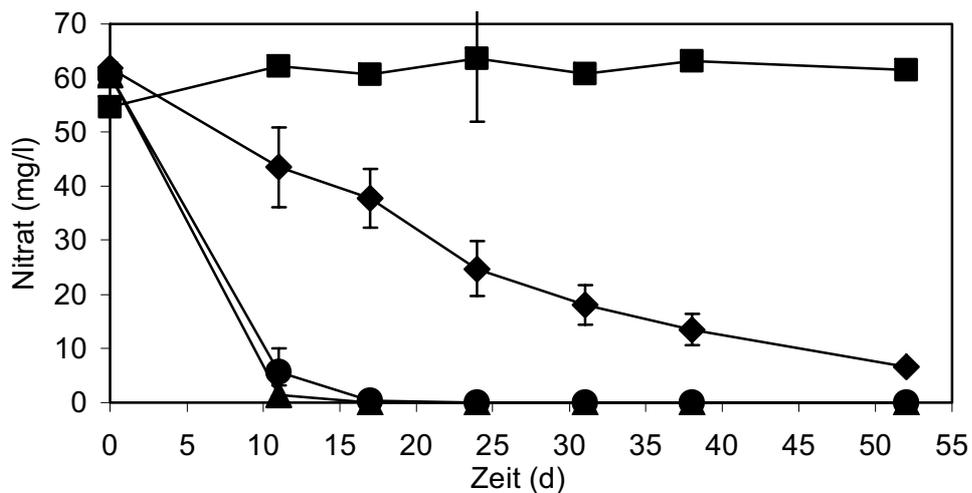


Abb. 4.2 Verlauf der Nitrat-Reduktion in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG (◆), in Kontrollansätzen mit Desorbate der Reaktiven Wand in Rheine (■), biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% Desorbate (▲) sowie 2 Gew.-% gealtertem GG nach der Desorption (●).

Der prozentuale Anteil an gebildetem Ammonium aus der Nitrat-Reduktion war in den abiotischen Ansätzen (Abb 4.3) höher als in Ansätzen mit Desorbate und GG (Abb 4.4). In den abiotischen Ansätzen mit GG erfolgte eine vollständige Umsetzung zu Ammonium. Mit H_2 als Elektronendonator wurden nur 2,4 % Ammonium aus Nitrat freigesetzt. Ursache der Bilanzlücke sind wahrscheinlich die Endprodukte N_2 und N_2O , deren Nachweis analytisch nicht möglich war.

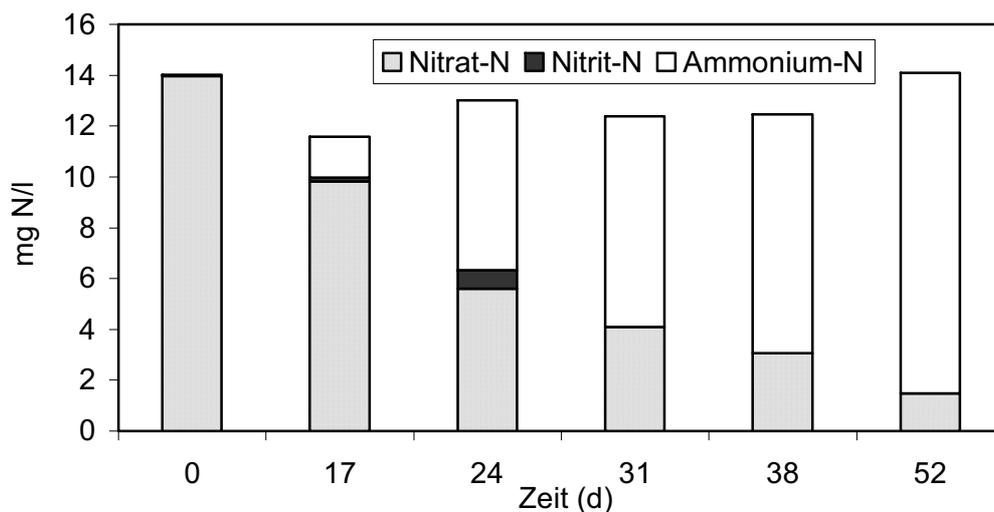


Abb. 4.3 Verlauf der Nitrat-Reduktion bezogen auf Stickstoff in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG.

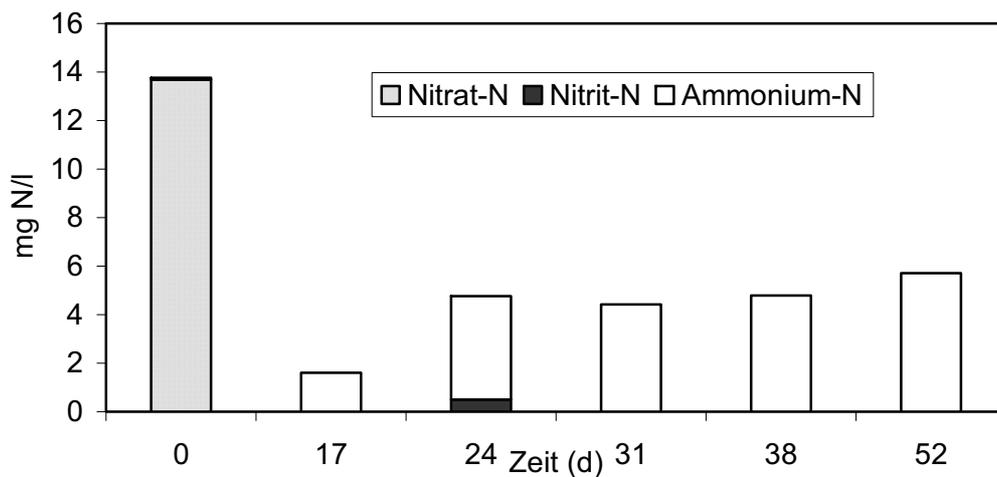


Abb. 4.4 Verlauf der Nitrat-Reduktion bezogen auf Stickstoff in Ansätzen mit 2 Vol.-% Desorbat und 2 Gew.-% GG.

Eine quantitative Erfassung von Denitrifikanten nach der MPN-Methode ergab eine Zellzahl von $1,4 \cdot 10^5$ /g GG-Kies-Gemisch.

Versuchsansätze mit gealtertem GG nach der Desorption zeigten wie auch beim Nachweis von Sulfatreduzierern, dass nur eine teilweise Desorption erreicht wurde.

Besiedlung der Säule in Kiel

In der Tabelle 4.4 wird die prozentuale Nitrat-Abnahme sowie Ammoniumbildung, der H_2 -Verbrauch oder die Dosierung, die Acetatbildung sowie, soweit möglich, eine Elektronenbilanz der verschiedenen Ansätze dargestellt. Statt Helium wurde in diesen Ansätzen ein Gasgemisch aus 80 Vol.-% N_2 und 20 Vol.-% CO_2 (Inertal) als Gasphase eingesetzt, so dass H_2 -Messungen erfolgen konnten.

Entsprechend den Ergebnissen der ersten Probenahme wurde Nitrat sowohl abiotisch durch GG als auch biotisch durch Desorbat reduziert (Abb 4.5). Innerhalb eines Zeitraums von 40 Tagen wurden in den abiotischen Ansätzen mit GG ca. 93 % Nitrat umgesetzt, wobei überwiegend Ammonium gebildet wurde. Die H_2 -Produktion betrug nach 40 Tagen ca. 260 μmol und war im Vergleich zu den abiotischen Ansätzen mit Sulfat, die nach 50 Tagen Inkubation ca. 440 μmol erreichten, vergleichsweise gering. Die Berechnung der übertragenen Elektronen hingegen ergab für die Ansätze mit GG und Nitrat einen Wert von 810 μequiv , mit GG und Sulfat von 870 μequiv in Form einer H_2 -Freisetzung.

Tab. 4.4 Nachweis der Nitratreduktion im GG-Kies-Gemisch der Säule Kiel bei einer Konzentration von ca. 50 mg Nitrat/l

Tripletts ^a (Proben aus Kiel)	Abnahme der Nitratmenge (%)	Ammonium- bildung (%)	Produktion bzw. Ver- brauch von H ₂ (μmol)	Acetat- bildung (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^b (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	1,5	0,5	<5	<1	<10
GG	93	76	261 ± 13	<1	810
GG + Desorbat	100	16	<5	6 ± 2	450
Desorbat + H ₂	100	1,0	- 1120	226 ± 33	2000 (dosiert 2240)
gealtertes GG vor Desorption	100	29	<5	15 ± 3	340
gealtertes GG nach Desorption	100	37	<5	13 ± 3	325

^a Inkubationszeit 40 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente (μequiv/μmol): Bildung von Acetat: 8, Ammonium: 8, H₂ : 2, N₂: 5 Elektronen

Eine Zugabe von 2 Vol.-% Desorbat bewirkte eine Beschleunigung der Nitratreduktion, so dass bereits nach vier Tagen eine fast vollständige Reduktion erfolgt war (Abb 4.5).

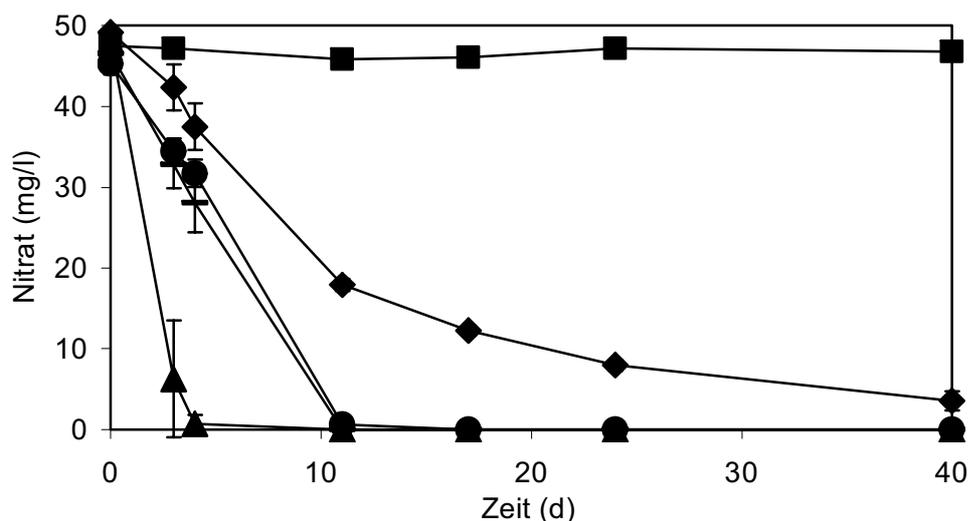


Abb. 4.5 Verlauf der Nitrat-Reduktion in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG (◆), in Kontrollansätzen mit 2 Vol.-% Desorbat der Reaktiven Wand in Rheine (■), in biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% Desorbat (▲), in Ansätzen mit 2 Gew.-% „gealtertem“ GG vor (—) und nach der Desorption (●).

In Ansätzen mit H_2 statt Eisen als Elektronendonator erfolgte im Vergleich zu abiotischen Ansätzen mit GG eine schnelle Reduktion des Nitrats, aber es konnte nur eine 1%ige Ammonium-Freisetzung nachgewiesen werden. Eine Kalkulation der übertragenen Elektronen ergab bei Zugabe von 2240 μequiv einen Verbrauch von 2000 μequiv .

Um die Methodik der Desorption zu überprüfen, wurden Ansätze mit „gealtertem“ GG vor und nach der Desorption angelegt. Sowohl vor als auch nach erfolgter Desorption war eine vergleichbar schnelle Nitratreduktion zu verzeichnen, so dass denitrifizierende Bakterien sich auch nach der Desorption auf der Eisenoberfläche befanden. In den Ansätzen nach Desorption war eine höhere Ammonium-Freisetzung als in den Ansätzen vor Desorption zu verzeichnen.

Nach der MPN-Methode wurde eine Zellzahl von $3,7 \cdot 10^7/\text{g}$ GG-Kies-Gemisch ermittelt.

4.1.1.3 Acetogene Bakterien

Acetogene und Methanogene konkurrieren um CO_2 als Elektronenakzeptor. Das von acetogenen Bakterien gebildete Acetat kann zudem von acetotrophen Methanogenen verwertet werden. Um acetogene Bakterien über die Bildung von Acetat nachweisen zu können, muss durch Zugabe von BES zum Medium eine methanogene Aktivität unterdrückt werden.

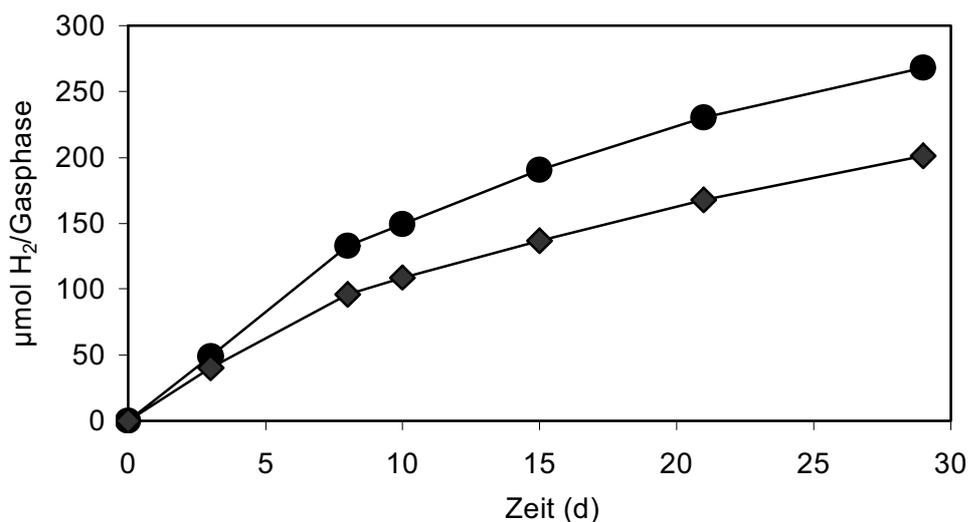


Abb. 4.6 H_2 -Entwicklung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG ohne (●) und mit Inhibitor für die Methanogenen (4 mM BES) (◆).

In abiotischen Vorversuchen setzte 4 mM BES die H_2 -Freisetzung durch die anaerobe Korrosion des GG herab (Abb 4.6). Während ohne BES innerhalb von 29 Tagen

Inkubation ca. 270 $\mu\text{mol H}_2$ freigesetzt wurden, waren in BES-haltigen Ansätzen nur ca. 190 $\mu\text{mol H}_2$ messbar.

Besiedlung der Reaktiven Wand in Rheine

In diesen Ansätzen wurde BES als methanogener Inhibitor eingesetzt, um ausschließlich acetogene Bakterien zu erfassen. In Kontrollen mit Desorbat, in denen Elektronendonatoren fehlten, waren keine messbaren Stoffwechselaktivitäten feststellbar. Durch Korrosionsprozesse des GG wurden zudem weder Acetat noch Methan gebildet, wie die abiotischen Kontrollen mit GG belegen. Die Bildung von Acetat oder Methan wurde demnach durch biologische Prozesse katalysiert (Tab. 4.5).

Tab. 4.5 Nachweis der Acetatbildung im GG-Kies-Gemisch der Reaktiven Wand in Rheine unter Zugabe von 4 mM BES.

Tripletts ^a (Proben aus Rheine)	Acetatbildung (μmol)	Methanbildung (μmol)	H_2 -Produktion bzw. Verbrauch (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^b (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	<1	n.b.	<5	<10
GG	<1	n.b.	269 \pm 20	540
GG + Desorbat	43 \pm 4	13 \pm 5	<5	450
Desorbat + H_2	212 \pm 16	n.b.	- 1077	1700 (dosiert: 2155)
gealtertes GG nach Desorption	76 \pm 5	18 \pm 5	<5	750

^a Inkubationszeit 56 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Bildung von Acetat: 8, H_2 : 2, Methan: 8 Elektronen

Eine vollständige Inhibierung der Methanogenese durch BES wurde in Vorversuchen gezeigt. Während in Ansätzen mit H_2 und Desorbat wie erwartet Acetat gebildet wurde, aber keine Methanogenese stattfand, konnte eine vollständige Inhibierung der Methanogenese in den Ansätzen mit GG nicht erreicht werden. Diente GG statt H_2 als Elektronendonator, so wurde sowohl Acetat als auch Methan gebildet. Während die übertragenen Elektronen 450 μequiv betrug, wurde für gealtertes Eisen nach der Desorption 750 μequiv Elektronen transferiert, wobei die Elektronen zu ca. 80 % zur Acetatbildung (610 μequiv) genutzt wurden.

Die Zellzahl betrug $0,9 \cdot 10^4$ /g GG-Kies-Gemisch. Da die MPN-Bestimmung mit H_2 statt mit GG durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass BES die methanogene Aktivität vollständig inhibierte und somit ausschließlich Acetogene erfasst wurden.

Besiedlung der Säule in Kiel

Für den Nachweis von Acetogenen in Proben der ersten Probenahme wurde mit GG als Elektronendonator keine vollständige Inhibierung der Methanogenese erreicht. Um die Daten untereinander vergleichbar zu machen, wurde auch für die zweite Probenahme 4 mM BES eingesetzt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 4.6 Nachweis der Acetatbildung im GG-Kies-Gemisch der Säule in Kiel unter Zugabe von 4 mM BES

Triplets ^a (Proben aus Kiel)	Acetatbildung (μmol)	Methanbildung (μmol)	H_2 -Produktion bzw. Verbrauch (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^b (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	<1	n.b.	<5	<10
GG	<1	n.b.	281 ± 7	560
GG + Desorbat	33 ± 9	n.b.	<5	270
Desorbat + H_2	80 ± 11	n.b.	- 420	640 (dosiert: 840)
gealtertes GG vor Desorption	27 ± 8	n.b.	<5	220
gealtertes GG nach Desorption	29 ± 17	n.b.	8 ± 11	245

^a Inkubationszeit 50 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Bildung von Acetat: 8, H_2 : 2, Methan: 8 Elektronen

Während BES in den Ansätzen mit GG und Desorbat aus der ersten Probenahme nur zu einer unvollständigen Inhibierung der Methanogenese führte, konnte keine Freisetzung von Methan in entsprechenden Ansätzen der zweiten Probenahme festgestellt werden. Alle biotischen Ansätze zeigten nur einen relativ geringen Transfer an Elektronen, der mit GG (frisch oder gealtert) nur bei ca. 220 bis 270 μequiv lag. In den Ansätzen mit Desorbat und H_2 wurde weniger H_2 verbraucht. Von 840 μequiv als H_2 zudosierten Elektronenäquivalenten wurden 640 μequiv zur Bildung von Acetat verwendet.

Die MPN-Bestimmung für die Acetogenen ergab eine Zellzahl von 25/g GG-Kies-Gemisch.

4.1.1.4 Methanogene

Viele Vertreter der Methanogenen sind in der Lage, CO₂ und/oder Acetat als Elektronenakzeptor zu nutzen. Um hydrogenotrophe Methanogene zu erfassen, müssen konkurrierende Acetogene inhibiert werden. Dies kann mit dem eubakteriellen Inhibitor Vancomycin erfolgen. Damit ist aber ein Nachweis von acetotrophen Methanogenen in acetatfreiem Medium nicht mehr möglich. Um auch diese erfassen zu können, wurde in den folgenden Ansätzen ohne Inhibitor gearbeitet, wobei eine unvollständige Umsetzung von Acetat in Kauf genommen werden musste.

Besiedlung der Reaktiven Wand in Rheine

In der Tabelle 4.7 werden die Acetat- und Methanbildung, der H₂-Verbrauch bzw. die Dosierung von H₂, sowie Elektronenbilanzen der verschiedenen Ansätze dargestellt.

Tab. 4.7 Nachweis der Methanbildung im GG-Kies-Gemisch der Reaktiven Wand in Rheine

Tripletts ^a (Proben aus Rheine)	Acetatbildung (μmol)	Methanbildung (μmol)	H ₂ -Produktion bzw. Verbrauch (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^b (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	<1	n.b.	<5	< 10
GG	<1	n.b.	425 \pm 5	850
GG + Desorbat	57 \pm 6	58 \pm 10	<5	920
Desorbat + H ₂	204 \pm 10	n.b.	-930	1630 (dosiert: 1860)
gealtertes GG nach Desorption	3 \pm 4	129 \pm 1	<5	1055

^a Inkubationszeit 58 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Bildung von Acetat: 8, H₂: 2, Methan: 8 Elektronen

Die höchste Methanbildung erfolgte in den Ansätzen mit gealtertem GG nach der Desorption (98 % an Elektronenäquivalenten), während mit frischem GG ungefähr 51 % zu Methan und mit H₂ als Elektronendonator nur ca. 1 % zu Methan umgesetzt wurden.

Die abiotischen Kontrollen mit GG zeigten wie auch die biotischen Vergleichsansätze mit Desorbat keine Methan- und Acetatbildung.

Besiedlung der Säule in Kiel

Um unterscheiden zu können, ob Methanogene H_2 oder Acetat als Elektronendonator nutzten, wurde 50 mg/l Vancomycin zur Unterdrückung acetogener Aktivität zu den Ansätzen gegeben. Somit sollten nur hydrogenotrophe Methanogene erfasst werden.

Im Vorfeld wurde dazu bestimmt, welchen Einfluss Vancomycin auf die anaerobe Korrosion des GG hatte. In abiotischen Vorversuchen zeigte 50 mg/l Vancomycin nur einen geringen negativen Einfluss auf die H_2 -Entwicklung des GG (Abb 4.7).

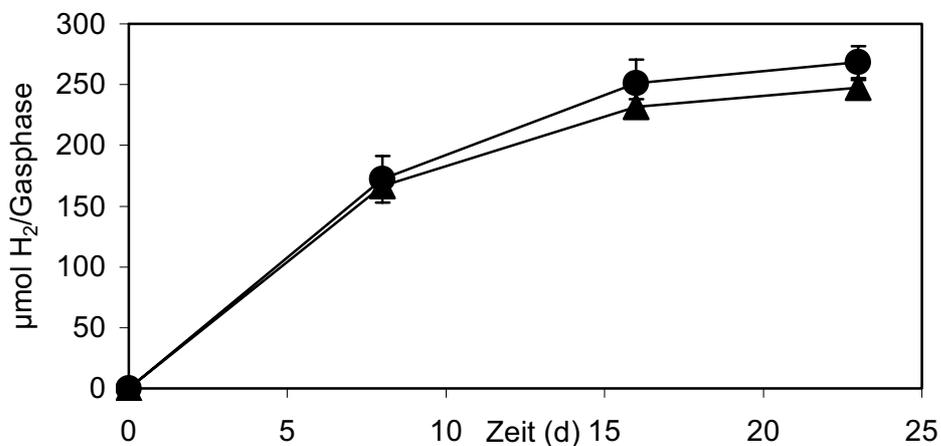


Abb. 4.7 H_2 -Entwicklung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG ohne (●) und mit 50 mg/l Vancomycin (▲).

In den abiotischen Kontrollen mit GG und biotischen Kontrollen mit Desorbat wurde kein Methan freigesetzt. Auch in Ansätzen mit Desorbat des GG-Kies-Gemisches bzw. mit gealtertem GG aus der Säule in Kiel war keine Methanbildung feststellbar (Tab. 4.8).

Der in Vorversuchen ermittelte geringe Einfluss von Vancomycin auf die H_2 -Produktion wurde in den abiotischen Ansätzen mit GG der ersten Probenahme (ohne Vancomycin) und der zweiten Probenahme (mit Vancomycin) bestätigt. Ohne Vancomycin wurde innerhalb von 58 Tagen 425 $\mu\text{mol } H_2$, mit Vancomycin 430 $\mu\text{mol } H_2$ innerhalb von 53 Tagen freigesetzt.

Tab. 4.8 Nachweis der Methanbildung im GG-Kies-Gemisch der Säule in Kiel unter Zugabe von 50 mg/l Vancomycin

Tripletts ^a (Proben aus Kiel)	Acetatbildung (μmol)	Methanbildung (μmol)	H ₂ -Produktion bzw. Verbrauch (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^b (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	<1	n.b.	<5	< 10
GG	<1	n.b.	429 \pm 14	860
GG + Desorbat	3 \pm 3	n.b.	333 \pm 172	670
Desorbat + H ₂	<1	n.b.	n.b. ^c	n.b. ^c
gealtertes GG vor Desorption	35 \pm 8	n.b.	189 \pm 9	660
gealtertes GG nach Desorption	10 \pm 0,4	n.b.	226 \pm 28	490

^a Inkubationszeit 53 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Bildung von Acetat: 8, H₂: 2, Methan: 8 Elektronen; ^c aufgrund der hohen Standardabweichung zwischen den Ansätzen keine Auswertung möglich.

In den biotischen Ansätzen mit H₂ als Elektronendonator wurde die Acetogenese vollständig gehemmt, während in Ansätzen mit GG Acetat gebildet wurde. In allen biotischen Ansätzen mit GG war eine Freisetzung von ca. 190 bis 330 μmol H₂ zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu wurde in vergleichbaren biotischen Ansätzen ohne Vancomycin nur gegen Ende der Inkubation keine oder nur eine geringe H₂-Produktion bis zu 11 μmol H₂ festgestellt. Ansätze mit gealtertem Eisen vor der Desorption zeigten eine höhere Acetatproduktion als entsprechende Ansätze nach der Desorption. Acetogene Bakterien wurden demnach nicht vollständig von der Eisenoberfläche abgelöst.

4.1.1.5 Dechlorierende Bakterien

Besiedlung der Reaktiven Wand in Rheine

Dechlorierende Bakterien konnten in den Proben aus der Reaktiven Wand in Rheine nicht nachgewiesen werden. Die in den Ansätzen eingestellte wässrige PCE-Konzentration von 25 bis 30 mg/l entsprach den maximal gemessenen Konzentrationen im Zulauf der Reaktiven Wand. Zur Zeit der Probenahme zeigten jedoch die PCE-Konzentrationen im Anstrom der Reaktiven Wand durch ein Abreißen der Schadstofffahne nur etwa 1/10 der maximalen Zulaufkonzentration.

In den abiotischen Ansätzen mit GG und einer anfänglichen PCE-Stoffmenge im System von $17,6 (\pm 2,5) \mu\text{mol}$ wurden nach 60 Tagen noch $2,8 (\pm 0,3) \mu\text{mol}$ PCE, $1,7 (\pm 0,3) \mu\text{mol}$ TCE und $2,3 (\pm 1,1) \mu\text{mol}$ Ethen festgestellt. cDCE und VC wurden als Zwischenprodukte nicht nachgewiesen. Aus diesen Ergebnissen ergab sich eine Bilanzlücke von ca. $11 \mu\text{mol}$ C₂-Verbindungen (ca. 60 %). Das Dechlorierungsmuster von PCE in den abiotischen Ansätzen mit GG entsprach dem in den biotischen Ansätzen mit GG sowie den Ansätzen mit gealtertem GG. In den biotischen Ansätzen mit Desorbat und den Ansätzen mit gealtertem GG nach der Desorption wurde jedoch im Gegensatz zu den abiotischen Ansätzen Acetat gebildet. Acetogene Bakterien waren demnach vorhanden und in der Lage, die hohen PCE-Konzentrationen zu tolerieren.

Die Bestimmung der Zellzahl nach dem MPN-Verfahren ergab $1,2 \cdot 10^2/\text{g}$ GG-Kies-Gemisch, wobei bei dieser Art der Quantifizierung Dechlorierer, PCE-tolerante Acetogene und Methanogene miterfasst wurden.

Besiedlung der Säule in Kiel

Die PCE-Konzentration in den Batch-Ansätzen für die zweite Probenahme aus den Rheine-Säulen in Kiel wurde auf 15 bis 20 mg/l, bezogen auf die wässrige Phase, eingestellt. In den abiotischen Ansätzen mit GG zeigte sich ein ähnliches Dechlorierungsmuster wie in den entsprechenden Ansätzen mit Proben aus der Reaktiven Wand. Bei 18 mg/l wässriger PCE-Konzentration konnten während einer 56tägigen Inkubation PCE, TCE und Ethen nachgewiesen werden (Abb 4.8). Zwischenprodukte wie cDCE und VC traten nicht auf. Die Bilanzlücke an C₂-Verbindungen betrug $3,9 \mu\text{mol}$ (ca. 50 %).

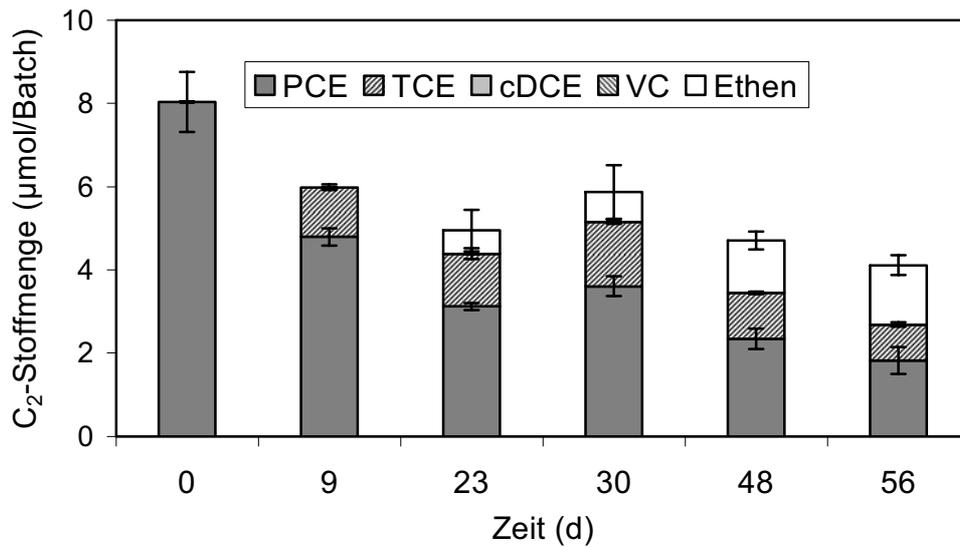


Abb. 4.8 Verlauf der abiotischen PCE-Dechlorierung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG

Wurden Ansätze mit GG mit Desorbat versetzt, so verlief die Dechlorierung bis zum 23. Tag entsprechend einer abiotischen Dechlorierung durch GG. Danach wurde cDCE angereichert, was auf eine Beteiligung von dechlorierenden Bakterien hinwies (Abb 4.9). Von 17 mg/l PCE waren nach 56tägiger Inkubation überwiegend cDCE und Ethen, jedoch kein TCE und VC nachweisbar. Die Bilanzlücke an C₂-Verbindungen betrug ca. 40 %.

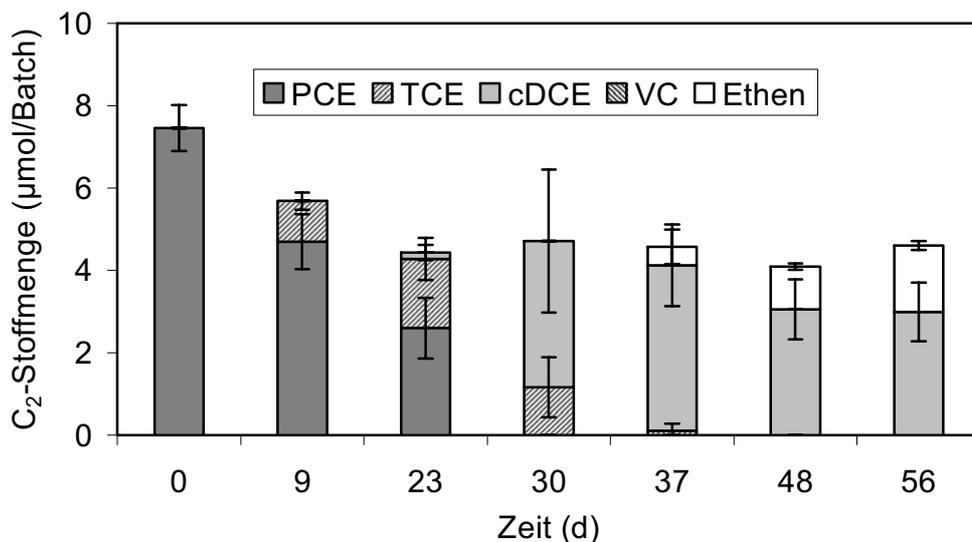


Abb. 4.9 Verlauf der PCE-Dechlorierung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% Desorbat.

Aus diesen Ansätzen wurden Batch-Ansätze mit 1 mM Acetat sowie 2 Gew.-% GG angeimpft. Auch nach insgesamt sieben Transfers erfolgte eine Dechlorierung bis zum cDCE.

Mit H₂ als Elektronendonator wurde PCE zwischen dem 23. und 30. Tag fast vollständig zu cDCE umgesetzt (Abb 4.10).

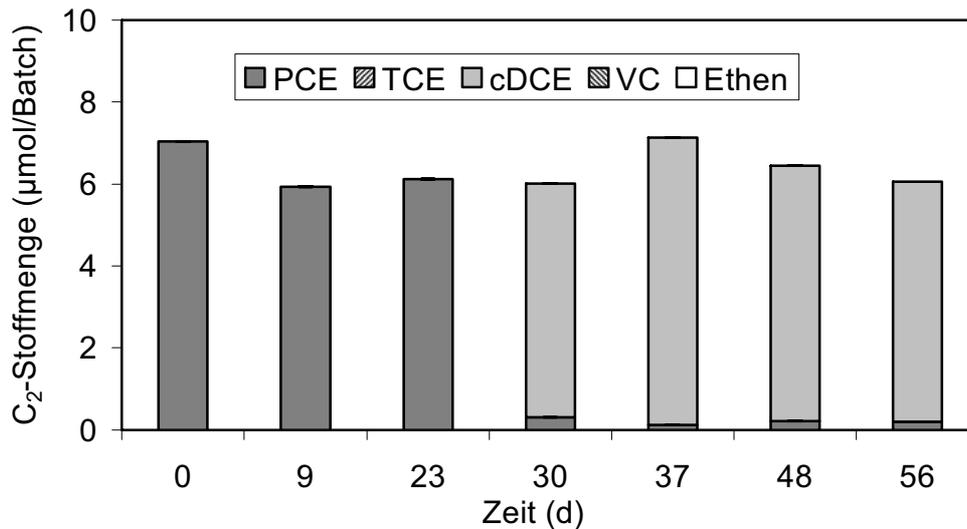


Abb. 4.10 Verlauf der PCE-Dechlorierung in einem Ansatz mit H₂ als Elektronendonator und 2 Vol.-% Desorbat.

Eine weitere Reduktion zu VC oder Ethen erfolgte bis zum Ende der Inkubationszeit nicht, obwohl H₂ weiter verbraucht und nachdosiert wurde. Im Gegensatz zu den abiotischen Ansätzen mit GG mit und ohne Desorbat war die C₂-Bilanz im Ansatz mit Desorbat und H₂ als Elektronendonator nahezu ausgeglichen. Ethen wurde nicht freigesetzt.

In der Tab 4.9 sind die Ergebnisse dargestellt. Eine Freisetzung von H₂ war nur in abiotischen Ansätzen mit GG zu verzeichnen. In Ansätzen mit GG und Desorbat bzw. gealtertem GG wurde kein H₂ freigesetzt, aber Acetat gebildet.

In den Ansätzen mit Desorbat und H₂ als Elektronendonator wurde mehrfach H₂ nachdosiert, wobei ca. 85 % für die Bildung von Acetat und die Dechlorierung zum cDCE verbraucht wurden. Eine MPN-Bestimmung ergab keine auswertbaren Ergebnisse.

Tab. 4.9 Nachweis der PCE-Dechlorierung im GG-Kies-Gemisch der Säule in Kiel mit GG oder H₂ als Elektronendonator

Tripletts ^a (Proben aus Kiel)	Abnahme der PCE- Menge (%)	Produkte der PCE- Dechlorierung	Acetat- bildung (μmol)	H ₂ – Produktion bzw. Verbrauch (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^{b,c} (Mittelwerte)
Kontrolle: nur Desorbat	20	-	<1	<5	<10
GG	78	TCE, Ethen	<1	478 \pm 20	985
GG + Desorbat	100	cDCE, Ethen	63 \pm 3	<5	530
Desorbat + H ₂	97	cDCE	183 \pm 31	- 870	1470 (dosierte: 1740)
gealtertes GG vor Desorption	100	cDCE, Ethen	39 \pm 5	<5	330
gealtertes GG nach Desorption	63	TCE, Ethen	48 \pm 0,1	<5	390

^a Inkubationszeit 56 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Bildung von Acetat: 8, H₂: 2, Methan: 8, TCE: 2, cDCE: 4, VC: 6, Ethen: 8 Elektronen; ^c keine Methanbildung in den Ansätzen

Während vor der Desorption dechlorierende Bakterien an der Umsetzung von PCE beteiligt waren (Abb 4.11), wies die Dechlorierungscharakteristik nach erfolgter Desorption auf abiotische Prozesse hin.

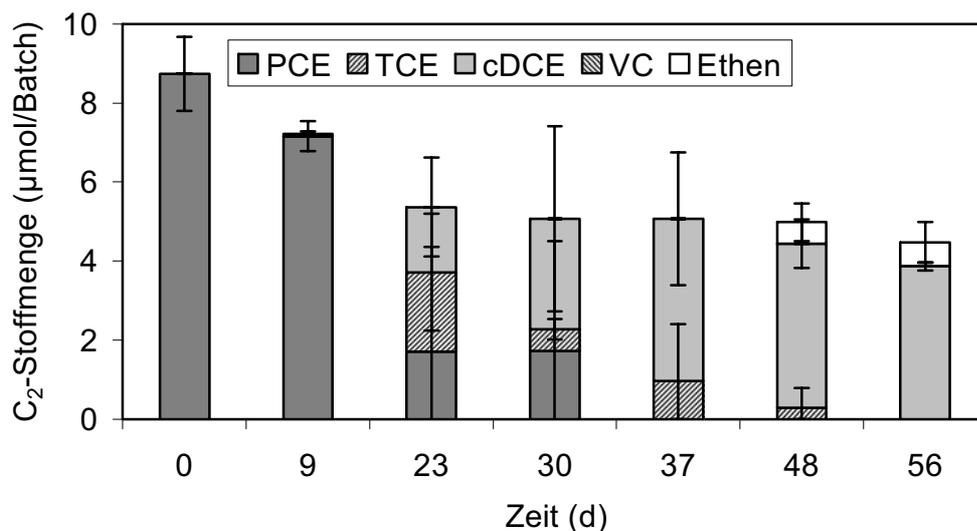


Abb. 4.11 Verlauf der PCE-Dechlorierung in Triplets mit 2 Gew.-% gealtertem GG vor der Desorption.

Die dechlorierenden Bakterien ließen sich demnach vollständig von der Eisenoberfläche desorbieren. Entsprechend wurde in Ansätzen mit gealtertem GG vor der Desorption unter anderem cDCE gebildet, während nach der Desorption TCE und Ethen, jedoch kein cDCE nachweisbar waren. Die Bilanzlücke an C₂-Verbindungen betrug ca. 48 %.

4.1.2 Nachweis einer mikrobiologischen Besiedlung von Eisenschwamm

Besiedlung der Reaktiven Wand in Rheine

Die unvermischte Eisenschwamm-Probe wurde aus 4,2 bis 5,2 m Tiefe unter Geländeoberkante aus dem Anstrombereich in der Reaktiven Wand in Rheine genommen. Der pH-Wert betrug 8,0. Die Desorption des ES erfolgte nach Ankunft im Labor (36 h nach Probenahme). Der pH-Wert der ES-Probe stieg während der Desorption von 8,0 auf 9,5 an und musste durch Zugabe von festem Hydrogencarbonat gepuffert werden. Der pH-Wert betrug nach der Desorption 9,0.

Die Ergebnisse der ersten Probenahme ergaben keine Sulfatreduktion, keine Methanogenese, keine biologisch induzierte Dechlorierung und nur eine schwache Denitrifikation. Dafür konnte eine ausgeprägte Acetogenese festgestellt werden. In Abb 4.12 sind die Ergebnisse für die biotischen Ansätze mit ES und Desorbat bzw. gealtertem ES graphisch dargestellt.

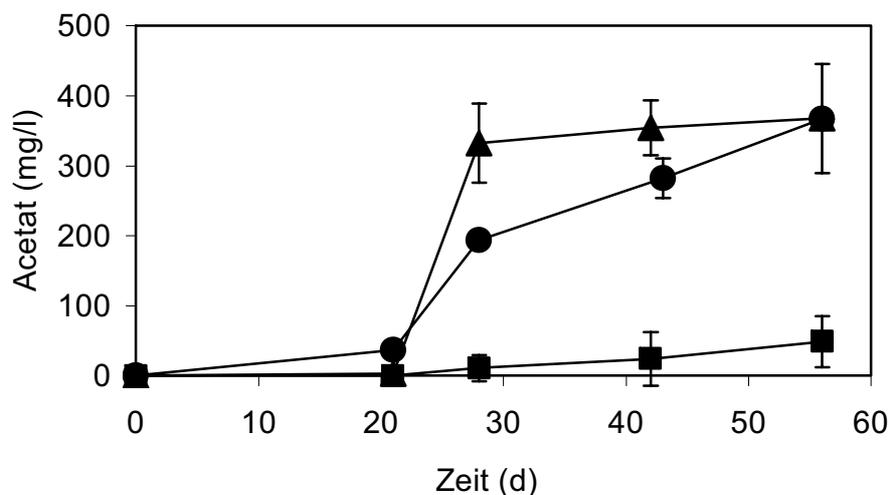


Abb. 4.12 Acetatbildung in biotischen Ansätzen mit ca. 4 Gew.-% ES und 2 Vol.-% Desorbat aus der Reaktiven Wand in Rheine (▲), mit gealtertem ES nach Desorption (●), in Ansätzen mit H₂ und Desorbat (■).

Auffällig war die hohe Menge an gebildetem Acetat in Ansätzen mit ES und Desorbat sowie mit gealtertem ES aus der Reaktiven Wand in Rheine. Am Ende der Inkubationszeit waren somit ca. 2.500 μequiv Elektronen für die Acetatbildung übertragen worden.

Entsprechend hoch war die H_2 -Entwicklung in abiotischen Kontrollansätzen mit ES. Bereits nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen lagen die H_2 -Werte außerhalb des kalibrierten Bereiches von 20 Vol.-% H_2 . Parallel dazu war ein pH-Anstieg auf ca. 10,0 zu beobachten (Abb 4.13). Im Vergleich dazu lag der pH-Wert in abiotischen Ansätzen mit GG während der Inkubationszeit im neutralen bis schwach alkalischen Bereich. Überlegungen, eine geringere ES-Menge einzusetzen, waren nicht umsetzbar. Eine Klassierung des zur Verfügung stehenden Eisenschwamms hatte ergeben, dass die Kugeln mit den geringsten Durchmessern ca. 2 g wogen. Eine Verringerung der eingesetzten ES-Menge wäre nur durch Zerkleinerung des kugelförmigen ES möglich gewesen. Um die vorhandenen Oberflächenstrukturen des ES im Vergleich zu dem in der Reaktiven Wand eingesetzten Material nicht zu verändern, wurde auf eine Zerkleinerung verzichtet.

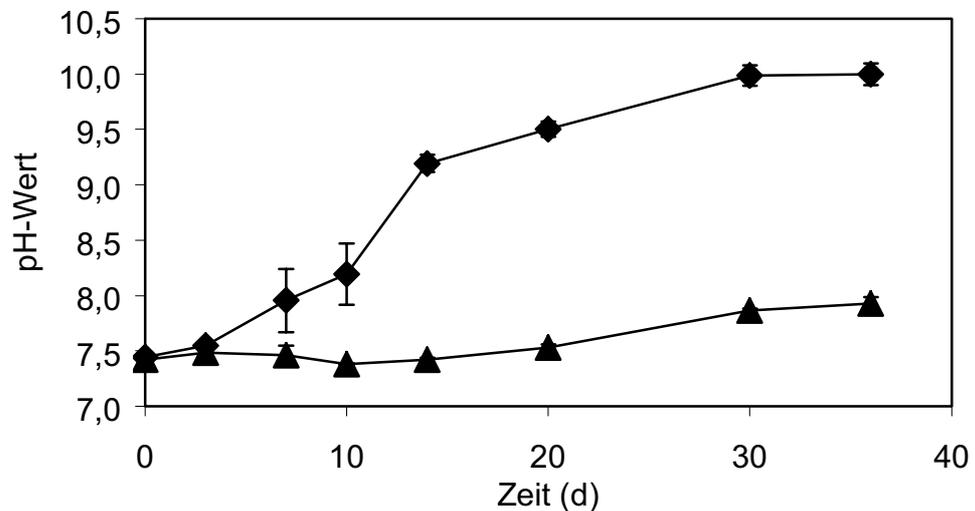


Abb. 4.13 Entwicklung der pH-Werte in carbonatgepufferten Ansätzen mit 2 Gew.-% GG (▲) und ca. 4 Gew.-% Eisenschwamm (◆).

Der in abiotischen Vorversuchen mit ES innerhalb der Inkubationszeit erfolgte starke Anstieg des pH-Wertes wurde auch in den Versuchsreihen der ersten und zweiten Probenahme beobachtet. Ansätze mit gealtertem ES der ersten Probenahme zeigten nach Beendigung der Versuche pH-Werte von 9,0 bis 9,9. Die pH-Werte in Ansätzen mit

ES und Desorbat variierten zwischen 9,8 und 10,3. Ansätze mit gealtertem sterilem ES aus der Reaktiven Wand wiesen dagegen im Verhältnis dazu geringe End-pH-Werte von 8,4 und 8,8 auf.

Ansätze mit gealtertem ES aus Proben der zweiten Probenahme in Kiel zeigten im Verhältnis zur ersten Probenahme am Ende der Inkubationszeit pH-Werte von 7,3 bis ca. 7,5. Das ES-Material war stark bräunlich verfärbt, was auf oxidative Veränderungen hinwies. Die pH-Werte von Ansätzen mit frischem ES, angeimpft mit GG-Desorbat bzw. Grundwasser, stiegen dagegen auf 9,9 bis 10,2 an.

Die Ergebnisse der ersten Probenahme wiesen bis auf acetogene Bakterien nur auf eine geringe mikrobiologische Besiedlung hin. Die zur Verfügung gestellten analytischen Daten zeigten eine vollständige Nitrat- als auch Sulfatreduktion im Anstrombereich der Reaktiven Wand, die nicht auf Sorptionsverluste bzw. Reaktionen mit Eisen zurückzuführen waren. Daher wurde vermutet, dass

- entweder die Probenahme nicht im mikrobiologisch besiedelten Bereich stattgefunden hatte,
- der pH-Wert während der Probenaufbereitung zu stark anstieg,
- durch die Kultivierung in Batch-Ansätzen mit 4 Gew.-% ES ein zu schneller Anstieg des pH-Wertes sich ungünstig auf mikrobiologische Prozesse auswirkte.

Besiedlungsfähigkeit von Eisenschwamm

Um eine prinzipielle Besiedlung des ES durch Bakterien zu belegen, wurde bei der zweiten Probenahme Desorbat aus dem GG-Kies-Gemisch der Anstromsäule in Kiel als Inokulum verwendet. Als Elektronendonator wurden 4 Gew.-% ES eingesetzt. Im Desorbat des GG-Kies-Gemisches wurden Sulfatreduzierer, Denitrifizierer, Acetogene und Dechlorierer nachgewiesen. Bis auf dechlorierende Bakterien konnten diese Gruppen ES als Elektronendonator verwenden (Tab 4.10).

In allen Ansätzen wurden bis auf eine Ausnahme große Mengen an Acetat gebildet. Nur in Ansätzen mit Vancomycin, einem acetogenen Inhibitor, wurde weniger Acetat produziert. Eine vollständige Inhibierung erfolgte demnach nicht. Eine Methanogenese war nicht nachweisbar. Die hohen Acetat-Werte entsprechen in etwa den Gehalten, die auch in den Versuchen der ersten Probenahme ermittelt wurden. Somit wurde der

größte Anteil an übertragenen Elektronen für die Acetatbildung genutzt, während nur ein Bruchteil für eine Sulfat- und Nitratreduktion verwendet wurde.

Tab. 4.10 Nachweis der Besiedlungsfähigkeit von ES. Als Inokulum diente Desorbat des GG-Kies-Gemisches aus den Säulen in Kiel.

Triplets ^a ES+ GG-Kies-Desorbat	Nachweis des TEA-Prozesses	H ₂ -Produktion (μmol)	Acetatbildung (μmol)	Übertragene Elektronen (μequiv) ^c (Mittelwerte)
Sulfatreduktion	+	33 ± 18	322 ± 221	3250
Denitrifikation	+	14 ± 7	265 ± 42	2350
Acetogenese ^d	+	36 ± 7	318 ± 56	2620
Methanogenese ^e	-	$>> 500^b$	144 ± 88	n.b.
Reduktive Dechlorierung	-	$>> 500^b$	377 ± 94	n.b.

^a Inkubationszeit 40 bis 63 Tage; ^b außerhalb der Kalibrierung, ^c Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Bildung von Acetat: 8, Ammonium: 8, H₂: 2, N₂: 5, Sulfat: 8 Elektronen; ^d Zugabe von 5 mM BES; ^e Zugabe von 50 mg/l Vanocmycin

Eine Kompensation des gebildeten H₂ erfolgte nur in Ansätzen, in denen sulfatreduzierende, denitrifizierende und acetogene Bakterien nachgewiesen wurden.

Die PCE-Menge von ca. 15 mg/l in den Ansätzen zum Nachweis von Dechlorierern zeigte keinen negativen Effekt auf die Acetogenese. Eine Kompensation des gebildeten H₂ durch mikrobielle Prozesse erfolgte in diesen Ansätzen nicht. Entsprechend hohe H₂-Mengen wurden auch in den Ansätzen zum Nachweis von Methanogenen gebildet.

Damit scheiden generell Kultivierungsbedingungen als Grund für die geringe mikrobiologische Aktivität in Proben aus der Wand Rheine aus.

Besiedlung der Säule in Kiel

Um die vorhandene Besiedlung des ES aus den Säulen nachzuweisen, wurde in diesen Versuchen gealterter ES eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.11 zusammengefasst.

Tab. 4.11 Nachweis der Besiedlung von gealtertem ES aus der Säule in Kiel

Tripletts ^a Gealtertes ES (Säulen)	Nachweis des untersuchten TEA-Prozesses	H ₂ -Produktion (µmol)	Acetatbildung (µmol)	Übertragene Elektronen (µequiv) ^b (Mittelwerte)
Sulfatreduktion	+	<5	30 ± 11	630
Denitrifikation	+	<5	6 ± 10	125
Acetogenese ^c	+	<5	32 ± 26	250
Methanogenese ^d	-	281 ± 151	1,5 ± 2	575
Reduktive Dechlorierung	-	<5	42 ± 20	340

^a Inkubationszeit 50 bis 63 Tage; ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente (µequiv/µmol): Acetat: 8, Ammonium: 8, H₂: 2, N₂: 5, Sulfat: 8 Elektronen; ^c Zugabe von 5 mM BES; ^d Zugabe von 50 mg/l Vancomycin

Gealterter ES zeigte bei gleicher Eisenmenge eine insgesamt geringere Anzahl an übertragenen Elektronen als bei frischem ES (Abb 4.12; Tab 4.10, 4.11). Während für Ansätze mit frischem ES und Desorbat mindestens 2350 µequiv Elektronen übertragen wurden, lagen diese für Ansätze mit gealtertem ES zwischen 125 und 630 µequiv Elektronen. Auffallend sind die geringen Acetatgehalte, die mit Werten von 1,5 bis zu 42 µmol wesentlich niedriger lagen als für die Ansätze mit frischem ES und Desorbat.

In diesen Ansätzen wurde mit Ausnahme der methanogenen Ansätze kein H₂ freigesetzt. Zudem erfolgte eine vollständige Hemmung von acetogenen Bakterien. Eine Methanogenese war ebenfalls nicht nachweisbar, so dass H₂ sich anreichern konnte.

Eine biologische Dechlorierung erfolgte nicht. Die PCE-Konzentration in den Ansätzen von 15 mg/l zeigte keinen negativen Effekt auf die Acetogenese.

Die Ergebnisse zeigen, dass gealterter ES von sulfatreduzierenden, denitrifizierenden und acetogenen Bakterien besiedelt war. Eine Methanogenese sowie eine biologisch induzierte Dechlorierung konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem war gealterter ES weniger reaktiv als frischer ES.

4.1.3 Bakterien im Grundwasser

Mit dem Grundwasser werden neben den zu behandelnden Schadstoffen auch Boden-Mikroorganismen in die Reaktive Wand transportiert. Diese Mikroorganismen können die Wand besiedeln. Im Folgenden sind die Ergebnisse von Ansätzen dargestellt, bei denen

Grundwasser als Animpfmaterial verwendet wurde. Exemplarisch sind die Ergebnisse für Ansätze dargestellt, in denen GG als Elektronendonator eingesetzt wurde (Tab 4.12).

Tab. 4.12 Nachweis von Bakterien im Grundwasser mit GG als Elektronendonator

Triplets ^a	Nachweis des untersuchten TEA-Prozesses	Methanbildung (µmol)	Acetatbildung (µmol)	Übertragene Elektronen (µequiv) ^b (Mittelwerte)
Sulfatreduktion	+	n.b.	26 ± 10	690
Denitrifikation	+	18 ± 4	18 ± 6	520
Acetogenese, Methanogenese ^c	+	19 ± 1	44 ± 8	485

^a Inkubationszeit 40 bis 50 Tage, ^b Annahme für die Berechnung der Äquivalente (µequiv/µmol): Acetat: 8, Ammonium: 8, H₂: 2, N₂: 5, Sulfat: 8 Elektronen; ^c Zugabe von 4 mM BES.

Während sulfatreduzierende und denitrifizierende Bakterien, Acetogene und Methanogene im Grundwasser vorhanden waren (Tab. 4.12), konnten dechlorierende Bakterien in Ansätzen mit GG als Elektronendonator nicht nachgewiesen werden. Nur in parallelen Versuchen mit H₂ als Elektronendonator kam es in einem Ansatz mit H₂ als Elektronendonator ab dem 56. Inkubationstag zur Bildung von cDCE.

Eine durch Grundwasserinhaltsstoffe induzierte abiotische Acetat- und Methanbildung sowie Nitrat- und Sulfatreduktion konnte in Kontrollen mit Grundwasser als Inokulum ausgeschlossen werden.

MPN-Versuche zur Bestimmung der Zellzahlen ergaben nur für die Gruppen der Denitrifikanten und Methanogenen/Acetogenen auswertbare Ergebnisse. Im Grundwasser wurden für die Denitrifikanten Zellzahlen von $9,3 \cdot 10^2$ Denitrifikanten/ml und für die Methanogenen und Acetogenen Zellzahlen von 15/ml ermittelt. Trotz Zugabe von BES wurde keine vollständige Inhibierung der Methanogenese erreicht. Aus diesem Grund konnten die Zellzahlen von Methanogenen und Acetogenen nicht getrennt voneinander bestimmt werden. In parallelen Ansätzen mit Vancomycin wurden weder eine Acetat- noch Methanbildung festgestellt.

4.2 Untersuchungen mit einer reduktiv dechlorierenden Mischkultur

Von besonderem Interesse war der Nachweis von dechlorierenden Bakterien und deren Einfluss auf die abiotische Dechlorierung von PCE. Während der Nachweis von dechlorierenden Bakterien im Grundwasser nicht möglich war, wurde im Desorbat des GG-Kies-Gemisches aus den Säulen in Kiel eine biologische Dechlorierung von PCE zu cDCE belegt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reaktive Wand in Rheine mit dechlorierenden Bakterien besiedelt war. Eine vollständige Dechlorierung von PCE zu Ethen fand jedoch nicht statt. Im Folgenden wurde untersucht, ob die physikochemischen Bedingungen in einer Reaktiven Wand die vollständige Dechlorierung von PCE zu Ethen durch dechlorierende Bakterien beeinflussen. Für diese Versuche wurde eine Mischkultur eingesetzt, die zu Beginn der Untersuchungen PCE zu VC und Ethen dechlorierte.

4.2.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Als Erstes wurden die Kultivierungsbedingungen für die reduktiv dechlorierende Mischkultur (DMC) soweit verändert, dass eine vollständige und stabile Dechlorierung des PCE zum Ethen möglich war.

Der DMC wurden wöchentlich Proben entnommen, bevor durch Purgen chlorierte Ethene, Ethen und Methan aus der Kultur entfernt und ein Teil des Mediums ausgetauscht wurde. 25,5 mmol Methanol und 1,55 mmol PCE wurden im Anschluss zudosiert. Damit standen für die Reduktion von PCE zwar ausreichend Elektronendonatoren zur Verfügung, eine vollständige Dechlorierung des PCE zum Ethen erfolgte jedoch nicht. Stattdessen wurde durch eine ausgeprägte Methanogenese ein so hoher Druck in den Kulturgefäßen aufgebaut, dass regelmäßige Gasentnahmen notwendig waren. Die dabei pro Woche gebildeten durchschnittlich 20 mmol Methan (Abb 4.14), entstammten zum größten Teil aus dem zudosierten Methanol.

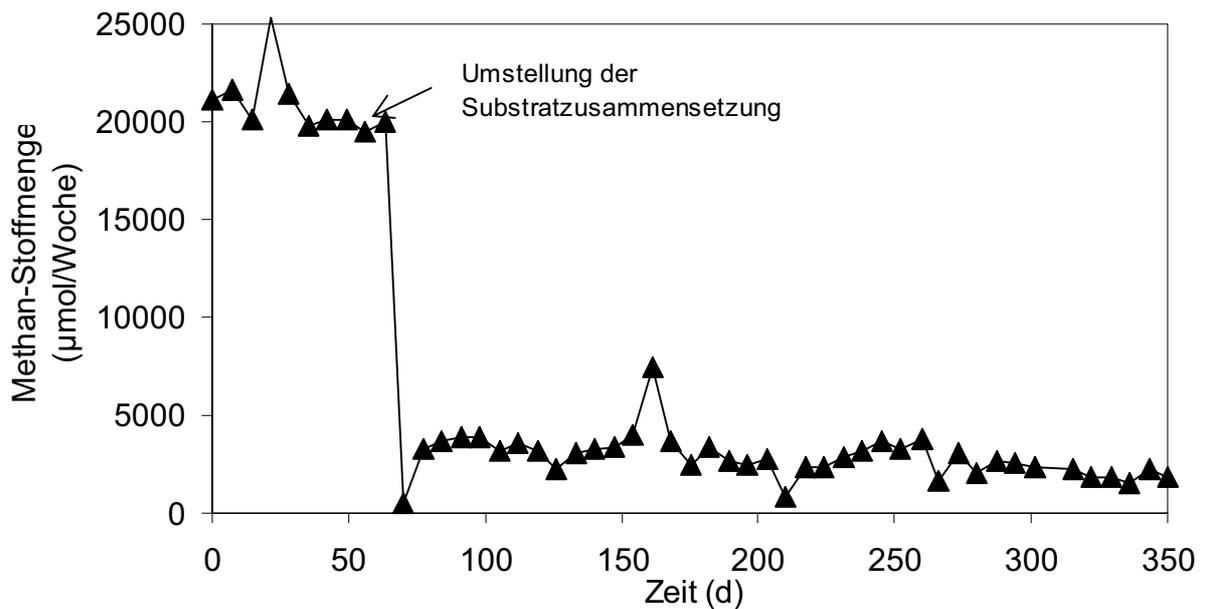


Abb. 4.14 Methanentwicklung einer reductiv dechlorierenden Mischkultur vor und nach Substratumstellung am 51. Tag der Kultivierung. Dargestellt sind die Stoffmengen an Methan, die in wöchentlichem Abstand 7 Tage nach der Zugabe von PCE und Elektronendonatoren gemessen wurden (▲).

Die Reduzierung auf eine wöchentliche Zugabe von 5,1 mmol Methanol führte zu einer drastischen Abnahme der Methanbildung. Durch Zugabe von 60 ml H₂ (entspricht ca. 5 mmol Elektronenäquivalenten), je nach Bedarf bis zu zweimal wöchentlich, wurden ausreichend Elektronenäquivalente für die Dechlorierung von PCE vorgehalten.

Neben einer geringeren Methanbildung konnte durch die Substratumstellung eine vollständige Dechlorierung bis zum Ethen innerhalb von sieben Tagen nach jeder PCE-Zugabe erreicht werden (Abb 4.15). Dabei erfolgte die Dechlorierung sequentiell über TCE, cDCE und VC. Während die Dechlorierung zum cDCE und VC häufig innerhalb von 48 h nach PCE-Zugabe verlief, erfolgte innerhalb von sieben Tagen eine vollständige Dechlorierung bis zum Ethen.

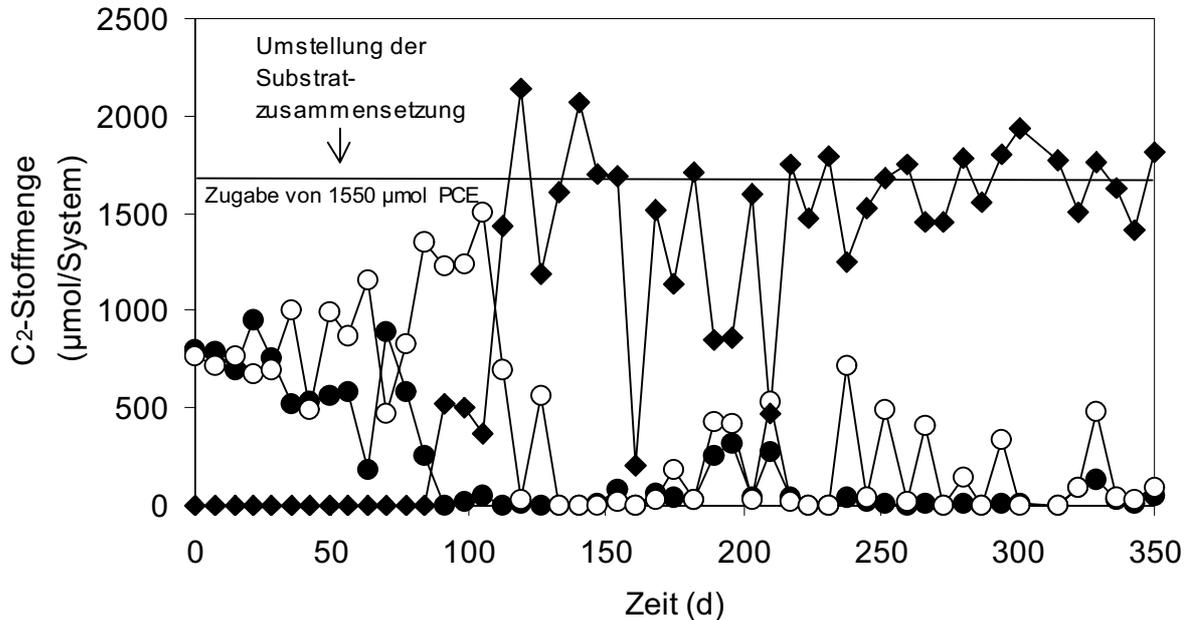


Abb. 4.15 Dechlorierung von PCE durch eine reduktiv dechlorierende Mischkultur vor und nach Substratumstellung am 51. Tag der Kultivierung. Dargestellt sind die Stoffmengen der Dechlorierungsprodukte cDCE (●), VC (○) und Ethen (◆), die jeweils eine Woche nach PCE-Zugabe gemessen wurden. PCE und TCE waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

Durch die Änderung der Kultivierungsbedingungen verringerte sich der Proteingehalt von ca. 340 mg/l auf ca. 200 mg/l, bestimmt jeweils über einen Zeitraum von 4 bis 6 Wochen. Um die in der DMC enthaltenen Bakteriengruppen zu ermitteln, wurden nach der Substratumstellung MPN-Bestimmungen durchgeführt. Die Zahl an Acetogenen betrug $1,1 \cdot 10^5$ /ml. Die Acetatkonzentrationen lagen über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten zwischen 85 und 170 $\mu\text{mol/l}$. Zur Bestimmung der Methanogenen wurde Vancomycin eingesetzt, um konkurrierende Acetogene zu unterdrücken. Damit wurden jedoch nur hydrogenotrophe Methanogene erfasst. Daraus resultierte für die MPN-Bestimmungen eine sehr niedrige Zellzahl von $2,4 \cdot 10^2$ /ml. Mit PCE im Medium wurde eine Zellzahl von $1,1 \cdot 10^5$ /ml ermittelt. Erfasst wurden damit sowohl dechlorierende, als auch PCE-tolerante Acetogene und Methanogene. Für sulfatreduzierende Bakterien wurden Zellzahlen von $2,4 \cdot 10^4$ /ml ermittelt.

4.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Eine reduktive Dechlorierung von PCE zu VC und Ethen durch Reinkulturen wurde bislang nur für *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 beschrieben [MAYMÓ-GATELL

et al., 1997]. Diese Dechlorierungscharakteristik stimmt mit der für die DMC festgestellten sequentiellen Dechlorierung von PCE zu Ethen überein. Es wurden deshalb molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um *Dehalococcoides* Spezies in der DMC nachzuweisen.

4.2.2.1 Nachweis von *Dehalococcoides* Spezies

Durch Vergleich von Basensequenzen der 16S rDNA können Bakterienstämme identifiziert werden und Verwandtschaftsverhältnisse quantifiziert werden. Deshalb wurden Proben aus der DMC entnommen und 16S rRNA-Gensequenzen mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Um die 16S rDNA von *Dehalococcoides* Spezies zu amplifizieren, wurden zwei Primerkombinationen verwendet. Der *Dehalococcoides* spp. spezifische Vorwärtsprimer DHC728V wurde mit dem universellen Rückwärtsprimer 1492R kombiniert bzw. der eubakterielle Vorwärtsprimer 616V mit dem *Dehalococcoides* spezifischen Rückwärtsprimer DHC1172R. Die entstehenden Amplifikate umfassten 750 und 1150 Basenpaare (bp). Von beiden Reaktionen wurden Genbanken angelegt. Zwei unterschiedliche Sequenzen konnten nach Amplifizierung mit DHC728V und 1492R und anschließendem Klonieren erhalten werden. Eine Sequenz zeigte mit 99,9 % die höchsten Sequenzhomologien zu Stamm CBDB1 (AF230641.1) und FL2 (AF357918.2). Die zweite Sequenz zeigte höchste Sequenzhomologien zu *D. ethenogenes* Stamm 195 (AF004928.2, 99,2 % Sequenzhomologie).

4.2.2.2 Restriktionsanalyse der amplifizierten Produkte

Das Vorhandensein von unterschiedlichen *Dehalococcoides* Spezies-Sequenzen in der DMC sollte verifiziert werden. Dazu wurden Klone aus der Amplifikation mit 616V und DHC1172R mittels der „amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA) überprüft. Durch eine Kombination der Restriktionsenzyme EcoRI und FauNDI konnten CBDB1 und *D. ethenogenes* Stamm 195 16S rDNA-Sequenzen voneinander unterschieden werden. Eine EcoRI-Schnittstelle ist sowohl in der Sequenz von CBDB1 als auch von *D. ethenogenes* Stamm 195 an Position 612 vorhanden. Zudem trägt der Vektor zwei EcoRI-Schnittstellen, die ein Ausschneiden des Inserts aus dem Vektor ermöglichen (siehe Kapitel 3.5.4, Abb 3.3). Die Schnittstelle für FauNDI ist nur in der 16S rDNA-Sequenz von CBDB1 vorhanden und schneidet dieses in zwei Fragmente mit jeweils ca. 500 und 100 bp Länge (Tab. 4.13).

Tab. 4.13 Abgleich von *Dehalococcoides* 16S rDNA Sequenzen in der variablen Region 2. Die Klone V und VI wurden aus der DMC gewonnen. Ein Punkt zeigt Sequenzübereinstimmungen mit der Sequenz von *D. ethenogenes* Stamm 195. Die Erkennungsstelle von FauNDI ist zum Vergleich angegeben.

Sequenz	<i>E. coli</i> Position 183-219													
<i>D. ethenogenes</i>	GAT	GGG	CTG	ACA	TAA	GTC	GGT	TCA	TTA	AAG	CCG	CAA	GGT	
clone V
CBDB1	·G·	...	·C·	...	·T·	·T·	C·	T·	·C	
FL2	·G·	...	·C·	...	·T·	·T·	C·	T·	·C	
clone VI	·G·	...	·C·	...	·T·	·T·	C·	T·	·C	
	FauNDI Erkennungsstelle:							CA TAT G						

Mit DNA einer Reinkultur von CBDB1 wurde gezeigt, dass das 600 bp Fragment geschnitten wurde. Eine Verdauung mit beiden Enzymen ergab für 19 von 20 Klonen aus der Genbank ein Restriktionsmuster, welches für *D. ethenogenes* Stamm 195 erwartet wurde. Nur in einem von 20 Klonen zeigte sich das für CBDB1 und FL2 erwartete Restriktionsmuster. In Abb. 4.16 sind exemplarisch die Ergebnisse der Restriktionsanalyse von fünf Klonen dargestellt.

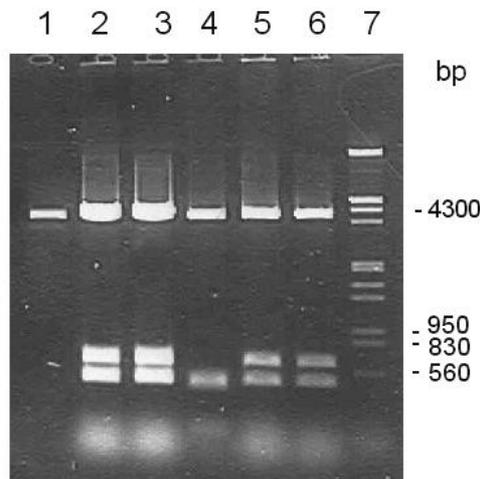


Abb. 4.16 ARDRA von Vektoren (pCR[®]2.1) mit Inserts der 16S rDNA von *Dehalococcoides* Spezies aus der DMC. Nach Isolierung der Vektoren wurden diese mit EcoRI und FauNDI geschnitten. Lane 1: Vektor ohne Insert. Lane 2-6: geschnittene Vektoren mit Inserts der Klone IV, V, VI, III and VII. Lane 7: DNA Marker λ -H/E.

Ein Insert mit FauNDI-Schnittstelle und 3 Inserts ohne die FauNDI-Erkennungssequenz wurden sequenziert. Die höchsten Sequenzhomologien wurden entsprechend zu Stamm CBDB1 / FL2 (99.9%) und *D. ethenogenes* Stamm 195 (100%) gefunden.

4.2.3 Dechlorierung von PCE durch die DMC mit GG als Elektronendonator

Im Folgenden sollte festgestellt werden, ob die DMC in der Lage ist, mit elementarem Eisen als Elektronendonator PCE reaktiv zu dechlorieren. Die Ergebnisse mit Probenmaterial aus der Reaktiven Wand in Rheine zeigten, dass sich GG aufgrund der geringeren Reaktivität für biologische Untersuchungen in Batch-Ansätzen besser eignet als Eisenschwamm. Für weitere Untersuchungen wurde aus diesem Grund GG eingesetzt. In Batch-Ansätzen mit 2 Gew.-% GG verlief die abiotische Dechlorierung von PCE über TCE zu Ethen, wobei weder das Zwischenprodukt cDCE noch VC freigesetzt wurden. Eine vollständige Dechlorierung von PCE innerhalb von 30 Tagen wurde nicht erreicht (Abb. 4.17). Die Bilanzlücke an C₂-Verbindungen von 35 % in den abiotischen Ansätzen mit GG ließ sich nur zu 10 % auf Probenahme-Verluste oder mangelnde Dichtigkeit zurückführen, wie Kontrollansätze belegten.

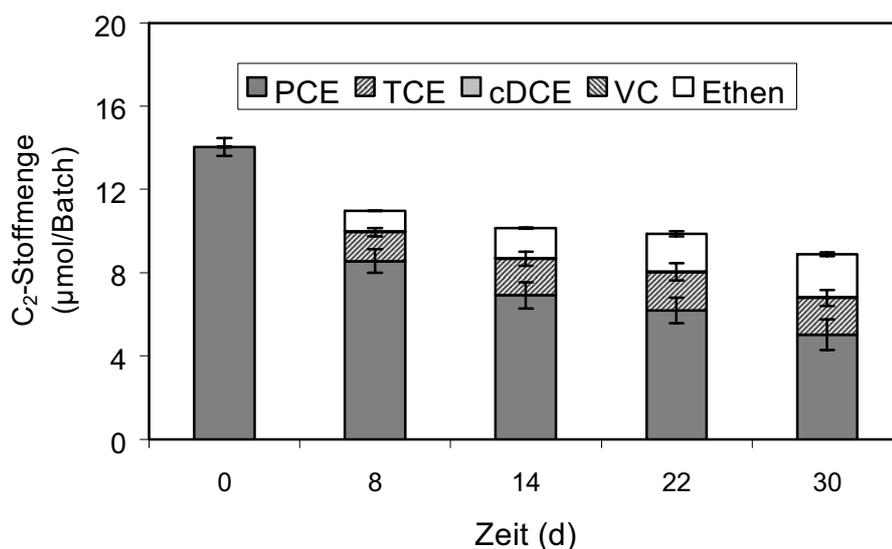


Abb. 4.17 Dechlorierung von PCE in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG

In Ansätzen mit H₂ als Elektronendonator und der DMC erfolgte keine vollständige Dechlorierung (Abb. 4.18 oben). Bis zum Ende der Inkubationszeit wurden 62 μmol Methan freigesetzt. Im Gegensatz dazu erfolgte in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und der DMC innerhalb von 30 Tagen eine vollständige Dechlorierung bis zum Ethen (Abb. 4.18 unten). Eine sequentielle Dechlorierung des PCE bis zum Ethen fand statt. Nach erfolgter Dechlorierung zum cDCE wurde Methan gebildet. Nach 30 Tagen wurden 16,5 μmol Methan entwickelt.

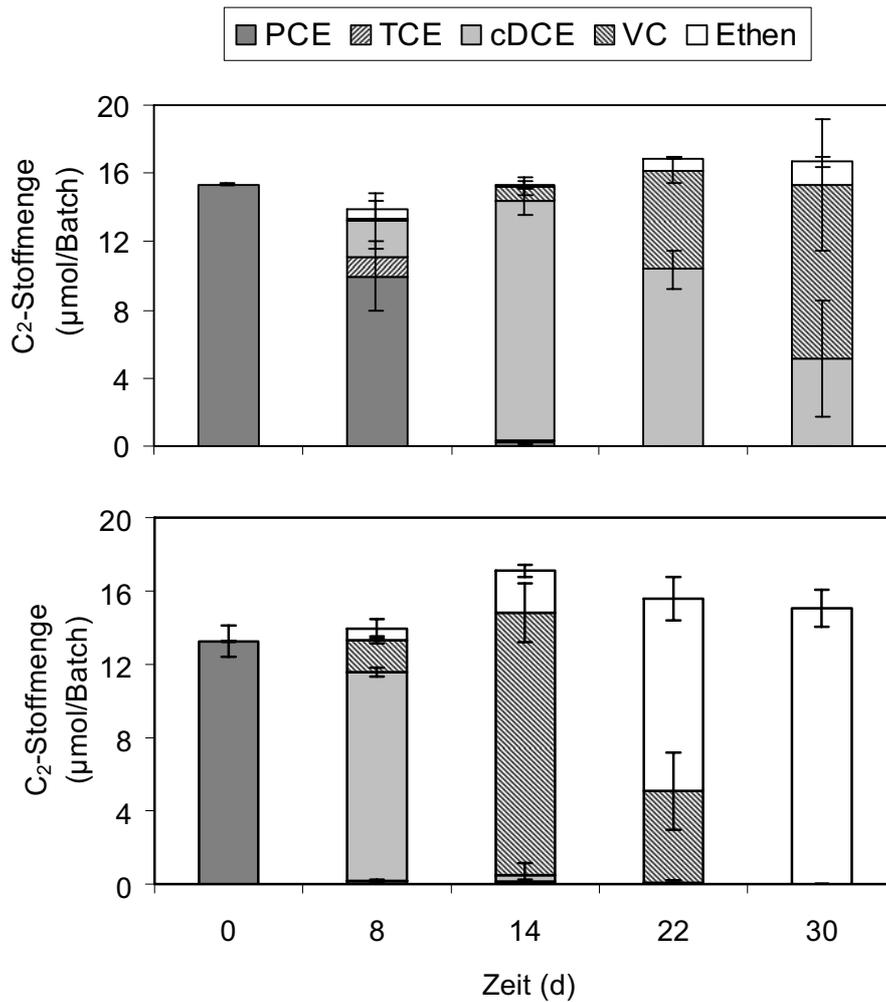


Abb. 4.18 Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC mit H₂ (oben) bzw. mit 2 Gew.-% GG (unten) als Elektronendonator

4.2.4 Wachstum der DMC mit GG als Elektronendonator

Die Ergebnisse belegen, dass die DMC mit GG als direkter oder indirekter Elektronendonator PCE vollständig dechlorieren kann. Um herauszufinden, ob eine vollständige Dechlorierung auch langfristig erhalten bleibt, sollte ein Wachstum mit GG nachgewiesen werden.

Dies wurde über eine Kultivierung der DMC in Form eines sequentiellen Transfers erreicht. Dabei wurde der erste Ansatz mit 2 Gew.-% GG, 1 mM Acetat und 2 Vol.-% DMC angeimpft. Nach vollständiger Dechlorierung zum Ethen dienten jeweils 2 Vol.-% dieses Ansatzes als Inokulum für den darauffolgenden Ansatz. Innerhalb eines Jahres

konnte so auch nach dem siebten Transfer eine nach einer achtwöchigen Inkubation vollständige Dechlorierung zum Ethen erreicht werden.

Zusätzlich wurde ein molekularbiologischer Nachweis von *Dehalococcoides* Sequenzen mittels PCR durchgeführt, um vergleichend zwischen Ansätzen mit PCE, GG und der DMC zum Zeitpunkt einer vollständigen Dechlorierung zu Ethen in diesen Ansätzen und Kontrollen Rückschlüsse auf die Häufigkeit von *Dehalococcoides* 16S rDNA-Sequenzen treffen zu können. Die Proben für diesen Nachweis konnten ohne eine DNA-Isolierung und -Aufreinigung aus den geschüttelten Batch-Ansätzen entnommen und für die PCR eingesetzt werden. Während in den Ansätzen mit PCE, GG und der DMC in der 1:100 Verdünnung der Proben noch ein Amplifikat erhalten werden konnte, zeigten die Vergleichsansätze mit GG und DMC nur eine schwache Bande in der 1:10 verdünnten Probe (Abb. 4.19).

Wie erwartet, gab es kein Amplifikat in den abiotischen Kontrollen mit GG und PCE. Die Vergleichsansätze mit DMC und PCE aber ohne Elektronendonator zeigten in der 1:10 verdünnten Probe ein Amplifikat, die Ansätze nur mit DMC in der unverdünnten Probe. Da die Desorption von Bakterien von der Eisenoberfläche wie in den Rheine-Ergebnissen beschrieben, nicht vollständig war, ist auch in diesen Ansätzen davon auszugehen, dass ein Teil der Bakterien an der Eisenoberfläche haftete und deren DNA nicht als Template zur Verfügung stand.

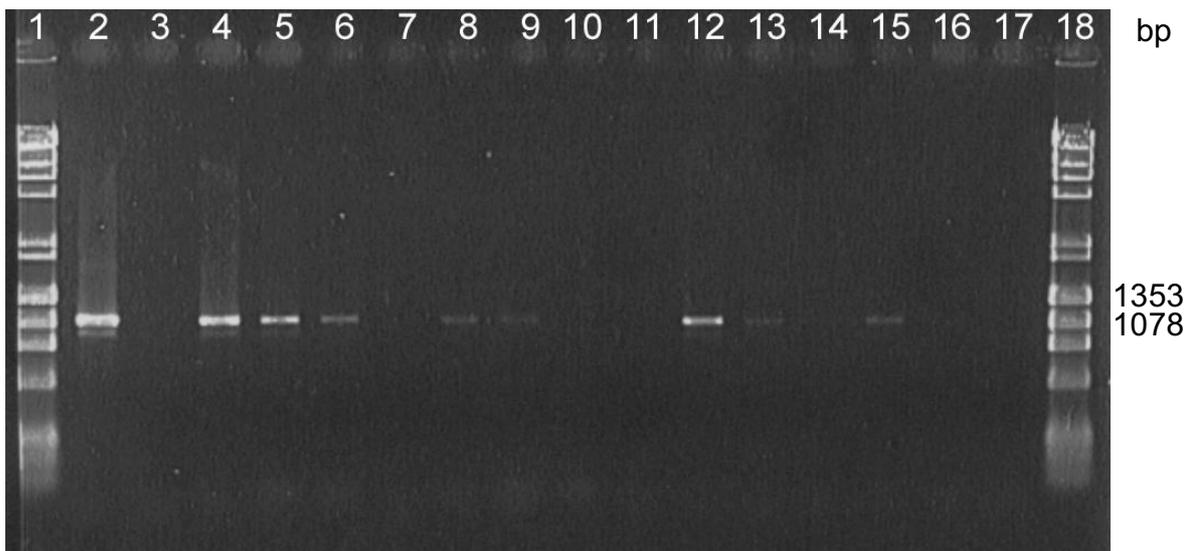


Abb. 4.19 Nachweis von *Dehalococcoides* Sequenzen mittels *Dehalococcoides* spezifischen PCR Assay mit den Primern 616V und DHC1172R in Batch-Ansätzen. Lane 1 und 18: Molekularer Gewichtsmarker λ -HindIII / Φ X174-HaeIII (Fa. Finnzymes, Espoo, Finnland). Lane 2: gereinigte CBDB1-DNA als Template. Lane 3: Negativkontrolle: H₂O.

Ansatz	unverdünnt	1:10 verd.	1:100 verd.	1:1000 verd.
DMC + GG + PCE	Lane 4	Lane 5	Lane 6	Lane 7
DMC + GG	Lane 8	Lane 9	Lane 10	-
GG + PCE	Lane 11	-	-	-
DMC + PCE	Lane 12	Lane 13	Lane 14	-
DMC	Lane 15	Lane 16	Lane 17	-

Ein Wachstum von *Dehalococcoides* Spezies in der DMC mit PCE als Elektronenakzeptor und GG als Elektronendonator konnte somit nachgewiesen werden.

4.2.5 Einflussfaktoren auf die Dechlorierung von PCE durch die DMC

4.2.5.1 Einfluss von acetogenen Bakterien

Die Wachstumsversuche wurden mit 1 mM Acetat durchgeführt, wobei Acetat vorrangig als Kohlenstoff-Quelle dienen sollte. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Acetat auch als Elektronendonator zur Dechlorierung verwendet wurde. Zudem war

es möglich, dass acetogene Bakterien oder weitere dechlorierende Bakterien in der DMC einen Einfluss auf die Dechlorierung von PCE hatten.

Durch Einsatz von Vancomycin sollten acetogene Bakterien in ihrem Wachstum gehemmt werden. Während die Bildung von Acetat vollständig unterdrückt wurde, zeigten Konzentrationen von 50 mg Vancomycin/l keinen Effekt auf die Dechlorierung von PCE. In Vancomycin-freien Ansätzen wurde bis zum 8. Tag H_2 freigesetzt (Abb. 4.20).

An weiteren Messtagen lagen die H_2 -Gehalte bei bzw. unterhalb der Nachweisgrenze. In Ansätzen mit Vancomycin hingegen wurde bis zum 23. Tag H_2 freigesetzt, wobei Gehalte von 85 μmol erreicht wurden. Bis zum 37. Tag wurde ein Großteil des freigesetzten H_2 verbraucht. Signifikante Methangehalte wurden in diesen Ansätzen erst ab 23 Tagen gebildet, so dass ein Zusammenhang zwischen dem H_2 -Verbrauch und der Methanbildung besteht.

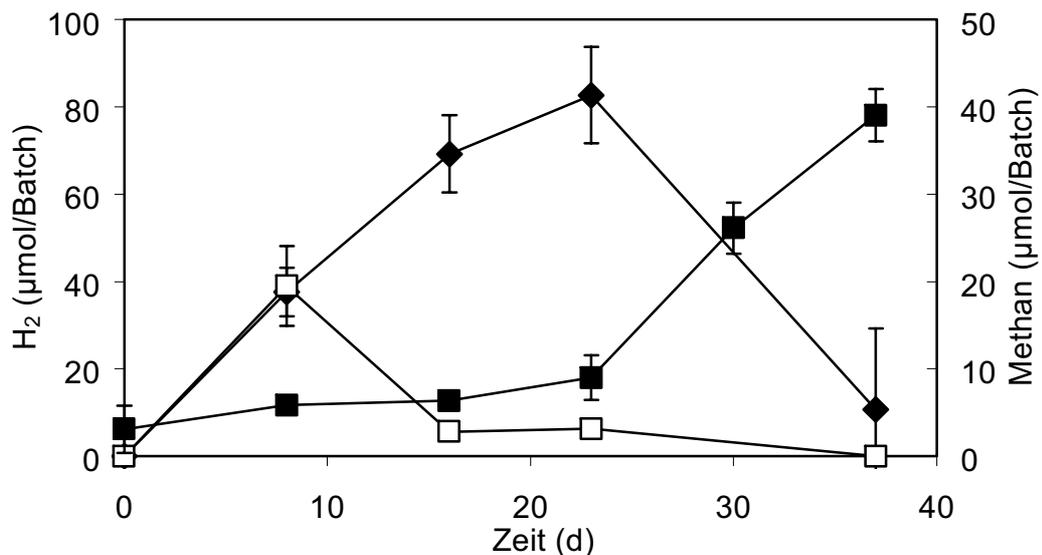


Abb. 4.20 H_2 -Entwicklung bzw. -Abnahme in Ansätzen mit (◆) und ohne 50 mg/l Vancomycin (□). Die Ansätze enthielten 2 Vol.-% DMC und 2 Gew.-% GG. Ohne Vancomycin wurden ca. 10 μmol Methan gebildet. Dargestellt sind die Methangehalte für die Ansätze mit Vancomycin (■).

Die Methanbildung setzte erst ein, wenn PCE vollständig zu cDCE umgesetzt worden war (Abb 4.21).

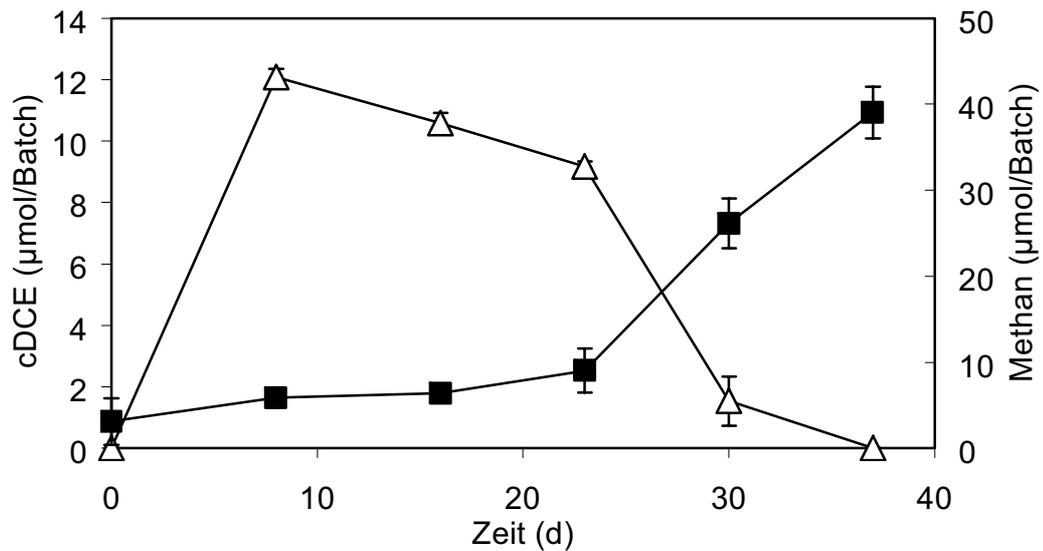


Abb. 4.21 Bildung und Dechlorierung des Intermediates cDCE (Δ) sowie Methanentwicklung (\blacksquare) in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC und 2 Gew.-% GG sowie 50 mg/l Vancomycin.

Acetogene Bakterien zeigten keinen direkten Einfluss auf die Dechlorierung von PCE. Ein möglicher Einfluss von Acetat selber wurde in vergleichenden Untersuchungen in Form von Ansätzen, in denen H_2 und /oder Acetat zur Verfügung gestellt wurden, getestet (Abb. 4.22). Nach 21 Tagen Inkubation zeigten sich deutliche Unterschiede in der Verteilung der PCE-Dechlorierungsprodukte zwischen den Ansätzen mit oder ohne H_2 als Elektronendonator.

Fehlte H_2 als Elektronendonator, wurde kein Ethen gebildet. In den Ansätzen mit Acetat waren nach 21 Tagen Inkubation ca. 49 % PCE, 42 % TCE, 6 % cDCE und 3 % VC vorhanden. Eine ähnliche Produktverteilung ergaben die Kontrollansätze ohne Acetat und ohne H_2 mit ca. 30 % PCE, 56 % TCE, 10 % cDCE und 4 % VC. Mit H_2 als Elektronendonator erfolgte eine sukzessive, unvollständige Dechlorierung bis zu VC und Ethen. Die Gehalte an cDCE lagen unterhalb der Nachweisgrenze. In den Ansätzen mit H_2 und Acetat wurden 63 % VC und 36 % Ethen, in den Ansätzen mit H_2 wurden 84 % VC und 16 % Ethen gebildet.

Die Methangehalte lagen für die Ansätze ohne H_2 unterhalb der Nachweisgrenze. In den Ansätzen mit H_2 wurden nach 21 Tagen Inkubation ca. $18 \pm 5 \mu\text{mol}$, in den Ansätzen mit H_2 und Acetat $12 \pm 3 \mu\text{mol}$ Methan gebildet.

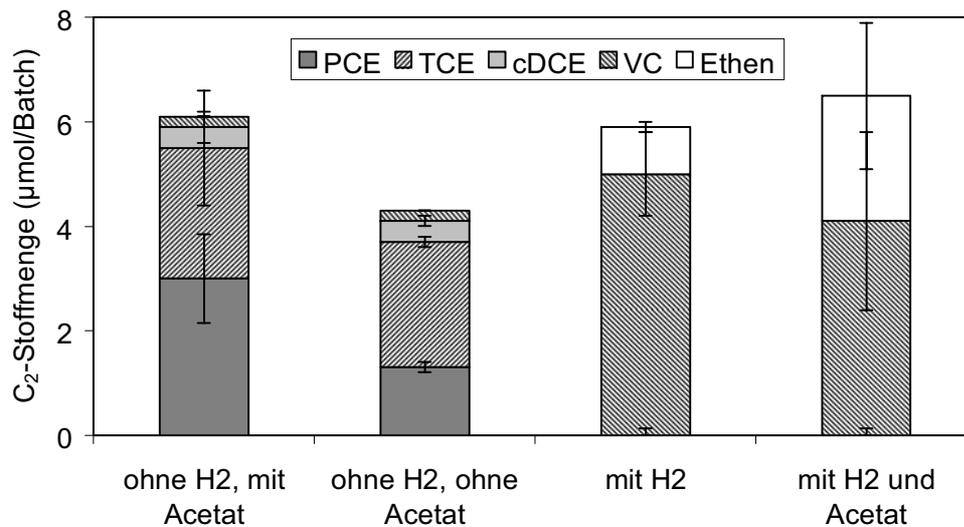


Abb. 4.22 Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC sowie 5 ml H₂ und/oder 1 mM Acetat. Die Inkubationszeit betrug 21 Tage, die PCE-Ausgangskonzentration $6,0 \pm 0,5 \mu\text{mol}$.

Ein direkter Einfluss von Acetat auf die Dechlorierung von PCE konnte ausgeschlossen werden.

4.2.5.2 Einfluss der Eisenmenge

In weiterführenden Versuchen wurde der Einfluss der Eisenmenge auf die Dechlorierung von PCE durch die dechlorierende Mischkultur untersucht.

Wie in Kap. 4.2.3 beschrieben, wurde durch Verwendung von 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% DMC eine vollständige Dechlorierung von PCE zum Ethen bereits innerhalb von 30 Tagen Inkubation erreicht. Eine geringere Menge GG von 0,4 Gew.-% ergab nach einer Inkubationszeit von 48 Tagen die Bildung von 67 % Ethen und 33 % Vinylchlorid (Abb. 4.23). Im gleichen Zeitraum erfolgte sowohl mit 1 Gew.-% als auch mit 2 Gew.-% GG eine vollständige Dechlorierung zum Ethen. Dagegen führte eine größere GG-Menge von 4 Gew.-% zur Bildung von 2 % cDCE, 23 % Vinylchlorid und 75 % Ethen. Mit 10 Gew.-% GG verschob sich die Produktverteilung zu 48 % cDCE, 13 % VC und 39 % Ethen.

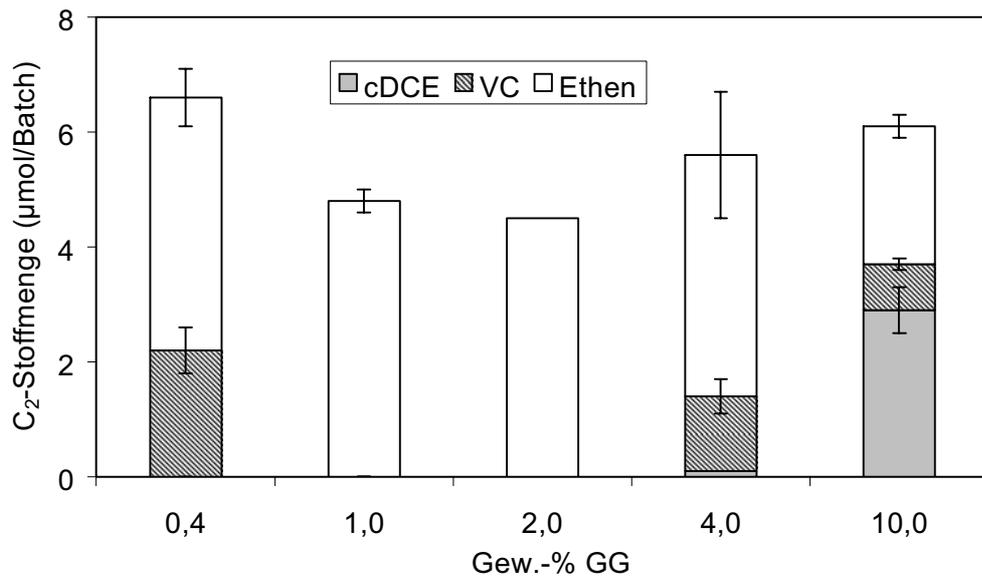


Abb. 4.23 PCE-Dechlorierung mit 2 Vol.-% DMC und verschiedenen Fe⁰-Mengen (1, 2, 4 oder 10 Gew.-% GG). Die Inkubationszeit betrug 48 Tage. Die PCE-Ausgangskonzentration betrug $6,0 \pm 1,3$ µmol.

Die pH-Werte änderten sich in den Ansätzen mit 0,4 und 1 Gew.-% GG während der 48tägigen Inkubationszeit nicht, wobei in den Ansätzen mit 4 Gew.-% GG der pH-Wert auf 8,1 und mit 10 Gew.-% GG auf 9,3 anstieg (Tab 4.14). Entsprechend nahmen die Acetat-Konzentrationen mit größeren GG-Mengen, mit Ausnahme des Ansatzes mit 2 Gew.-% GG, stärker zu.

Tab. 4.14 Darstellung der Acetatkonzentration sowie der pH-Werte nach 13, 41 und 48tägiger Inkubation in Abhängigkeit vom Gehalt an GG

Tripletts Gew.-% GG	Acetatbildung (mg/l) ¹	pH-Wert nach Inkubationszeit von			
		t ₀	13 Tagen ²	41 Tagen ³	48 Tagen ³
0,4	23,6 ± 0,8	7,3	7,2	7,3	7,2
1	36,2 ± 7,0	7,2	7,2	7,3	7,3
2	35,9	7,2	7,3	7,4	7,5
4	128,2 ± 44,7	7,2	7,6	7,9	8,1
10	180,2 ± 10,5	7,2	8,9	9,2	9,3

¹ bis auf Ansatz mit 2,0 Gew.-% GG Mittelwerte von Triplets; ² pH-Wert jeweils von Ansatz c; ³ Standardabweichung bis auf Ansatz mit 2,0 Gew.-% GG < 0,1.

4.2.5.3 Einfluss der Eisensorte

Die Eisensorten GG und ES zeichneten sich durch eine sehr unterschiedliche Reaktivität aus, obwohl sich die BET-spezifischen Oberflächen mit $0,6 \text{ m}^2/\text{g}$ GG und mit $0,63 \text{ m}^2/\text{g}$ ES nicht signifikant unterscheiden. In abiotischen Kontrollansätzen mit 2 Gew.-% GG wurden ca. $250 \text{ } \mu\text{mol H}_2$ innerhalb von 30 Tagen gebildet. Bei ca. 4 Gew.-% ES hingegen setzte eine enorme Wasserstoffproduktion ein. Die ca. 4 Stunden nach Versuchsbeginn gemessenen „Nullwerte“ wiesen beim ES bereits Werte auf, die mit der vorhandenen Kalibrierung nicht mehr zu erfassen waren ($\gg 20 \text{ Vol.-% H}_2$).

Für die folgenden Versuche wurden unterschiedliche Mengen ES verwendet. Die abiotische Dechlorierung bzw. Adsorption von PCE durch ES verlief entsprechend der des GGs. Die C_2 -Bilanz zeigte, dass für 2,9 und 0,5 Gew.-% Eisenschwamm von anfänglich $13,1 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{mol PCE}$ nach einer 53tägigen Inkubationszeit noch ca. 55 % an C_2 -Verbindungen nachweisbar waren (Abb. 4.24).

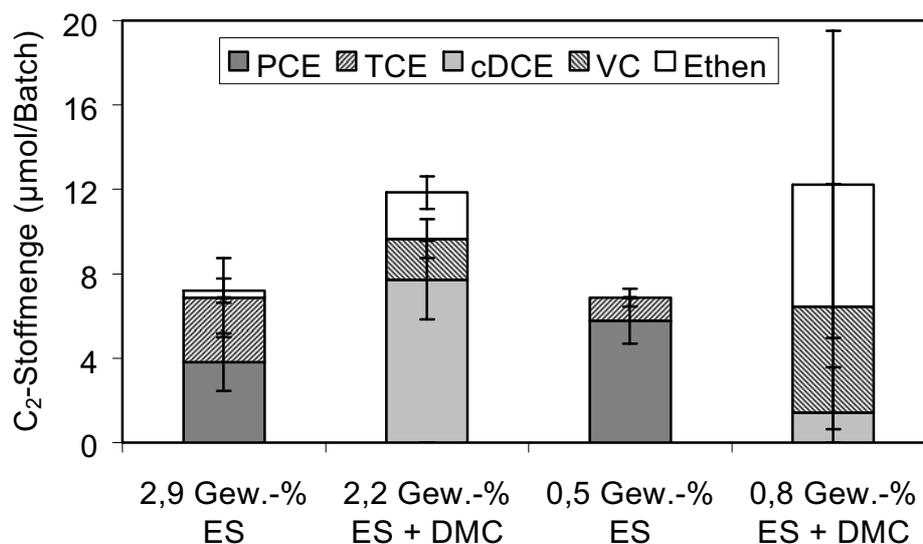


Abb. 4.24 Dechlorierung von PCE in abiotischen Ansätzen mit 2,9 und 0,5 Gew.-% ES sowie in Ansätzen mit 2,2 und 0,8 Gew.-% ES mit 2 Vol.-% DMC nach 53tägiger Inkubationszeit. Die PCE-Ausgangskonzentrationen betragen $13,1 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{mol}$.

In den Ansätzen mit der DMC lag die Wiederfindungsrate bei ca. 92 % bzw. 95 %. In den Ansätzen mit 0,8 Gew.-% ES und der DMC verlief die Dechlorierung von PCE in den Triplets sehr unterschiedlich, was zu einer hohen Standardabweichung führte. Auffallend war jedoch, dass in den Ansätzen mit 0,8 Gew.-% ES und DMC die Dechlorierung überwiegend bis zum VC und Ethen erfolgte, während mit 2,2 Gew.-% ES und DMC überwiegend cDCE gebildet wurde.

In Vergleichsansätzen mit H_2 wurde während der 53tägigen Inkubation eine vollständige Dechlorierung zum Ethen erreicht. Aus dem dosierten H_2 (ca. 800 μmol) wurde ausschließlich Methan ($229 \pm 20 \mu\text{mol}$) gebildet. Die Methanbildung setzte allerdings erst nach einer lag-Phase von 18 Tagen ein. In den Ansätzen mit ES als Elektronendonator war die Methanbildung vergleichsweise sehr gering (Abb. 4.25). Acetatkonzentrationen wurden in diesen Ansätzen nicht bestimmt.

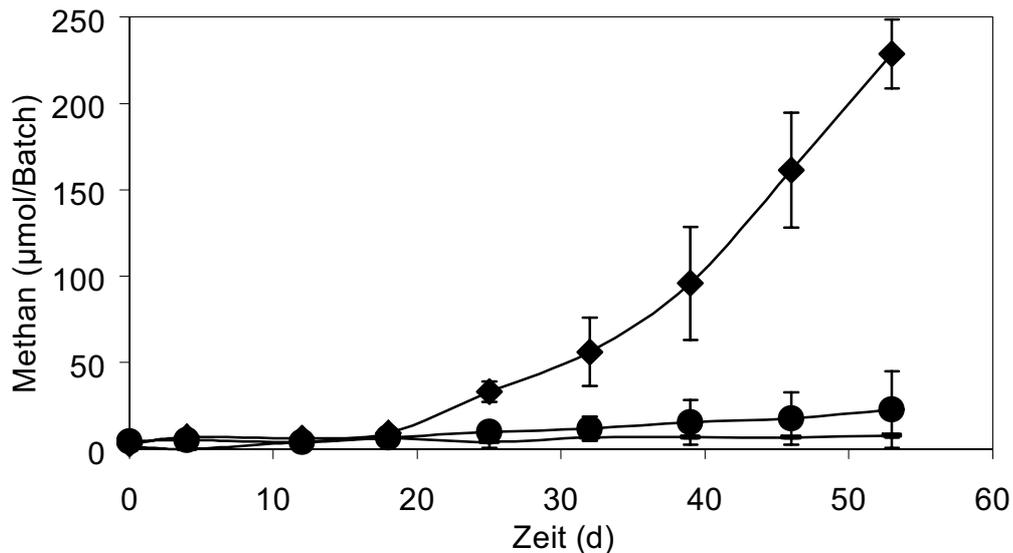


Abb. 4.25 Bildung von Methan in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC und 0,8 Gew.-% ES (●), bzw. 2,2 Gew.-% ES (-) sowie in Ansätzen mit H_2 (♦).

Da eine überraschend geringe methanogene Aktivität bereits in den Ansätzen mit Eisen und Desorbat aus den Rheine-Proben festgestellt worden war, wurde in einem weiterführenden Versuch die Bildung von Acetat mit 0,8 Gew.-% ES bei einer geringeren PCE-Stoffmenge untersucht. Dieser Versuch wurde nach 31 Tagen beendet. Zu diesem Zeitpunkt war eine biologisch induzierte Dechlorierung von anfänglich $7,6 \pm 0,9 \mu\text{mol}$ PCE zu ca. 85 % cDCE und 15 % VC erfolgt. Die pH-Werte betragen zu diesem Zeitpunkt $8,8 \pm 0,4$. Methan war in den Ansätzen nachweisbar, aber aufgrund der geringen Stoffmenge nicht quantifizierbar. Hingegen stieg die Acetatkonzentration auf ca. 300 mg/l bis zum Versuchsende nach 31 Tagen an. Im Vergleich dazu wurden mit 10 Gew.-% GG als Elektronendonator innerhalb von 48 Tagen 180 mg/l Acetat gebildet.

4.2.5.4 Einfluss des pH-Wertes

Die anaerobe Korrosion des Eisens führt in Reaktiven Wänden in Abstromrichtung in der Regel zu einem Anstieg der pH-Werte. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die PCE-

Dechlorierung durch die DMC zu erfassen, wurde in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf ca. 7, 8, 9 oder 10 eingestellt. In Abb. 4.26 sind die Dechlorierungsprodukte für Ansätze mit unterschiedlichen pH-Werten dargestellt.

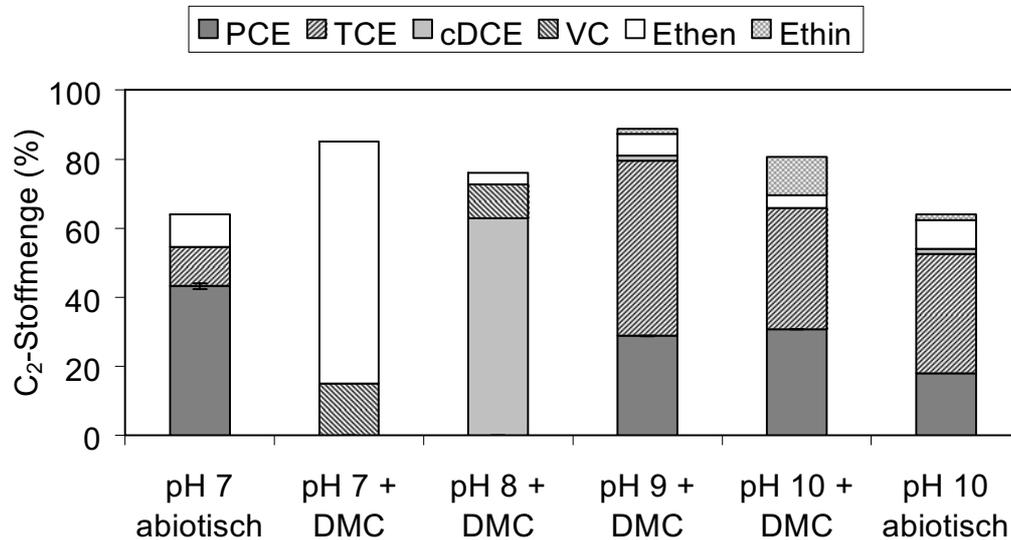


Abb. 4.26 Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG abhängig vom pH-Wert. Dargestellt sind jeweils abiotische Ansätze sowie biotische Ansätze mit 2 Vol.-% DMC bei pH-Werten von 7 bis 10. Die Ausgangskonzentrationen wurden 100 % gesetzt. Die Inkubationszeit betrug 28 bis 30 Tage.

Bei Anfangs-pH-Werten von $7,1 \pm 0,0$ stiegen die pH-Werte nach 30tägiger Inkubation in den abiotischen Kontrollen auf $7,5 \pm 0,1$, in Ansätzen mit DMC auf $7,4 \pm 0,0$ an. Die Dechlorierungscharakteristik der Ansätze unterscheidet sich signifikant voneinander. In abiotischen Ansätzen wurden nach 30tägiger Inkubation PCE, TCE sowie Ethen nachgewiesen, während in biotischen Ansätzen mit der DMC PCE zu VC und Ethen dechloriert wurde.

Bei Anfangs-pH-Werten von $8,1 \pm 0,1$ stieg der pH-Wert nach 14tägiger Inkubation auf $8,4 \pm 0,0$ an. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde überwiegend cDCE mit geringen Anteilen an VC gebildet. Bis zum Versuchsende nach 28 Tagen änderten sich die prozentualen Anteile der Dechlorierungsprodukte nicht. Der End-pH-Wert betrug $8,5 \pm 0,1$. Eine unvollständige Dechlorierung des PCE erfolgte auch in Ansätzen mit Anfangs-pH-Werten von $9,1 \pm 0,1$ sowie $10,6 \pm 0,1$. Die pH-Werte betragen nach 28- bzw. 30tägiger Inkubation $9,2 \pm 0,0$ bzw. $10,5 \pm 0,0$. Als C₂-Verbindungen wurden PCE, TCE sowie unterschiedliche Anteile an Ethen bzw. Ethin gebildet. Ein ähnliches Dechlorierungsmuster ergaben die abiotischen Kontrollansätze mit GG bei einem pH-Wert von $10,6 \pm 0,1$ (End-pH-Wert $10,4 \pm 0,0$).

4.2.5.5 Einfluss von Sulfat und Nitrat

Nitrat und Sulfat gelangen kontinuierlich mit dem Grundwasserstrom in die Reaktive Wand in Rheine. Da nachweislich Sulfatreduzierer und Denitrifikanten den Anstrombereich der Reaktiven Wand besiedelt haben, können konkurrierende terminale Elektronen akzeptierende Prozesse (TEAP) Einfluss auf die biologische Dechlorierung von PCE nehmen. Da in der DMC neben einer acetogenen, methanogenen auch eine denitrifizierende und sulfatreduzierende Aktivität vorhanden ist, konnte diese Kultur für die Versuche verwendet werden. Als Elektronendonator wurden 2 Gew.-% GG in allen Ansätzen eingesetzt. Die biotischen Ansätze enthielten zusätzlich als Inokulum 2 Vol.-% DMC. Nach einer Inkubationszeit von 36 Tagen wurden in biotischen Kontrollen ohne Nitrat oder Sulfat $6,5 \pm 0,2 \mu\text{mol}$ PCE zu überwiegend VC und Ethen dechloriert. Die C_2 -Bilanz ergab eine 71%ige Wiederfindungsrate an C_2 -Verbindungen (Abb 4.27).

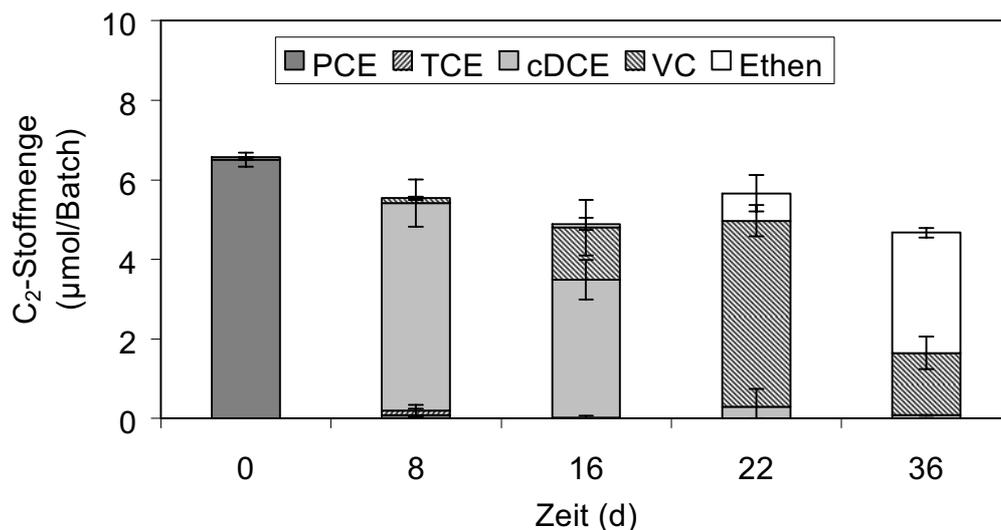


Abb. 4.27 Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% DMC. Die Inkubationszeit betrug 36 Tage.

Im Vergleich dazu zeigten biotische Ansätze mit $66,0 \pm 0,4 \text{ mg/l}$ Sulfat eine Dechlorierung von $7,1 \pm 0,5 \mu\text{mol}$ PCE zu überwiegend VC, wenig cDCE und nur wenig Ethen (Abb. 4.28 oben). Mit $43,8 \pm 2,7 \text{ mg/l}$ Nitrat wurden im gleichen Zeitraum $8,4 \pm 0,6 \mu\text{mol}$ PCE zu VC und wenig Ethen dechloriert. Die C_2 -Bilanz betrug für die biotischen Ansätze mit Sulfat 99 %, mit Nitrat 81 % (Abb. 4.28 unten).

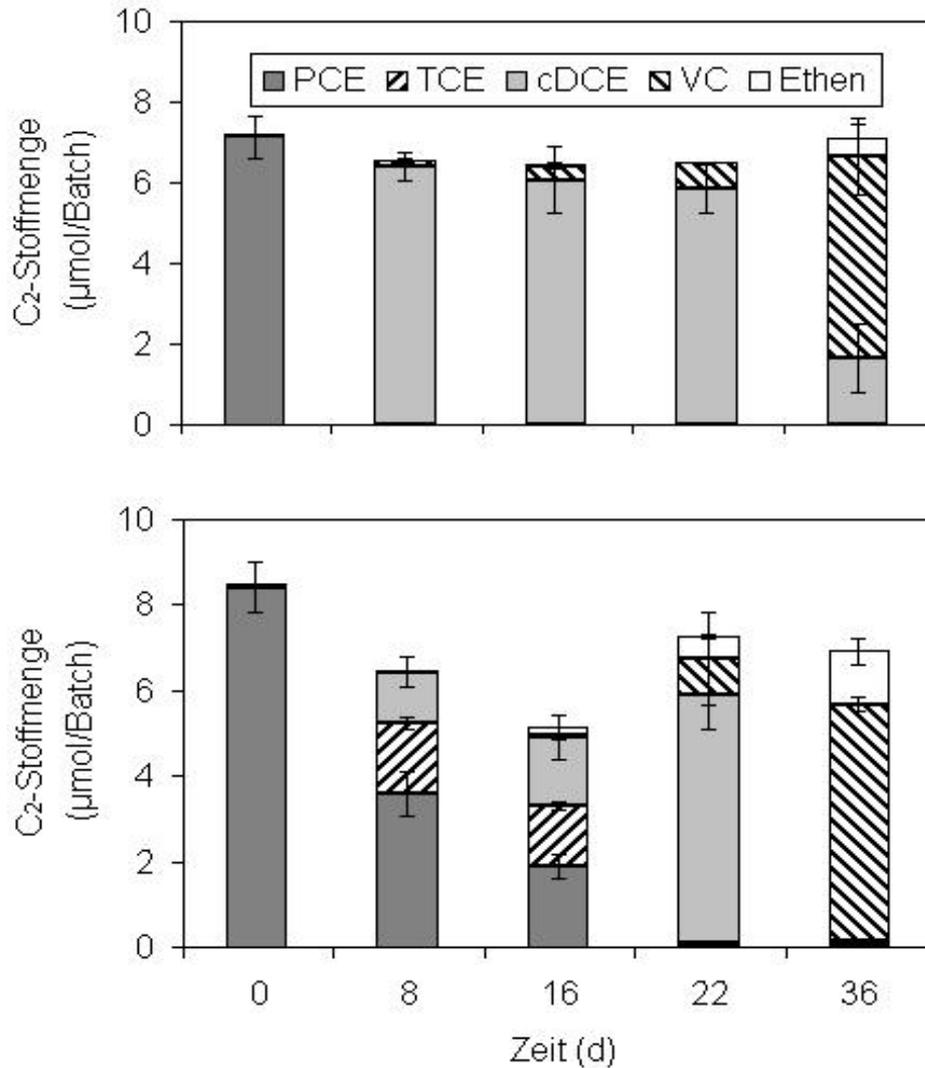


Abb. 4.28 Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% DMC, sowie mit 66 mg/l Sulfat (oben) und 44 mg/l Nitrat (unten). Die Inkubationszeit betrug 36 Tage.

Von anfänglich $7,0 \pm 0,4$ µmol PCE in abiotischen Kontrollen mit $66,8 \pm 0,4$ mg/l Sulfat waren nach 36 Tagen Inkubation noch PCE, TCE sowie geringe Mengen an Ethen bei einer Wiederfindungsrate von 53 % an C₂-Verbindungen zu finden. Mit $44,8 \pm 1,8$ mg/l Nitrat wurden von anfänglich $7,9 \pm 0,1$ µmol PCE im entsprechenden Zeitraum noch über 50 % PCE, daneben auch TCE und Ethen gefunden. Die C₂-Bilanz ergab eine Wiederfindungsrate von 71 % (Abb. 4.29).

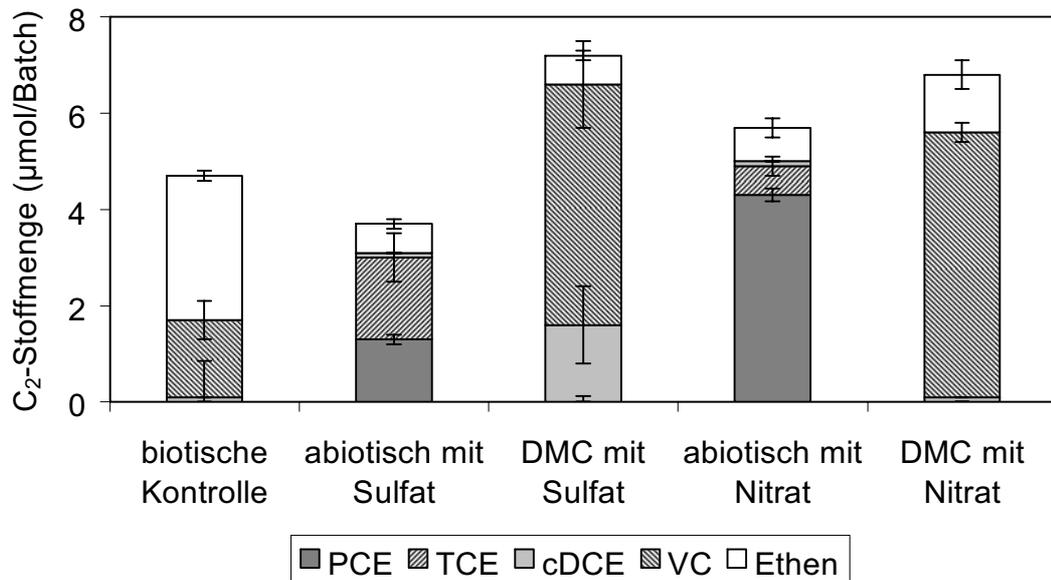


Abb. 4.29 Dechlorierung von PCE unter dem Einfluss eines konkurrierenden Elektronenakzeptors in abiotischen oder biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG. Diese enthielten, bis auf die biotischen Vergleichsansätze, entweder Sulfat oder Nitrat als konkurrierenden Elektronenakzeptor. Biotische Ansätze wurden mit 2 Vol.-% DMC inokuliert. Die Inkubationszeit betrug 36 Tage.

Die Dechlorierung von PCE in den biotischen Kontrollen mit GG, aber ohne Sulfat und Nitrat verlief sukzessive bis zum VC und Ethen innerhalb der Inkubationszeit (Abb 4.27). Entsprechend fand in biotischen Ansätzen mit Sulfat innerhalb von 8 Tagen eine Dechlorierung von PCE zu cDCE statt (Abb. 4.28 oben). Eine deutliche Reduktion zum VC und eine beginnende Ethenbildung wurde erst nach 36 Tagen bei vollständiger Sulfatreduktion nachgewiesen. (Abb. 4.28 oben; Abb. 4.30). In den Ansätzen mit Nitrat fand bis zum 16. Tag nur eine unvollständige Dechlorierung von PCE zu TCE und cDCE statt (Abb. 4.28 unten; Abb. 4.30). Erst nach vollständiger Umsetzung von Nitrat setzte nach 22 Tagen eine Dechlorierung zu VC und Ethen ein. Während in abiotischen Kontrollen Sulfat durch GG nicht umgesetzt wurde, konnten in abiotischen Kontrollen mit $44,8 \pm 1,8$ mg/l Nitrat noch $7,9 \pm 2,1$ mg/l Nitrat zum Versuchsende nachgewiesen werden (Abb. 4.30).

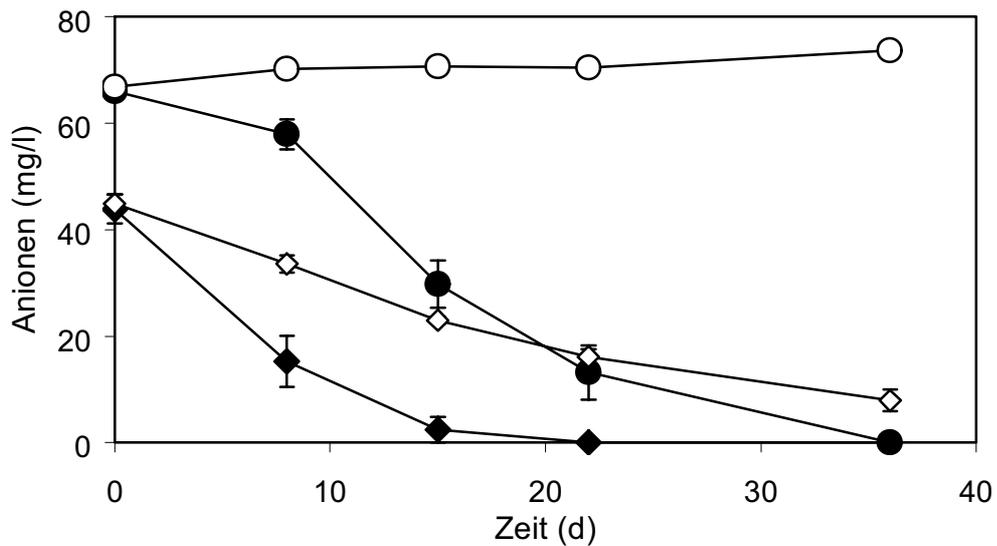


Abb. 4.30 Verlauf der Reduktion von Sulfat (●) und Nitrat (◆) in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC und 2 Gew.-% GG sowie von Sulfat (○) und Nitrat (◇) in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG.

4.3 Säulenversuche

Die mittels Batchversuchen erzielten Ergebnisse lassen sich nur bedingt auf „in-situ“ Verhältnisse einer Fe^0 -Reaktiven Wand übertragen. Reale Verhältnisse lassen sich noch am ehesten durch Säulenversuche nachbilden, in denen das Verhältnis von reaktivem Material zur flüssigen Phase wesentlich höher ist als in Batchansätzen. Zudem liegt kein geschlossenes System vor, sondern es erfolgt eine kontinuierliche Beschickung mit PCE-haltigem Medium. Die Säulenversuche wurden ausschließlich mit der Eisensorte GG durchgeführt, da nach Voruntersuchungen mikrobiologische Effekte am ehesten mit dem weniger reaktiven GG deutlich waren. Zudem werden die Sanierungszielwerte für die mit GG beschickte Wandhälfte der Reaktiven Wand in Rheine im Gegensatz zur ES-haltigen Hälfte nicht erreicht, so dass hier Handlungsbedarf besteht.

Während mit Säule C und D der Aufbau der mit GG-Kies-Gemisch befüllten Wandhälfte der Reaktiven Wand in Rheine simuliert werden sollte, wurden alternativ zwei Säulen (A und B) ausschließlich mit GG befüllt, um nachzuprüfen, ob die Reinigungsleistung durch eine höhere Raumdichte an GG durch Weglassen des Kieses verbessert werden kann.

Während der ersten 176 Tage wurden diese Säulen bei einem Eingangs-pH-Wert von ca. 8,7 betrieben, was den pH-Verhältnissen in einer Reaktiven Wand entspricht. Anschließend wurden nur Säule C und D weitergeführt. Der pH-Wert wurde auf ca. 7,0

gesenkt, um die pH-Verhältnisse im Eingangsbereich der Reaktiven Wand nachzustellen. Diese Absenkung des pH-Wertes konnte nur durch Erhöhung der Carbonatkonzentration erreicht werden, so dass auch eine verstärkte Ausfällung von Carbonaten erfolgte. Eine dadurch bedingte Passivierung der Eisenoberfläche und somit verringerte Freisetzung von H_2 wurde in Kauf genommen, da dechlorierende Bakterien noch bei sehr geringen H_2 -Konzentrationen metabolisch aktiv sein können [LÖFFLER et al., 1999].

4.3.1 Säulenversuche mit einem Eingangs-pH-Wert von 8,7

Säulen mit GG

Nach Beginn der Säulenversuche zeigten sich anfangs überlagernde Effekte der Adsorption an der Eisenoberfläche mit der Dechlorierung von PCE. Diese führten in den Säulen A und B dazu, dass bei einer Wiederfindungsrate an C_2 -Verbindungen von unter 20 % nur Ethen und Ethan freigesetzt wurden. Am Tag 22 betrug die C_2 -Wiederfindungsrate für die Säule A bereits 38 %, für die Säule B hingegen 22 %. Neben Ethan und Ethen wurde auch cDCE gebildet. Tendenziell stiegen im weiteren Verlauf die C_2 -Wiederfindungsraten an. Ab dem Tag 113 war kein cDCE mehr nachweisbar. Die C_2 -Wiederfindungsraten für die Säule A pendelten sich zwischen 60 und 105 % ein und es wurden überwiegend Ethen und Ethan in einem Verhältnis von etwa 3:1 gefunden.

Nach dem Beimpfen der Säule B am Tag 29 änderte sich die Dechlorierungscharakteristik gegenüber der abiotischen Säule A (reines GG) nur unwesentlich, so dass am 43. Tag erneut beimpft wurde (Abb. 4.31 unten). Im Vergleich zur Säule A (Abb. 4.31 oben) zeigten sich in Säule B bereits ab Tag 64 höhere Wiederfindungsraten von ca. 75 bis 105 %, wobei der Anteil an PCE und cDCE wesentlich höher lag. Die Konzentrationen an PCE stiegen bis zum 64. Tag, an cDCE bis zum 92. Tag weiter an, sanken dann aber unter die Nachweisgrenze. Nach 176 Tagen wurden ausschließlich Ethan und Ethen im Verhältnis 6:1 freigesetzt.

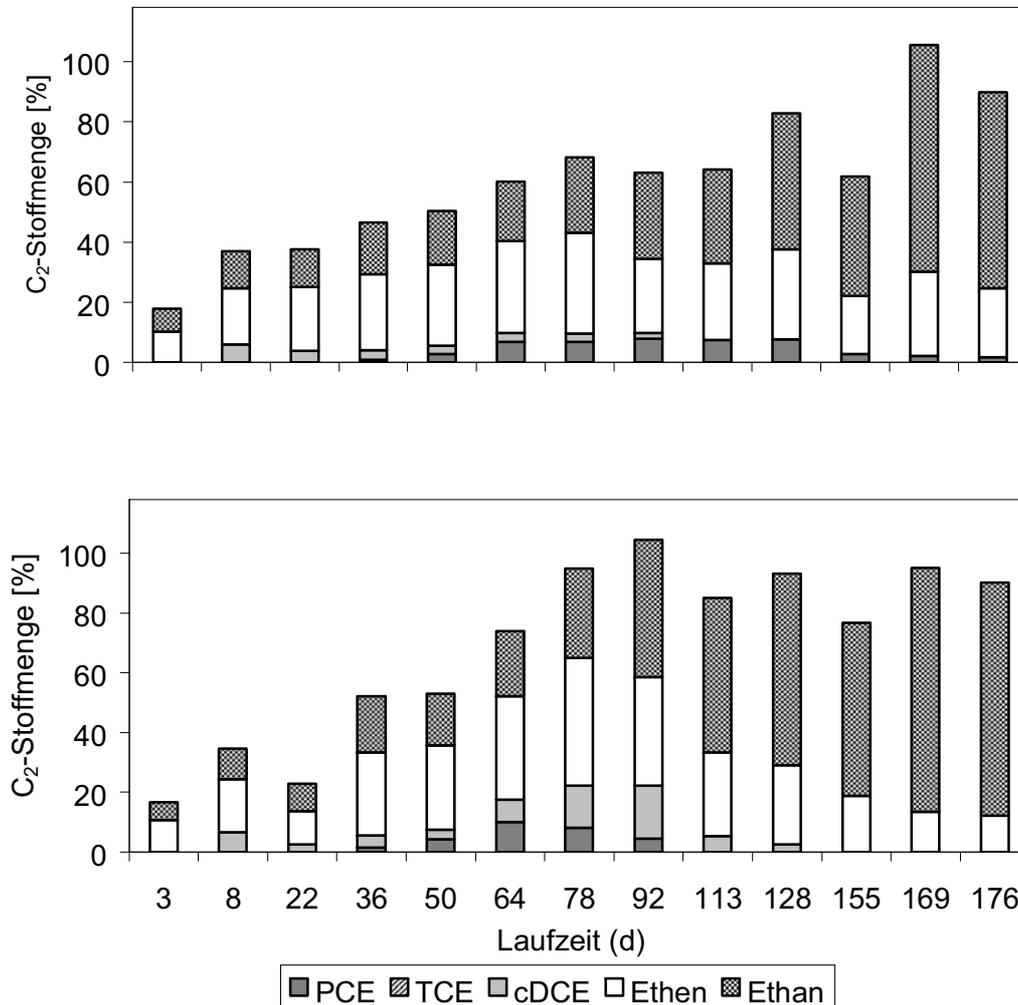


Abb. 4.31 C₂-Bilanz für Säule A (oben) und B (unten). Angegeben sind die Gehalte an C₂-Verbindungen am Ende der reaktiven Schüttung. Den Säulen wurden täglich 120 bis 160 µmol PCE zugeführt. Die Beimpfung der Säule B erfolgte am Tag 29 und 43.

Die pH-Werte in den Säulen A und B stiegen von ca. 8,7 am Säuleneingang auf 9,6 bis 9,7 am Ende der Eisenschüttung an. Nach einer Erhöhung der Vitamin B₁₂-Konzentration stieg der pH-Wert bis auf 9,9 an.

Säulen mit einem GG-Kies-Gemisch

In der Einlaufphase wurde nur bei der ersten Messung in der Säule C eine vollständige Abnahme von PCE beobachtet (Abb. 4.32 oben). Bereits ab Tag 8 verlangsamte sich die Abnahme von PCE. So waren in Säule C noch 30 % und in Säule D noch 39 % der PCE-Zulaufkonzentration nachweisbar. Die C_2 -Wiederfindungsrate stieg zu diesem Zeitpunkt für Säule C auf 60 % und für Säule D auf ca. 70 % an.

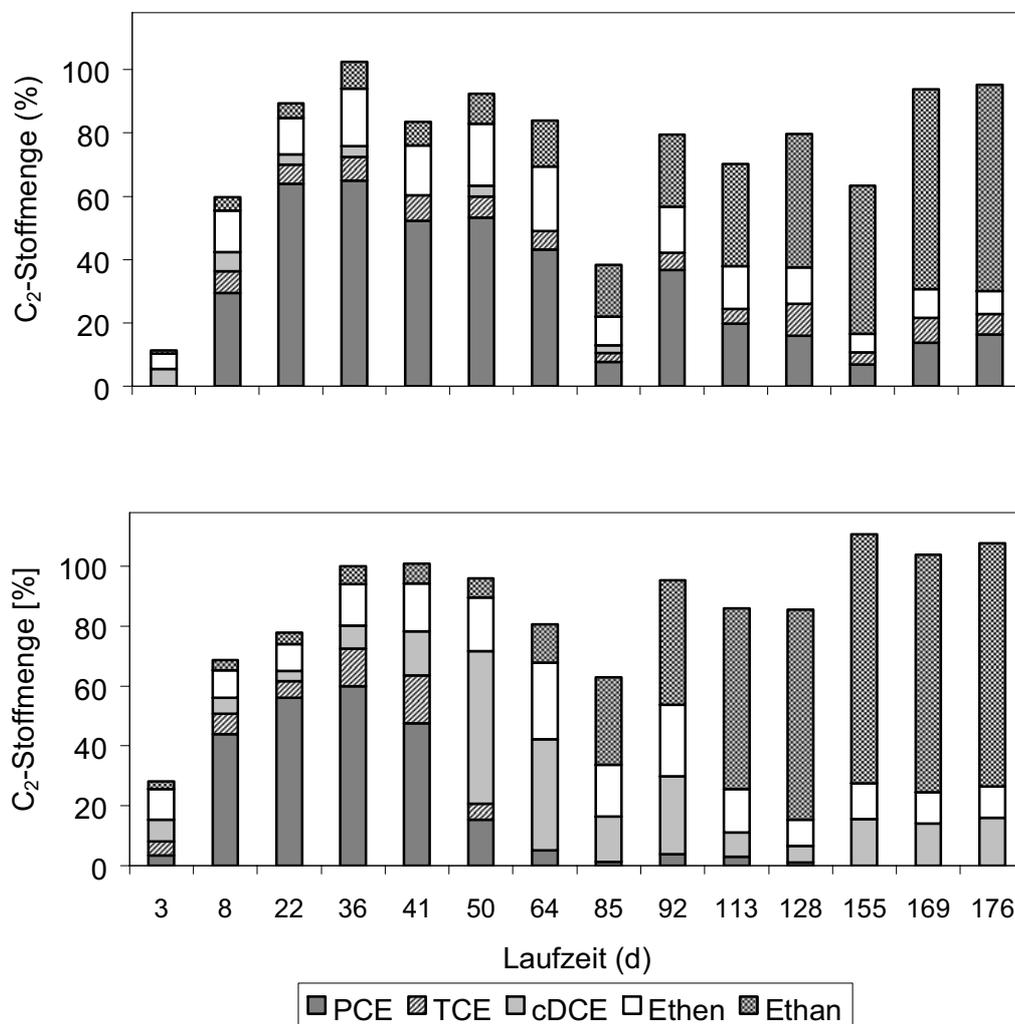


Abb. 4.32 C_2 -Bilanz für Säule C (oben) und Säule D (unten). Angegeben sind die Gehalte an C_2 -Verbindungen am Ende der reaktiven Schüttung. Den Säulen wurden täglich 120 bis 160 μmol PCE zugeführt. Die Beimpfung von Säule D erfolgte am Tag 29 und 43.

Nach dem Beimpfen der Säule D am Tag 29 zeigte sich eine Veränderung der Dechlorierungscharakterik nur in einem leichten Anstieg der Konzentration an cDCE, so dass am Tag 43 erneut beimpft wurde. Bereits am Tag 50 war eine deutliche Verbesserung der PCE-Dechlorierung zum cDCE zu verzeichnen. Die Konzentration an PCE und cDCE nahm im weiteren Verlauf zugunsten der Bildung von Ethan und Ethen weiter ab, so dass nach 155 Tagen ausschließlich cDCE, Ethan und Ethen freigesetzt wurden (Abb. 4.32 unten).

In Säule C und D erreichte der pH-Wert in den ersten Wochen am Ende der Schüttung nur Werte von 8,9 bis 9,0. Ab Tag 52 stiegen die Werte kontinuierlich an und erreichten ab Tag 80 pH-Werte von 9,6. Die pH-Werte von Säule D lagen geringfügig unter denen der Säule C.

Nach 137 Tagen wurden wässrige Proben aus den beimpften Säulen B und D aus den Ports 1 bis 8 entnommen. Mit den *Dehalococcoides* spezifischen Primern DHC 718V und DHC 1172R erfolgte eine Amplifizierung von Teilen des 16S rDNA von *Dehalococcoides spp.* mit Probenmaterial beider Säulen. Jedoch konnte nur in Proben aus dem ersten Port von Säule B und D ein Amplifikat erzielt werden (Abb. 4.33).

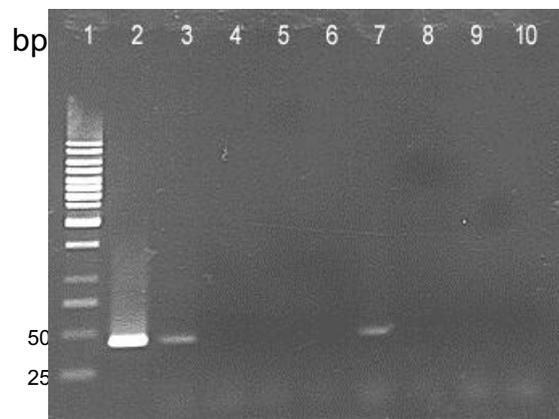


Abb. 4.33 Nachweis von *Dehalococcoides* Sequenzen mit *Dehalococcoides* spezifischen PCR Assay mit den Primern DHC 728V und DHC1172R in Proben aus Säule B und D nach 137 Tagen Laufzeit. Lane 1: Molekularer Gewichtsmarker Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas; St. Leon-Rot). Lane 2: gereinigte CBDB1-DNA als Template. Lane 3: Template aus Säule B, Port 1. Lane 4: Template aus Säule B, Port 2. Lane 5: Template aus Säule B, Port 3. Lane 6: Template aus Säule B, Port 8. Lane 7: Template aus Säule D, Port 1. Lane 8: Template aus Säule D, Port 2. Lane 9: Template aus Säule D, Port 3. Lane 10: Template aus Säule D, Port 8. Die Negativkontrolle mit H₂O zeigte kein Amplikon.

4.3.2 Säulenversuche mit Eingangs-pH-Wert von ca. 7,0

Da bei einem hohen Eingangs-pH-Wert von 8,7 keine optimalen Wachstumsbedingungen für reduktive Dechlorierer vorlagen, wurde im zweiten Zeitabschnitt Carbonatmedium (vgl. Kapitel 3.4.6) eingesetzt. Damit wurde der Eingangs-pH-Wert auf 7,0 bis 7,1 abgesenkt. Ziel dieser Untersuchungen war es, die prinzipielle Besiedlung des GG-Kies-Gemisches, wie es in Rheine verwendet wird, nachzustellen. H_2 -Messungen erfolgten nicht, da nach den vorhergehenden Messungen mit einem Eingangs-pH-Wert von ca. 8,7 davon auszugehen war, dass H_2 keinen limitierenden Faktor für die mikrobielle Dechlorierung darstellt. Die Ergebnisse für Säule D sind im Folgenden dargestellt.

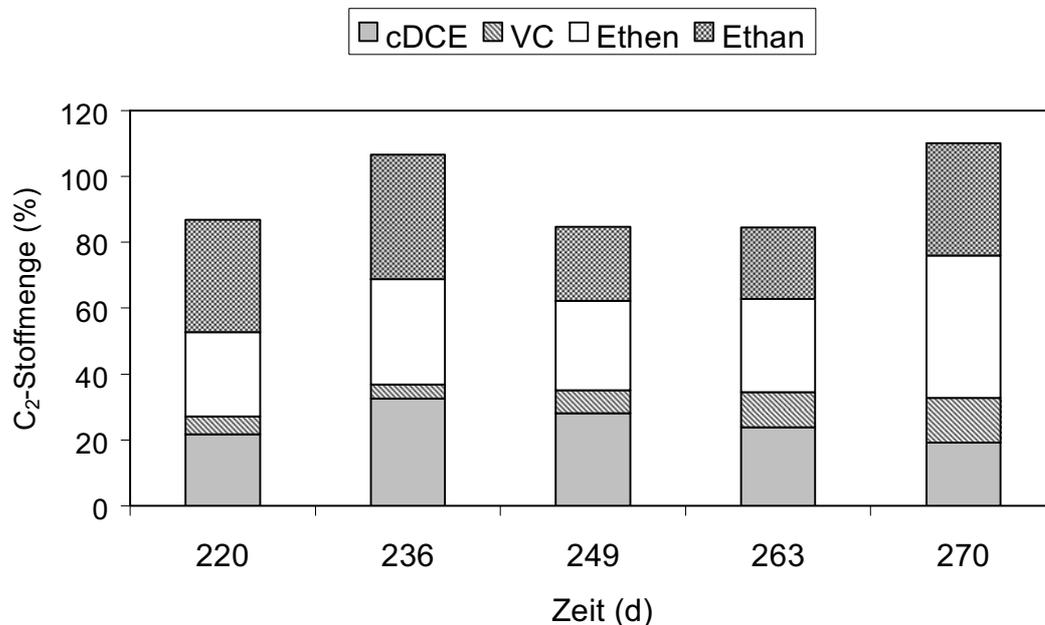


Abb. 4.34 C_2 -Bilanz für Säule D für die Laufzeit von 220 bis 270 Tagen. Angegeben sind die Gehalte an C_2 -Verbindungen am Ende der reaktiven Schüttung. Den Säulen wurden täglich 120 bis 160 μmol PCE zugeführt.

Nach Absenken des pH-Wertes wurden die Säulen noch weitere 94 Tage betrieben. Am Tag 184 und am Tag 217 erfolgte eine erneute Inokulation der Säule. Nach einer Laufzeit von 220 Tagen wurden bei einer C_2 -Wiederfindungsrate von ca. 80 % überwiegend cDCE, Ethen und Ethan gebildet. Da auch am Tag 236 die Produktverteilung keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurde versucht, durch die einmalige Zugabe von Methanol eine weitere Energiequelle bereitzustellen. Ein positiver

Effekt auf die Dechlorierung war nach einer Analyse nach weiteren drei Tagen (Tag 249) nicht sichtbar. Am Tag 270 wurden die Versuche abgeschlossen. Die Produktverteilung zeigte zu diesem Zeitpunkt einen relativ hohen Anteil an cDCE, VC sowie an Ethen und Ethan.

Die pH-Werte der Säule D lagen zwei Tage nach Medienwechsel bei 7,1 und stiegen bis zum Ende der Schüttung auf 7,5 an. Im Vergleich dazu stiegen die pH-Werte der Säule C am Ende der Schüttung bis zum Tag 193 auf 8,4 an und sanken bis zum Tag 235 auf 7,8 ab. Ab Tag 242 stellten sich pH-Werte von ca. 7,2 bis 7,4 ein.

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse für die Dechlorierung von PCE in der Säule D angegeben. Ein Vergleich der Dechlorierungsprodukte in Abhängigkeit von der Verweilzeit zeigt, dass in Säule D ein Teil des PCE bereits vor der reaktiven Schüttung (Port 1) dechloriert wurde. In Port 2, welches einer Verweilzeit von 2,3 h entspricht, war PCE vollständig umgesetzt, wobei cDCE, VC, Ethen und Ethan entstanden waren. Während cDCE sukzessive bis zu einer Verweilzeit von 9,3 h abnahm, stieg die cDCE-Konzentration nach 14 h Verweilzeit wieder an. Die Konzentration an VC hingegen nahm kontinuierlich ab, während die Konzentrationen an Ethen und Ethan bis zu einer Verweilzeit von 14 h zunahmen und dann konstant blieben.

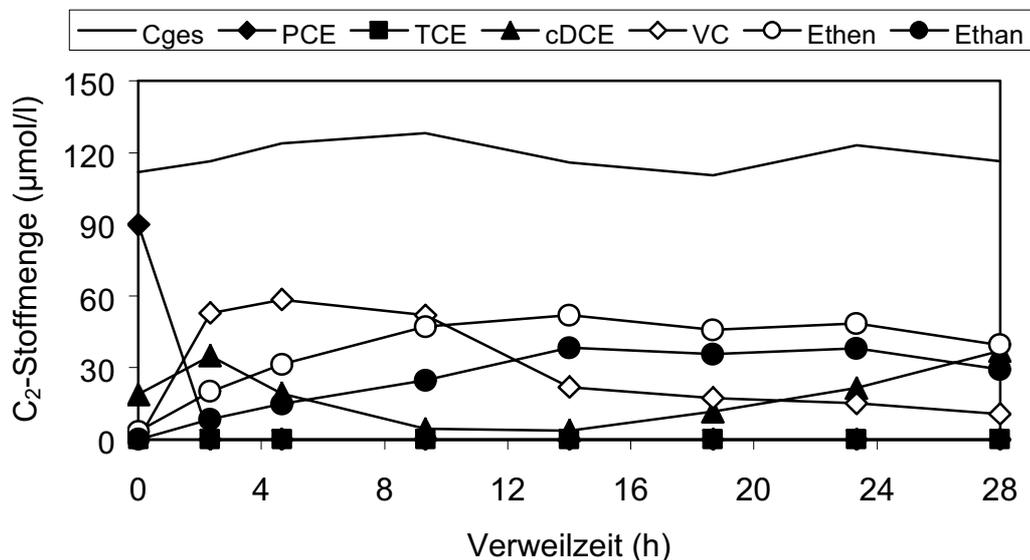


Abb. 4.35 Dechlorierung von PCE in Säule D nach 270 Tagen Inkubation

Am Tag 270 wurden zudem flüssige Proben für eine molekularbiologische Untersuchung genommen. Die Verwendung zweier *Dehalococcoides* spp. spezifischer Primer DHC718V und DHC1172R zur Amplifizierung von Teilen der 16S rDNA ergaben

ausschließlich Amplikons in Proben des Portes 1 und 2 der Säule D, wobei das Amplikon der Probe des Portes 2 nur sehr schwach war. Mit Proben aus Säule C konnte kein Amplikon nachgewiesen werden.

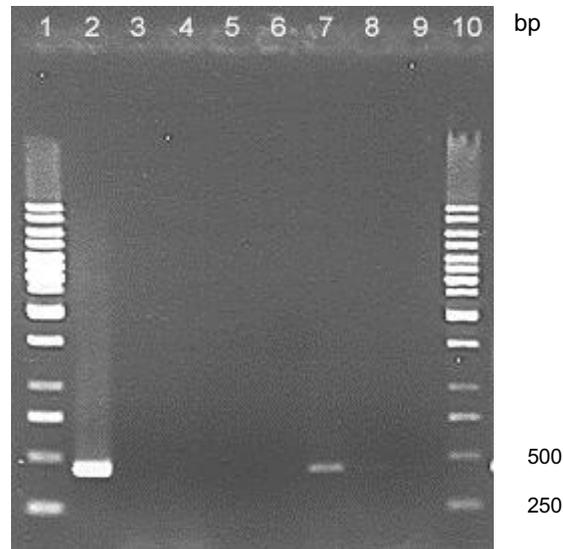


Abb. 4.36 Nachweis von *Dehalococcoides* Sequenzen mit *Dehalococcoides* spezifischen PCR Assay mit den Primern DHC 728V und DHC1172R mit Proben aus Säule C und D nach 270 Tagen Laufzeit. Lane 1 und 10: Molekularer Gewichtsmarker Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (MBI Fermentas St. Leon-Rot). Lane 2: gereinigte CBDB1-DNA als Template. Lane 3: Negativkontrolle: H₂O. Lane 4: Template aus Säule C, Port 1. Lane 5: Template aus Säule C, Port 2. Lane 6: Template aus Säule C, Port 7. Lane 7: Template aus Säule D, Port 1. Lane 8: Template aus Säule D, Port 2. Lane 9: Template aus Säule D, Port 3.

Durch Beimpfen von Batchansätzen mit Inokulum aus Port 1 der Säule D sollte der Einfluss der in den Säulen etablierten dechlorierenden Bakterien auf die Dechlorierung von PCE untersucht werden. Diese Ansätze ergaben nach einer 30tägigen Inkubation eine vollständige Umsetzung von PCE zu VC und nur wenig Ethen.

Die Ergebnisse belegen, dass eine Besiedlung im Säulenzulauf durch *Dehalococcoides* Spezies erfolgreich war, eine vollständige Dechlorierung von PCE zum Ethen jedoch nicht erreicht wurde.

5 Diskussion

5.1 Ökophysiologische Gruppen des reaktiven Materials

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus der Reaktiven Wand in Rheine sowie Eisenmaterial aus Säulenversuchen auf das Vorhandensein von ökophysiologischen Gruppen wie Denitrifikanten, Sulfatreduzierer (SRB), Acetogene, Methanogene und dechlorierende Bakterien untersucht. Das Material für die Säulenversuche in Kiel stammte aus der Reaktiven Wand in Rheine und wurde bei der ersten Probenahme in Rheine entnommen und in die Säulen eingebaut. Ziel war es, Alterungsprozesse der Reaktiven Wand im Labor nachzustellen. Vom Zeitpunkt der Probenahme aus der Reaktiven Wand in Rheine bis zur Probenahme aus den Säulen in Kiel waren ca. 6 Monate vergangen. Die Betriebszeit der Säulen entspricht für die GG-Kies-Säulen einer theoretischen Alterung unter Feldbedingungen von ca. 4 Jahren, für die ES-Säulen von ca. 2,7 Jahren. Mit mikrobiologischen Untersuchungen konnten die in Tab. 5.1 aufgeführten Gruppen nachgewiesen werden.

Tab. 5.1 Nachweis von ökophysiologischen Gruppen

Probenahme aus	Graugusseisengranulat (GG)-Kies-Gemisch	Eisenschwamm (ES)
Reaktive Wand in Rheine	+ Sulfatreduzierer	-- Sulfatreduzierer
	+ Denitrifikanten	+/- Denitrifikanten
	+ Acetogene	+ Acetogene
	+/- Methanogene	-- Methanogene
	-- Dechlorierer	-- Dechlorierer
Säulen in Kiel	+ Sulfatreduzierer	+ Sulfatreduzierer
	+ Denitrifikanten	+ Denitrifikanten
	+ Acetogene	+ Acetogene
	-- Methanogene	-- Methanogene
	+ Dechlorierer	-- Dechlorierer

Das Vorliegen einer biologischen Sulfat- und Nitratreduktion, wie von EBERT et al. [1999] vermutet wurde, konnte damit bestätigt werden. Mit den vorliegenden Ergebnissen wurden zudem erstmals Acetogene in einer bestehenden Reaktiven Wand nachgewiesen. Insbesondere das Vorhandensein von Acetogenen als Produzenten von

Acetat, einem wichtigen Kohlenstoff- und Elektronendonator für bakterielles Wachstum, wurde für Fe⁰-Reaktive Wände bzw. Säulen bislang nicht beschrieben. PCE-dechlorierende Bakterien konnten in den GG-Kies-Säulen nachgewiesen werden. Bisher wurden in einer Reaktiven Wand nur TCE dechlorierende Bakterien nachgewiesen werden [LIANG et al., 2000].

Die bereits nach dreimonatigem Betrieb sichtbar gewordenen biologischen Prozesse deuten darauf hin, dass eine Besiedlung des Eisens durch Bakterien aus der umgebenden Bodenmatrix erfolgt. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Untersuchung belegen, dass im Grundwasser des Anstrombereiches vor der Reaktiven Wand Sulfatreduzierer, Acetogene, Methanogene und Denitrifikanten vorhanden waren.

Für den Nachweis der verschiedenen Gruppen wurden Zellzahlen nach dem MPN-Verfahren ermittelt, sowie Kultivierungen in Form von Batch-Ansätzen durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahlen war notwendig, um die Stärke der mikrobiellen Besiedlung des Eisenmaterials festzustellen. Ergänzend wurden Kultivierungen durchgeführt, um festzustellen, ob die desorbierten Bakterien in der Lage waren, Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Nitrat, PCE etc. mit Fe⁰ als Elektronendonator umzusetzen. Diese Ergebnisse sind in Form von Elektronenbilanzen in Anlehnung an FENNELL et al. [1997] dargestellt (siehe Kapitel 4.1). Dabei wird der Umsatz an Elektronen in Redoxreaktionen berechnet. Dient beispielsweise H₂ als Elektronendonator, werden bei dessen Oxidation zwei Elektronen frei, die auf Sulfat, Nitrat, PCE oder CO₂ übertragen werden können. In der Elektronenbilanz wird somit die Zahl an übertragenen Elektronen, auch Äquivalente genannt, mit der Einheit μequiv angegeben. Je höher die Zahl an Äquivalenten ist, desto mehr Elektronen werden übertragen. Durch diese Art der Bilanzierung lassen sich neben biologischen Prozessen auch abiotische Prozesse einbeziehen. Durch die anaerobe Korrosion des Eisens werden Elektronen auf Hydronium-Ionen (H₃O⁺) transferiert, wobei H₂ entsteht. Dabei gilt, je größer die Anzahl der übertragenen Elektronen ist, desto reaktiver ist das Eisen.

5.1.1 Biologische Besiedlung des Graugusseisengranulat-Kies-Gemisches

5.1.1.1 Sulfatreduzierende Bakterien (SRB)

Eine Sulfatreduktion in Ansätzen mit Desorbat sowie die Bestimmung der Zellzahl belegen das Vorhandensein von sulfatreduzierenden Bakterien in der Reaktiven Wand in Rheine. Die Zellzahlen des Desorbates, bestimmt nach dem MPN-Verfahren, waren mit $6,6 \cdot 10^2$ bzw. 0,6/g GG-Kies-Gemisch jedoch sehr gering. In abiotischen Kontrollen mit Eisen fand keine Sulfatreduktion statt, wie bereits mehrfach für Batch- und Säulenversuche beschrieben wurde [SCHLICKER et al., 1998; DAHMKE et al., 2000; GU et al., 2002; NESTLER, 2002]. Eine Festlegung des Sulfates durch Bildung von Komplexen an (hydr)oxidischen Oberflächen wie von GUI & DEVINE [1994] beschrieben, konnte für die vorliegenden Versuche ausgeschlossen werden, da in abiotischen Ansätzen mit Fe^0 keine Verluste an Sulfat festgestellt wurden. Die in der Fe^0 -Reaktiven Wand in Rheine beobachteten Sulfat-Abnahmen sind somit auf eine mikrobielle Sulfatreduktion zurückzuführen. GU et al. [2002] wiesen ebenfalls sulfatreduzierende Bakterien in einer Reaktiven Wand mit Eisen nach 15monatiger Laufzeit durch DNA-Analysen sowohl auf dem reaktivem Material als auch im umgebenden Boden nach. Auch wurde die Existenz von sulfatreduzierenden Bakterien im umgebenden Aquifer einer Fe^0 -Reaktiven Wand bereits vereinzelt beschrieben [LIANG et al. 1997; 2000].

In den vorliegenden Untersuchungen ergab die Auswertung von biotischen Kontrollansätzen mit H_2 in Form von Elektronenbilanzen eine Nutzung von 85 % bzw. 99 % des dosierten H_2 für Sulfatreduktion und Acetatbildung. In biotischen Ansätzen mit Fe^0 wurde ebenfalls Acetat gebildet. Als Elektronendonator konnte damit neben dem vom Fe^0 produzierten H_2 auch das gebildete Acetat genutzt werden. Tatsächlich sind nur wenige Sulfatreduzierer bekannt, die autotroph mit H_2 und Sulfat zu wachsen vermögen. Die Mehrzahl der Sulfatreduzierer nutzt Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle [MADIGAN et al., 2001].

Während Aussagen über acetotrophe Sulfatreduzierer in Systemen mit Fe^0 nicht bekannt sind, untersuchten GU et al. [1999] in fünfmonatigen Säulenversuchen mit Fe^0 unter anderem den Einfluss von Sulfat auf die Langzeitstabilität eines Säulensystems. Da nach einer zweimonatigen Betriebszeit eine erhöhte Sulfatreduktion zu verzeichnen war, stellten GU et al. [1999] die Hypothese auf, dass der aus der Eisenkorrosion freigesetzte Wasserstoff das Wachstum von Bakterien förderte. Dabei fiel das gebildete

Sulfid als korrosionsinhibierendes FeS aus. Auch das anfangs als Green-Rust II ($\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) festgelegte Sulfat wurde mobilisiert und zu Sulfid reduziert.

5.1.1.2 Denitrifizierer

Die hohen Zellzahlen an Denitrifizierern lassen vermuten, dass in den beprobten Bereichen für diese Gruppe gute Wachstumsbedingungen vorliegen, möglicherweise gestützt durch die aeroben Verhältnisse des anströmenden Grundwassers. Denitrifikanten sind fakultativ anaerobe aber strikt respiratorische Bakterien [MADIGAN et al., 2001], die somit auch Bereiche in der Wand besiedeln können, in denen noch keine strikt anaeroben Bedingungen herrschen, H_2 als Elektronendonator aber bereits verfügbar ist. In biotischen Versuchen mit Fe^0 und Nitrat fand neben der Nitratreduktion auch die Bildung von Acetat statt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben H_2 auch Acetat als weiterer Elektronendonator genutzt wurde. MADIGAN et al. [2001] beschrieben denitrifizierende Homo-Acetogene, die sowohl CO_2 als auch Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen können.

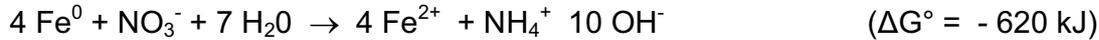
Durch die Beteiligung einer Nitratreduktion wurde Nitrat in biotischen Ansätzen mit Fe^0 wesentlich schneller reduziert als in abiotischen Ansätzen mit Fe^0 . So war in Ansätzen mit frischen GG mit Desorbat aus dem GG-Kies-Gemisch in Rheine Nitrat nach 17 Tagen nicht mehr nachweisbar, während in abiotischen Ansätzen mit GG auch nach 52tägiger Inkubation noch ca. 12 % Nitrat vorhanden waren. Eine noch schnellere Umsetzung wurde in biotischen Ansätzen mit Probenmaterial aus den Säulen in Kiel beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit den nach der MPN-Methode bestimmten Zellzahlen überein. Die Zellzahlen waren mit $1,4 \cdot 10^5/\text{g}$ für Probenmaterial aus der Reaktiven Wand in Rheine deutlich geringer als für die Säulen in Kiel mit $3,7 \cdot 10^7/\text{g}$ GG-Kies-Gemisch. Diese Differenz deutet darauf hin, dass in den beprobten Bereichen der zweiten Probenahme bessere Bedingungen für denitrifizierende Bakterien vorlagen.

In Vergleichsansätzen mit H_2 und Desorbat war die Elektronenbilanz fast ausgeglichen. Von 2240 μequiv dosierten Elektronen als H_2 wurde jedoch nur ein Bruchteil zur Denitrifikation verwendet. Der überwiegende Teil wurde für die Acetogenese verbraucht.

Die abiotische Reduktion von Nitrat durch Fe^0 zu Ammonium war in Ansätzen mit GG und Desorbat der biologischen Denitrifikation unterlegen, so dass nur ca. 16 % des Gesamtstickstoffs abiotisch umgesetzt wurden. KIELEMOES et al. [2000] beschrieb eine generelle Überlegenheit einer biologisch hydrogenotrophen Denitrifikation zum N_2

gegenüber einer abiotischen Nitratreduktion zum Ammonium aufgrund von thermodynamischen Gesichtspunkten:

Abiotische Reaktion:



Biologische Reaktion unter der Annahme, dass Fe^0 über die Bildung von H_2 als Elektronendonator dient:



Einen größeren Einfluss wird jedoch die Reaktivität des Fe^0 auf das Verhältnis von biologischer zu abiotischer Nitratreduktion haben, wie TILL et al. [1998] erstmals in Versuchen mit *Paracoccus denitrificans*, einem autotrophen Denitrifikanten, beschrieben. Mit Stahlwolle, welche mit $0,4 \text{ m}^2/\text{l}$ eine geringere spezifische Oberfläche als ebenfalls eingesetztes Eisenpulver mit $135 \text{ m}^2/\text{l}$ hatte und weniger reaktiv war, stieg der pH-Wert des Mediums nicht signifikant an. Der Anteil der Denitrifikation an der Umsetzung von Nitrat war wesentlich höher als in vergleichbaren Ansätzen mit dem Eisenpulver, in denen nach weniger als einem Tag Inkubation bereits pH-Werte von über 10 erreicht wurden. Während pH-Werte zwischen 6 und 9 die Denitrifikation nicht signifikant beeinflussten, war *P. denitrificans* nicht in der Lage, die Denitrifikation bei pH-Werten größer als 9 fortzusetzen.

5.1.1.3 Dechlorierende Bakterien

Ansätze mit Desorbat aus der Reaktiven Wand in Rheine ergaben durch Vergleich der Dechlorierungscharakteristik mit den abiotischen Fe^0 -Kontrollen keinen Hinweis auf das Vorhandensein von dechlorierenden Bakterien. Da die PCE-Konzentrationen von 25 bis 30 mg/l in den Ansätzen jedoch von acetogenen Bakterien toleriert wurden, wurde davon ausgegangen, dass die in der Eisenwand angesiedelten Bakterien an diese hohen PCE-Konzentrationen adaptiert sind. Da die in der Wand ankommende Schadstofffahne jedoch zum Zeitpunkt der Probenahme geringere PCE-Gehalte aufwies, wurde die PCE-Konzentration für die zweite Probenahme aus den Säulenversuchen auf 15 bis 20 mg/l herabgesetzt.

Für die Säulen in Kiel konnte eine biologisch induzierte Dechlorierung zu cDCE nachgewiesen werden. Die Dechlorierung von PCE in abiotischen Kontrollansätzen verlief dabei über TCE zu Ethen. Dass neben TCE keine weiteren chlorierten Ethene

detektiert wurden, deutete darauf hin, dass eine Dechlorierung des gebundenen PCE stattfand und erst Ethen als Endprodukt freigesetzt wurde. ARNOLD & ROBERTS [2000] postulierten, dass über reduktive β -Eliminierung PCE zu Ethen und Ethan umgesetzt wird. Eine analytische Erfassung von hochreaktiven Zwischenprodukten wie chlorierte Ethine und Ethin erwies sich als schwierig, da unter Normalbedingungen eine schnelle Reaktion zu Ethen und Ethan stattfindet [FARRELL et al., 2000 b]. Ein Teil des PCE adsorbiert an unreaktiven Plätzen der Eisenoberfläche [BURRIS et al., 1995], was die Minderbefunde in der Massenbilanz an C_2 -Verbindungen erklärt. BOKERMANN [2004] und BLOTEVOGEL [2003] stellten einen entsprechenden Effekt für Batch-Ansätze bzw. Säulenversuche fest.

Während die durch Fe^0 induzierte abiotische Dechlorierung von PCE zur Freisetzung von TCE und Ethen führte, wies die Bildung von cDCE und Ethen auf eine konkurrierende Dechlorierung durch biologisch induzierte Prozesse hin. Untermuert werden kann diese Behauptung durch die vollständige Umsetzung von PCE zu cDCE in einem Ansatz mit Desorbat, in dem Fe^0 durch H_2 ersetzt wurde. Die Elektronenbilanz für diesen Ansatz ergab eine Zudosierung von 1740 μ equiv als H_2 und einen Verbrauch durch Acetogenese und PCE-Dechlorierung von 1470 μ equiv. Da für die Reduktion von ca. 8 μ mol PCE zu cDCE nur etwa 16 μ mol Elektronen notwendig sind, wurde der überwiegende Teil für die Acetogenese verwendet. Entsprechendes beschrieben YANG & MCCARTY [1998]. Sie konnten in eigenen Untersuchungen zeigen, dass mit H_2 als Elektronendonator 88 % für die Acetogenese, 8 % für die Methanogenese und 4 % für die Dechlorierung verwendet wurden.

Überraschend war das Einsetzen der biologischen Dechlorierung zwischen Tag 23 und Tag 30 in den Ansätzen mit Desorbat und GG bzw. zwischen dem zweiten und dritten Probenahmetag (Tag 9 und Tag 23) in Ansätzen mit gealtertem GG. Einen entsprechenden Effekt beschrieben HE et al. [2002] für acetotrophe Dechlorierer. Auch hier setzte erst nach einer mehrwöchigen Lag-Phase eine biologisch induzierte Dechlorierung von PCE ein. Sie vermuten, dass durch hydrogenotrophe Acetogene Acetat angereichert wird, wodurch die Wachstumsbedingungen für dechlorierende Bakterien verbessert werden. LEE et al. [2001] konnten in Versuchen mit *Desulfitobacterium* sp. Stamm Y-51 zeigen, dass Fe^0 als Elektronendonator zur Dechlorierung von PCE zu cDCE verwendet wurde. In biotischen Ansätzen mit 0,1 Gew.-% Fe^0 setzte eine signifikante Dechlorierung von PCE ebenfalls erst nach einer Lag-

Phase von ca. 12 Tagen ein. Da *Desulfitobacterium* Spezies zwar H_2 , jedoch kein Acetat verwertet, kann der Einfluss von acetogenen Bakterien ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist, dass die Bakterien eine gewisse Adaptionszeit benötigten, um sich an die veränderten Kultivierungsbedingungen zu gewöhnen.

Der Versuch, die im Desorbat vorliegenden dechlorierenden Bakterien durch sequentiellen Transfer zu kultivieren, ergab auch nach mehrmaligem Überimpfen in PCE-haltigem Medium mit GG stets eine Anreicherung von cDCE. Da Acetat als C-Quelle zudosiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl H_2 wie auch Acetat als Elektronendonator gedient haben. Eine Vielzahl von Reinkulturen wurden beschrieben, die PCE zu cDCE dechlorieren. *Desulfitobacterium* Spezies, *Dehalobacter restrictus*-Stämme sowie *Dehalospirillum multivorans* nutzen dabei H_2 als Elektronendonator [UTKIN et al., 1994; SCHOLZ-MURAMATSU et al., 1995; WILD et al., 1996; MILLER et al., 1996; HOLLIGER et al., 1998], während *Desulfuromonas* Spezies und *Enterobacter* Stamm MS-1 Acetat benötigen [SHARMA & MCCARTY, 1996; KRUMHOLZ, 1997; SUNG et al., 2003]. Insbesondere die acetatverwertenden *Desulfuromonas michiganense* BB1 und BRS 1, für die ein Wachstum noch bei 10°C und pH-Werten von 8,0 nachgewiesen wurde (siehe Tab. 2.4), sind als mögliche Besiedler von Fe^0 -Reaktiven Wänden denkbar. Für Mischkulturen sind auch syntrophe Assoziationen beschrieben, die in der Lage sind, PCE umzusetzen [HOLLIGER et al., 1999].

5.1.1.4 Acetogene und Methanogene

In diesem Kapitel wird die Diskussion um den Nachweis von Acetogenen und Methanogenen gemeinsam geführt, da beide Gruppen sowohl um H_2 als Elektronendonator als auch um CO_2 als Elektronenakzeptor konkurrieren. Auch können viele Methanogene Acetat nutzen [SCHINK, 1997]. Da in den Ansätzen zum Nachweis von sulfatreduzierenden, denitrifizierenden und dechlorierenden Bakterien ein Carbonatmedium verwendet wurde, war in allen Ansätzen die Bildung von Methan und Acetat möglich. Überraschend war das Ergebnis, dass in allen Ansätzen zwar Acetat aber nur in wenigen Ansätzen Methan feststellbar war. Unter Standardbedingungen können Methanogene durch H_2 -Oxidation mehr Energie gewinnen als acetogene Bakterien, so dass sie erfolgreich gegen acetogene Bakterien konkurrieren können (ΔG^0 von $-33,9\text{kJ/mol } H_2$ gegenüber $-26,1\text{ kJ/mol } H_2$ [LÖFFLER et al., 1999]).

Um beide Gruppen voneinander zu unterscheiden, wurde in den Ansätzen 2-Bromethansulfonat (BES) als spezifischer methanogener Inhibitor bzw. Vancomycin als eubakterieller, folglich als acetogener Inhibitor eingesetzt.

Inhibierung der Methanogenese durch BES

Die Wirkung von BES beruht auf einer Strukturhomologie zu Mercaptoethansulfonat, bekannt als Cofaktor des Coenzym M (CoM) in Methanogenen. CoM wird für die terminale Methylierung benötigt, bei der der Methyl-CoM-Reduktase-Enzym-Komplex beteiligt ist und Methan freigesetzt wird. BES inhibiert somit das Wachstum von Methanogenen sowohl mit H_2 als auch mit Acetat und anderen organischen Substanzen als Elektronendonator [OREMLAND & CAPONE, 1988]. In eigenen Untersuchungen mit H_2 erwiesen sich 4 mM BES als ausreichend, um die Methanogenese vollständig zu hemmen. In Ansätzen mit GG wurde die Methanogenese jedoch nicht vollständig inhibiert. Einen entsprechenden Effekt beschrieb NESTLER [2002] für Versuche mit einer sulfatreduzierenden Mischkultur. Als Ursache für diese unvollständige Inhibierung sind zwei Möglichkeiten denkbar. Wie von YE et al. [1999] und CHIU & LEE [2001] vermutet, kann es durch die hohe sulfatreduzierende Aktivität in den Ansätzen zur Reduktion der Sulfonatgruppe des BES kommen, wodurch die Hemmwirkung aufgehoben wird. Für die vorliegenden Untersuchungen ist jedoch wahrscheinlicher, dass eine Reduktion des BES durch das Fe^0 stattfindet, da in Vergleichsansätzen mit H_2 eine vollständige Inhibierung der Methanogenese zu beobachten war.

Inhibierung der Acetogenese durch Vancomycin

Das Antibiotikum Vancomycin ist ein Glykopeptid von 1,5 kD Größe, welches die Transpeptidbindung in der Biosynthese des Mureins verhindert und somit mikrobiozid gegen Gram-positive Bakterien wirkt [NEUMÖLLER, 1988]. Auch Vancomycin führte in den vorliegenden Untersuchungen nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Acetogenese in Ansätzen mit GG und ES. Da energetische Betrachtungen ergeben, dass die Methanogenese mit H_2 ein günstigerer Prozess ist als die Acetogenese, wurde in der ersten Versuchsreihe davon ausgegangen, dass H_2 primär von Methanogenen verwendet wird und somit wurde auf die Zugabe von Vancomycin für den Nachweis von Methanogenen verzichtet. Wegen der starken Acetogenese in diesen Ansätzen wurde beim zweiten Versuchsdurchlauf Vancomycin eingesetzt, um die Acetogenese zugunsten einer hydrogenotrophen Methanogenese zu unterdrücken.

Interessanterweise konnte in den Ansätzen der zweiten Probenahme aus den Säulen in Kiel weder mit ES noch mit GG als Elektronendonator eine Methanogenese nachgewiesen werden. Daraus lässt sich folgern, dass in diesen Proben keine Methanogenen vorhanden waren.

Acetogenese versus Methanogenese

Während der Nachweis von Methanogenen in Proben aus der Reaktiven Wand positiv, in Proben aus den Säulen in Kiel negativ war, war die Acetogenese der dominierende Prozess auch in Ansätzen mit Sulfat oder Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor.

Das Fehlen von Methanogenen kann verschiedene Ursachen haben:

1. Im anströmenden Grundwasser waren keine Methanogenen vorhanden.
2. Eine Ansiedlung von Methanogenen erfolgte aufgrund von ungünstigen Bedingungen nicht.
 - a. Erfolgreiche Konkurrenz mit Acetogenen um den Elektronenakzeptor CO_2
 - b. Inhibierung der Methanogenese durch Grundwasserinhaltsstoffe bzw. toxische Substanzen.

Ein Vergleich mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergab, dass methanogene Reinkulturen Fe^0 prinzipiell für die Methanbildung nutzen können [DANIELS et al., 1987; BELAY & DANIELS, 1990]. Gu et al. [2002] zeigten für Proben aus einer Reaktiven Wand eine wenn auch schwache Methanogenese. Aussagen über eine acetogene Beteiligung fehlten. Sie vermuten, dass Sulfatreduzierer durch höhere Affinität zum H_2 und konstant hohe Sulfatkonzentrationen im Anstrom der Wand erfolgreich gegen Methanogene konkurrieren. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam SCHOLTEN et al. [2002]. Sie beschrieben für Süßwasser-Sedimente in den Niederlanden, dass Acetat das wichtigste Substrat für die Methanproduktion darstellt. In Konkurrenz um Acetat mit Sulfatreduzierern unterlagen jedoch die Methanogenen, wie auch thermodynamische Berechnungen bestätigen. NESTLER [2002] fand ebenfalls eine höhere Affinität von sulfatreduzierenden Bakterien zum H_2 als von Methanogenen. Da in den Ansätzen, die im Rahmen dieser Arbeit angelegt wurden, jedoch Sulfat fehlte, schied eine direkte Konkurrenz um H_2 als Ursache für das Fehlen einer Methanogenese aus. Eine Konkurrenz mit Acetogenen wäre jedoch prinzipiell denkbar.

Suboptimale Bedingungen als Ursache für das Fehlen einer Methanogenese beschrieben FEY & CONRAD [2000]. Sie stellten fest, dass im Aquifer Methanogene den Acetogenen bedingt durch die geringen Temperaturen unterlegen waren. Die in Rheine gemessenen Grundwasser-Temperaturen betragen ca. 10°C. Die Versuche selber wurden jedoch bei 24°C durchgeführt, so dass dieser Aspekt bei Vorhandensein von Methanogenen nicht ausschlaggebend gewesen wäre.

Hemmende Effekte wurden ebenfalls von SCHOLTEN et al. [2002] beschrieben. Obwohl Denitrifizierer gegen Methanogene um Acetat nicht konkurrieren konnten, führte Nitrat zu einer vollständigen Inhibierung der Methanogenese. Sie vermuteten, dass durch die Anreicherung geringer Konzentrationen an NO ($< 0,2$ mM) die Methanogenen gehemmt wurden. Eine Hemmung der acetotrophen Methanogenese durch Chlorethene stellten CHRISTIANSEN et al. [1997] und HE et al. [2002] fest. Eine Empfindlichkeit von Methanogenen gegenüber hohen Konzentrationen an PCE wurde zudem von FREEDMAN & GOSSETT [1989] und DISTEFANO et al. [1991] beschrieben.

Die genaue Ursache für die im Verhältnis zur Acetogenese geringe Methanogenese lässt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht ableiten. Für den Betrieb einer Fe⁰-Reaktiven Wand ist eine verminderte bzw. ausbleibende Methanogenese durchaus von Vorteil, da Methan gemeinsam mit dem durch die anaerobe Korrosion produzierten H₂ einen negativen Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit der Wand haben kann.

5.1.2 Nachweis einer mikrobiologischen Besiedlung des Eisenschwamms

Eine prinzipielle mikrobiologische Besiedlung des Eisenschwamms konnte für die Proben aus der Reaktiven Wand in Rheine festgestellt werden. Während eine ausgeprägte Acetogenese nachgewiesen werden konnte, war nur eine schwache Denitrifikation, keine Sulfatreduktion, keine Methanogenese oder keine biologisch induzierte Dechlorierung festzustellen. Kultivierungsbedingungen als Ursache können ausgeschlossen werden, da nach der zweiten Probenahme in Ansätzen mit Desorbat des GG-Kies-Gemisches und ES als Elektronendonator eine Sulfatreduktion, Denitrifikation und Acetogenese nachgewiesen werden konnte. Auch die Vermutung, dass die Probenahme im nicht mikrobiologisch besiedelten Bereich der Reaktiven Wand stattgefunden hatte, kann nicht bestätigt werden, da eine acetogene Aktivität zweifelsfrei nachgewiesen wurde. Somit muss die Ursache in der Probenahme bzw. –aufbereitung gesucht werden. Der Zeitraum der Probenahme in Rheine bis zur Probenaufbereitung

betrug 36 h. Ausschlaggebend wird jedoch der Anstieg des pH-Wertes während der Probenaufbereitung gewesen sein. Dieser stieg kurzzeitig bis auf 9,5 an und betrug am Ende 9,0. Nur acetogene Bakterien und wenige denitrifizierende Bakterien schienen solche Bedingungen überdauern zu können. Für die Säulen in Kiel muss somit bedacht werden, dass das Eisenmaterial aus Rheine, mit dem diese Säulen befüllt wurden, gelagert wurde und somit ein pH-Anstieg in den Probengefäßen zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Mikroorganismen geführt haben kann. Von der Materialentnahme in Rheine bis zum Befüllen der Säulen waren mehrere Tage vergangen [EBERT, 2002]. Ein direkter Vergleich beider Probenahmen ist somit für beide Eisensorten fraglich.

5.1.3 Vergleich der Eisensorten in Hinblick auf ihre Reaktivität und eine mikrobiologische Besiedlung

Vergleich der Reaktivität

Die in der Reaktiven Wand in Rheine verwendeten Eisensorten GG und ES weisen bzgl. ihrer BET-spezifischen Oberflächen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Reaktivität beider Eisensorten in Batch-Ansätzen mit Hydrogencarbonat-Puffer und einer N_2/CO_2 -Gaspase hingegen zeigte gravierende Unterschiede in der Entwicklung von H_2 . In abiotischen Kontrollen stiegen die pH-Werte mit ES wesentlich stärker an als mit GG (Tab. 5.2). Eine entsprechende Beobachtung machten VENKATAPATHY et al. [2002]. Sie stellten fest, dass die BET-spezifische Oberfläche nicht mit der Anzahl an reaktiven Plätzen auf der Eisenoberfläche korreliert. Durch Verwendung eines Carbonatpuffers können zudem katalytische Prozesse durch Bestandteile des Eisens stärker wirksam geworden sein. Prinzipiell wird durch Kohlensäure und Hydrogencarbonat die anaerobe Korrosion beschleunigt (siehe Kapitel 2.3.1). Eine positiv lineare Abhängigkeit zwischen den molaren Ausgangskonzentrationen an Kohlensäure und Hydrogencarbonat und der H_2 -Entwicklungsrate wurde ausführlich beschrieben [REARDON, 1995]. Die Förderung der Korrosion führt durch zunehmende H_2 -Entwicklung einhergehend mit dem Verbrauch an Hydronium-Ionen zum Ansteigen des pH-Wertes [GU et al., 1999; BOKERMANN, 2004].

Tab. 5.2 Vergleich der Eisensorten Eisenschwamm und Graugusseisengranulat

Ansätze	Parameter	4 Gew.-% ES	2 Gew.-% GG
Abiotisch mit Fe ⁰	End-pH-Werte	bis zu 10	ca. 8
Biotisch mit Fe ⁰ und Desorbat	Elektronentransfer [μequiv]	2350 - 3250	450 - 980
“	Bildung von Acetat [mg/l]	170 – 445	bis zu 75

Entsprechende Unterschiede zeigten sich auch in biotischen Ansätzen. Die Anzahl an transferierten Elektronen war in den Ansätzen mit GG und Desorbat wesentlich niedriger als in entsprechenden Ansätzen mit ES. Der überwiegende Anteil an Elektronen wurde dabei auch in Ansätzen mit Sulfat, Nitrat oder BES für die Acetatbildung verwendet. Somit wurde mit ES als Elektronendonator wesentlich mehr Acetat gebildet als mit GG (Tab. 5.2).

Vergleich der mikrobiologischen Besiedlung

Eine nachlassende Reaktivität des Eisens führt zwangsläufig zu einer Verminderung der Dechlorierungsraten. Als mögliche Ursachen für diesen Reaktivitätsverlust gelten Passivierungen der Eisenoberfläche durch Ausbildung von Präzipitaten [ROH et al., 2000] sowie möglicherweise die Ansiedlung von Mikroorganismen [LIANG et al., 2000].

Um Unterschiede bezüglich der mikrobiellen Besiedlung über die Laufzeit der Reaktiven Wand zu ermitteln, wurden die Zellzahlen der GG-Kies-Desorbate der ersten Probenahme aus der Reaktiven Wand in Rheine mit der zweiten Probenahme aus den Säulen in Kiel verglichen (Tab. 5.3).

Tab. 5.3 Vergleich der Zellzahlen (nach MPN-Verfahren) des Desorbates von dem GG-Kies-Gemisch aus zeitlich versetzten Probenahmen (n.n.: nicht nachweisbar)

	Reaktive Wand in Rheine [Zellzahl/g TS]	Säulen in Kiel [Zellzahl/g TS]
Denitrifikanten	1,4*10 ⁵	3,7*10 ⁷
Sulfatreduzierer	6,6*10 ²	0,7
Acetogene	0,9*10 ⁴	25
Methanogene	n.n.	n.n.

Eine Zunahme der Zellzahlen konnte nur für Denitrifikanten ermittelt werden, während die Zellzahlen für Sulfatreduzierer und Acetogene abnahmen. Methanogene ließen sich nach dem MPN-Verfahren nicht nachweisen. Da Denitrifikanten im Gegensatz zu den strikt anaeroben Sulfatreduzierern und Acetogenen auch unter aeroben bzw. anoxischen Bedingungen metabolisch aktiv sein können, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass im Gegensatz zu der Reaktiven Wand in Rheine in den Säulen bzw. bei der Überführung des Eisenmaterials in die Säulen keine strikt anaeroben Verhältnisse vorlagen. Ursache können beispielsweise O₂-Durchlässigkeiten im Säulensystem (zuführende Schläuche, Versorgung mit Standortwasser, Säulenmaterial) oder durch die Lagerung des Grundwassers in O₂-durchlässigen Kanistern sein. Die Auswertung der Zellzahlen zeigt somit, dass in Hinblick auf Alterungsprozesse ein Vergleich der Ergebnisse beider Probenahmen nicht zulässig ist.

5.1.4 Mikroorganismen im Grundwasser

Im Grundwasser des Anstrombereiches der Wand in Rheine konnten sulfatreduzierende, denitrifizierende Bakterien, Acetogene und Methanogene nachgewiesen werden. Die nach der MPN-Methode ermittelten Zellzahlen waren nur für Denitrifizierer mit $9,3 \cdot 10^2$ /ml und für Acetogene/Methanogene mit 15/ml auswertbar. Die höheren Zellzahlen an Denitrifikanten lässt sich durch die oxischen Verhältnisse des Grundwassers erklären. Analysenberichten zufolge lag im Grundwasser des Anstrombereiches ein leicht positives Redoxpotenzial und somit ungünstige Bedingungen für strikt anaerobe Bakterien vor. Während die Ermittlung der Zellzahlen nach der MPN-Methode für Sulfatreduzierer keine auswertbaren Ergebnisse brachte, konnten eine Sulfatreduktion in parallel durchgeführten Anreicherungen in Form von Batch-Ansätzen zwar nachgewiesen werden, jedoch setzte diese in Ansätzen mit GG als Elektronendonator erst sehr spät ein.

Der Nachweis von acetogenen Bakterien war positiv. Es zeigte sich jedoch, dass trotz Zugabe von 4 mM BES Methan gebildet wurde. In Ansätzen mit Vancomycin hingegen wurde weder Acetat noch Methan gebildet. Durch Ausschalten der konkurrierenden Acetogenen hätten für hydrogenotrophe Methanogene gute Wachstumsbedingungen vorgelegen. Das Fehlen einer Methanogenese in Ansätzen mit Vancomycin deutet darauf hin, dass im Grundwasser acetotrophe Methanogene vorhanden waren.

5.1.5 Desorption von Mikroorganismen von der Eisenoberfläche

Versuche zur Desorption der Bakterien von der Eisenmatrix zeigten, dass mit der hier eingesetzten Methodik eine vollständige Desorption nur für dechlorierende Bakterien erfolgreich war. Sulfatreduzierende, denitrifizierende, acetogene Bakterien und, soweit vorhanden, Methanogene ließen sich auch nach erfolgter Desorption durch Kultivierung des desorbierten Eisens nachweisen. Die Tatsache, dass dechlorierende Bakterien vollständig abgelöst wurden, kann bedeuten, dass nur eine oberflächliche Adsorption an die Eisenoberfläche vorlag, während andere Gruppen möglicherweise Bestandteil eines Biofilms waren. Eine Besiedlung der zur Verfügung stehenden Oberflächen konnte somit indirekt belegt werden. GANDHI et al. [2002] stellten mittels SEM-Analysen fest, dass Eisen in bioaugmentierten Säulen eine Besiedlung von Bakterien auf der Oberfläche von Eisenoxiden zeigte. Eine Besiedlung von Bakterien auf der Eisenoberfläche bis in kleine Risse stellten LAMPRON et al. [2001] mittels Konfokalmikroskopie dar. Eine gezielte Besiedlung von Fe^0 -Oberflächen durch denitrifizierende Bakterien konnten DEJOUNETT & ALVAREZ [1999] in mit Eisen-Kies-Gemisch befüllten Säulen nachweisen.

5.1.6 Eignung des Batch-Systems für mikrobiologische Untersuchungen

Die Auswertung der Ergebnisse aus den Batch-Ansätzen erfolgte anhand der Ermittlung der transferierten Elektronen, angegeben als Elektronenäquivalente. Dabei wurden die Elektronen erfasst, die zur H_2 -Entwicklung verbraucht bzw. für Reduktionsprozesse wie Sulfatreduktion, Nitratreduktion etc. benötigt wurden. Nicht erfasst werden konnten Elektronen, die für das Zellwachstum genutzt wurden. Da für den Nachweis von einigen Gruppen Inhibitoren wie Vancomycin oder BES eingesetzt wurden, konnte in Kontrollansätzen der Einfluss dieser Inhibitoren auf die H_2 -Entwicklung bestimmt werden. In abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG ohne Inhibitoren, mit Sulfat oder mit Nitrat konnte ein Transfer von ca. 800 bis ca. 900 μequiv an Elektronen berechnet werden.

Tab. 5.4 Darstellung der übertragenen Elektronen in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und Vancomycin, Nitrat oder Sulfat sowie ohne weitere Zusätze.

Tripletts ^{a,b} Abiotische Ansätze mit 2 Gew.-% GG	H ₂ -Produktion (μequiv) ^c	Sulfatreduktion (μequiv) ^c	Reduktion von Nitrat zu NH ₄ ⁺ (μequiv) ^c	Übertragene Elektronen (μequiv) ^c
Ohne Zusatz	850	-	-	850
Vancomycin	860	-	-	860
Ca. 50 mg/l Nitrat	520	-	290	810
Ca. 100 mg/l Sulfat	870	-	-	870

^a Inkubationszeit 50 bis 58 Tage; ^b Mittelwerte von Triplets; ^c Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Ammonium: 8, H₂: 2, N₂: 5.

Da in Gegenwart von Nitrat bei gleichbleibender Menge an transferierten Elektronen weniger H₂ freigesetzt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass die abiotische Reduktion von Nitrat auf Kosten einer H₂-Freisetzung erfolgte. Vancomycin zeigte keinen Effekt auf die H₂-Entwicklung, während BES zu einer verringerten H₂-Freisetzung (transferierte Elektronen 540 bzw. 560 μequiv mit GG) führte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob die verminderte H₂-Freisetzung durch Adsorption an reaktiven Plätzen oder durch Reduktion von BES erfolgte.

Die Eignung dieses Batch-Systems ist stark von der Eisensorte abhängig. Während mit dem weniger reaktiven GG gute Resultate erzielt wurden, konnten Versuche mit ES nur zum Teil ausgewertet werden, da durch die hohe Reaktivität dieser Eisensorte eine nicht zu quantifizierende H₂-Menge entwickelt wurde.

Der Nachweis von Mikroorganismen läßt sich somit nach den vorliegenden Ergebnissen in Abhängigkeit von der Eisensorte über eine Kultivierung in Batch-Ansätzen führen.

5.1.7 Auswirkungen von Mikroorganismen auf das Langzeitverhalten einer Reaktiven Wand

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ökophysiologische Gruppen wie die Denitrifikanten, die Sulfatreduzierer und die Acetogenen sowie in geringem Maße auch Methanogene in der Reaktiven Wand in Rheine nachgewiesen. Das Vorliegen einer biologischen Sulfat- und Nitratreduktion wurde von EBERT et al. [1999] bereits vermutet, da nach einer dreimonatigen Betriebszeit Ammonium als Produkt der abiotischen Nitratreduktion und

das abiotisch nicht umsetzbare Sulfat nicht mehr im Abstrombereich feststellbar waren. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Acetogene in einer Reaktiven Wand nachgewiesen. Insbesondere das Vorhandensein von acetogenen Bakterien wurde für Reaktive Wände mit Eisen bislang nicht beschrieben. In Säulen, die mit GG-Material der Reaktiven Wand in Rheine befüllt waren, konnten zudem PCE dechlorierende Bakterien nachgewiesen werden.

In der folgenden Abbildung sind für die Reaktive Wand in Rheine neben den abiotischen Prozessen die möglichen Auswirkungen der biologischen Besiedlung dargestellt.

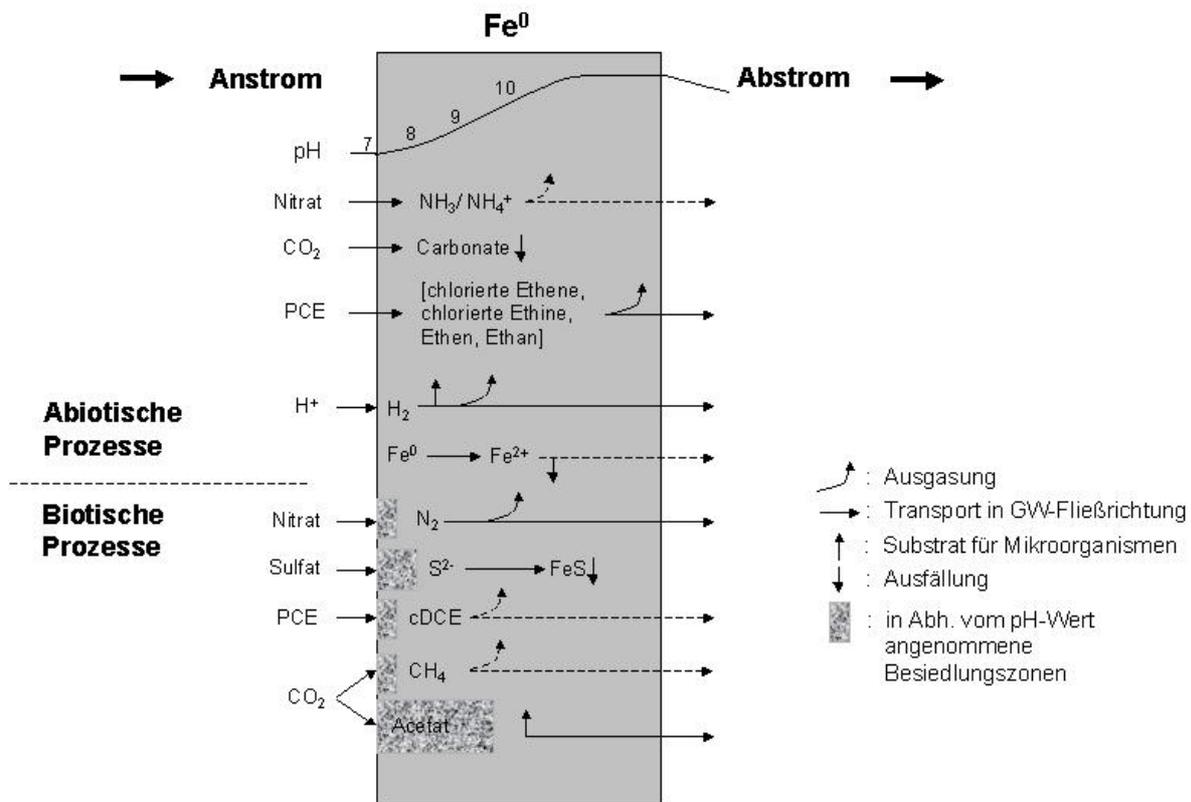


Abb. 5.1 Möglicher Einfluss von abiotischen und biologischen Prozessen in der Reaktiven Wand in Rheine. Das aus der anaeroben Eisenkorrosion gebildete H_2 sowie Acetat können Mikroorganismen als Elektronendonator dienen. H_2 , N_2 , CH_4 sowie cDCE können ausgasen, während FeS in der Wand präzipitiert.

Welche Auswirkungen hat diese mikrobiologische Besiedlung auf das Langzeitverhalten der Reaktiven Wand in Rheine? Aufgrund der auch nach ca. 3 Jahren Laufzeit geringen Zellzahlen kann ein Bioclogging zum heutigen Zeitpunkt ausgeschlossen werden. Bei weiter nachlassender Reaktivität des Eisens kann in Zukunft die Bedeutung von mikrobiologischen Effekten jedoch zunehmen.

Der Einfluss von dechlorierenden Bakterien auf die Dechlorierungsleistung ist auf Grundlage der vorliegenden Untersuchungen zu vernachlässigen. Methanogene werden vermutlich durch konkurrierende sulfat- und nitratreduzierende Bakterien verdrängt, so dass auch weiterhin keine größeren Mengen an Methan gebildet werden.

Ein Vergleich mit bisherigen Studien ergab sehr unterschiedliche Aussagen bezüglich einer mikrobiologischen Besiedlung von Fe⁰-Reaktiven Wänden (siehe Tab. 5.5).

Tab. 5.5 Zusammenfassung von Fe⁰-Reaktiven Wänden, bei denen Hinweise auf eine mikrobiologische Besiedlung gefunden wurden (n.b.: nicht bestimmt).

Reaktive Wand, Standort	pH	HCO ₃ ⁻ (mg/l)	Mikrobiologische Untersuchungen	Mikrobiologische Effekte
Rheine (BRD) , [EBERT et al. 1999; diese Arbeit]	7 ^a > 9 ^b	n.b.	Acetogene, Sulfatreduzierer, Denitrifizierer, PCE-Dechlorierer, Methanogene	Kein Biofouling in der Wand
Portsmouth (Ohio, USA) [KORTE et al., 1997; LIANG et al., 1997]	6 ^a bis 7,6 ^b	50 - 85	Sulfatreduzierer, TCE-Dechlorierer, Methanogene, Metallreduzierer	Starke Clogging-Effekte innerhalb von 6 Monaten nach Inbetriebnahme; Biofouling nicht belegt
Borden site (Borden, Canada), [MATHESON & TRANTNYEK, 1994; O'HANNESIN & GILLHAM, 1998]	8,1 ^a 7,5 ^b	169	Keine mikrobiologische Besiedlung nach einem Jahr nach Inbetriebnahme	Kein Biofouling
Lowry AFB (Colorado, USA) [GAVASKAR et al., 2002]	6,9 ^a > 10 ^b	490	Zellzahlen von 5 bis 9*10 ⁴ /g TS in der Wand (vor und nach der Wand bis zu 10 ⁷ /gTS)	Keine sichtbare Besiedlung in Form eines Biofilms
NAS Moffett Field (Santa Clara County, Californien, USA), [GAVASKAR et al., 2002]	7 ^a 10 ^b	315 - 400	Zellzahlen von 1,4 bis 5*10 ⁶ /g TS in der Wand (vor und nach der Wand bis zu 5*10 ⁶ /gTS)	Keine sichtbare Besiedlung in Form eines Biofilms
Oak Ridge Y-12 (Tennessee, USA), [GU et al., 2002]	6,8 ^a 9,0 ^b	139	Nach 15 Monaten Betrieb: Sulfatreduzierer, Denitrifizierer, Methanogene, Metallreduzierer	Kein Biofouling in der Wand
Elizabeth City (North Carolina, USA), [PULS et al., 1999]	n.b.	n.b.	Keine mikrobiologischen Untersuchungen, aber Nachweis von Eisensulfiden als Produkt einer Sulfatreduktion	Kein Biofouling in der Wand

^a Anstrom, ^b Abstrom

Mikroorganismen sind in vielen Reaktiven Wänden folglich nachweisbar. Generell läßt sich zusammenfassen, dass im Boden vor und nach einer Wand in der Regel höhere

Zellzahlen vorliegen als in der Reaktiven Wand selber [GAVASKAR et al., 2002]. Eine Erhöhung der Zellzahl in der Reaktiven Wand im Vergleich zum Anstrombereich beschrieben GU et al. [2002]. Um ein Einstürzen der Seitenwände zu verhindern, wurde beim Bau der Reaktiven Wand „guargum“, ein Polymer auf Basis von Guarkernmehl, verwendet. Dieses zusätzliche Substrat förderte eine mikrobiologische Besiedlung. Trotzdem wurde kein starkes bakterielles Wachstum oder Biofouling in der Wand beobachtet. Das stärkste Wachstum erfolgte hier im direkten Anstrombereich vor der Wand. Starke Clogging-Effekte wurden in der Reaktiven Wand in Portsmouth beschrieben [KORTE et al., 1997; LIANG et al., 1997]. Obwohl die Existenz verschiedener Mikroorganismen-Gruppen festgestellt wurde, konnten die Clogging-Effekte nicht direkt auf den Bewuchs durch Mikroorganismen zurückgeführt werden.

GAVASKAR et al. [2002] und Gu et al. [2002] beschrieben, dass sich die Zusammensetzung der Mikroflora in einer Wand in Bezug auf den Anstrombereich verändert. Diese Untersuchungen wurden mittels der PLFA-Analyse (phospholipid fatty acid analysis) durchgeführt. Phospholipidhaltige Fettsäuren sind in allen Membranen von lebenden Zellen zu finden, werden aber in abgestorbenen Zellen schnell abgebaut. Die Bestimmung des PLFA-Gehaltes gibt somit die Möglichkeit, die lebende mikrobiologische Biomasse zu qualifizieren. GU et al. [2002] fanden heraus, dass eine Anreicherung von Gram-positiven, anaeroben Mikroorganismen in einer Reaktiven Wand stattfindet. Im Gegensatz dazu beschrieben GAVASKAR et al. [2002], dass eine Abnahme an Sulfatreduzierern und Zunahme an Fe(III)-Reduzierern in der Wand im Vergleich zum Anstrombereich zu beobachten war. Gram-negative Bakterien dominierten sowohl im An- und Abstrombereich als auch in der Wand selber, während sich die Zusammensetzung an Gram-negativen Bakterien änderte.

Einen großen Einfluss auf mikrobiologische Prozesse und somit Einfluss auf das Langzeitverhalten einer Reaktiven Wand hat die Zusammensetzung des Grundwassers [KLAUSEN et al., 2003]. TRATNYEK et al. [2003] fasste zusammen, dass bestimmte Bedingungen in Reaktiven Wänden ein mikrobielles Wachstum fördern. Die Bildung von makroskopischen Biofilmen und ein Bioclogging wurden bislang jedoch nicht beobachtet. LIANG et al. [2000] sieht einen Zusammenhang zwischen der Art des Füllmaterials und der Reinigungsleistung. Wird dem Fe⁰ Sand oder Kies untergemischt, so kann eine schlechtere Reinigungsleistung auch durch stärkere Besiedlung durch Mikroorganismen

die Folge sein. Die eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigen damit bereits veröffentlichte Erfahrungen anderer Reaktiver Wände.

Welche generellen Aussagen lassen sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen und aus dokumentierten Erfahrungen weiterer Reaktiver Wände ableiten:

- Eine Besiedlung von Reaktiven Wänden durch Mikroorganismen ist nicht zu verhindern. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Grundwasser-zusammensetzung und der Reaktivität des Eisens.
- Bei Vorhandensein von Hydrogencarbonat findet eine Acetogenese bedingt durch deren hohe pH-Toleranz auch in Bereichen mit relativ hohen pH-Werten statt. Acetat kann als Substrat für weitere biologische Umsetzungen dienen. Eine Acetat-Reduktion durch abiotische Prozesse in einer Reaktiven Wand ist nicht bekannt.
- Methanogene werden vermutlich durch konkurrierende sulfat- und nitratreduzierende Bakterien verdrängt.
- Sulfatreduzierende Bakterien reduzieren das abiotisch durch Fe^0 nicht umsetzbares Sulfat, wobei entstehendes Sulfid als FeS präzipitiert und somit die Reaktivität des Eisens vermindern kann.
- Eine Gasdrainage von Fe^0 -Reaktiven Wänden ist unerlässlich. Durch die anaerobe Korrosion des Eisens kann es zu einer starken H_2 -Entwicklung kommen. Ein Verbrauch des gebildeten H_2 durch Mikroorganismen wird auf Abschnitte mit eher neutralem pH-Wert beschränkt sein, wobei eine quantitative Verwertung unwahrscheinlich ist.
- Bioclogging-Effekte sind nach dem derzeitigen Informationsstand nicht zu erwarten.

5.2 Einfluss einer reduktiv dechlorierenden Mischkultur auf die PCE-Dechlorierung in Eisen-Systemen

Während nach wie vor eine Dechlorierung von PCE in der Reaktiven Wand in Rheine im mit Eisenschwamm verfüllten Bereich bis unter die geforderte Nachweisgrenze erfolgt, nimmt die Dechlorierungsleistung im GG-Kies-Gemisch kontinuierlich ab. Bisherige Untersuchungen haben ergeben, dass dechlorierende Bakterien in der Reaktiven Wand nur eine untergeordnete Rolle spielen. Weiterführende Untersuchungen sollten nun klären, ob eine Bioaugmentation mit einer dechlorierenden Mischkultur die Dechlorierungsleistung des mit GG-Kies-Gemisch befüllten Bereiches verbessern kann. Dazu wurden im Vorfeld grundlegende Untersuchungen mit einer dechlorierenden Mischkultur (DMC) durchgeführt. Diese war zwar in der Lage, PCE zu Ethen zu dechlorieren, jedoch erfolgte in der Regel eine Anreicherung von cDCE und VC. Durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen sollte eine vollständige Dechlorierung erreicht werden. Als nächstes sollte untersucht werden, ob diese Mischkultur in der Lage ist, mit Eisen als Elektronendonator PCE vollständig zu Ethen zu dechlorieren und ob Wachstum unter diesen Bedingungen möglich ist. Der Einfluss von weiteren terminalen Elektronenakzeptor-Prozessen wie Sulfatreduktion und Denitrifikation wurde überprüft, da das Grundwasser in Rheine stark sulfat- und nitrathaltig ist und somit Konkurrenzreaktionen mit anderen anaeroben Bakterien zu vermuten sind. Da in Fe^0 -Reaktiven Wänden die Korrosion des Eisens zu einer pH-Wert-Erhöhung führt, wurde zudem der Einfluss des pH-Wertes auf die Dechlorierung von PCE untersucht. In Vorbereitung auf Säulenversuche wurde ein Testsystem entwickelt, mit dem auf Basis eines PCR-Nachweises die Detektion von dechlorierenden Bakterien in eisenhaltigen Proben möglich ist. Ziel war es, eine dauerhafte Besiedlung in kontinuierlich betriebenen Fe^0 -Säulen nachzuweisen und dessen Einfluss auf die Dechlorierung von PCE zu untersuchen.

5.2.1 Optimierung der biologischen Dechlorierung von PCE

Die dechlorierende Mischkultur wurde 1998 von KUHLMANN [1998] etabliert. Diese Mischkultur entwickelte innerhalb einer siebentägigen Inkubation große Mengen an Methan, während nur eine Dechlorierung von 50 mg/l PCE zu ca. 80 % VC und 20 % Ethen erreicht wurde. Die Dechlorierung war sehr instabil, weshalb häufig innerhalb von einer Woche Inkubationszeit nur ca. 50 % cDCE und 50 % VC gebildet wurden. Die

Bildung von VC und Ethen deutete darauf hin, dass *Dehalococcoides* Spezies in der Mischkultur an der Dechlorierung beteiligt waren.

D. ethenogenes Stamm 195 ist das bislang einzige beschriebene Bakterium, welches in der Lage ist, als Reinkultur PCE zu Ethen zu dechlorieren [MAYMÓ-GATELL et al., 1997]. In dechlorierenden Anreicherungskulturen, aus denen *D. ethenogenes* Stamm 195 isoliert wurde, konnte mit Methanol im Vergleich zu Substraten wie Acetat, H₂, Formiat und Glukose die effektivste Dechlorierung von PCE zu VC und Ethen erreicht werden [FREEDMAN & GOSSETT, 1989]. Wurde dem Medium Vitamin B₁₂ zugesetzt, so konnte Methanol durch H₂ ersetzt werden [MAYMÓ-GATELL et al., 1995]. Aus diesen Anreicherungskulturen wurde *D. ethenogenes* Stamm 195 isoliert, der nur mit H₂ als Elektronendonator Wachstum zeigte [MAYMÓ-GATELL et al., 1997]. Man nahm an, dass Methanol als Elektronendonator für die Anreicherungskulturen nur deshalb erfolgreich war, weil *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 einen hohen Bedarf an Vitamin B₁₂ hat. Cobalt-haltige Coenzyme waren dem damals verwendeten Medium nicht zugesetzt worden, es wurde jedoch vermutet, dass methanolverwertende Bakterien diese aus dem Spurenelement Cobalt gebildet hatten [FLORENCIO et al., 1994]. Versuche in Form von Batch-Ansätzen mit der hier untersuchten dechlorierenden Mischkultur (DMC) ergaben, dass eine Zugabe von Vitamin B₁₂ für eine vollständige Dechlorierung von PCE, insbesondere für die Reduktion von VC zum Ethen, Voraussetzung ist. Dies kann als zusätzlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass *Dehalococcoides* Spezies in der DMC wesentlich an der Dechlorierung von VC zu Ethen beteiligt sind. Während die Reduktion von VC durch *D. ethenogenes* Stamm 195 als ein cometabolischer Prozess beschrieben wurde, bei dem keine Energie gewonnen wird [MAYMÓ-GATELL et al., 1997], konnten CUPPLES et al. [2003] in einer Mischkultur eine *Dehalococcoides* Spezies namens VS nachweisen, der in der Lage ist, VC unter Energiegewinn zu dechlorieren.

Auf Grundlage dieser Kenntnisse wurde die Kultivierung der hier untersuchten dechlorierenden Mischkultur umgestellt. Wie bereits vermutet, hatte der teilweise Ersatz von Methanol durch H₂ einen positiven Einfluss auf die Dechlorierung von PCE, so dass eine vollständige Umsetzung zu Ethen innerhalb einer siebentägigen Kultivierung erreicht wurde. Vitamin B₁₂ war auch vor der Substratumstellung Bestandteil des Mediums, so dass eine Bildung durch methanolverwertende Bakterien aus dem Spurenelement Cobalt nicht notwendig war. Da H₂ der eigentliche Elektronendonator für *D. ethenogenes* Stamm 195 ist [MAYMÓ-GATELL et al., 1997] und Methanol überwiegend

zu Methan umgesetzt wurde, konnten nach Substratumstellung dechlorierende Bakterien gegen die Methanogenen erfolgreich um den Elektronendonator H_2 konkurrieren. Diesen Effekt beobachteten auch DUHAMEL et al. [2002]. FLORENCIO et al. [1994] beschrieben dazu, dass bei der Umsetzung von Methanol kaum H_2 freigesetzt wird und zudem überwiegend von Methanogenen verbraucht wird.

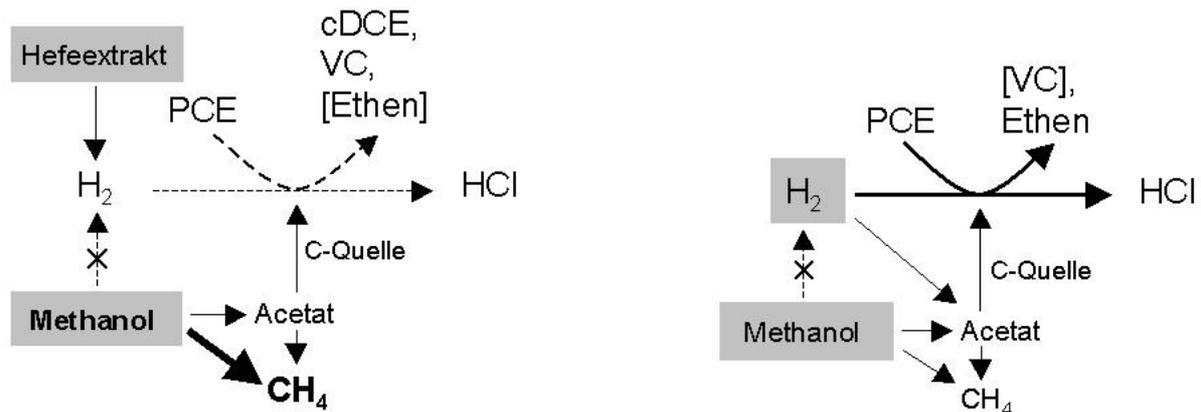


Abb. 5.2 Dechlorierung von PCE durch die DMC bei einer wöchentlichen Zudosierung von ca. 20 mmol Methanol und 100 μ l Hefeextrakt (links) sowie nach Substratumstellung und Zudosierung von 5 mmol H_2 und 7,5 mmol Methanol wöchentlich (rechts). Die zudosierten Substrate sind grau hinterlegt.

Die Substratumstellung ergab somit den erwünschten Effekt einer vollständigen Dechlorierung von PCE zu Ethen durch die DMC. Auch Hefeextrakt war für die Kultivierung der DMC nicht unbedingt notwendig. FENNELL et al. [1997] setzten für die Kultivierung einer PCE-dechlorierenden Kultur vorverdauten Hefeextrakt (FYE) oder eine definierte Mischung von verschiedenen molekularen Fettsäuren (SFYE) ein. *D. ethenogenes* Stamm 195 benötigte sog. „Kulturüberstand“ nicht näher definierter Zusammensetzung. In der Reinkultur konnte zwar als C-Quelle Hefeextrakt durch Acetat ersetzt werden, die Zugabe eines sog. „Supernatant“ einer auf Methanol gewachsenen Kultur war jedoch notwendig (MAYMÓ-GATELL et al., 1995; 1997). In dieser Arbeit hingegen war in der Kultivierung der DMC ein vollständiger Ersatz von Hefeextrakt durch Acetat auch nach der Substratumstellung möglich. Vermutlich liefern andere Bakterien wie die nachgewiesenen Acetogenen, Sulfatreduzierer oder Methanogene Intermediate, die die dechlorierenden Bakterien als Suppline benötigen [RICHARDSON et al., 2002]. CHIU & LEE [2001] beschrieben in diesem Zusammenhang, dass sulfatreduzierende Bakterien und Methanogene häufig in dechlorierenden Mischkulturen nachgewiesen werden. ROSSETTI et al. [2003] wiesen Acetogene und Methanogene, DUHAMEL et al.

[2002] *Acetobacterium* Spezies als hydrogenotrophe acetogene Bakterien in dechlorierenden Kulturen nach.

5.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Kultivierungsunabhängige molekularbiologische Nachweismethoden sind prinzipiell geeignet, das Vorhandensein von Mikroorganismen in einem Habitat zu dokumentieren. Zum Nachweis von *Dehalococcoides* Spezies in einer Reaktiven Wand wurde in dieser Arbeit eine PCR-Methode entwickelt, um auch in eisenhaltigen Proben mit einem hohen pH-Wert einen Nachweis zu ermöglichen. Dieser Nachweis sollte bewusst auf die Gattung *Dehalococcoides* beschränkt sein, da bisher zur vollständigen Dechlorierung von PCE zu Ethen nur Vertreter dieser Spezies bekannt sind und eine Bioaugmentation nur sinnvoll ist, wenn dadurch eine vollständige Dechlorierung in der Reaktiven Wand ermöglicht werden kann.

In dieser Arbeit konnte mittels molekularbiologischer Analysen gezeigt werden, dass in der DMC *Dehalococcoides* Stämme vorhanden waren. Damit eignet sich die vorgestellte Methode prinzipiell für den Nachweis von *Dehalococcoides* Spezies in Umweltproben. *Dehalococcoides* Spezies wurden bisher in vielen unterschiedlichen Umweltkompartimenten nachgewiesen (LÖFFLER et al., 2000; FENNEL et al., 2001; HENDRICKSON et al., 2002; MAJOR et al., 2002). Stets korrelierte das Vorhandensein von *Dehalococcoides* spp. mit einer Dehalogenierungsaktivität in der Kultur (MAYMÓ-GATELL et al., 1997; ADRIAN et al., 2000; LÖFFLER et al., 2000; DUHAMEL et al. 2002; HENDRICKSON et al., 2002; RICHARDSON et al., 2002; WU et al., 2002; BUNGE et al., 2003; CUPPLES et al., 2003; HE et al., 2003).

Interessanterweise zeigten die molekularbiologischen Analysen dieser Arbeit zudem, dass in der Mischkultur zwei unterschiedliche *Dehalococcoides* 16S rDNA-Sequenzen, vermutlich also zwei Stämme vorhanden waren. Auf Basis der durch Sequenzierung erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen konnte eine Methode entwickelt werden, mit der die unterschiedlichen Sequenzen in Kulturen mittels einer Restriktionsanalyse (sog. ARDRA) nachgewiesen werden konnten. Voraussetzung dafür war, dass Unterschiede in der Basenzusammensetzung von spezifischen Erkennungsstellen für Restriktions-Endonukleasen vorlagen. Dies traf auf das Enzym FauNDI zu. Während in CBDB1, einem Chlorbenzol und Dioxin dechlorierenden Bakterium [ADRIAN et al., 2000; BUNGE et al., 2003], und FL2, einem TCE-dechlorierenden Bakterium [LÖFFLER et al., 2000],

FauNDI die 16S rDNA-Sequenz in zwei Fragmente schnitt, konnte FauNDI in *D. ethenogenes* Stamm 195 ähnlichen Sequenzen durch Austausch einer Base in dieser Erkennungsstelle die DNA nicht schneiden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Sequenzen vorlagen, wobei *D. ethenogenes* Stamm 195 ähnliche Sequenzen gegenüber CBDB1- bzw. FL2-ähnliche Sequenzen in der DMC überwogen [ROSENTHAL et al., 2004].

Unterschiedliche 16S rDNA-Sequenzen in einer über zwei Jahre stabilen Mischkultur beschrieben ebenfalls RICHARDSON et al. [2002]. Der Nachweis verschiedener 16S rDNA-Sequenzen von *Dehalococcoides* Spezies in Umweltkompartimenten, in denen eine vollständige Dechlorierung bis zum Ethen nachgewiesen werden konnte, führte zur Einteilung in drei Gruppen, die sogenannte Cornell-, Pinellas- und Victoria-Gruppe [HENDRICKSON et al., 2002]. Sequenzen, die mit *D. ethenogenes* Stamm 195 die größte Ähnlichkeit aufwiesen, wurden zur Cornell-Gruppe zusammengefasst. Die Gruppe um CBDB1 und FL2 wurde als Pinellas-Gruppe bezeichnet. Die dritte Gruppe, bei der es derzeit noch kein isoliertes Bakterium gibt, wurde Victoria-Gruppe genannt. Der in dieser Arbeit entwickelte ARDRA-Nachweis für zwei Gruppen, die Cornell- und die Pinellas-Gruppe, wurde weiterentwickelt, um auch die Victoria-Gruppe von den beiden anderen Gruppen unterscheiden zu können [VOTTELER, 2002]. Die Ergebnisse von VOTTELER [2002] bestätigten, dass in der dechlorierenden Mischkultur ausschließlich *Dehalococcoides* Sequenzen aus der Cornell- und der Pinellas-Gruppe vorhanden waren.

Die Bedeutung unterschiedlicher *Dehalococcoides* 16S rDNA Sequenzen und somit möglicherweise verschiedener *Dehalococcoides* Stämme in einer Mischkultur kann nur vermutet werden. Die unterschiedlichen *Dehalococcoides* Sequenzen können auf das Vorhandensein von Stämmen hinweisen, die Konkurrenten um die selben Elektronenakzeptoren sind oder unterschiedliche Schritte in der Dechlorierung katalysieren.

CUPPLES et al. [2003] konnten in einer Mischkultur eine *Dehalococcoides* Spezies namens VS nachweisen, welche in der Lage ist, auch VC unter Energiegewinn zu dechlorieren. So erreichte das Bakterium VS hohe Umsatzraten von cDCE und VC, während TCE kaum und PCE nicht dechloriert wurden. *D. ethenogenes* hingegen dechloriert PCE, TCE und cDCE schnell, während VC nur cometabolisch umgesetzt wird. CUPPLES et al. [2003] stellten die Hypothese auf, dass es verschiedene Stämme

gibt, die bei einer hohen Ähnlichkeit der 16S rDNA zu *D. ethenogenes* Stamm 195 verschiedene Substrate nutzen. HE et al. [2003] gehen ebenfalls davon aus, dass *Dehalococcoides* Populationen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten für chlorierte Ethene existieren, so dass eine vollständige reduktive Dechlorierung auch durch mehr als eine *Dehalococcoides* Spezies stattfinden kann. Aufgrund der derzeitigen Informationslage über die Gruppe *Dehalococcoides* ist es jedoch nicht möglich, eine spezifische Dechlorierungsaktivität einzelnen *Dehalococcoides* Stämmen zuzuordnen.

5.2.3 Fe⁰ als Elektronendonator

Während in abiotischen Ansätzen mit GG PCE nur unvollständig zu TCE und Ethen umgesetzt wurde (Abb. 5.3), entsprach die Produktverteilung in biotischen Ansätzen mit GG und der DMC einer durch *Dehalococcoides* Spezies beschriebenen und für die DMC bestätigten sequentiellen Dechlorierung von PCE.

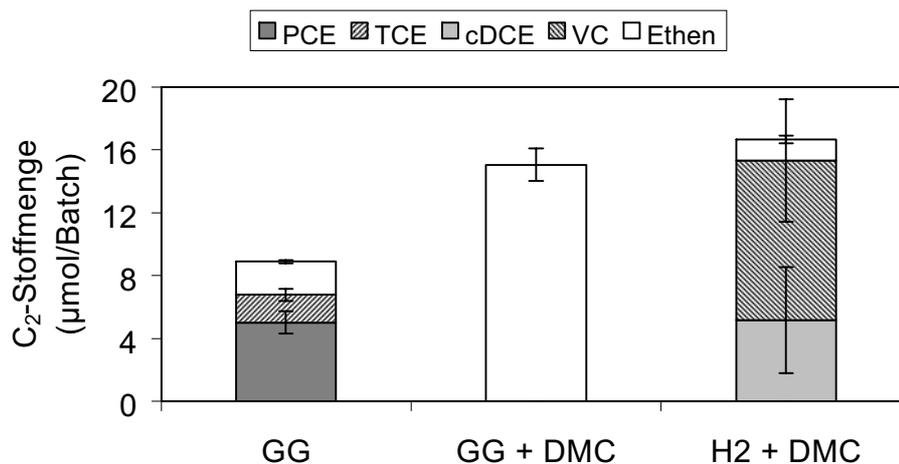


Abb. 5.3 Typisches Dechlorierungsmuster von PCE in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG, biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG bzw. H₂ (Zudosierung je nach Bedarf) nach 30tägiger Inkubation. Die durchschnittlichen PCE-Stoffmengen betragen anfangs 13,3 bis 15,4 μmol PCE/Batch.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Konkurrenz der abiotischen und mikrobiologischen Dechlorierung von PCE die mikrobiologische Umsetzung durch die DMC überwiegt. So wurden als Zwischenprodukte cDCE und VC gebildet, wie für mikrobiologische Prozesse durch sequentielle Hydrogenolyse beschrieben. Bei der für abiotische Prozesse beschriebenen β -Eliminierung wird die Bildung von VC umgangen [ARNOLD & ROBERTS, 2000]. Zudem erreichte die Wiederfindungsrate für PCE in

abiotischen Ansätzen mit Fe^0 nur 65 % im Gegensatz zu über 100 % für die kombinierten Ansätzen mit GG und DMC. Für abiotische Ansätze beschrieben BURRIS et al. [1995] als Ursache eine Sorption an unreaktiven Plätzen des Fe^0 , was durch die Anwesenheit von dechlorierenden Bakterien der DMC vermutlich vermindert wurde.

LAMPRON et al. [2001] zeigte in Untersuchungen mit einer ursprünglich aus einer Deponie der Dover Air Force Base (Dover, Del., USA) angereicherten Mischkultur einen entsprechenden Effekt. In kombinierten Ansätzen mit TCE, der Mischkultur und Fe^0 wurde jedoch keine vollständige Dechlorierung von TCE erreicht. Die Akkumulation von VC führte er darauf zurück, dass aufgrund des hohen Henry-Koeffizienten die wässrige Konzentration nur sehr niedrig war und limitierend auf die Dechlorierung wirkte [LAMPRON et al., 1998].

In Ansätzen, in denen H_2 statt GG als Elektronendonator zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte nur eine unvollständige Dechlorierung des PCE zu cDCE, VC und wenig Ethen, während mehr Methan gebildet wurde als in Ansätzen mit GG (Tab. 5.6).

Tab. 5.6 Übertragene Elektronen in Ansätzen mit GG oder H_2 als Elektronendonator. Nicht erfasst wurden Elektronen, die für Acetogenese oder Produktion von Biomasse verbraucht wurden.

μequiv^a	Triplets mit		
	GG + PCE	GG + DMC + PCE	H_2 + DMC + PCE
H_2 Freisetzung	520	< 10	-
Produktion von CH_4	-	132	322
Dechlorierung von PCE	20	122	80
Zugabe von H_2	-	-	440 ^b
Wiederfindungsrate (%)	-	-	93

^a Annahme für die Berechnung der Äquivalente ($\mu\text{equiv}/\mu\text{mol}$): Methan: 8, H_2 : 2, TCE: 2, cDCE: 4, VC: 6, Ethen: 8, ^b die Zugabe von 5 ml H_2 entsprach in etwa dem Gehalt an H_2 , der durch die Korrosion von 2 Gew.-% GG innerhalb von 30 Tagen freigesetzt wurde; 5 ml H_2 wurden innerhalb von 22 Tagen verbraucht.

Somit wurden in biotischen Ansätzen mit GG prozentual mehr Elektronen zur Dechlorierung von PCE verwendet als in Ansätzen mit H_2 als Elektronendonator, was auf einen Selektionsvorteil von dechlorierenden Bakterien gegenüber Methanogenen hinweist. Da die Wiederfindungsrate von zudosiertem und verbrauchtem H_2 in Ansätzen mit H_2 93 % betrug, wurden nur wenig Elektronen für die Acetat- oder

Biomasseproduktion verwendet. In Kulturen mit GG und der DMC hingegen wurden ca. 50 % des theoretisch durch Eisenkorrosion gebildeten H_2 (siehe abiotische Ansätze mit GG) für Methanogenese und die Dechlorierung von PCE verwendet. Da die Produktion von Acetat und Biomasse nicht bestimmt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die DMC die Freisetzung von H_2 durch Belegung der Eisenoberfläche vermindert [ROSENTHAL et al., 2004].

Wahrscheinlicher ist die Hypothese, dass in Anlehnung an FENNELL et al. [1997] und FENNELL & GOSSETT [1998] Substrate, die eine langsamere H_2 -Freisetzung ermöglichen, zu einer Förderung von dechlorierenden Bakterien zu Ungunsten von Methanogenen führen. Dies würde bedeuten, dass bei einem Überschuss an H_2 Methanogene bevorzugt werden. Eine interessante Hypothese stellten in diesem Zusammenhang DINH et al. [2004] auf. Sie fanden heraus, dass *Desulfobacterium*-verwandte Isolate mit Fe^0 wesentlich schneller Sulfat reduzieren können als die H_2 -verbrauchenden *Desulfovibrio* Spezies. Entsprechendes konnte für eine methanogene Reinkultur belegt werden. Sie stellten die Hypothese auf, dass diese Isolate in der Lage sind, die Elektronen in einer direkteren Weise von der Eisenoberfläche abfangen zu können als über freien H_2 .

5.2.4 Wachstum von *Dehalococcoides* Spezies mit Fe^0

Um ein Wachstum von *Dehalococcoides* Spezies mit GG als Elektronendonator und PCE als Elektronenakzeptor nachzuweisen, wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurde die DMC mit GG und PCE sowie Acetat als C-Quelle kultiviert und insgesamt siebenmal überimpft. Auch nach dem letzten Transfer konnte in den Batch-Ansätzen mit Fe^0 , Acetat als C-Quelle und Inokulum aus der vorangegangenen Kultivierung eine Dechlorierung von PCE zu VC und Ethen erreicht werden.

Zusätzlich wurde ein molekularbiologischer Nachweis von *Dehalococcoides* Sequenzen mittels PCR geführt. Dabei wurde bestätigt, dass in Ansätzen mit PCE, GG und der DMC zum Zeitpunkt der vollständigen Dechlorierung zu Ethen im Vergleich mehr *Dehalococcoides* 16S rDNA-Sequenzen vorhanden waren als in Kontrollansätzen, in denen PCE oder GG fehlte. Somit konnte auch über diese „vergleichende“ PCR nachgewiesen werden, dass für ein Wachstum von *Dehalococcoides* Spezies PCE und Fe^0 notwendig sind [ROSENTHAL et al., 2004]. HENDRICKSON et al. [2002] zeigten für die sog. KB-1 Kultur [MAJOR et al., 2002], dass mit PCE und Methanol Wachstum erfolgt. Ein Nachteil der für Fe^0 -haltige Proben entwickelten vergleichenden PCR ist, dass keine

quantitativen Aussagen möglich sind. Inzwischen ist es apparatetechnisch möglich, mittels einer Real-time PCR eine DNA-Quantifizierung von *Dehalococcoides* Sequenzen zu erreichen. HE et al. [2003] nutzten diese Methodik erstmals, um ein Wachstum des *Dehalococcoides* Stammes VS mit VC nachzuweisen. Für eine exakte Quantifizierung der DNA für Versuche mit Fe^0 muss jedoch im Vorfeld eine Optimierung der Desorption von Bakterien von der Eisenoberfläche erfolgen.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Fe^0 eine vollständige Dechlorierung von PCE zu Ethen durch die DMC möglich ist und ein Wachstum unter diesen Bedingungen erfolgt.

5.2.5 Einfluss von Acetat bzw. Acetogenen

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde Acetat als C-Quelle eingesetzt. Damit stellte sich die Frage, ob H_2 oder Acetat der eigentliche Elektronendonator für die Dechlorierung ist. Zudem war eine Beteiligung von Acetogenen nicht auszuschließen.

Einige Acetogene sind in der Lage, über den induzierten Acetyl-CoA-Weg (Wood-Ljungdahl-Weg) durch eine cometabolische reduktive Dechlorierung PCE zu TCE zu reduzieren, wie TERZENBACH & BLAUT [1994] für das hydrogenotrophe Bakterium *Sporomusa ovata* nachwiesen. In Versuchen mit der DMC ließ sich durch Einsatz von Vancomycin das Wachstum acetogener Bakterien und folglich die Bildung von Acetat hemmen, während die Dechlorierung von PCE zu Ethen nicht beeinflusst wurde. Da Vancomycin generell Gram-positive Bakterien hemmt, läßt sich zudem vermuten, dass dechlorierende Gram-positive Bakterien wie *Desulfitobacterium* [UTKIN et al., 1994; GERRITSE et al., 1996; MILLER et al., 1996] und *Dehalobacter* Spezies [WILD et al., 1996; HOLLIGER et al., 1998] an der Dechlorierung von PCE nicht beteiligt sind. Die Unempfindlichkeit gegenüber eubakteriellen Zellwandsynthese-Inhibitoren wurde bereits mehrfach für H_2 -verbrauchende Mischkulturen, die PCE reduktiv zu VC und Ethen dechlorieren [DISTEFANO et al., 1992; MAYMÓ-GATELL et al., 1995] bzw. für *Dehalococcoides* Reinkulturen [MAYMÓ-GATELL et al., 1997; ADRIAN et al., 2000] beschrieben. Die Unempfindlichkeit der Dechlorierungsaktivität in der hier untersuchten Mischkultur gegenüber Vancomycin bestätigt die Vermutung, dass *Dehalococcoides* spp. an der Dechlorierung von PCE zu Ethen beteiligt sind. Zudem kann eine direkte Beteiligung von Acetogenen sowie Gram-positiven Dechlorierern an der Dechlorierung von PCE ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zum Nachweis von Methanogenen in den Rheine-Ansätzen, bei denen auch mit Vancomycin noch Acetat gebildet wurde, wurden Acetogene in diesem Versuch vollständig inhibiert. Während die Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit und ohne Vancomycin keine signifikanten Unterschiede zeigte, war der Einfluss auf Methanogene deutlich sichtbar. In Ansätzen ohne Vancomycin konkurrierten die Acetogenen erfolgreich mit den Methanogenen, sichtbar an der nur schwachen Methanogenese. Der durch die Korrosion des Eisens entstehende Wasserstoff wurde in diesen Ansätzen demnach überwiegend von acetogenen Bakterien verwertet. In Ansätzen mit Vancomycin war erst durch Ausschalten der Acetogenese eine hydrogenotrophe Methanogenese möglich. Diese setzte jedoch erst nach beginnender Dechlorierung von cDCE zu VC ein.

Versuche, in denen Wasserstoff durch Acetat als Elektronendonator ersetzt wurde, zeigten nur eine partielle Dechlorierung von PCE zu TCE. Verursacht wurde diese Dechlorierung vermutlich durch abiotische Reaktionen, bei denen Ti (NTA), welches in diesen Ansätzen als Reduktionsmittel diente, PCE zu TCE reduzierte. Gefördert wurde diese Reaktion durch Vitamin B₁₂ im Medium [KIM & CARRAWAY, 2002]. Mit H₂ hingegen wurde PCE durch die DMC zu VC und Ethen umgesetzt. Viele Reinkulturen benötigen ebenfalls H₂ als Elektronendonator für reduktive Dechlorierungsprozesse [DISTEFANO et al., 1992; MAYMÓ-GATELL et al., 1995; FENNELL et al., 1997; BALLAPRAGADA et al., 1997; WEATHERS et al., 1997; CARR & HUGHES, 1998; YANG & MCCARTY, 1998]. Jedoch gibt es auch Misch- und Reinkulturen, in denen Acetat als primärer Elektronendonator dient [HE et al., 2002]. Eine vollständige Dechlorierung von PCE zu Ethen durch diese Mischkultur wurde nur mit Acetat als Elektronendonator erreicht. Mit H₂ als alleinigem Elektronendonator erfolgte eine Dechlorierung erst, nachdem sich durch hydrogenotrophe Acetogene Acetat angereichert hatte.

5.2.6 Einfluss der Eisenmenge und Eisensorte

Um Effekte der Eisenmenge auf die Dechlorierung von PCE sichtbar zu machen, wurden diese Ansätze wesentlich länger inkubiert als für eine vollständige Dechlorierung zu Ethen mit 2 Gew.-% GG und DMC notwendig gewesen wäre. Eine Verlangsamung einer vollständigen Dechlorierung wurde dabei sowohl durch Verringerung als auch Erhöhung der Eisenmenge erreicht. Dechlorierende Bakterien vermögen bei geringeren H₂-Partialwerten noch H₂ zu nutzen als Acetogene und Methanogene [LÖFFLER et al., 1999], so dass eine biologische Dechlorierung mit abnehmender H₂-Freisetzung durch

geringere Eisenmengen gefördert wird. Nicht schlüssig ist somit das Ergebnis, dass mit 0,4 Gew.-% GG keine vollständige Dechlorierung, jedoch eine Acetogenese nachweisbar war, während mit bis zu 2 Gew.-% GG PCE quantitativ in Ethen umgesetzt wurde.

Bei höheren Mengen an GG waren vermutlich die ansteigenden pH-Werte in den Batchansätzen ausschlaggebend für die schlechtere Dechlorierungsleistung durch die DMC. In Ansätzen mit 10 Gew.-% GG korrelierte eine gesteigerte Freisetzung von Wasserstoff mit einem pH-Wert-Anstieg auf bis zu 9,3. Da PCE durch die DMC sequentiell dechloriert wurde, stoppte die biologische Dechlorierung vermutlich bei einem pH-Wert außerhalb des tolerierten Bereiches von ca. 8.

Untersuchungen mit Material aus der Reaktiven Wand in Rheine zeigten eine unterschiedliche Reaktivität der Eisensorten GG und ES, die sich nicht mit der Variation der Eisenmenge begründen ließ, sondern vermutlich auf andere metallische Verunreinigungen zurückzuführen ist. Eine Korrelation zwischen der eingesetzten Menge an Eisen und den Dechlorierungsprodukten von PCE war besonders deutlich in Untersuchungen mit ES und der DMC festzustellen. Mit 2,2 Gew.-% ES wurde PCE durch die DMC bis überwiegend cDCE dechloriert, während mit 0,8 Gew.-% zu etwa gleichen Anteilen VC und Ethen gebildet wurden. Da sich das Spektrum der PCE-Dechlorierungsprodukte gegen Ende der Inkubationszeit nicht mehr signifikant veränderte, kann davon ausgegangen werden, dass eine weitere mikrobielle Umsetzung dieser Produkte nicht mehr stattfand. Da sowohl mit ES als auch mit GG keine Methanogenese nachweisbar war, war ein direkter Reaktivitätsvergleich der Eisensorten durch die gebildete Acetatmenge möglich. Dazu wurden Versuche mit 0,8 Gew.-% ES wiederholt, wobei der PCE-Gehalt in diesen Ansätzen mit durchschnittlich ca. 7,5 μmol PCE dem Gehalt in Ansätzen mit GG entsprach. Die Ergebnisse belegen die hohe Reaktivität des Eisenschwamms, da bereits nach 31 Tagen Inkubation 300 mg/l Acetat gebildet wurden, während mit 10 Gew.-% GG innerhalb von 48 Tagen nur 180 mg/l Acetat gebildet wurden. Damit zeigt sich, dass die Reaktivität des Eisens entscheidend für die mikrobielle Dechlorierung von PCE durch die DMC ist. Durch Erhöhung der Eisenmenge bzw. Verwendung einer hochreaktiven Eisensorte kann eine mikrobielle Dechlorierung unterdrückt werden. Als primäre Ursache wird dabei der pH-Anstieg vermutet, der im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

5.2.7 Einfluss des pH-Wertes

Untersuchungen mit der DMC ergaben eine unvollständige Dechlorierung von PCE bereits ab pH-Werten von ca. 8. Als Dechlorierungsprodukt wurde cDCE angereichert. Bei pH-Werten ab ca. 9 erfolgte keine biologisch induzierte Dechlorierung mehr. Bei diesen pH-Werten wurde hingegen ein hoher Anteil an TCE gebildet, was vermutlich auf Reaktionen mit GG und Vitamin B₁₂ zurückzuführen ist.

KIM & CARRAWAY [2002] konnten zeigen, dass PCE in Anwesenheit von Fe⁰ und Vitamin B₁₂ durch reduziertes Vitamin B₁₂ (Cob(II)alamin) zu einem prozentual höheren Anteil zu TCE umgesetzt wurde, als wenn Vitamin B₁₂ fehlt. Warum dieser Effekt in den vorliegenden Untersuchungen bei pH-Werten ab 9 stärker ausgeprägt ist, ist nicht schlüssig belegbar.

Während Untersuchungen zum Einfluss von unterschiedlichen Mengen an Fe⁰ bzw. Eisensorten auf die Dechlorierungsleistung von *Dehalococcoides* Spezies enthaltenen Kulturen nicht bekannt sind, wurden durch TILL et al. [1998] entsprechende Versuche mit dem denitrifizierenden *Paracoccus denitrificans* durchgeführt. Sie zeigten, dass die durch die anaerobe Korrosion ansteigenden pH-Werte einen signifikanten Einfluss auf denitrifizierende Prozesse hatten. pH-Werte bis 9 beeinflussten die Denitrifikation nicht wesentlich, während diese ab pH 9 inhibiert wurde.

In der Reaktiven Wand in Rheine wurden pH-Werte von über 9,0 festgestellt. Am Ende der reaktiven Schüttung wurden in Rheine für das GG-Kies-Gemisch pH-Werte von fast 10, für die ES-Schüttung von 11,5 gemessen [EBERT et al., 1999]. In der Fe⁰-Reaktiven Wand in der Hill AFB (Utah) wurden im Abstrom der Reaktiven Wand pH-Werte von über 9,0, in der Lowry AFB (Colorado) sogar über 10,0 und in der reaktiven Schüttung in der Wand in Elizabeth City (North Carolina) ebenfalls von über 10,0 gemessen [LIANG et al., 2000]. Es ist somit davon auszugehen, dass sich nur dechlorierende Bakterien, die auch bei hohen pH-Werten noch PCE dechlorieren können, in Fe⁰-Reaktiven Wänden dauerhaft ansiedeln können.

Während in den vorliegenden Untersuchungen eine Beteiligung von *Dehalococcoides* Spezies an der Dechlorierung von PCE nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob weitere dechlorierende Bakterien an der Dechlorierung beteiligt sind, die erhöhten pH-Werten gegenüber unempfindlicher sind.

5.2.8 Einfluss von Sulfat und Nitrat

Der Standort Rheine zeichnet sich durch hohe Nitrat- und Sulfatkonzentrationen aus. Somit war die Frage nach dem Einfluss dieser Ionen auf die Dechlorierungsleistung der DMC in Hinblick auf eine mögliche Bioaugmentation unerlässlich. Die dechlorierende Mischkultur konnte für diese Versuche eingesetzt werden, da sie nachweislich eine methanogene, acetogene und sulfatreduzierende Aktivität zeigte. In Versuchen mit Nitrat als alternativem Elektronenakzeptor konnte zudem eine denitrifizierende Aktivität in der Mischkultur gezeigt werden [TESTA, 2003].

Die Ergebnisse mit Sulfat als zusätzlichem Elektronenakzeptor zu PCE zeigen eine simultan stattfindende Sulfatreduktion und Dechlorierung von PCE zum cDCE. Erst nach vollständiger Reduktion des Sulfats setzt die weitere Dechlorierung des cDCE ein.

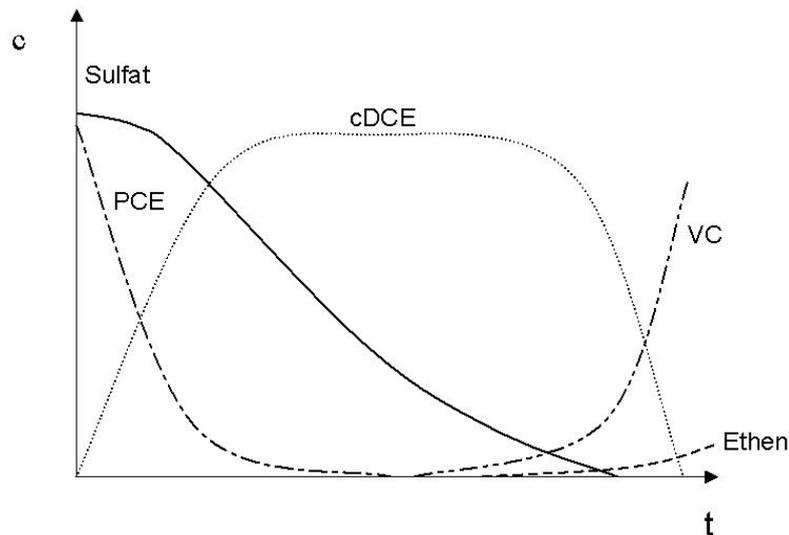


Abb. 5.4 Dechlorierungscharakteristik von PCE in Ansätzen mit GG und der DMC in Anwesenheit von Sulfat

D. ethenogenes Stamm 195 kann durch Sulfatreduktion keine Energie gewinnen [MAYMÓ-GATELL et al., 1997]. In Untersuchungen von ADRIAN et al. [1998] konnte eine reversible Hemmung der Dechlorierung durch Sulfat an einer Trichlorbenzol-dechlorierenden Mischkultur beobachtet werden. Weiterführende Untersuchungen mit dem aus dieser Mischkultur isolierten Stamm CBDB1 bestätigen die Vermutung, dass eine Konkurrenz zwischen den dechlorierenden und sulfatreduzierenden Bakterien der Mischkultur vorgelegen haben muss [ADRIAN, 1999]. Eine Vergleichbarkeit war dadurch gegeben, dass es sich sowohl bei dem Trichlorbenzol-dechlorierenden+ CBDB1 als

auch bei den PCE-dechlorierenden Bakterien aus der hier untersuchten Mischkultur um *Dehalococcoides* Spezies handelt.

Das Vorhandensein von zwei reduktiven Dehalogenasen bei *D. ethenogenes* 195 erklärt nicht, warum die anfänglich stattfindende Dechlorierung von PCE bei Vorhandensein von Sulfat beim cDCE stoppt. Während die PCE-Reduktase PCE zu TCE reduziert, katalysiert die TCE-Reduktase die Dechlorierung von TCE, cDCE und VC [MAGNUSON et al., 1998]. Läge eine kompetitive Hemmung auf Enzymebene vor, so wäre eine vorübergehende Akkumulation von TCE durch Hemmung der TCE-Rdase zu erwarten. Eine Hemmung der Dehalogenasen von *Dehalococcoides* Spezies kann somit als Ursache ausgeschlossen werden.

Weitere dechlorierende Bakterien können an der Dechlorierung von PCE und Metaboliten beteiligt sein. NEUMANN et al. [1994] beschrieben, dass Sulfat die Dechlorierung von PCE zu cDCE durch *Dehalospirillum multivorans* nicht negativ beeinflusst. *Enterobacter* Stamm MS-1 und *E. agglomerans*, zwei fakultativ anaerobe Bakterien, dechlorieren PCE zu cDCE. 1 mM Sulfat zeigte nur einen geringen Effekt auf die Dechlorierung von PCE [SHARMA & MCCARTY, 1996]. Als Elektronendonator benötigen diese Bakterien jedoch Acetat, was nachweislich nicht der direkte Elektronendonator für die Dechlorierung von PCE durch die hier untersuchte DMC ist (siehe Kapitel 4.2.5.1). Auch eine cometabolische Beteiligung von acetogenen Bakterien scheidet aus, da Versuche mit Vancomycin eine vollständige Unterdrückung der Acetogenese ergaben, die Dechlorierung jedoch nicht negativ beeinflusst wurde. Die Versuche mit Vancomycin ergaben zudem, dass Gram-positive Bakterien nicht an der Dechlorierung von PCE beteiligt sind.

Eine Methanbildung setzte erst nach einer vollständigen Dechlorierung zum cDCE ein, so dass es unwahrscheinlich ist, dass Methanogene an der Dechlorierung von PCE zum cDCE beteiligt waren. Somit sind zwei Möglichkeiten denkbar: Möglich ist einerseits eine Beteiligung von sulfatreduzierenden Bakterien an der Dechlorierung von PCE zu cDCE in Konkurrenz mit dechlorierenden Bakterien oder andererseits das Vorhandensein von cDCE-bildenden hydrogenotrophen Gram-negativen Bakterien wie z.B. *Dehalospirillum multivorans* [SCHOLZ-MURAMATSU et al., 1995].

Unter denitrifizierenden Bedingungen fand ebenfalls nur eine verlangsamte biologische Transformation von PCE statt.

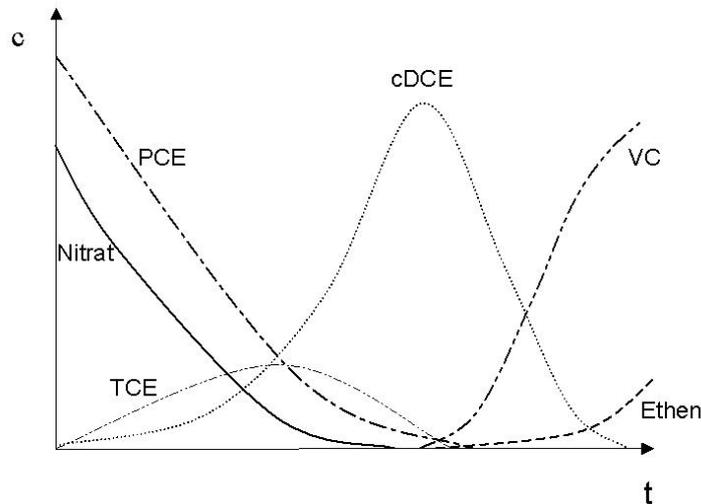


Abb. 5.5 PCE-Dechlorierungscharakteristik in Ansätzen mit GG und der DMC in Anwesenheit von Nitrat

Nitrat wird von *D. ethenogenes* Stamm 195 nicht als Elektronenakzeptor verwendet [MAYMÓ-GATELL et al., 1997]. Eine Beteiligung von dechlorierenden Bakterien an einer Nitratreduktion wurde jedoch mehrfach beschrieben. So ist *Dehalospirillum multivorans* in der Lage, Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor zu verwenden [SCHOLZ-MURAMATSU et al., 1995]. Über eine Hemmung der PCE-Dechlorierung durch Nitrat wurden jedoch keine Angaben gemacht. Bei den fakultativ anaeroben Bakterien *Enterobacter* Stamm MS-1 und *E. agglomerans* setzte eine Dechlorierung von PCE erst ein, wenn kein Nitrat mehr vorhanden war [SHARMA & MCCARTY, 1996].

Ein Vergleich der abiotischen Kontrollen ergab für Ansätze mit Sulfat eine wesentlich geringere Wiederfindungsrate an C₂-Verbindungen als für Ansätze mit Nitrat. PCE und Nitrat konkurrierten nicht nur bei der Reduktion sondern bereits bei der Sorption an den reaktiven und unreaktiven Plätzen des Eisens, so dass im Durchschnitt weniger PCE adsorbiert wurde. Sulfat schien nicht an das Eisen zu adsorbieren, so dass prozentual mehr PCE an Eisen gebunden wurde.

5.2.9 Nachweis von *Dehalococcoides* Spezies in Säulen

Die mittels Batchversuchen erzielten Ergebnisse dienten als Grundlage für weiterführende Säulenversuche, in denen die Besiedlung der Säulen durch *Dehalococcoides* Spezies aus der dechlorierenden Mischkultur und der Effekt auf die Dechlorierung von PCE untersucht wurde. Als Eisenmaterial wurde entweder GG

(Säule A und B) oder ein GG-Kies-Gemisch (Säule C und D) eingesetzt, wobei Säule B und D mit der DMC beimpft wurden.

Die Auswertung der C₂-Bilanzen zeigt deutlich, dass vor der Beimpfung mit der DMC Sorptionseffekte zu Minderbefunden an PCE und Dechlorierungsprodukten führen. Eine Sorption kann an den reaktiven Plätzen des Eisens erfolgen, wobei PCE sukzessive zum Ethen dechloriert und erst dann freigesetzt wird. Durch Sorption an unreaktiven Plätzen wird PCE reversibel festgelegt [BURRIS et al., 1995]. In den Säulen C und D (Reaktive Schüttung aus GG-Kies-Gemisch) waren die C₂-Bilanzen eher ausgeglichen als bei den Säulen A und B (Reaktive Schüttung nur mit GG). Ursache dafür können die im Verhältnis zu Säule C und D höheren Eisenmengen sein, so dass vorhandene nicht reaktive Oberflächen zu einem früheren Zeitpunkt belegt waren. Auch ein Verbleib von Dechlorierungsprodukten wie Ethen und Ethan in den Gasphasen in den Säulen kann zu Minderbefunden vorwiegend in den Säulen A und B geführt haben, während eine nachlassende Dechlorierungseffektivität der Säulen C und D auch eine verminderte Freisetzung von Ethen und Ethan nach sich gezogen hätte.

Auffallend ist, dass in allen Säulen, die mit einem Eingangs-pH-Wert von 8,7 betrieben wurden, kein Vinylchlorid, dafür jedoch cDCE auftrat. In den abiotischen Säulen A und C wurden überwiegend Ethen und Ethan sowie geringe Konzentrationen an TCE und cDCE gefunden, wie auch in Batchansätzen und Säulenversuchen von BURRIS et al. [1995], ORTH & GILLHAM [1996], ROBERTS et al. [1996], ARNOLD & ROBERTS [2000] und FARRELL et al. [2000 b] beschrieben. Durch den von ARNOLD & ROBERTS [2000] postulierten Mechanismus der reduktiven β -Eliminierung sollen in Batchansätzen 87 % PCE und 97 % TCE über die reaktiven Zwischenprodukte Dichlorethin und Chlorethin zu Ethen bzw. Ethan dechloriert worden sein. Während die Bildung von VC umgangen wird, ist die Bildung von cDCE durch Hydrogenierung von Dichlorethin denkbar [ARNOLD & ROBERTS, 2000]. Dieser Mechanismus ist auch für die Umsetzung von PCE in den abiotischen Säulen dieser Untersuchungen denkbar.

Eine Bildung von Ethan aus Ethen durch methanogene Aktivität ist möglich [CHIU & LEE, 2001], für die vorliegenden Säulenversuche jedoch unwahrscheinlich, da sowohl in den abiotischen als auch den biotischen Ansätzen keine Unterschiede in der Bildung von Methan festgestellt werden konnten und somit eine aktive Methanogenese in den bioaugmentierten Säulen keine Bedeutung hatte. Die Bildung von Methan kann somit auf eine abiotische Produktion durch Kohlenstoff-Verunreinigungen des Eisens

zurückgeführt werden. Die Produktion von Methan sowie von niedermolekularen Alkanen und Alkenen in Batchansätzen mit Fe^0 ist bereits länger bekannt und wurde beispielsweise von HARDY & GILLHAM [1996] und MÜHLECK [2000] untersucht.

Signifikante Mengen an cDCE traten in den bioaugmentierten Säulen B und D auf. Der Anteil an biologischer Dechlorierung war in der Säule B als gering zu bewerten, während in Säule D eine unvollständige Dechlorierung von PCE an die Bildung von bis zu 50 % cDCE gekoppelt war. Ca. 100 Tage nach der Beimpfung mit der DMC war in beiden Säulen vor der reaktiven Schüttung ein Nachweis von *Dehalococcoides* Sequenzen mittels des PCR-Assays aus Flüssigproben bei EingangspH-Werten von ca. 8,7 möglich. Eine Besiedlung der Eisenoberfläche im direkten Anstrombereich vor der reaktiven Schüttung ist damit anzunehmen. Eine Beteiligung von *Dehalococcoides* Spezies an der Dechlorierung von PCE zu cDCE ist bei diesem pH-Wert nicht auszuschließen, wobei eine Umsetzung bis zum VC und Ethen nicht beobachtet wurde. Denkbar ist jedoch auch eine Beteiligung weiterer hydrogenotropher dechlorierender Bakterien an der Dechlorierung von PCE.

Eine signifikante Freisetzung von VC, jedoch keine vollständige Dechlorierung zum Ethen erfolgte nach Absenkung des pH-Wertes von Säule D auf 7,0 und erneutem Animpfen mit der DMC. Am Tag 270 war im Eingangsbereich zwischen dem Beginn der reaktiven Schüttung und dem ersten Probenahme-Port in der reaktiven Schüttung (entspricht einer Aufenthaltszeit von 2,3 Stunden) die stärkste Bildung von VC zu verzeichnen. Dies korrelierte mit dem Nachweis von *Dehalococcoides* Spezies direkt vor der reaktiven Schüttung und am darauf folgenden Probenahme-Port. Eine signifikante Abnahme von VC erfolgte jedoch erst zwischen Port 4 und 5, was einer Aufenthaltszeit von 9,3 und 14 Stunden entspricht. Während cDCE und VC durch Fe^0 wesentlich schlechter dechloriert werden als höher chlorierte Ethene [MATHESON & TRATNYEK, 1994], kann eine abiotische Dechlorierung ebenso wie eine mikrobiologische Umsetzung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der Säulenversuche zeigen somit, dass *Dehalococcoides* Spezies sich im Anstrombereich einer Reaktiven Wand ansiedeln können. Eine quantitative Dechlorierung zum Ethen konnte in den Säulen jedoch nicht erreicht werden.

5.2.10 Bioaugmentation der Fe⁰-Reaktiven Wand in Rheine

In allen bisher untersuchten PCE oder TCE belasteten Aquiferen konnte ein Nachweis von VC und Ethen an das Vorhandensein von *Dehalococcoides* Spezies gekoppelt werden [HENDRICKSON et al., 2002]. Beispielsweise wiesen FENNEL et al. [2001] das Vorhandensein von *Dehalococcoides* Spezies mittels PCR in einem TCE-kontaminierten Aquifer an der Cape Canaveral Air Force Station (Florida, USA) nach. ELLIS et al. [2000] erreichten mit der Bioaugmentation der Pinellas Kultur [HENDRICKSON et al., 2002] des Aquifers der Dover Air Force Base (Delaware, USA) eine vollständige Dechlorierung von 5 mg/l TCE zu Ethen. Im Vorfeld erfolgte eine Biostimulierung: Die Schaffung anaerober Bedingungen wurde durch Zugabe von Lactat und Hefeextrakt erreicht. Durch Kreislaufführung des belasteten und inokulierten Grundwassers wurde dabei eine fast vollständige Dechlorierung zu Ethen erreicht. Eine weitere erfolgreiche Bioaugmentation mit der sog. KB-1 Kultur, einer TCE-dechlorierenden Anreicherungskultur [MAJOR et al., 2002] zeigte, dass die nachhaltige Besiedlung eines bislang *Dehalococcoides* freien Aquifers möglich war. Um im Untergrund anaerobe Verhältnisse zu schaffen, wurden Methanol und Acetat zugegeben, wobei eine Dechlorierung zu VC mit nachfolgender Bildung von Ethen beobachtet wurde. ADAMSON et al. [2003] beschrieben in diesem Zusammenhang erstmals den Versuch einer Quellensanierung durch Bioaugmentation, wobei eine Umwandlung von PCE in cDCE und VC, eine vollständige Dechlorierung bis zum Ethen jedoch nicht erreicht wurde.

Während bei einer Bioaugmentation in einen Aquifer anaerobe Verhältnisse durch Zugabe von Lactat und damit die Voraussetzungen für anaerobe mikrobiologische Prozesse erst geschaffen werden müssen, erfolgt in Fe⁰-Reaktiven Wänden durch die Korrosion des Eisens ein Absinken des Redoxpotenzials bei gleichzeitiger Freisetzung von H₂ als Elektronendonator für hydrogenotrophe Acetogenese und Dechlorierung. Für die DMC bedeutet dies, dass sowohl H₂ für die reduktive Dechlorierung als auch Acetat als C-Quelle bereitgestellt werden. Ein grundsätzliches Problem hingegen ist die Versorgung des Systems mit konstant niedrigen H₂-Partialdrücken, bei denen ein Wachstum von Dechlorierern auf Kosten anderer TEA-Prozesse gefördert wird. Außerdem zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen, dass durch den Anstieg des pH-Wertes bei der Passage durch die Wand nur eine begrenzte Besiedlung in den Anfangsbereichen stattfinden wird. Eine vollständige Dechlorierung im Anstrombereich der Fe⁰-Schicht konnte in den vorliegenden Säulenexperimenten nicht erreicht werden.

Ein wesentlicher Einfluss weiterer Grundwasserinhaltsstoffe auf die Dechlorierung muss zudem beachtet werden. In Hinblick auf die Bioaugmentation einer Fe⁰-Reaktiven Wand zeigte sich, dass Nitrat bzw. Sulfat eine Verlangsamung der mikrobiellen Dechlorierung von PCE bewirken. Ein Vergleich geochemischer Daten des Grundwassers der Dover Air Force Base (Delaware, USA) und dem Rheine-Gelände macht deutlich, dass im Dover-Aquifer weder Sulfat noch Nitrat in nennenswerten Konzentrationen vorhanden sind und somit eine negative Beeinflussung auf die Dechlorierung hier ausgeschlossen werden kann (Tab. 5.7).

Tab. 5.7 Geochemische Daten von Grundwasser des Dover Testgelände und dem Anstrombereich der Reaktiven Wand in Rheine (k. A.: keine Angaben)

Parameter	Dover AFB Test Aquifer (ELLIS et al., 2000)	Grundwasser aus dem Anstrom der Reaktiven Wand in Rheine (EBERT et al., 1999)
Gelöster O ₂	2,5 mg/l	0,3 mg/l
Nitrat	2,0 mg/l	40 mg/l
Sulfat	2,9 mg/l	80 mg/l
Methan	0,02 mg/l	k.A.
E _h	100 mV	-30 mV
pH	6,0	7,0

5.3 Ausblick

Die Untersuchungen zeigen, dass die Fe⁰-Reaktive Wand in Rheine von Bakterien besiedelt ist. Der Einfluss dieser mikrobiologischen Besiedlung auf die Langzeitstabilität ist zum derzeitigen Zeitpunkt als gering zu bewerten. Bei weiter nachlassender Reaktivität des Eisens kann die Bedeutung von mikrobiologischen Effekten in Zukunft jedoch zunehmen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, im Abstand von einigen Jahren weitere mikrobiologische Untersuchungen durchzuführen.

In Proben aus der Reaktiven Wand in Rheine wurde eine hohe acetogene Aktivität festgestellt. Weiterführende Untersuchungen können Aufschluss darüber geben, ob Acetogene durch Bildung von Acetat zu einer verminderten Präzipitatbildung durch Carbonate führen und somit einen positiven Effekt auf die hydraulische Leitfähigkeit einer Fe⁰-Reaktiven Wand haben. Zudem soll untersucht werden, welche Bedeutung der Parameter Acetat als alternativer Elektronendonator zum H₂ für die Besiedlung einer Fe⁰-Reaktiven Wand darstellt. In diesem Zusammenhang soll geklärt werden, warum Acetogene über Methanogene dominieren.

Dechlorierende Bakterien haben an der Umsetzung von PCE in der Reaktiven Wand in Rheine keine Bedeutung. Während in Probenmaterial aus den Säulen in Kiel dechlorierende Bakterien zwar angereichert wurden, waren diese jedoch nur in der Lage, PCE zu cDCE umzusetzen. Weiterführende Untersuchungen mit einer dechlorierenden Mischkultur ergaben, dass mit Fe⁰ als Elektronendonator eine Dechlorierung von PCE zu Ethen möglich ist. Eine Beteiligung von *Dehalococcoides* Spezies an der Dechlorierung wurde nachgewiesen. Bei erhöhten pH-Werten sowie bei Anwesenheit von Sulfat und Nitrat war jedoch eine Akkumulation von cDCE zu beobachten. Um die Bakterien zu bestimmen, die für eine vollständige Dechlorierung notwendig sind, ist eine kinetische und phylogenetische Charakterisierung der dechlorierenden Mischkultur sinnvoll. Dabei sollen die an der Dechlorierung beteiligten Bakterien isoliert und deren Anteil an der Dechlorierung erfasst werden, wenn PCE, TCE, cDCE oder VC einzeln als Elektronenakzeptor vorliegen sowie wenn ein Gemisch von zwei bis drei chlorierten Ethenen eingesetzt wird. Des Weiteren sollen weitere Elektronendonatoren wie z.B. Acetat untersucht werden.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit Fe⁰ als Elektronendonator bezeichnet wird, muss offengelassen werden, ob Fe⁰ als direkter durch Transfer der Elektronen von der

Eisenoberfläche, oder als indirekter Elektronendonator durch Bildung von atomarem Wasserstoff oder von H_2 dient. Durch die schnellere Dechlorierung von PCE durch die dechlorierende Mischkultur mit Fe^0 als mit H_2 als Elektronendonator kann vermutet werden, dass ein direkter Transfer von Elektronen stattfindet. Für eine Beweisführung müssen ebenfalls die an der Dechlorierung beteiligten Bakterien isoliert werden und genau bestimmt werden, in welchen syntrophen Assoziationen eine Dechlorierung von PCE zu Ethen erfolgt. Damit kann festgestellt werden, ob durch Effekte des Materials Eisen selber oder durch die langsame Freisetzung von H_2 dechlorierende Bakterien gefördert werden. Ist beides nicht der Fall, so kann untersucht werden, ob ein direkter Elektronentransfer von der Eisenoberfläche auf die dechlorierenden Bakterien für eine schnellere Dechlorierung sorgt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde reaktives Material aus zwei Probenahmen sowie eine Grundwasser-Probe aus dem Anstrombereich der Fe⁰-Reaktiven Wand in Rheine auf das Vorhandensein von ökophysiologischen Gruppen untersucht.

In den Proben des Graugusseisengranulat-(GG)-Kies-Gemisches aus der Reaktiven Wand in Rheine waren denitrifizierende und sulfatreduzierende Bakterien, Acetogene und Methanogene vorhanden. In den Eisenschwamm-(ES)-Proben hingegen waren nur Acetogene und Denitrifizierer nachzuweisen. Vermutlich aufgrund der Reaktivität des Eisenschwamms und des daraus resultierenden hohen pH-Wertes der Probe konnten nur alkalotolerante Bakterien überdauern.

Die zweite Probenahme erfolgte an Säulen, die zum Zeitpunkt der ersten Probenahme mit Material aus der Reaktiven Wand in Rheine bestückt worden waren. Sowohl in Proben mit GG-Kies-Gemisch als auch mit ES-Proben waren Sulfatreduzierer, Denitrifizierer und Acetogene nachweisbar. Eine methanogene Aktivität fehlte. Im GG-Kies-Gemisch waren zudem dechlorierende Bakterien vorhanden, die PCE bis cDCE dechlorierten.

Die Besiedlung erfolgte über den Grundwasserpfad, in dem Sulfatreduzierer, Denitrifizierer, Acetogene und Methanogene nachweisbar waren.

Der Einfluss der mikrobiologischen Besiedlung auf die Langzeitstabilität ist aufgrund der geringen Zellzahlen in den Proben zum derzeitigen Zeitpunkt als gering zu bewerten. Ein Vergleich beider Probenahmen, um eine zunehmende Besiedlung durch Mikroorganismen als mögliche Ursachen für die nachlassende Reaktivität des Eisens festzustellen, war nicht zulässig. Abnehmende Zellzahlen für strikt anaerobe Bakterien sowie die zunehmende Zellzahl an Denitrifikanten waren vermutlich auf O₂-Kontaminationen des Säulensystems aufgrund der Lagerung des Grundwassers bzw. des Aufbaus der Säulensysteme zurückzuführen.

Parallel durchgeführte Laboruntersuchungen mit einer dechlorierenden Mischkultur (DMC) dienten zur Überprüfung, ob eine Bioaugmentation der Reaktiven Wand in Rheine sinnvoll ist. Ziel war es, unter den in der Wand herrschenden Bedingungen eine quantitative PCE-Dechlorierung zu Ethen zu erreichen.

- Durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen konnte eine stabile, quantitative Dechlorierung von PCE zu Ethen durch die DMC innerhalb von einer Woche Inkubation etabliert werden. Dabei konnte H_2 durch Fe^0 als Elektronendonator für die Dechlorierung von PCE zu Ethen ersetzt werden.
- Mittels molekularbiologischer Untersuchungen konnten zwei *Dehalococcoides* Spezies in der DMC nachgewiesen werden. Die prozentual häufigere Sequenz zeigte hohe Homologien zu *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195, einem Bakterium, welches PCE zu Ethen umsetzt. Die zweite Sequenz ließ sich der Pinellas-Gruppe zuordnen, zu der CBDB1, ein Dioxin und Chlorbenzol dechlorierendes Bakterium sowie FL2, ein TCE dechlorierendes Bakterium, gezählt werden. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch eine „Amplified ribosomal DNA restriction analysis“ (ARDRA).
- Ein Wachstum der dechlorierenden Bakterien in der Mischkultur konnte über sequentielle Kultivierung nachgewiesen werden. Parallel durchgeführte molekularbiologische Untersuchungen belegten zudem ein Wachstum von *Dehalococcoides* Spezies mit GG als Elektronendonator, PCE als Elektronenakzeptor und Acetat als C-Quelle.
- Die verwendeten Eisensorten und –mengen in den Batchansätzen beeinflussten die Dechlorierung durch die DMC. Je reaktiver das Fe^0 bzw. je größer die eingesetzte Menge war, desto unvollständiger war die Dechlorierung von PCE. Als häufiges Endprodukt trat dann cDCE auf. Praxisnahe Konzentrationen von ca. 50 mg Nitrat/l und 100 mg Sulfat/l führten zu einer verzögerten Dechlorierung durch die DMC. Ebenso ergab eine starke pH-Abhängigkeit der biologischen Dechlorierung, dass bei pH-Werten ab ca. 8 eine Anreicherung von cDCE, bei pH-Werten ab 9 nur noch eine abiotisch durch Fe^0 induzierte Dechlorierung erreicht wurde.
- Säulenversuche zeigten nach Inokulation mit der DMC, dass der Anstrombereich von *Dehalococcoides* Spezies besiedelt wurde. Eine quantitative Dechlorierung bis zum Ethen wurde hingegen nicht erreicht.

7 Literaturverzeichnis

- Adamson, D. T., J. M. McDade & J. B. Hughes.** 2003. Inoculation of a DNAPL source zone to initiate reductive dechlorination of PCE. *Environ. Sci. Technol.* **37**:2525-2533.
- Adrian, L., W. Manz, U. Szewzyk & H. Görisch.** 1998. Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:496-503.
- Adrian, L.** 1999. Dechlorierung von Trichlorbenzolen durch anaerobe Mikroorganismen. Dissertation, Fachbereich Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Technische Universität Berlin, Verlag dissertation.de.
- Adrian, L., U. Szewzyk & H. Görisch.** 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* **408**:580-583.
- Arnold, W. A. & A. L. Roberts.** 2000. Pathways and kinetics of chlorinated ethylene and chlorinated acetylene reaction with Fe⁰ particles. *Environ. Sci. Technol.* **34**:1794-1805.
- Ballapragada, B. S., H. D. Stensel, J. A. Puhakka & J. F. Ferguson.** 1997. Effect of hydrogen on reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Environ. Sci. Technol.* **31**:1728-1734.
- Belay, N. & L. Daniels.** 1990. Elemental metals as electron sources for biological methane formation. *Antonie van Leeuwenhoek* **57**:1-7.
- Birke, V., H. Burmeister & D. Rosenau.** 2003. Aquifersanierung mit durchströmten Reinigungswänden. In: *Handbuch Altlastensanierung und Flächenmanagement*, V. Franzius, K. Wolf & E. Brandt (Eds.), C. F. Müller-Verlag, Altenbockum, 35. Erg. der 3. Aufl.
- Bliefert, C.** 1997. *Umweltchemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2. erw. Aufl.: 307.
- Blotevogel, J.** 2003. Diplomarbeit, Institut für Technischen Umweltschutz, Arbeitsgruppe Umwelthygiene, Technische Universität Berlin.
- Blume, H.-P.** 1990. *Handbuch des Bodenschutzes*. Ecomed Verlagsgesellschaft mbh, Landsberg/Lech, 1. Aufl.: 351-353
- Bokermann, C.** 2004. Abschlussbericht zu den Forschungsvorhaben STE 765 / 1-1 und 1-2. Langzeitverhalten reaktiver Systeme mit elementarem Eisen (Fe⁰) zur Reinigung LCKW-kontaminierter Grundwässer. Institut für Technischen Umweltschutz, Arbeitsgruppe Umwelthygiene, Technische Universität Berlin.
- Bolt, H. M.** 1997. Halogenierte Kohlenwasserstoffe: In: *Lehrbuch der Toxikologie*. H. Marquardt & S.G. Schäfer (Eds.), Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, unveränd. Sonderausgabe: 405-413.
- Breznak, J. A.** 1994. Acetogenesis from carbon dioxide in termite guts. In: *Acetogenesis*, H.L. Drake (Ed.), Chapman & Hall, Inc., New York:303-330.
- Bunge, M., L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W. G. Lorenz, J. R. Andreesen, H. Görisch & U. Lechner.** 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* **421**:357-360.
- Burris, D. R., T. J. Campbell & V. S. Manoranjan.** 1995. Sorption of trichloroethylene in a batch reactive metallic iron-water system. *Environ. Sci. Technol.* **29**:2850-2855.
- Carr, C. S. & J. B. Hughes.** 1998. Enrichment of high-rate PCE dechlorination and comparative study of lactate, methanol and hydrogen as electron donors to sustain activity. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1817-1824.
- Chiu, P. C. & M. Lee.** 2001. 2-Bromoethanesulfonate affects bacteria in a trichloroethene-dechlorinating culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2371-2374.
- Christiansen, N., S. R. Christensen, E. Arvin & B. K. Ahring.** 1997. Transformation of tetrachloroethene in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:91-94.

- Conrad, R.** 1996. Soil microorganism as controllers of atmospheric trace gases. *Microbiol. Rev.* **60**:609-640.
- Cord-Ruwisch, R. & F. Widdel.** 1986. Corroding iron as a hydrogen source for sulphate reduction in growing cultures of sulphate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**:169-174.
- Cord-Ruwisch, R., H.-J. Seitz & R. Conrad.** 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **149**:350-357.
- Cord-Ruwisch, R.** 2000. Microbially influenced corrosion on steel. In: *Environmental microbe-metal interactions*. D.R. Lovley (Ed.). ASM Press, Washington, D.C.:159-173.
- Cupples A. M., A. M. Spormann & P. L. McCarty.** 2003. Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and cis-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:953-959.
- Dahmke, A.** 1997. Aktualisierung der Literaturstudie "Reaktive Wände" pH-Redox-reaktive Wände. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe. 33/97.
- Dahmke, A., M. Ebert, D. Schäfer, O. Schlicker & W. Wüst.** 2000. Konstruktion und Optimierung passiver geochemischer Barrieren zur in-situ-Sanierung und Sicherung CKW-kontaminierter Aquifere. Technischer Bericht Nr. 02-WT9546/2. Institut für Geowissenschaften, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel.
- Daniels, L., N. Belay, B. S. Rajagopal & P. J. Weimer.** 1987. Bacterial methanogenesis and growth from CO₂ with elemental iron as the sole source of electrons. *Science* **237**:509-511.
- Dejournett, T. & P. J. J. Alvarez.** 1999. Combined microbial-Fe(O)system to remove nitrate from contaminated groundwater. *Biorem. J.* **4**:149-154.
- Deutsches Institut für Normung.** 1983. DIN 38406 Teil 5. Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs.
- Dinh, H. T., J. Kuever, M. Mußmann, A. W. Hassel, M. Stratmann & F. Widdel.** 2004. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. *Nature* **427**:829-832.
- DiStefano, T. D., J. M. Gossett & S. H. Zinder.** 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2287-2292.
- DiStefano, T. D., J. M. Gossett & S. H. Zinder.** 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3622-3629.
- Dolfing, J. & B. K. Harrison.** 1992. Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments. *Environ. Sci. Technol.* **26**:2213-2218.
- Dolfing, J. & D. B. Janssen.** 1994. Estimates of Gibbs free energies of formation of chlorinated aliphatic compounds. *Biodegradation* **5**:21-28.
- Dolfing, J. & J. E. M. Beurskens.** 1995. The microbial logic and environmental significance of reductive dehalogenation. In: *Advances in microbial ecology*, J. G. Jones (Ed.), Plenum Press, New York, Vol. **14**:143-206.
- Duhamel, M., S. D. Wehr, L. Yu, H. Rizvi, D. Seepersad, S. Dworatzek, E. E. Cox, & E. A. Edwards.** 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. *Wat. Res.* **36**:4193-4202.
- Ebert, M., W. Möller, & M. Wegner.** 1999. F+E-Vorhaben Reaktive Wand in Rheine - aktuelle Ergebnisse - Altlasten Spektrum **2**:109-112.
- Ebert, M.** 2002. Persönliche Mitteilung. Institut für Angewandte Geologie. Universität Kiel.
- El Fantroussi, S. E., H. Naveau & S. N. Agathos.** 1998. Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotechnol. Prog.* **14**:167-188.
- Ellis, D. E. E. J. Lutz, J. M. Odom, R. J. Buchanan jr., C. L. Bartlett, M. D. Lee, M. R. Harkness &**

- K. A. DeWeerd. 2000. Bioaugmentation for accelerated in situ anaerobic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2254-2260.
- Fathepure, B. Z. & S. A. Boyd. 1988. Dependence of tetrachlorethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2976-2980.
- Farrell, J., M. Kason, N. Melitas & T. Li. 2000 a. Investigation of the long-term performance of zero-valent iron for reductive dechlorination of trichloroethylene. *Environ. Sci. Technol.* **34**:514-521.
- Farrell, J., N. Melitas, M. Kason, & T. Li. 2000 b. Electrochemical and column investigation of iron-mediated reductive dechlorination of trichloroethylene and perchloroethylene. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2549-2556.
- Fennell, D. E., J. M. Gossett & S. H. Zinder. 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ. Sci. Technol.* **31**:918-926
- Fennell, D. E. & J. M. Gossett. 1998. Modeling the production of and competition for hydrogen in a dechlorinating culture. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2450-2460.
- Fennell, D. E., A. B. Carroll, J. M. Gossett & S. H. Zinder. 2001. Assessment of indigenous reductive dechlorinating potential at a TCE-contaminated site using microcosms, polymerase chain reaction analysis, and site data. *Environ. Sci. Technol.* **35**:1830-1839.
- Fey, A. & R. Conrad. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4790-4797.
- Florencio, L., J. A. Field & G. Lettinga. 1994. Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:227-234.
- Freedman, D. L. & J. M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2144-2151.
- Gandhi, S., B.-T. Oh, J. L. Schnoor & P. J. J. Alvarez. 2002. Degradation of TCE, Cr(VI), sulfate, and nitrate mixtures by granular iron in flow-through columns under different microbial conditions. *Water Res.* **36**:1973-1982.
- Gaspar, D. J., L. A. Scott, H. M. Engelhard, D. R. Baer, R. Miehr & P. G. Tratnyek. 2002. Evidence for localization of reaction upon reduction of carbontetrachloride by granular iron. *Langmuir* **18**:7688-7693.
- Gavaskar, A., B. Sass, N. Gupta, E. Drescher, W.-S Yoon, J. Sminchak, J. Hicks & W. Condit. 2002. Final report: Evaluating the longevity and hydraulic performance of permeable reactive barriers at department of defense sites. Battelle, Columbus, Ohio (Ed.), Contract No.: N47408-95-D-0730-0087: 69-80.
- Gerlach, R., A. B. Cunningham & F. Caccavo. 2000. Dissimilatory iron-reducing bacteria can influence the reduction of carbon tetrachloride by iron metal. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2461-2464.
- Gerritse, J., V. Renard, T. M. P. Gomes, P. A. Lawson, M. D. Collins & J. C. Gottschal. 1996. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.* **165**:3800-3808.
- Gillham, R. W. & S. F. O'Hannesin. 1994. Enhanced degradation of halogenated aliphatics by zero-valent iron. *Ground Water.* **32**:958-967.
- Glod, G., W. Angst, C. Holliger & R. P. Schwarzenbach. 1997. Corrinoid-mediated reduction of tetrachloroethene, trichloroethene, and trichlorofluoroethene in homogeneous aqueous solution: reaction kinetics and reaction mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* **31**:253-260.
- Gossett, J. M. 1987. Measurement of henry's law constant for C₁ and C₂ chlorinated hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **21**:202-208.

- Gray, L. G. S., B. G. Anderson, M. J. Danysh & P. R. Tremaine.** 1989. Mechanism of carbon steel corrosion in brines containing carbon dioxide at pH 4. In: Corrosion 198; NACE (Ed.), Houston, USA: 464:1-19.
- Gu, B., T. J. Phelps, L. Liang, M. J. Dickey, Y. Roh, B. L. Kinsall, A. V. Palumbo & G. K. Jacobs.** 1999. Biogeochemical dynamics in zero-valent iron columns: implications for permeable reactive barriers. *Environ. Sci. Technol.* **33**:2170-2177.
- Gu, B., D. B. Watson, L. Wu, D. H. Phillips, D. C. White & J. Zhou.** 2002. Microbiological characteristics in a zero-valent iron reactive barrier. *Environ. Monit. Assess.* **77**:293-309.
- Gui, J. & T. M. Devine.** 1994. The influence of sulfate ions on the surface enhanced raman spectra of passive films formed on iron. *Corros. Sci.* **36**:441-462.
- Hardy, J.** 1983. Utilisation of cathodic hydrogen by sulphate-reducing bacteria. *Br. Corros. J.* **18**:190-193.
- Hardy, L. I & R. W. Gillham.** 1996. Formation of hydrocarbons from the reduction of aqueous CO₂ by zero-valent iron. *Environ. Sci. Technol.* **30**:57-65.
- He, J., Y. Sung, M. E. Dollhopf, B. Z. Fathepure, J. M. Tiedje & F. E. Löffler.** 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. *Environ. Sci. Technol.* **36**:3945-3952.
- He J., K. M. Ritalahti, M. R. Aiello & F. E. Löffler.** 2003. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:996-1003.
- Heitz, E. H.-C. Flemming & W. Sand.** 1996. Microbially influenced corrosion of materials. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Hendrickson, E. R., J. A. Payne, R. M. Young, M. G. Starr, M. P. Perry, S. Fahnestock, D. E. Ellis & R. C. Ebersole.** 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:485-495.
- Henschler, D.** 1994. Toxikologie chlororganischer Verbindungen. Der Einfluß chlororganischer Verbindungen. VCH-Verlag, Weinheim, 1. Aufl.:22-26.
- Herbert, D., P. J. Phillips & R. E. Strange.** 1971. Chemical analysis of microbial cells IV. The Folin-Ciocalteu reagent. In: Methods in Microbiology 5 B, J. R. Norris & D. W. Ribbons (Eds.), Academic Press, London and New York.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss & A. J. B. Zehnder.** 1998. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* **169**:313-321.
- Holliger, C., G. Wohlfarth & G. Diekert.** 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:383-398.
- Kalmbach, S., W. Manz, & U. Szewzyk.** 1997. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16S rRNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4164-4170.
- Kamolpornwijit, W., L. Liang, O. R. West, G. R. Moline & A. B. Sullivan.** 2003. Preferential flow path development and its influence on long-term PRB performance: column study. *J. Cont. Hydrol.* **66**:161-178.
- Kielemoes, J., P. De Boever & W. Verstraete.** 2000. Influence of denitrification on the corrosion of iron and stainless steel powder. *Environ. Sci. Technol.* **34**:663-671.
- Kim, Y.-H. & E. R. Carraway.** 2002. Reductive dechlorination of tri- and tetrachloroethylenes by vitamin B12 and ZVMs. *Environ. Technol.* **23**:1135-1145.

- Klausen, J., P. J. Vikesland, T. Kohn, D. R. Burris, W. P. Ball & A. L. Roberts.** 2003. Longevity of granular iron in groundwater treatment processes: Solution composition effects on reduction of organohalides and nitroaromatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **37**:1208-1218.
- Koch, R.** 1991. Umweltchemikalien: Physikalische-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten. VCH-Verlag, Weinheim, 2.Aufl.
- Kölbel-Boelke, J., E.-M. Anders & J. Böttcher.** 1983. Microbial communities in the saturated groundwater environment I: methods of isolation and characterization of heterotrophic bacteria. *Microb. Ecol.* **16**:125-147.
- Korte, N., O. R. West, L. Liang, M. J. Pelfrey & T. C. Houk.** 1997. A field-scale test facility for permeable reactive barriers at the portsmouth gaseous diffusion plant. *Fed. Fac. Environ. J.* **8**:105-104.
- Kristjansson, J. K., P. Schönheit & R. K. Thauer.** 1982. Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: An explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch. Microbiol.* **131**:278-282.
- Krumholz, L. R.** 1997. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:1262-1263.
- Kuhlmann, A.** 1998. Untersuchungen zur reduktiven Dechlorierung von Tetrachlorethen durch eine methanogene Mischkultur. Diplomarbeit, Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Hygiene, Technische Universität Berlin.
- Lampron, K. J., P. C. Chiu & D. K. Cha.** 1998. Biological reduction of trichloroethene supported by Fe^0 . *Biorem. J.* **2**:175-181.
- Lampron, K. J., P. C. Chiu & D. K. Cha.** 2001. Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes with elemental iron: the role of microorganisms. *Wat. Res.* **35**:3077-3084.
- Landesamt für Umweltschutz Baden-Württemberg.** 1995. Handbuch Altlasten und Grundwasserschadensfälle. Hydraulische und pneumatische in-situ Verfahren. Band 16:59-81.
- Lee, T., T. Tokunaga, A. Suyama & K. Furukawa.** 2001. Efficient dechlorination of tetrachloroethylene in soil slurry by combined use of an anaerobic *Desulfitobacterium* sp. strain Y-51 and Zero-Valent Iron. *J. Biosci. Bioeng.* **5**:453-458.
- Lehninger, A.L.** 1985. Biochemie, VCH Verlag, Weinheim, 2.Aufl.:282-284.
- Lesage, S., S. Brown & K. Millar.** 1998. A different mechanism for the reductive dechlorination of chlorinated ethenes: Kinetic and spectroscopic evidence. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2264-2272.
- Li, T. & J. Farrell.** 2000. Reductive dechlorination of trichloroethylene and carbon tetrachloride using iron and palladized-iron cathodes. *Environ. Sci. Technol.* **34**:173-286.
- Liang, L., O. R. West & N. Korte.** 1997. Interim report: The X-625 groundwater treatment facility: A field scale test of trichloroethylene dechlorination using iron fillings for the X-120/X-729 groundwater plume. Oak Ridge National Laboratory. TM-13410, Oak Ridge, TN.
- Liang, L., N. Korte, B. Gu, R. Puls & C. Reeter.** 2000. Geochemical and microbial reactions affecting the long-term performance of in situ 'iron barriers'. *Adv. Environ. Res.* **4**:273-286.
- Löffler, F. E., J. M. Tiedje & R. S. Sanford.** 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halo-respiratory physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4049-4056.
- Löffler, F. E., Q. Sun, S. Li & J. M. Tiedje.** 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1270-1275.
- Lorowitz, W. H., D. N. Nagle & R. S. Tanner.** 1992. Anaerobic oxidation of elemental metals coupled to methanogenesis by *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Environ. Sci. Technol.* **26**:1606-1610.
- Lovley, D. R.** 1985. Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1530-1531.

- Lovley, D. R. & S. Goodwin.** 1988. Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**:2993-3003.
- Lovley, D. R., F. H. Chapelle & J. C. Woodward.** 1994. Use of dissolved H_2 concentrations to determine distribution of microbially catalyzed redox reactions in anoxic groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **28**:1205-1210.
- Madigan, M. T, J. M. Martinko & J. Parker.** 2001. Brock Mikrobiologie, W. Goebel (Ed.), Spektrum Akad. Verlag GmbH, Heidelberg, 1. Aufl.:673-687.
- Magnuson, J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder and D. R. Burris.** 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1270-1275.
- Magnuson, J. K., M.F. Romine, D. R. Burris & M. T. Kingsley.** 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of tceA and substrate range characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5141-5147.
- Major, D. W., M. L. McMaster, E. E. Cox, E. A. Edwards, S. M. Dworatzek, E. R. Hendrickson, M. G. Starr, J. A. Payne & L. W. Buonamici.** 2002. Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* **36**:5106-5116.
- Matheson, L. J. & P. G. Tratnyek.** 1994. Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron metal. *Environ. Sci. Technol.* **28**:2045-2053.
- Maymó-Gatell, X., V. Tandoi, J. M. Gossett & S. H. Zinder.** 1995. Characterization of an H_2 -utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3928-3933.
- Maymó-Gatell, X., Y. T. Chien, J. M. Gossett & S. H. Zinder.** 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**:1568-1571.
- Miller, E., G. Wohlfarth & G. Diekert.** 1996. Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* **166**:379-387.
- Miller, E., G. Wohlfarth & G. Diekert.** 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* **169**:497-502.
- Möller, W.** 1998. Bau einer „Reaktiven Wand“ als F+E-Vorhaben in Rheine. *TerraTech* **4**:47-48.
- Morita, R. Y.** 1999. Is H_2 the universal energy source for long-term survival. *Microb. Ecol.* **38**:307-320.
- Mühleck, R.** 2000. Entstehung von Wasserstoff und Kohlenwasserstoffen bei der anaeroben Eisenkorrosion. Diplomarbeit, Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Hygiene, Technische Universität Berlin.
- Nader, F.** 1998. Positionen zur Chemie mit Chlor (Web-Version). <http://www.vci.de/start.asp?bhcp=1>. Stand: 01. Dez. 1998.
- Nestler, A.** 2002. Wasserstoffverwertung und Sulfat-Reduktion einer Mischkultur in reaktiven Systemen mit elementarem Eisen (Fe^0). Diplomarbeit, Institut für Technischen Umweltschutz, Arbeitsgruppe Umwelthygiene, Technische Universität Berlin.
- Neumann, A. H. Scholz-Muramatsu & G. Diekert.** 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* **162**:295-301.
- Neumöller, O.-A.** 1988. Römpps Chemie-Lexikon. Franckh'sche Verlagshandlung, W. Keller & Co., Stuttgart.
- O'Hannesin, S. F. & R. W. Gillham.** 1998. Long-term performance of an in situ „iron wall“ for remediation of VOCs. *Groundwater*. **36**:164-170.
- Oremland, R. S. & D. G. Capone.** 1988. Use of specific inhibitors in biogeochemistry and microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.* **10**:285-383.

- Orth, W. S. & R. W. Gillham.** 1996. Dechlorination of trichloroethene in aqueous solution using Fe⁰. *Environ. Sci. Technol.* **30**:66-71.
- Potekhina, J. S., N. G. Sherisheva, L. P. Povetkina, A. P. Pospelov, T. A. Rakitina, F. Warnecke & G. Gottschalk.** 1999. Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:639-646.
- Puls, R. W., C. J. Paul & R. M. Powell.** 1999. The application of in situ permeable reactive (zero-valent iron) barrier technology for the remediation of chromate-contaminated groundwater: A field test. *Appl. Geochem.* **14**:989-1000.
- Rajagopal, B. S. & J. LeGall.** 1989. Utilization of cathodic hydrogen by hydrogen-oxidizing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:406-412.
- Reardon, E. J.** 1995. Anaerobic corrosion of granular iron: measurement and interpretation of hydrogen evolution rates. *Environ. Sci. Technol.* **29**:2936-2945.
- Renz, G., H. Schliephake & K. Stercken.** 1995. Eisenschwamm für die Stahlerzeugung.- Gemeinsame Vollsitzung des Rohstoffausschusses und des Stahlwerksausschusses des VCEh, Düsseldorf.
- Richardson, R. E., V. K. Bhupathiraju, D. L. Song, T. A. Goulet, & L. Alvarez-Cohen.** 2002. Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environ. Sci. Technol.* **36**:2652-2662.
- Rippen.** 1997. Handbuch der Umweltchemikalien, Band 1-7. Loseblattsammlung, Ecomed Verlag Landsberg, Lech, Stand Mai 1997.
- Roberts, A. L., L. A. Totten, W. A. Arnold, D. R. Burris & T. J. Campbell.** 1996. Reduction of chlorinated ethylenes by zero-valent metals. *Environ. Sci. Technol.* **30**:2654-2658.
- Roh, Y., S. Lee & M. Elless.** 2000. Characterization of Corrosion Products in the Permeable Reactive Barriers. *Environ. Geol.* **40**:184-194.
- Rosenthal, H., L. Adrian & M. Steiof.** 2004. Dechlorination of PCE in the presence of Fe⁰ enhanced by a mixed culture containing two *Dehalococcoides* strains. *Chemosphere* **55**:661-669.
- Rossetti, S., L. L. Blackall, M. Majone, P. Hugenholtz, J. J. Plumb & V. Tandoi.** 2003. Kinetic and phylogenetic characterization of an anaerobic dechlorinating microbial community. *Microbiol.* **149**:459-469.
- Sambrock, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2 Aufl.
- Scherer, M. M., B. A. Balko, D. A. Gallagher und P. D. Tratnyak.** 1998. Correlation analysis of rate constants for dechlorination by zero-valent iron. *Environ. Sci. Technol.* **32**:3026-3033.
- Scherer, M. M., S. Richter & R. L. Valentine.** 2000. Chemistry and microbiology of permeable reactive barriers for in situ groundwater clean up. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **30**:363-411.
- Schink, B.** 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:262-280.
- Schlicker, O., M. Ebert, H. Schad, W. Wüst & A. Dahmke.** 1998. Geochemische Modellierungen zur Abschätzung der Grundwassergüte im Abstrom von Fe⁰-Reaktionswänden. *TerraTech* **7**:43-46.
- Scholten, J. C. M., P. M. van Bodegom, J. Vogelaar, A. van Ittersum, K. Hordijk, W. Roelofsen & A. J. M. Stams.** 2002. Effect of sulfate and nitrate on acetate conversion by anaerobic microorganisms in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**:375-385.
- Scholz-Muramatsu, H. & H.-C. Fleming.** 1991. Unter welchen Milieubedingungen erfolgt ein mikrobieller Abbau leichtflüchtiger aromatischer Kohlenwasserstoffe (LCKW)? In: *Wasser-Kalender 1991*, R. Wagner (Ed.), Erich Schmidt Verlag, Berlin:135-158.
- Scholz-Muramatsu, H., A. Neumann, M. Meßmer, E. Moore & G. Diekert.** 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov. sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **163**:48-56.

- Schumacher, W., C. Holliger, A. J. B. Zehnder & W. R. Hagen. 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. FEBS Lett. **409**:421-425.
- Sharma, P. K. & P. L. McCarty. 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethylene to cis-1,2-dichloroethylene. Appl. Environ. Microbiol. **62**:761-765.
- Sigg, L. & W. Stumm. 1996. Aquatische Chemie. Teubner-Verlag, Stuttgart, 4. Aufl.
- Starr, R. C. & J. A. Cherry. 1996. In-situ remediation of contaminated ground water – the funnel-and-gate system. Ground Water **32**:465-476.
- Steiof, M. 1993. Biologische in-situ Sanierung eines mit Dieselöl kontaminierten Aquifers. Dissertation, Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Hygiene, Technische Universität Berlin.
- Sung, Y. K. M. Ritalahti, R. A. Sanford, J. W. Urbance, S. J. Flynn, J. M. Tiedje & F. E. Löffler. 2003. Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. **69**:2964-2974.
- Suyama, A., M. Yamashita, S. Yoshino & K. Furukawa. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. J. Bacteriol. **184**:3419-3425
- Terzenbach, D. P. & M. Blaut. 1994. Transformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene by homoacetogenic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **123**:213-218.
- Testa, P. 2003. Persönliche Mitteilung. Arbeitsgruppe Umwelthygiene. Technische Universität Berlin.
- Thauer, R. K., K. Jungermann & K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobes. Bacteriol. Rev. **41**:100-180.
- Till, B. A., L. J. Weathers & P. J. J. Alvarez. 1998. Fe⁰-supported autotrophic denitrification. Environ. Sci. Technol. **32**:634-639.
- Tratnyek, P. G., T. L. Johnson, M. M. Scherer & G. R. Eykholt. 1997. Remediating ground water with zero-valent metals: Chemical considerations in barrier design. Ground Wat. Monit. Remed. **3**:108-114.
- Tratnyek, P. G., M. M. Scherer, T. L. Johnson & L. J. Matheson. 2003. Permeable reactive barriers of iron and other zero-valent metals. In: Chemical degradation methods for wastes and pollutants. Environmental and industrial applications, M. A. Tarr (Ed.), Marcel Dekker, New York:371-421.
- Utkin, I., C. Woese & J. Wiegand. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov. sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds, Int. J. Syst. Bacteriol. **44**:1010-1015.
- Van Eekert, M. H. A. & G. Schraa. 2001. The potential of anaerobic bacteria to degrade chlorinated compounds. Water Sci Technol. **44**:49-56.
- Van de Pas, B. A., J. Gerritse, W. M. de Vos, G. Schraa & A. J. M. Stams. 2001. Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and chlorophenol reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1. Arch. Microbiol. **176**:165-169.
- Venkatapathy, R., D. G. Bessingpas, S. Canonica & J. A. Perlinger. 2002. Kinetic models for trichloroethylene transformation by zero-valent iron. Appl. Catalysis B: Environ. **37**:139-159.
- Vikesland, P. J., J. Klausen, H. Zimmermann, A.L. Roberts & W. P. Ball. 2003. Longevity of granular iron in groundwater treatment processes: changes in solute transport properties over time. Cont. Hydrol. **64**:3-33.
- Votteler, J. 2002. Molekularbiologische Analyse anaerober, reduktiv dechlorierender Mischkulturen. Studienarbeit, Fachbereich Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Technische Universität Berlin.

- Wang, J. & J. Farrell.** 2003. Investigating the role of atomic hydrogen on chloroethene reactions with iron using tafel analysis and electrochemical impedance spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **37**:3891-3896.
- Weathers, L. J. G. F. Parkin & P. J. Alvarez.** 1997. Utilization of cathodic hydrogen as electron donor for chloroform cometabolism by a mixed, methanogenic culture. *Environ. Sci. Technol.* **31**:880-885.
- Westerhoff, P. & J. James.** 2003. Nitrate removal in zero-valent iron packed columns. *Wat. Res.* **37**:1818-1830.
- Widdel, F.** 1988. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: *Biology of anaerobic microorganisms*, A.J.B. Zehnder (Ed.), John Wiley and Sons, Inc. London, United Kingdom:469-586.
- Wild, A., R. Hermann & T. Leisinger.** 1996. Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. *Biodegradation* **7**:507-511.
- Wu Q., J. E. M. Watts, K. R. Sowers & H. D. May.** 2002. Identification of a bacterium that specifically catalyzes the reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls with doubly flanked chlorines. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:807-812.
- Yang, Y. & P. L. McCarty.** 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture. *Environ. Sci. Technol.* **32**:3591-3597.
- Ye, D., J. F. Quensen III, J. M. Tiedje & S. A. Boyd.** 1999. 2-Bromoethanesulfonate, sulfate, molybdate, and ethanesulfonate inhibit anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls by pasteurized microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:327-329.
- Zehnder, A. J. B. & K. Wuhrmann.** 1976. Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**:1165-1166.

8 Anhang

8.1 Eigenschaften der Schüttung in Säule A und B

	Säule A	Säule B
Eisenmasse [g]	3735,8	3608,9
Flüssigvolumen in der Eisenschüttung [ml]	569	625
Porosität der Eisenschüttung [%]	49,3	54,1
Länge der Eisenschüttung [cm]	30	30
Porenwassergeschwindigkeit in der Eisenschüttung [cm/d]	50,6	46,8
Kiesmasse [g]	1862,5	1914,6
Flüssigvolumen in der Kiesschüttung [ml]	421	412
Porosität der Kiesschüttung [%]	36,5	35,7
Länge der Kiesschüttung [cm]	30	30
Porenwassergeschwindigkeit in der Kiesschüttung [cm/d]	68,4	69,9

8.2 Eigenschaften der Schüttung in Säule C und D.

	Säule C /D
Eisenmasse [g]	800,0
Kiesmasse [g]	3200,0
Flüssigvolumen in der Eisen-Kies-Schüttung [ml]	1120
Porosität der Eisen-Kies-Schüttung [%]	48,5
Länge der Eisen-Kies-Schüttung [cm]	60
Porenwassergeschwindigkeit in der Eisen-Kies-Schüttung [cm/d]	51,4

8.3 Übersicht über die zeitliche Variation der Betriebsparameter des Säulenexperiments.

Tag	Anmerkungen
0	Befüllen der Säulen, Versorgung nur mit CaCl ₂ , MgCl ₂ und Carbonat
12	zusätzlich Spurenelemente und Vitamin-Stammlösung mit 5 µg/l Vitamin B ₁₂
27	zusätzlich 1 mM Acetat
29	Inokulierung von Säulen B und D mit je 120 ml DMC Verminderung der PCE-Eingangskonzentration in Säulen C und D
43	Inokulierung von Säulen B und D mit je 150 ml DMC
81	Wechsel auf Vitamin-Stammlösung mit 50 µg/l Vitamin B ₁₂
83	Anheben der PCE-Eingangskonzentration in Säulen C und D auf altes Niveau
101	Verminderung der Acetat-Konzentration auf 0,1 mM
137	Entnahme von Probenmaterial für die PCR
159	Aussetzen der Vitamin-Zugabe
179	Experimente mit Säule A und B beendet
184	durch Änderung der Medienzusammensetzung Absenkung des pH-Wertes von ca. 8,7 auf ca. 7,1 im Einlauf von Säule C und D; Inokulierung von Säule D mit 80 ml DMC
217	Zugabe von 30 ml DMC in Säule D
246	Zugabe von 100 µl Methanol in Säule D
270	Probenahme für PCR; Untersuchungen beendet

8.4 Standardherstellung

Die Gasstandards wurden in 1 l Serumflaschen hergestellt. Dafür wurden nach Bestimmung des Volumens die vollständig mit Wasser gefüllten Serumflaschen in ein Wasserbad getaucht. Inertal (ein Gasmisch aus 80 Vol.-% N₂ und 20 Vol.-% CO₂ 2.8) wurde eingeleitet und die Flasche unter Wasser mit zwei Septen (Butylgummi, rot Ø 35 mm; Chlorbutylstopfen, Ø 35 mm; Fa. Machery-Nagel, Düren) und einem Schraubverschluss gasdicht verschlossen. In diese Serumflaschen mit definierter Gaszusammensetzung wurde anschliessend 1, 5 oder 10 Vol.-% der Gase, bei Wasserstoff-Standards zusätzlich 15 und 20 Vol.-% zugegeben.

Im folgenden ist die Berechnung der Gasstandards dargestellt:

Gasanteil im Standard:
$$GA_s = \frac{V_Z}{V_Z + V_F}$$

mit GA_s = Gasanteil im Standard [-]

V_Z = in Glasflasche injiziertes Gasvolumen [ml]

V_F = Volumen der Glasflasche [ml]

Gasmenge in der Spritze:
$$n_{GAS} = \frac{V_i \cdot GA_s}{V_m}$$

mit n_{GAS} = Gasmenge in der Spritze [mol]
 V_i = Gasvolumen in der Spritze [m³]

Ethen, Ethin und Ethan

Zwischen dem niedrigsten mit 2,1 µM und dem höchsten Ethan- und Ethinstandard mit 204,3 µM wurden 10 weitere Konzentrationen eingestellt. Zwischen dem niedrigsten mit 2,1 µM und dem höchsten Ethenstandard mit 203,1 µM wurden ebenfalls 10 weitere Konzentrationen verwendet. Diese Standards wurden durch Verdünnung aus 1, 3 und 5 Vol.-% Standards hergestellt.

Ein entsprechendes Volumen wurde in mit 1 ml Millipore® versetzten und mit Teflon beschichteten Butylsepten (PTFE Butylrubber, Fa. Perkin Elmer) verschlossenen 22 ml Headspace-Vials (Fa. Perkin Elmer) injiziert. Dabei wurde die Nadel schräg durch die Septen geführt, um zu verhindern, dass durch bei der Messung im HS-GC auftretenden hohen Drücke ein Entweichen der Gase stattfinden konnte. Die so zugeführte Stoffmenge konnte somit auf 1 ml Millipore® bezogen werden. Die höchste und niedrigste Konzentration wurde im Zehnfach-, die übrigen im Doppelansatz gemessen.

Methan

Die Methankalibrierung erfolgte analog zur Ethan- bzw. Ethenkalibrierung, mit dem Unterschied, dass zur Kalibrierung für die Batch- und Säulenversuche nur ein Standard mit 1 Vol.-%, für die Kalibrierung für die Kultivierung von DMC bis zu 10 Vol.-%ige Standards angesetzt wurden. Das zugegebene Gasvolumen betrug 5 µl und in 10er Schritten ab 10 bis 100 µl, woraus sich Methankonzentrationen von 2,0 bis 40,9 µM bzw. bis 409,0 µM ergaben. Auch hier wurde die höchste und niedrigste Konzentration im Zehnfach-, die übrigen im Doppelansatz gemessen.

PCE, TCE und cDCE

Zunächst wurde die Standardlösung I hergestellt, indem 10 ml Methanol in ein Headspace-Vial gegeben wurden, dieses verschlossen wurde und mit einer gasdichten 25 µl-Glasspritze je 9 µl PCE, TCE und cDCE injiziert wurden. Die Standardlösung II wurde angesetzt, indem mit einer gasdichten 1 ml-Glasspritze 0,5 ml aus der Standardlösung I in ein verschlossenes Vial gegeben wurde, in dem sich ebenfalls 10 ml Methanol befand. In weitere Headspace-Vials wurde autoklaviertes Millipore® pipettiert und die Vials geschlossen. Das Flüssigvolumen wurde durch Zugabe verschiedener Mengen aus den beiden Standardlösungen mit einer geeigneten Glasspritze auf jeweils 1 ml aufgefüllt.

Die Konzentrationen der PCE-Standards lagen zwischen 1,75 µM und 176,1 µM, die TCE-Standards zwischen 1,98 und 200,9 µM und die cDCE-Standards zwischen 2,37 und 234,2

μM . Zwischen diesen wurden 9 Konzentrationen eingestellt. Die höchste und niedrigste Konzentration wurde im Zehnfach-, die übrigen im Doppelansatz gemessen.

Vinylchlorid

VC wurde mit einer Fünfpunktkalibrierung im Doppelansatz kalibriert. Dazu wurde der Halomix (Fa. Ultra Scientific) verwendet, der mit autoklaviertem Millipore® direkt im Headspace-Vial auf Konzentrationen von 16, 64, 112, 160 und 240 $\mu\text{mol/l}$ verdünnt wurde. Zunächst wurde Millipore® vorgelegt, nach anschließender Zugabe des Halomixes mit einer 100 μl -Glasspritze wurde das Vial sofort geschlossen. In jedem Vial waren analog zur Probenmessung 1 ml Flüssigkeit.

Wasserstoff

Kalibriert wurde mit einer Dreipunkt- bis Fünfpunktkalibrierung im Doppelansatz bei jeder Messung. Dazu wurde aus einem 1, 5, 10 bzw. 1, 5, 10, 15 und 20 %igen Standards je 100 μl mit einer 100 μl -Glasspritze (Pressure-LOK, Fa. VICI Precision Sampling) direkt in den GC-14A (Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) injiziert.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1	Von ARNOLDS & ROBERTS [2000] vorgeschlagener Mechanismus für die reduktive Dechlorierung von PCE mit elementarem Eisen	13
Abb. 2.2	Beteiligung von hydrogentrophen sulfatreduzierenden Bakterien (SRB) an der anaeroben Korrosion von Stahl.	16
Abb. 3.1	Prinzipskizze der Reaktiven Wand in Rheine (mit Genehmigung der Fa. M&P Ingenieurgesellschaft, Garbsen)	22
Abb. 3.2	Schema des Säulenaufbaus (Blotevogel, 2003).	29
Abb. 3.3	Die wichtigsten Funktionsmerkmale des pCR [®] 2.1-Plasmides.	32
Abb. 4.1	Nachweis einer biologischen Sulfatreduktion im GG-Desorbat von Proben der Reaktiven Wand in Rheine.	43
Abb. 4.2	Verlauf der Nitrat-Reduktion in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG (◆), in Kontrollansätzen mit Desorbat der Reaktiven Wand in Rheine (■), biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% Desorbat (▲) sowie 2 Gew.-% gealtertem GG nach der Desorption (●).	46
Abb. 4.3	Verlauf der Nitrat-Reduktion bezogen auf Stickstoff in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG. 46	
Abb. 4.4	Verlauf der Nitrat-Reduktion bezogen auf Stickstoff in Ansätzen mit 2 Vol.-% Desorbat und 2 Gew.-% GG.	47
Abb. 4.5	Verlauf der Nitrat-Reduktion in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG (◆), in Kontrollansätzen mit 2 Vol.-% Desorbat der Reaktiven Wand in Rheine (■), in biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% Desorbat (▲), in Ansätzen mit 2 Gew.-% „gealtertem“ GG vor (—) und nach der Desorption (●).	48
Abb. 4.6	H ₂ -Entwicklung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG ohne (●) und mit Inhibitor für die Methanogenen (4 mM BES) (◆).	49
Abb. 4.7	H ₂ -Entwicklung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG ohne (●) und mit 50 mg/l Vancomycin (▲).	53
Abb. 4.8	Verlauf der abiotischen PCE-Dechlorierung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG	56
Abb. 4.9	Verlauf der PCE-Dechlorierung in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% Desorbat.	56
Abb. 4.10	Verlauf der PCE-Dechlorierung in einem Ansatz mit H ₂ als Elektronendonator und 2 Vol.-% Desorbat.	57
Abb. 4.11	Verlauf der PCE-Dechlorierung in Triplets mit 2 Gew.-% gealtertem GG vor der Desorption.	58
Abb. 4.12	Acetatbildung in biotischen Ansätzen mit ca. 4 Gew.-% ES und 2 Vol.-% Desorbat aus der Reaktiven Wand in Rheine (▲), mit gealtertem ES nach Desorption (●), in Ansätzen mit H ₂ und Desorbat (■).	59
Abb. 4.13	Entwicklung der pH-Werte in carbonatgepufferten Ansätzen mit 2 Gew.-% GG (▲) und ca. 4 Gew.-% Eisenschwamm (◆).	60
Abb. 4.14	Methanentwicklung einer reduktiv dechlorierenden Mischkultur vor und nach Substratumstellung am 51. Tag der Kultivierung.	65
Abb. 4.15	Dechlorierung von PCE durch eine reduktiv dechlorierende Mischkultur vor und nach Substratumstellung am 51. Tag der Kultivierung.	67
Abb. 4.16	ARDRA von Vektoren (pCR [®] 2.1) mit Inserts der 16S rDNA von <i>Dehalococcoides</i> Spezies aus der DMC.	69
Abb. 4.17	Dechlorierung von PCE in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG	70
Abb. 4.18	Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC mit H ₂ (oben) bzw. mit 2 Gew.-% GG (unten) als Elektronendonator	71
Abb. 4.19	Nachweis von <i>Dehalococcoides</i> Sequenzen mittels <i>Dehalococcoides</i> spezifischen PCR Assay mit den Primern 616V und DHC1172R in Batch-Ansätzen.	73
Abb. 4.20	H ₂ -Entwicklung bzw. -Abnahme in Ansätzen mit (◆) und ohne 50 mg/l Vancomycin (□).	74
Abb. 4.21	Bildung und Dechlorierung des Intermediates cDCE (Δ) sowie Methanentwicklung (■) in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC und 2 Gew.-% GG sowie 50 mg/l Vancomycin.	75
Abb. 4.22	Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC sowie 5 ml H ₂ und/oder 1 mM Acetat.	76
Abb. 4.23	PCE-Dechlorierung mit 2 Vol.-% DMC und verschiedenen Fe ⁰ -Mengen.	77
Abb. 4.24	Dechlorierung von PCE in abiotischen Ansätzen mit 2,9 und 0,5 Gew.-% ES sowie in Ansätzen mit 2,2 und 0,8 Gew.-% ES mit 2 Vol.-% DMC nach 53tägiger Inkubationszeit.	78

Anhang

Abb. 4.25	Bildung von Methan in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC und 0,8 Gew.-% ES (●), bzw. 2,2 Gew.-% ES (-) sowie in Ansätzen mit H ₂ (◆).	79
Abb. 4.26	Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG abhängig vom pH-Wert.	80
Abb. 4.27	Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% DMC.	81
Abb. 4.28	Dechlorierung von PCE in Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und 2 Vol.-% DMC, sowie mit 66 mg/l Sulfat (oben) und 44 mg/l Nitrat (unten).	82
Abb. 4.29	Dechlorierung von PCE unter dem Einfluss eines konkurrierenden Elektronenakzeptors in abiotischen oder biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG.	83
Abb. 4.30	Verlauf der Reduktion von Sulfat (●) und Nitrat (◆) in Ansätzen mit 2 Vol.-% DMC und 2 Gew.-% GG sowie von Sulfat (○) und Nitrat (◇) in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG.	84
Abb. 4.31	C ₂ -Bilanz für Säule A (oben) und B (unten).	86
Abb. 4.32	C ₂ -Bilanz für Säule C (oben) und Säule D (unten).	87
Abb. 4.33	Nachweis von <i>Dehalococcoides</i> Sequenzen mit <i>Dehalococcoides</i> spezifischen PCR Assay mit den Primern DHC 728V und DHC1172R in Proben aus Säule B und D nach 137 Tagen Laufzeit.	88
Abb. 4.34	C ₂ -Bilanz für Säule D für die Laufzeit von 220 bis 270 Tagen.	89
Abb. 4.35	Dechlorierung von PCE in Säule D nach 270 Tagen Inkubation.	90
Abb. 4.36	Nachweis von <i>Dehalococcoides</i> Sequenzen mit <i>Dehalococcoides</i> spezifischen PCR Assay mit den Primern DHC 728V und DHC1172R mit Proben aus Säule C und D nach 270 Tagen Laufzeit.	91
Abb. 5.1	Möglicher Einfluss von abiotischen und biologischen Prozessen in der Reaktiven Wand in Rheine.	108
Abb. 5.2	Dechlorierung von PCE durch die DMC bei einer wöchentlichen Zudosierung von ca. 20 mmol Methanol und 100 µl Hefeextrakt (links) sowie nach Substratumstellung und Zudosierung von 5 mmol H ₂ und 7,5 mmol Methanol wöchentlich (rechts).	115
Abb. 5.3	Typisches Dechlorierungsmuster von PCE in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG, biotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG bzw. H ₂ (Zudosierung je nach Bedarf) nach 30tägiger Inkubation.	118
Abb. 5.4	Dechlorierungscharakteristik von PCE in Ansätzen mit GG und der DMC in Anwesenheit von Sulfat	125
Abb. 5.5	PCE-Dechlorierungscharakteristik in Ansätzen mit GG und der DMC in Anwesenheit von Nitrat	127

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Verwendung von Chlor in der Bundesrepublik Deutschland (Stand 1990), aus BLIEFERT, 1997)	5
Tab. 2.2	Ausgewählte physikalische und chemische Eigenschaften von PCE und seinen Metaboliten	6
Tab. 2.3	Wasserstoff-Schwellenwert-Konzentration, freie Energie (ΔG°) und Redoxpotenziale (E_0') für TEA-Prozesse mit H ₂ als Elektronendonator [aus LÖFFLER et al., 1999]	15
Tab. 2.4	Reduktive Dechlorierung von PCE durch bakterielle Reinkulturen	18
Tab. 3.1	Entnahme von Eisenproben	23
Tab. 3.2	Zusammensetzung des Carbonatmediums mit Spurenelemente- und Vitaminzusatz [nach ADRIAN, 1999]1	25
Tab. 3.3	Bezeichnungen, Positionen und Sequenzen der verwendeten Primer	31
Tab. 4.1	Nachweis einer biologischen Sulfatreduktion im GG-Kies-Gemisch aus der Reaktiven Wand in Rheine bei einer Konzentration von 120 mg Sulfat/l	42
Tab. 4.2	Nachweis einer biologischen Sulfatreduktion im GG-Kies-Gemisch aus der Säule in Kiel bei einer Konzentration von 115 mg Sulfat/l	44
Tab. 4.3	Nachweis der Nitratreduktion im GG-Kies-Gemisch der Reaktiven Wand in Rheine bei einer Konzentration von ca. 60 mg Nitrat/l	45
Tab. 4.4	Nachweis der Nitratreduktion im GG-Kies-Gemisch der Säule Kiel bei einer Konzentration von ca. 50 mg Nitrat/l	48
Tab. 4.5	Nachweis der Acetatbildung im GG-Kies-Gemisch der Reaktiven Wand in Rheine unter Zugabe von 4 mM BES.	50
Tab. 4.6	Nachweis der Acetatbildung im GG-Kies-Gemisch der Säule in Kiel unter Zugabe von 4 mM BES	51
Tab. 4.7	Nachweis der Methanbildung im GG-Kies-Gemisch der Reaktiven Wand in Rheine	52
Tab. 4.8	Nachweis der Methanbildung im GG-Kies-Gemisch der Säule in Kiel unter Zugabe von 50 mg/l Vancomycin	54
Tab. 4.9	Nachweis der PCE-Dechlorierung im GG-Kies-Gemisch der Säule in Kiel mit GG oder H ₂ als Elektronendonator	58
Tab. 4.10	Nachweis der Besiedlungsfähigkeit von ES. Als Inokulum diente Desorbat des GG-Kies-Gemisches aus den Säulen in Kiel.	62
Tab. 4.11	Nachweis der Besiedlung von gealtertem ES aus der Säule in Kiel	63
Tab. 4.12	Nachweis von Bakterien im Grundwasser mit GG als Elektronendonator	64
Tab. 4.13	Abgleich von <i>Dehalococcoides</i> 16S rDNA Sequenzen in der variablen Region 2. Die Klone V und VI wurden aus der DMC gewonnen. Ein Punkt zeigt Sequenzübereinstimmungen mit der Sequenz von <i>D. ethenogenes</i> Stamm 195. Die Erkennungsstelle von FauNDI ist zum Vergleich angegeben.	69
Tab. 4.14	Darstellung der Acetatkonzentration sowie der pH-Werte nach 13, 41 und 48tägiger Inkubation in Abhängigkeit vom Gehalt an GG	77
Tab. 5.1	Nachweis von ökophysiologischen Gruppen	93
Tab. 5.2	Vergleich der Eisensorten Eisenschwamm und Graugusseisengranulat	104
Tab. 5.3	Vergleich der Zellzahlen (nach MPN-Verfahren) des Desorbates von dem GG-Kies-Gemisch aus zeitlich versetzten Probenahmen (n.n.: nicht nachweisbar)	104
Tab. 5.4	Darstellung der übertragenen Elektronen in abiotischen Ansätzen mit 2 Gew.-% GG und Vancomycin, Nitrat oder Sulfat sowie ohne weitere Zusätze.	107
Tab. 5.5	Zusammenfassung von Fe ⁰ -Reaktiven Wänden, bei denen Hinweise auf eine mikrobiologische Besiedlung gefunden wurden (n.b.: nicht bestimmt).	110
Tab. 5.6	Übertragene Elektronen in Ansätzen mit GG oder H ₂ als Elektronendonator. Nicht erfasst wurden Elektronen, die für Acetogenese oder Produktion von Biomasse verbraucht wurden.	119
Tab. 5.7	Geochemische Daten von Grundwasser des Dover Testgelände und dem Anstrombereich der Reaktiven Wand in Rheine (k. A.: keine Angaben)	131

DANKSAGUNG

Herrn Dr. M. Steiof danke ich für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Rüden und Herrn Prof. Dr. W. Rotard möchte ich für die hilfreiche Unterstützung insbesondere bei fachlichen, technischen und organisatorischen Fragen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen jetzigen und ehemaligen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe Umwelthygiene sowie des Fachgebietes Technische Biochemie, die durch ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie angenehme Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hervorheben möchte ich Frau R. Hilarius, Frau A. Kramer, Frau K. Noack, Frau A. Nestler, Frau P. Testa, Frau J. Vorgel und Frau G. Wagner, die im Rahmen von Diplom- oder Projektarbeiten oder als Technische Angestellte wesentlich an den praktischen Tätigkeiten beteiligt waren.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. L. Adrian und seiner CBDB1-Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und Hilfe sowie für die uneingeschränkte Labornutzung bei der Bearbeitung von molekularbiologischen Fragestellungen. Für die fachlichen Diskussionen und konstruktive Kritik insbesondere bei der Verfassung von Veröffentlichungen möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. L. Adrian bedanken.

Abschließend und im Besonderen möchte ich mich bei Jörg und Svea für die große Anteil- und Rücksichtnahme und bei meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums bedanken.