

CHARBAK – Entwicklung physikalisch-biologischer Biokohlefilter für die Grundwassersanierung mit dem Fokus auf Biofilmentwicklung

Endbericht

Wien, 2024

Impressum

Medieninhaber, Verleger und Herausgeber:

Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und Technologie, Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Projektleitung: Andrea Watzinger

Autorinnen und Autoren: Simon Leitner, Christine Stumpp, Gerhard Soja, Katharina Keiblinger, Andrea Watzinger

Projektteam: Chloé Allo, Wisam Almohamed, Giuseppe Brunetti, Maria Eckardt Manniche, Corinna Eichinger, Martina Faulhammer, Celia Fernández Balado, Freja Haverland, Karl Haigner, Dorian Hostaux, Katharina Keiblinger, Simon Leitner, Axel Mentler, Fabian Riebl, Fridtjof Sobanski, Orracha Sae-Tun, Gerhard Soja, Christine Stumpp, Theresa Ukwamedua, Andrea Watzinger

Wien, 2024. Stand: 8. Oktober 2024

Copyright und Haftung:

Auszugsweiser Abdruck ist nur mit Quellenangabe gestattet, alle sonstigen Rechte sind ohne schriftliche Zustimmung des Medieninhabers unzulässig.

Es wird darauf verwiesen, dass alle Angaben in dieser Publikation trotz sorgfältiger Bearbeitung ohne Gewähr erfolgen und eine Haftung des Bundesministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und Technologie und der Autorin/des Autors ausgeschlossen ist. Rechtausführungen stellen die unverbindliche Meinung der Autorin/des Autors dar und können der Rechtsprechung der unabhängigen Gerichte keinesfalls vorgreifen.

Rückmeldungen: Ihre Überlegungen zu vorliegender Publikation übermitteln Sie bitte an andrea.watzinger@boku.ac.at.

Zusammenfassung

Das Projekt CHARBAK beschäftigte sich mit der Entwicklung von physikalisch-biologischen Biokohlefiltern für die Grundwassersanierung. Der Fokus lag in der Etablierung eines Biofilms im Biokohlefilter um Grundwasserkontaminanten nicht nur zu adsorbieren, sondern gleichzeitig auch vollständig zu umweltunschädlichen Substanzen abzubauen. Die verwendeten Modellschadstoffe sind chlorierte Kohlenwasserstoffe (Tetrachlorethen (PCE) und seine Abbauprodukte) sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe am Beispiel von Naphthalin (NAP), welche zu den weltweit meistangetroffenen organischen Grundwasserschadstoffen zählen. Das Projekt gliederte sich in die Herstellung und Charakterisierung von Biokohlen, die Etablierung schadstoffabbauender mikrobieller Konsortien (Biofilme) für die jeweilige Modellschadstoff, die Untersuchung der Sorptions- und Abbauprozesse im Biokohlefilter im Rahmen von Batch- und Säulenversuchen im Labormaßstab, sowie der molekularbiologischen und biologischen Analyse der entstandenen Biofilme.

Insgesamt wurden 14 Biokohlen aus den landwirtschaftlichen Nebenprodukten Sonnenblumenkernschalen (S), Marillenkernen (A), Holzschnitzel (H) und Miscanthus (M) bei je drei Temperaturen 350, 550 und 750°C und 2 Kohlen bei 650°C hergestellt. Als Referenzfiltermaterial wurde die Aktivkohle Hydraffin A 8x30 (AC) verwendet. Biokohlen pyrolysiert bei 350°C hatten eine geringe spezifische Oberfläche (geringes Sorptionsvermögen) während eine Pyrolyse bei 750°C zu erhöhten PAK Konzentrationen an den Biokohlen führte, welche auch durch eine nachträgliche Temperaturbehandlung kaum reduziert werden konnte. Somit wurden diese Biokohlen von einer Anwendung ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden aufgrund ihrer geringen mechanischen Stabilität Biokohlen aus Miscanthus. Von den verbliebenen Biokohlen zeigten A750 und W550 die besten Sorptionseigenschaften für PCE. Die Sorptionskapazität der Biokohlen für PCE war jedoch um ein Vielfaches geringer als jene der AC. Außerdem stellte sich das Sorptionsequilibrium bei den Biokohlen langsamer ein als bei der AC. Die mikrobiellen PCE-Metabolite cis-Dichlorethen (cDCE), Vinylchlorid (VC) und Ethen wurden jedoch von den Biokohlen im Vergleich zur Aktivkohle in ähnlicher Intensität sorbiert. Naphthalin zeigte eine sehr hohe Affinität zur Sorption an der AC. (Leitner et al., 2023b)

Der mikrobielle Abbau von PCE und PCE-Metaboliten wurde an Hand von zwei kommerziellen (kb1; Bioclear) sowie mehreren institutseigenen (iH) (Leitner et al., 2017) Kulturen untersucht. Für NAP kam eine von der Altlast W18 – Gaswerk Simmering angereicherte Kultur zum Einsatz. Neben den Biokohlen (W550 und A750) sowie AC wurde im Laufe der Versuche auch das Nährmedium und das Redoxmittel variiert und optimiert. In der Gegenwart von Biokohlen konnte ein vollständiger PCE Abbau in Batchversuchen beobachtet werden, wobei die W550 in Kombination mit dem Konsortium kb1 die höchste Abbaueffizienz zeigte. In AC wurde PCE nur im geringen Umfang mikrobiell abgebaut. Auch für den Schadstoff Naphthalin konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Kombination von Biokohle - A750 zeigte im Batchversuch eine bessere Eignung als W550 - und mikrobiellem Konsortium ein NAP Abbau stattfand. Im Anschluss wurden Säulenversuche durchgeführt. Dabei wurden die drei Kohlen AC, W550 und A750 jeweils mit zwei Kulturen (kb1, iH) beimpft. Die Säulen wurden am Ein- und Ausgang mit Quarzsand gefüllt und verfügten über eine ca. 5 cm mächtige Kohlenfüllung im zentralen Abschnitt. Das Transportverhalten der Kohlen wurde mit einem Salztracer und einem Isotopentracer untersucht und es zeigte sich, dass immobiles Wasser und somit Diffusionsprozesse in der Aktivkohle und W550 relevanter sind als in A750. Im PCE Säulenversuch über 6 Monate zeigten die mikrobiellen Konsortien kb1 und iH einen anaeroben vollständigen Abbau von PCE bis Ethen, wobei die Säulen mit iH-Inokulum den Umsatz von Ethen über die gesamte Versuchslaufzeit aufrechterhalten konnten, während bei kb1-Säulen PCE nur mehr bis VC abgebaut wurde. Die AC-Säulen zeigten eine höhere Sorption von PCE und Trichlorethen, jedoch in Vergleich zur W550 eine geringere Sorption von cDCE und VC. (Leitner et al. 2024; submitted) Auch im NAP Säulenversuch wurde der Schadstoff durch das hinzugefügte mikrobielle Konsortium, jedoch unter aeroben Verhältnissen über 4 Monate kontinuierlich abgebaut. Beim Vergleich der Biokohlen mit der Aktivkohle stellte sich heraus, dass die Aktivkohle NAP in höherem Ausmaß retardieren konnte und auch die NAP-Mineralisierung über die gesamte AC-Säule betrachtet am höchsten war.

DNA Analysen der PCE Versuche bestätigten, dass sich sowohl im Batch als auch in den Säulen organo-Halid veratmenden Mikroorganismen etablierten, die zwar flokkuliert und als Cluster vorkamen, aber auf Grund ihrer geringen exopolymeren Substanzbildung aller Voraussicht nach zu keinem Clogging der Säulen führen wird. Die Quantifizierung der lebenden mikrobiellen Biomasse und deren räumliche Verteilung mittels Phospholipid Fettsäuren Analyse zeigte, dass die Mikroorganismen und auch jene Gruppen, die den PCE abbauenden Organismen zugeordnet werden konnten, Biokohlen präferenziell besiedelten, während die Aktivkohle wahrscheinlich auf Grund der geringeren Bioverfügbarkeit von PCE gemieden wurde. Die mikrobiellen Gemeinschaften wurden durch den Umweltfaktor Kohle

bzw. auch durch deren physikalisch/chemische Eigenschaften beeinflusst. Somit ist es empfehlenswert die Auswahl des Materials kombinierter physikalisch-biologischer Biokohlefilter nicht allein auf Grund der Sorptionskapazität zu fällen, sondern vor allem auf die Synergieeffekte, die zu einer dauerhaft aktiven mikrobiellen Gemeinschaft und eine Verlängerung der Filterlaufzeit durch den kontinuierlichen Schadstoffabbauabbau führen, zu achten. (Leitner et al. 2024, submitted)

Die Etablierung Naphthalin abbauender Mikroorganismen in einem aeroben System ist relativ unkompliziert und erfolgt auch spontan (ohne Beimpfung) sofern ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff verfügbar sind. Die lebende mikrobielle Biomasse war in den aeroben Naphthalin Säulen um einen Faktor 4 höher als bei den anaeroben PCE Säulen. Die Verteilung der Mikroorganismen war ähnlich; i.e. stärkere Besiedelung der Biokohle im Vergleich zu der Aktivkohle. Mikroorganismen waren auch in der Lage adsorbiertes Naphthalin (unter Anwesenheit von Ethanol) umzusetzen. Diese Vermögen ist ein starker Indikator für die Nachhaltigkeit und das Selbstreinigungspotential der besiedelten Biokohlen. Für die Praxisanwendung muss bedacht werden, dass mit einer hohen Besiedelung auch die Biofilmentwicklung und somit auch die Cloggingwahrscheinlichkeit zunimmt.

Zusammenfassend zeigen die Projektergebnisse, dass für PCE Kontaminationen ein Biokohlefilter zur kombinierten Schadstoffsorption und einem mikrobiellen Abbau durchaus ein praktisches Verwertungspotential für Pump & Treat sowie Funnel & Gate Anlagen zur Verlängerung der Filterlaufzeiten hat. Als Fazit des Projektes Charbak ergibt sich somit die Empfehlung für ein Upscaling der Laborversuche, um das System eines biologisch-aktiven Biokohlefilters auch unter Realbedingungen (Technikum, Freilandversuch) zu testen.

Summary

The CHARBAK project dealt with the development of physical-biological biochar filters for groundwater remediation. The focus was to establish a biofilm on the biochar filter to completely degrade groundwater contaminants into substances harmless to the environment beside retaining them via adsorption. The model substances investigated were chlorinated hydrocarbons (tetrachloroethene (PCE) and its metabolites) and the polycyclic aromatic hydrocarbon naphthalene (NAP), which are among the most frequently encountered organic groundwater pollutants worldwide. The project was divided into the production and characterization of biochars, the establishment of contaminant-degrading microbial consortia (biofilms) for the respective model substance, the investigation of the sorption and degradation processes in the designed physical-biological filter using batch and column tests on a laboratory scale, as well as the molecular biological and biochemical analysis of the resulting biofilms.

A total of 14 biochars were produced from the agricultural by-products sunflower kernel shells (S), apricot kernels (A), wood chips (H) and miscanthus (M) at three temperatures each of 350, 550 and 750°C and 2 coals at 650°C. The activated charcoal Hydraffin A 8x30 (AC) was used as a reference filter material. Biochars pyrolyzed at 350°C had a low specific surface area (low sorption capacity), while pyrolysis at 750°C led to increased PAH concentrations on the biochars, which could not be reduced even by subsequent temperature treatment. These biochars were therefore excluded from use. Biochars from Miscanthus were also excluded due to their low mechanical stability. Of the remaining biochars, A750 and W550 showed the best sorption properties for PCE, but they were still many times lower than AC and sorption equilibrium was reached much slower. On the other hand, the microbial PCE metabolites cis-dichloroethene (cDCE), vinylchloride (VC) and ethene were sorbed similarly to biochars and activated carbon. Naphthalene showed a very high affinity for sorption on the AC. (Leitner et al., 2023)

The microbial degradation rate of two commercial (kb1; Bioclear) and in-house microbial consortia (iH) for PCE degradation and an enrichment culture from the contaminated site W18 – Gaswerk Simmering for NAP degradation was determined in batch experiments. In addition to the biochar (W550 and A750) and AC, the culture medium and the redox agent were also varied and optimized in the course of the experiments. The microbial degradation

of PCE in AC was the lowest. In the presence of the biochars complete PCE degradation could be observed, with the W550 in combination with the consortium kb1 showing the highest degradation efficiency. It was also possible to prove that NAP degradation took place with a combination of biochar - A750 showed a better performance than W550 in the batch test - and the microbial consortium. Following this, column experiments were started using three filters (AC, A750, W550) inoculated with two microbial consortia (kb1 and iH). The columns were filled with quartz sand at the entrance and exit and had a coal filling of about 5 cm thick in the central section. The transport behaviour was investigated with a salt and an isotope tracer and it was shown that immobile water and thus diffusion processes are more relevant in the activated carbon and W550 than in A750. In the PCE column test over 6 months, the microbial consortia kb1 and an in-house consortium showed microbial degradation from PCE to ethene, whereby the columns with iH were able to maintain complete degradation to ethene over the entire trial period while in kb1 inoculated columns PCE was only degraded up to VC. The AC columns showed a higher sorption of PCE and Trichloroethene, but a lower sorption of cDCE and VC compared to the W550. In the NAP column experiment, the contaminant was also continuously degraded over 4 months by the added microbial consortium and under aerobic conditions. When comparing biochar with AC, it was found that the AC was able to retard NAP to a higher extent and that the NAP mineralization was also highest in the total AC columns.

DNA analyses of the PCE experiments confirmed that organo-halide respiring microorganisms established in both the batch and the column experiments. Although microorganisms flocculated and occurred in clusters, they were unlikely to cause any clogging of the columns due to their low exopolymeric substance formation. The quantification of the living microbial biomass and its spatial distribution using PLFA analyses showed that the microorganisms and also those groups that can be assigned to PCE-degrading organisms preferentially colonized biochar, while AC was avoided possibly due to the lower bioavailability of PCE. The microbial communities were influenced by the environmental factor coal and also by its physical/chemical properties. It is therefore advisable to choose the combined physical-biological filter not solely on the basis of the sorption capacity, but to account for the synergy effects that lead to a permanently active microbial community and consequently to an extension of the filter life time due to the continuous contaminant degradation.

The establishment of naphthalene degrading microorganisms in an aerobic system is relatively uncomplicated and also occurs spontaneously (without inoculation) as long as

sufficient nutrients and oxygen are available. The living microbial biomass in the aerobic naphthalene columns was 4 times higher than in the anaerobic PCE columns. The spatial distribution of microorganisms was similar and we saw a stronger colonization of the biochar compared to the activated charcoal. Microorganisms were also able to metabolize adsorbed naphthalene (in the presence of ethanol). This ability is a strong indicator of the sustainability and self-cleaning potential of the colonized biochars. For practical use, it must be considered that a high colonization and biofilm development increases the probability of clogging.

In summary, the project results showed that for PCE contamination, a biochar filter for combined contaminant sorption and microbial degradation certainly has practical potential for use in pump & treat and funnel & gate systems to extend filter runtimes. The next step would be to upscale the biochar filters in order to test their usability under field conditions.

Inhalt

Impressum.....	2
Zusammenfassung	3
Summary	6
Inhalt.....	9
Einleitung	12
Zielsetzung.....	14
Methodik und Projektstruktur.....	15
AP 1.1 – Charakterisierung bestehender Filteranlagen	16
Auswahl und Beprobung bestehender Aktivkohlefilter und Detektion von Biofilmen mittels Digitalmikroskopie.....	16
Extraktion und 3DEEM-Fluoreszenzspektroskopie	22
Biofilmcharakterisierung	22
Fazit	24
AP 1.2 – Herstellung von Biokohlen als Filtermaterial	26
Durchführung	26
Ergebnisse.....	30
AP 1.3 – Chemische Grundcharakterisierung und Auswahl der Kohlen	32
Durchführung der physikalisch/chemischen Charakterisierung	32
Ergebnisse der physikalisch/chemischen Charakterisierung	34
Physikalisch/chemische Eigenschaften der Aktivkohle (Referenzmaterial)	36
Auswahl auf Grund der physikalisch/chemischen Charakterisierung.....	37
Kohlenstoffisotopenverhältnisse der Kohlen und Kohlenstoffquellen.....	39
Durchführung und Ergebnisse.....	41
Auswahl auf Grund der hydraulischen Eigenschaften	45
AP 1.5 – Charakterisierung des Sorptionsverhaltens der Kohlen.....	46
Vorversuche.....	46
Sorptionskinetik und -kapazität	46
Hauptversuch – Sorptionskinetik CKW, Ethen, NAP	49
Hauptversuch – Sorptionsisothermen CKW, Ethen, NAP	50
Schadstoffanalytik	51
Chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) und Ethen	52

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	55
Kohlendioxid beim aeroben Abbau von NAP in Ethanol	59
Parameter der Freundlich- Sorptionsisothermen CKW, Ethen, NAP	61
Stabilisotopenfraktionierung im Sorptionsequilibrium CKW und Ethen	64
Sorptionskapazität Quarzsand	65
AP 1.6 – Etablierung schadstoffabbauender Konsortien auf den Kohlen	67
Mikrobielle Konsortien PCE	67
Versuchsdurchführung PCE	68
Ergebnisse Batchstudien PCE	70
Kontrollversuche zum mikrobiellen Abbau von PCE	71
Versuchsreihe zur mikrobiellen Interaktion mit Bio- und Aktivkohle	73
Mikrobielle Konsortien NAP	76
Versuchsdurchführung NAP	76
Ergebnisse Batchversuche NAP	77
Versuchsreihe zur mikrobiellen Interaktion mit Biokohle	79
AP 2.1 Design und Aufbau der Säulenversuche	83
Versuchsaufbau PCE	83
Versuchsaufbau Naphthalin	90
AP 2.2 – Charakterisierung der Transporteigenschaften	95
Versuchsdurchführung und Zielsetzung	95
Ergebnisse	96
AP 2.3 – Monitoring – Schadstoffabbau und Sorption	99
Säulenversuch PCE	99
Monitoring von pH-Wert und Redoxpotential	100
Ergebnisse anaerober Abbau PCE	102
Desorption CKW aus Säulenversuch PCE	108
Interaktionen von Sorption und mikrobiellem Abbau	110
Fazit	110
Säulenversuch NAP	111
Monitoring von pH-Wert und Redoxpotential	111
Ergebnisse aerober Säulenversuch NAP	113
Desorption NAP aus Säulenversuch NAP	123
Fazit	125
AP 2.4 – Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften	126

Mikrobielle Gemeinschaft in den PCE Batch- und Säulenversuchen	127
DNA-Extraktion, Amplicon-Sequenzierung und Ergebnisanalyse	127
Ergebnisse DNA-Analyse	128
Mikrobielle Phospholipid Fettsäuren (PLFA) – Extraktion, Zuordnung und Kohlenstoffquellen	134
Ergebnisse der ¹³ C PLFA-Analysen	135
Mikrobielle Gemeinschaft in dem Naphthalin Säulenversuch	143
Ergebnisse der ¹³ C PLFA-Analysen	143
Massenbilanzierung - Naphthalin	148
Fazit	149
AP 2.5 – Biofilmcharakterisierung	151
Mikroskopische Untersuchungen	151
Gesamtlipide	157
Exopolymere Substanzen / Kohlehydrate	158
Extraktion und Messmethode	158
Ergebnisse	160
Fazit	162
Schlussfolgerung	163
Tabellenverzeichnis	164
Abbildungsverzeichnis	166
Literaturverzeichnung	174

Einleitung

Sorptive Reinigungsschritte sind als Altlastensanierungsmethode anerkannt. Diese werden sowohl ex-situ z.B. Aktivkohlefilter für Pump & Treat von CKWs als auch in-situ (Filterwände bzw. Funnel & Gate Systeme zur Reinigung von organischen Schadstoffen (BTEX, PAK, MTBE, ...)) angewandt. Bei diesen sorptiven Maßnahmen handelt es sich um eine weit entwickelte Sanierungsmethode mit geringem Forschungspotential. Probleme treten meist nach langjährigem Betrieb auf, wenn sich die Sorptions- und hydraulischen Eigenschaften aufgrund der Entwicklung von Biofilmen verändern. Sobald die Sorptionskapazität erreicht ist oder die Filter verstopfen, müssen sie ausgetauscht werden. Neben etwaigen Pumpkosten stellt der Austausch der Filter einen relevanten Kostenpunkt während einer Sanierung dar.

Im Gegensatz zu sorptiven Sanierungsmethoden sind biologische Sanierungsmethoden (das biologische Pendant zum sorptiven Filter ist der Biofilter) weniger gut erforscht und somit auch weniger gut vorhersagbar. Dieses Forschungsprojekt zielt darauf ab, das Wachstum von Biofilmen auf primär sorptiven Filtersystemen sowie den mikrobiellen Abbau und relevante Sorptionsprozesse in diesen Biofilmen zu quantifizieren.

Die hierbei angestrebte Sanierungsmethode kombiniert bewusst eine erfolgreiche technisch einfache physikalische Sanierungsmethode (Sorptionsfilter) mit einer komplexen biologischen Sanierungsmethode (Biofilter). Der Betrieb eines Sorptionsfilters ist langfristig nicht nachhaltig möglich, da der Schadstoff sorbiert aber nicht abgebaut wird und da es zu einem Bewuchs der Filter kommen kann. Der Vorteil des Sorptionsfilters, die robuste und verlässliche Funktion am Beginn seines Einsatzes, wird somit mit allen Vorteilen eines biologischen Systems - nämlich Nachhaltigkeit, Resilienz und Resistenz kombiniert. Die Funktionsfähigkeit dieses Systems als Grundlage des einer erfolgreichen Anwendung wurde in dem Projekt CHARBAK untersucht. Die Forschungsergebnisse sind sowohl für in-situ als auch ex-situ Sanierungsmethoden (Reaktive Wände / Filter, Biofilter, Pump & Treat) direkt anwendbar, da das Prinzip von Biofilmentwicklung, Biosorption und Bioabbau allgemein gültig ist.

Für eine Sanierung mittels Filter kommen alle Schadstoffe in Frage, die einerseits ausreichend mobil (Transport mit dem Grundwasser) sind, andererseits in signifikantem

Ausmaß abgebaut werden können. Somit eignet sich die Sanierungsmethode insbesondere für BTEX, kurzkettige PAKs sowie CKWs vor allem in der Fahnnensanierung. Laut dem Altlastenverdachtskataster und Altlastenatlas des Umweltbundesamtes (Stand Jänner 2018) betrifft das rund 43% der Altlasten (Granzin and Valtl, 2018). In diesem Projekt wurden zwei häufige und für diese neue kombinierte Sanierungsmethode relevante Kontaminanten, Tetrachlorethen (PCE) und Naphthalin (NAP), untersucht.

Zielsetzung

Das primäre Ziel des vorgestellten Projektes liegt in der Kostenreduktion beim Einsatz von Filtern zur Reinigung/Aufbereitung von mit chlorierten Kohlenwasserstoffen (CKW) bzw. aromatischer Kohlenwasserstoffe (Naphthalin) kontaminiertem Grundwasser. Die Kostenreduktion wird durch eine Standzeiterhöhung des Filters erreicht. Dafür wurde die Kombination von physikalischen (Sorptions) und biologischen (bakterielle Schadstoffumwandlung) Prozessen im Filter untersucht.

Davon begleitet war das gleichbedeutende Ziel der Generierung eines klimaneutralen, kostengünstigen und wiederverwendbaren Filtermaterials, in Form einer Biokohle, als Alternative zur gebräuchlichen Aktivkohle. Aus diesem Bestreben heraus wurde das zu schaffende Filtermaterial aus der Verwertung von land- bzw. forstwirtschaftlichen Nebenprodukten generiert.

Schlussendlich galt es eine optimale Kombination aus Biokohle und mikrobieller Gemeinschaft zu definieren um eine synergistische Etablierung eines schadstoffabbauenden Biofilmes zur Reinigung von mit chlorierten Kohlenwasserstoffen (CKW) einerseits und aromatischer Kohlenwasserstoffe (Naphthalin) andererseits kontaminiertem Grundwasser zu gewährleisten.

Methodik und Projektstruktur

Um die Fragestellungen zu beantworten wurde das Projekt CHARBAK in 2 Phasen gegliedert und in Arbeitspakete (AP) unterteilt. In Phase 1 wurden Biokohlen aus vier landwirtschaftlichen Nebenprodukten und drei bis vier unterschiedlichen Pyrolysetemperaturen hergestellt und chemisch/physikalisch und hydraulisch untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Sorptionseigenschaften der Biokohlen im Batchversuch. Im Anschluss wurden zwei Biokohlen und drei schadstoffabbauende Konsortien ausgewählt. Am Ende der ersten Phase wurde die Etablierung und Wechselwirkung der mikrobiellen Konsortien mit den Biokohlen und der Aktivkohle ebenfalls in Batchversuchen untersucht.

In Phase 2 wurden die Säulenversuche aufgebaut, das Transportverhalten der ausgewählten Biokohlen und Aktivkohle mit Hilfe von Tracerversuchen bestimmt und der Hauptversuche mit den Schadstoffen PCE und Naphthalin durchgeführt. Der Abbau der Schadstoffe wurde laufend und mit Hilfe von Stabilisotopenuntersuchungen der Schadstoffe sowie der Metaboliten und des Abbauprodukts CO₂ dokumentiert. Die Säulen wurden nach 4 bis 6 Monaten geschlachtet und die mikrobiellen Konsortien molekular- und mikrobiologisch charakterisiert. Die Biofilmentwicklung wurde sowohl mikroskopisch als auch nasschemisch untersucht. Die methodische Durchführung sowie die erlangten Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln detailliert beschrieben.

AP 1.1 – Charakterisierung bestehender Filteranlagen

Im AP 1.1 wurden bestehende Filteranlagen (ex-situ und in-situ Sanierungsanlagen von PAK-Altlasten) besichtigt, um Proben zu ziehen und potentielle lokale Herausforderungen der Anlagenbetreiber im Hinblick auf Biofilmentwicklung in den Filteranlagen zu dokumentieren und zu diskutieren. Probleme bezüglich einer Biofilmentwicklung wurde von den Betreibern von aeroben Filtern thematisiert. Mit den Proben aus den Anlagen wurde Impfmateriel für nachfolgende Batch- und Säulenversuche (AP 1.6, AP 2.3) gewonnen, eine erste Biofilmcharakterisierung durchgeführt, sowie Methoden zur Messung der Biofilmdicke und Charakterisierung etabliert und zu validiert. In Folge wurde die mikroskopische Biofilmmessung aufgrund der heterogenen Oberfläche für zukünftige Versuche optimiert.

Auswahl und Beprobung bestehender Aktivkohlefilter und Detektion von Biofilmen mittels Digitalmikroskopie

Zur Beprobung wurden PAK Aktivkohlefilter des Funnel & Gate (F&G) Systems am Altlastenstandort O76 „Kokerei Linz“ und der ex-situ Biofilter und Aktivkohlefilter am Altlastenstandort W18 „Gaswerk Simmering“ ausgewählt. Beide Anlagen werden zur Reinigung PAK kontaminierte Grundwässer verwendet. In der Anlage W18 treten regelmäßig Probleme mit Biofilmentwicklung verbunden mit einem Abfall der hydraulischen Leitfähigkeit auf. Im Gegensatz dazu ist kein Biofilmaufwuchs im F&G Systems der Anlage O76 bekannt. Es wurde aber in stark belasteten Gates ein Durchbruch von PAK beobachtet, was auf eine Sättigung der Sorptionsplätze und/oder präferenzielle Fließwege hinweist. Es blieb unklar, ob sich in diesem F&G System ein Biofilm entwickelt hat.

Die Beprobung der Aktivkohle (Filtermaterial: Hydrarffin 30N II neutral – Donau Carbon GmbH) am Standort O76 wurde am 22.09.2020 am Gate 8 durchgeführt (Abbildung 1).



Abbildung 1: Probennahme am Gate 8 „Kokerei Linz“ und Aktivkohle „Hydraffin 30N II neutral“ Foto: A. Watzinger

Die digitalmikroskopischen Aufnahmen zeigten kaum Biofilmentwicklung auf der Aktivkohle des Standortes O76 (Abbildung 2). Es wurden nur Biofilmreste in der Größenordnung von 0.5 bis 14 μm festgestellt. Eine geringe mikrobielle Aktivität und in Folge Biofilmentwicklung könnte auf das geringe Redoxpotential (Anaerobie) des lokalen Grundwassers zurückgeführt werden.



Abbildung 2: Digitalmikroskopische Aufnahme der Aktivkohle des Standortes O76

Die Besichtigung der Anlage W18 und Beprobung des Aktivkohlefilters 1 (pelletierte Aktivkohle CC50P – Donau Carbon GmbH) wurde im Zuge eines Aktivkohlefilter-Tausches am 25.09.2020 durchgeführt (Abbildung 3). Die Aktivkohlefilteranlage besteht aus mehreren in Serie geschalteten Biofiltern mit nachgeschalteten belüfteten Absetzbecken. Trotzdem müssen auch die Aktivkohlefilter (letzte Filtergruppe) auf Grund von Biofilmentwicklung alle paar Monate rückgespült werden.



Abbildung 3: Probennahme Aktivkohlefilters 1 „Gaswerk Simmering“ und Aktivkohle „CC50P“ Foto: A. Watzinger

Digitalmikroskopische Aufnahmen zeigen eine Biofilmentwicklung entlang der Aktivkohle bzw. dem Restfiltermaterial, mit einer Schichtdicke Ausdehnung von ungefähr 10 μm unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 4). Bei aeroben Verhältnissen (gelöster Sauerstoffgehalt 2-6 mg/l) hingegen wurden variable Schichtdicken von 10-100 μm ermittelt. Das weist darauf hin, dass hier offensichtlich das mikrobielle Wachstum gefördert wurde.

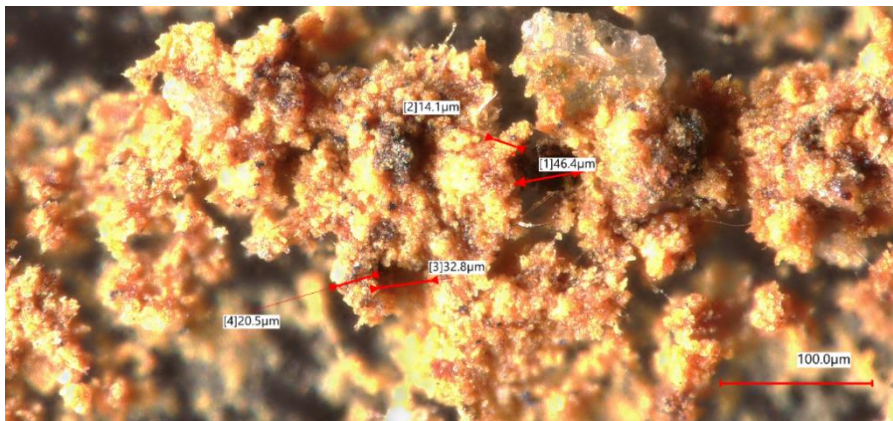


Abbildung 4: Digitalmikroskopische Aufnahme der Aktivkohle des Standortes W18

Die Dicke der gefundenen Biofilme konnte mit dem Digitalmikroskop VHX-7000 Keyence sehr genau dokumentiert werden (siehe Beispiel lt. Abbildung 5).

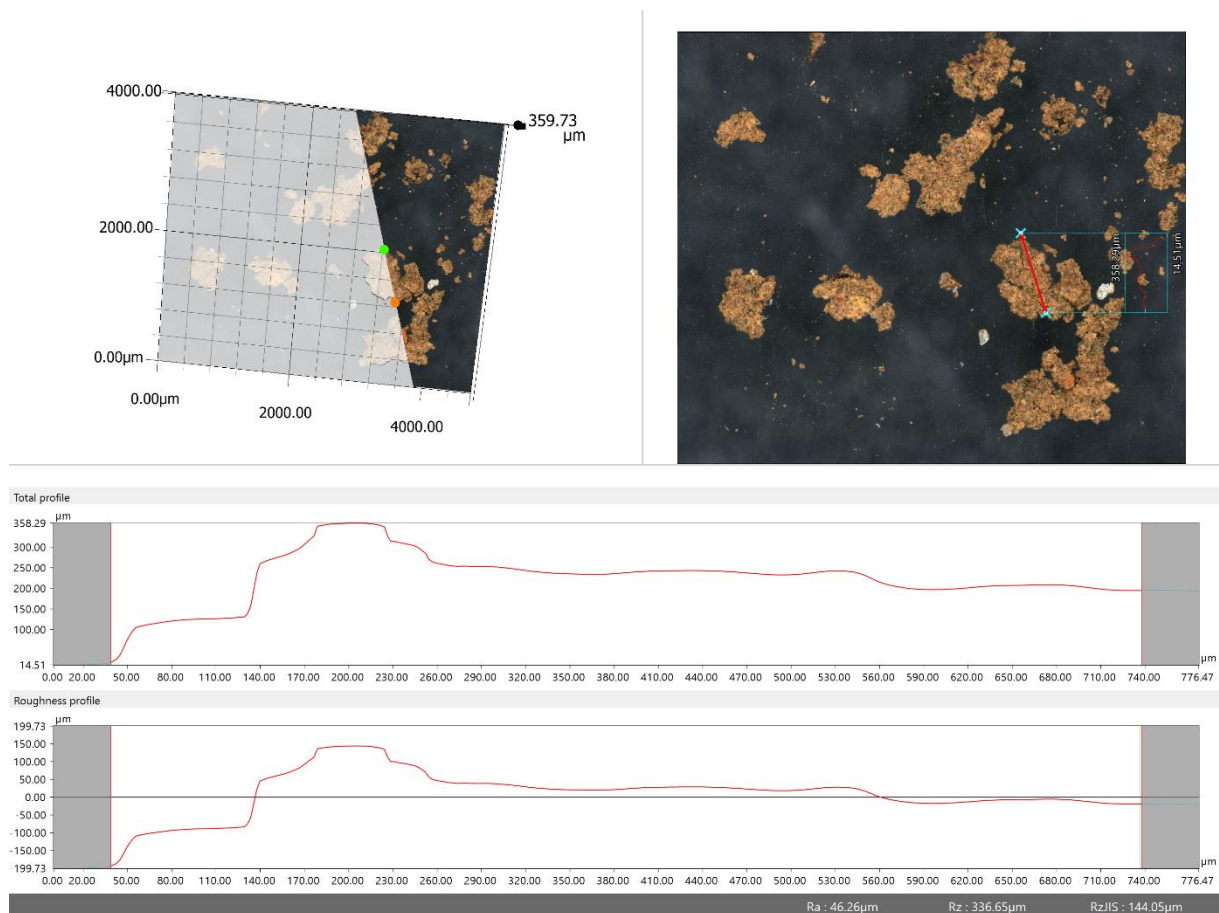


Abbildung 5: Dickenmessung mittels Digitalmikroskopie

Das Digitalmikroskop, Keyence, Modellreihe VHX-7000 verfügt über 3D Datenerfassung, zStapeldatei-Funktion, mit der exakte nStruktur-Oberflächenmessungen von Objekten erfasst werden können. Die Oberflächen der Biofilme wurden so in-vitro ohne strukturverändernde Präparation oder Fixierung durchgeführt. Die Kalibration des Abbildungsmaßstabs für exakte Oberflächenvermessungen entspricht den japanischen Industriestandards. Die 3-D Höhenmessungsanalysen in der spezifischen Anordnung wurden für die Schichtdickenanalyse der Biofilme herangezogen und basierten auf der ISO NORM 16232. Die Messung ist aber auf Grund der unterschiedlichen Oberflächengeometrie der Kohlen semiquantitativ. Für den Abbau- und Säulenversuch wurde daher entschieden, eine definierte Oberfläche zu verwenden (z.B. feinkörnig gebrochene Kohle auf Deckgläser aufzubringen), um unterschiedliche Biokohlen vergleichen zu können. Die Biofilme beider Aktivkohle-Standorte sowie das Prozesswasser vom Standort W18 „Gaswerk Simmering“ wurden in Folge extrahiert und mittels 3DEEM-Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert.

Das Prozesswasser (Standort W18) wurde an einem Entnahmepunkt zwischen Biofilter und Aktivkohlefilter sowie im Aktivkohlefilter selbst beprobt.

Extraktion und 3DEEM-Fluoreszenzspektroskopie

10 mL Probenvolumen (Prozesswasser) wurden mit 70 mL HQ-Wasser versetzt. Die weitere Extraktion erfolgte in Anlehnung an Pan et al. (2010) unter Einsatz eines Ultraschallgenerators (Sonopuls) mithilfe einer Ultraschall Sonde. Dabei wurde zunächst die Probenlösung bei einer Energie von 40 W in einem Eisbad mit Ultraschall für eine Dauer von 2 min beschallt. Die beschallten Probelösungen wurden im Anschluss bei 4 °C für 20 min bei 5.000 U*min⁻¹ zentrifugiert und die Überstände einer Spritzenvorsatz-Membranfiltration unterzogen. Die Filtrate wurden im Anschluss mit 3.500 Dalton-Molekulargewichts-Cutoff-Membranen dialysiert. Nach der Dialyse erfolgte eine Gefriertrocknung bei -50 °C und 0.090 mbar für 48 h. Das Lyophilisat wurde dann in 3 mL HQ-Wasser aufgenommen, was eine Aufkonzentration der Proben zur Folge hatte.

Zur Charakterisierung der Biofilm-Proben nach der Dialyse erfolgte eine 3DEEM-Fluoreszenz unter Verwendung von Fluoreszenzspektrometrie (Agilent 1290 infinity, FLD). Dreidimensionale Anregungsemissionsmatrixspektren wurden mit Rasteremissionsspektren von 250 nm bis 600 nm in Schritten von 5 nm durch bestimmte Variation der Anregungswellenlänge von 200 nm bis 450 nm bei Inkrementen von 5 nm und mit einer Geschwindigkeit von 1200 nm*min⁻¹ erstellt.

Biofilmcharakterisierung

In Abbildung 6 sind exemplarisch die 3D Spektren der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS, Hauptkomponente des durch Mikroorganismen gebildeten Biofilmes) des Standorts W18 zu sehen.

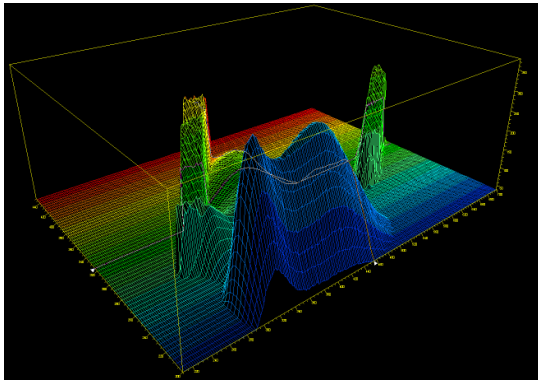


Abbildung 6: Biofilm Spektrum des Prozesswassers vom Standort W18 (links) und Biofilm Spektrum der Aktivkohle vom Standort W18 (rechts)

Die Auswertung des Biofilm Höhenmodells (Isobarenplot) nach Pan et al. (2010) für die jeweiligen Proben ist in Tabelle 1 dargestellt. Auffällig ist, dass die Biofilme im Prozesswasser im Vergleich zu den Aktivkohlebiofilmen einen höheren Wert bei Peak A (und B) aufweisen, was auf die Anwesenheit proteinähnlicher Substanzen vor allem jener, die mit aromatischen Aminosäuren und Tryptophan assoziiert sind, hinweist. Außerdem ist in den beiden Proben mit Prozesswasser, bzw. Prozesswasser mit Wasser aus dem Aktivkohlefilter der Peak C höher, der auf hoch molekulare, kondensierte organische Moleküle (z.B. Huminsäuren) hinweist. Hingegen ist der Anteil an gering molekularen sauren Kohlenstoffverbindungen (z.B. Fulvosäuren) (Peak E) beim Prozesswasser geringer. Fulvosäuren sind natürliche amphiphilische Polymere mit Carboxyl- und Phenol-OH Gruppen die eine mizellenartige Struktur bilden können und unabhängig vom pH-Wert gut wasserlöslich sind (Singh et al., 2015). Man geht davon aus, dass diese amphiphilen Polymere bei Bakterien dazu beitragen sich besser von Oberflächen zu lösen (Javier et al., 2021). Eine einfachere Reinigung von Biofilmen mit geringerem Protein- und höherer Fulvosäurenanteil wurde kürzlich beschrieben (Javier et al., 2021). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass der Anlagenbetreiber von W18 in der Lage ist, die Aktivkohlefilter mehrfach rück zu spülen.

Tabelle 1. Isobarenplot Auswertung nach Pan et al. (2010) mit Ex = Excitation und Em = Emission

Probe	Peak A Ex 228 nm/ Em 272 nm	Peak B Ex 275 nm/Em 350 nm	Peak C Ex 272 nm/ Em 450 nm	Peak D Ex 350 nm/ Em 450nm	Peak E Ex 340 nm/ Em 390 nm
Prozesswasser W18	353	186	138	31	37
Prozesswasser + Wasser aus dem Aktivkohlefilter W18	20	124	166	20	102
Aktivkohle 10-20 cm W18	20	101	79	40	106
Aktivkohle 10-20 cm W18	20	36	44	20	101
Aktivkohlefilter O76 310 cm u. Filteroberkante	20	91	43	51	63

Fazit

Die Quantifizierung der Biofilme, die an den Aktivkohlepartikeln haften, stellte sich aufgrund der Matrix als schwierig heraus. Für die Mikroskopische Messung der Biofilmschichtdicke ist ein definiertes Trägermaterial wünschenswert, weil die Aktivkohleoberfläche sehr heterogen ist. Dies wurde entwickelt und in AP1.6 eingesetzt und die Ergebnisse in AP 2.5 beschrieben. Des Weiteren wurde die Wichtigkeit erkannt, dass neben dem mikroskopischen Ansatz insbesondere Gehaltbestimmungen und Charakterisierung über nasschemische Methoden notwendig sind und diese wurde auch in AP1.6 und AP2.3 eingesetzt. Methoden und Ergebnisse werden in AP2.5 detailliert beschrieben.

Aus den Feldbegehungen war ersichtlich, dass vor allem in aeroben Aktivkohle-Filteranlagen hydraulische Probleme auf Grund von Biofilmentwicklung auftreten. Eine Co-existenz von Absorptionsprozessen und mikrobiellen Abbauprozess wird vermutet und bestätigt die dem Projekt zugrundeliegenden Annahmen. Bei anaeroben Filtern erwarten wir eine geringe Biofilmentwicklung. Um auch Auswirkungen einer geringen

Biofilmentwicklung beobachten zu können, wurde beschlossen die anaeroben Tetrachlorethen (PCE) Säulenversuche länger zu betreiben.

AP 1.2 – Herstellung von Biokohlen als Filtermaterial

Durch die Pyrolyse vier verschiedener Biomassen (land-/forstwirtschaftliche Nebenprodukte) bei unterschiedlichen Temperaturen wurden Biokohlen hergestellt, die als Filtermaterialien in Biofilter verwendet werden sollten. Die maßgebende Anforderung an die produzierten Kohlevarianten war einerseits deren mechanische Stabilität und hydraulische Eignung, um als Filtermaterial verwendet werden zu können, als auch deren Sorptionskapazität für die Chemikalien der zwei Schadstoffgruppen (CKW, PAK) und deren Umweltverträglichkeit beim Umgang mit Grundwasser. Die produzierten Kohlen wurden in weiterer Folge in AP 1.3 physikalisch/chemisch charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Analysen waren die Basis für die Auswahl einzelner Biokohlen für die Sorptionsversuche.

Durchführung

Mit einem Pyrolyse-Reaktor (Pyreka 3.0, indirekt beheizter Schneckenreaktor im Labormaßstab; Pyreg GmbH, D-56281 Dörth) wurden Marillenkerne (A), Holzhackschnitzel (W), Miscanthus-Hackschnitzel (M) und Sonnenblumenkernschalen (S) bei vier Temperaturen (350, 550, 650 und 750 °C) und einer Aufenthaltsdauer von 20 Minuten mit Stickstoff als Spülgas (5 L min⁻¹) pyrolysiert. Alle Inputmaterialien stammten aus regionaler landwirtschaftlicher Produktion (Marillenkerne: Verein Wachauer Marille; Holz- und Miscanthus-Hackschnitzel: landwirtschaftlicher Produzent in Königstetten bzw. Tullner Feld; Sonnenblumenkernschalen: Ölmühle Bunge, Bruck/L.).

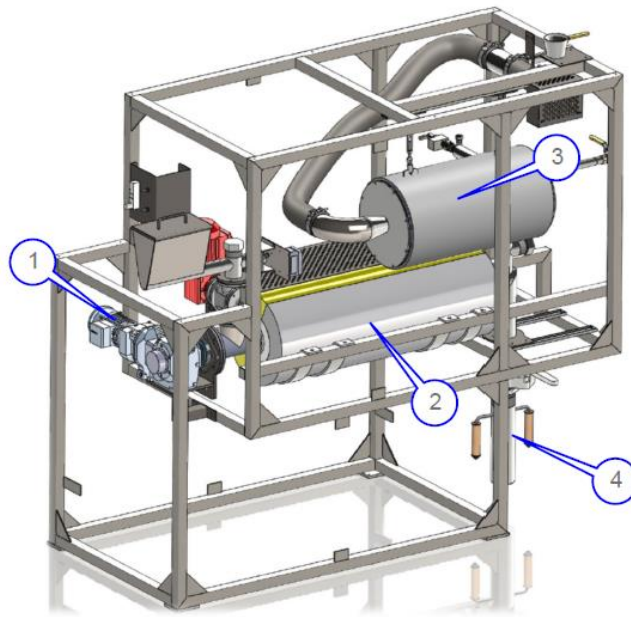


Abbildung 7: Schema der Labor-Pyrolyseanlage PYREKA mit den wichtigsten Komponenten (1: Feeder (Materialzuführung), 2: Reaktor, 3: Abgasbehandlung (Brennkammer), 4: Austrag (Kohletopf)). Quelle: PYREKA-Original-Betriebsanleitung R01 von Pyreg GmbH, 2021

Eine schematische Darstellung des Aufbaus des Pyrolyse-Reaktors (ohne Schutz-Verkleidung) zeigt Abbildung 7. Die Beheizung des Pyreka-Reaktors erfolgt elektrisch, da die im Versuchsbetrieb üblichen geringen Mengen an Biomasse nicht ausreichen würden, um - was im kommerziellen Maßstab kein Problem ist - ausreichende Mengen an Pyrolysegas zu erzeugen, deren Verbrennung thermisch für die Reaktorheizung nutzbar wäre. Aus diesem Grund ist für die Nachverbrennung eine ständig brennende Stützflamme (Propan) erforderlich, welche die Pyrolysegase sauber verbrennt und geruchs- und qualmbildende Emissionen dadurch unterbunden werden. In Abbildung 8 wird auf die Brennkammer, die Lanze für die Propangas-Einspeisung und das Abgas-Gebläse für den Transport ins Freie hingewiesen. Der Probeneintrag wird in (Abbildung 9) gezeigt. In der dargestellten Form ist er das Produkt eines Umbaus des originalen Eintrags und zeichnet sich durch vergrößertes Volumen, stärkeren Antrieb und Gasdichtheit aus. Dadurch war es möglich, auf die originale Zellradschleuse zu verzichten, welche zuvor die Rolle des Luftsauerstoff-Ausschlusses hatte, sich aber bei bestimmten Probematerialien als störanfällig erwiesen hatte. Da es bei der Pyrolyse mit kleinen Probemengen nicht reicht, nur den Luftsauerstoff auszuschließen, sondern die Atmosphäre im Reaktor durch ein Spülgas zusätzlich sauerstofffrei gemacht

werden muss, hat der Reaktor einen separaten Eingang für ein Spülgas (typischerweise Stickstoff), der in Abbildung 10 dargestellt ist.

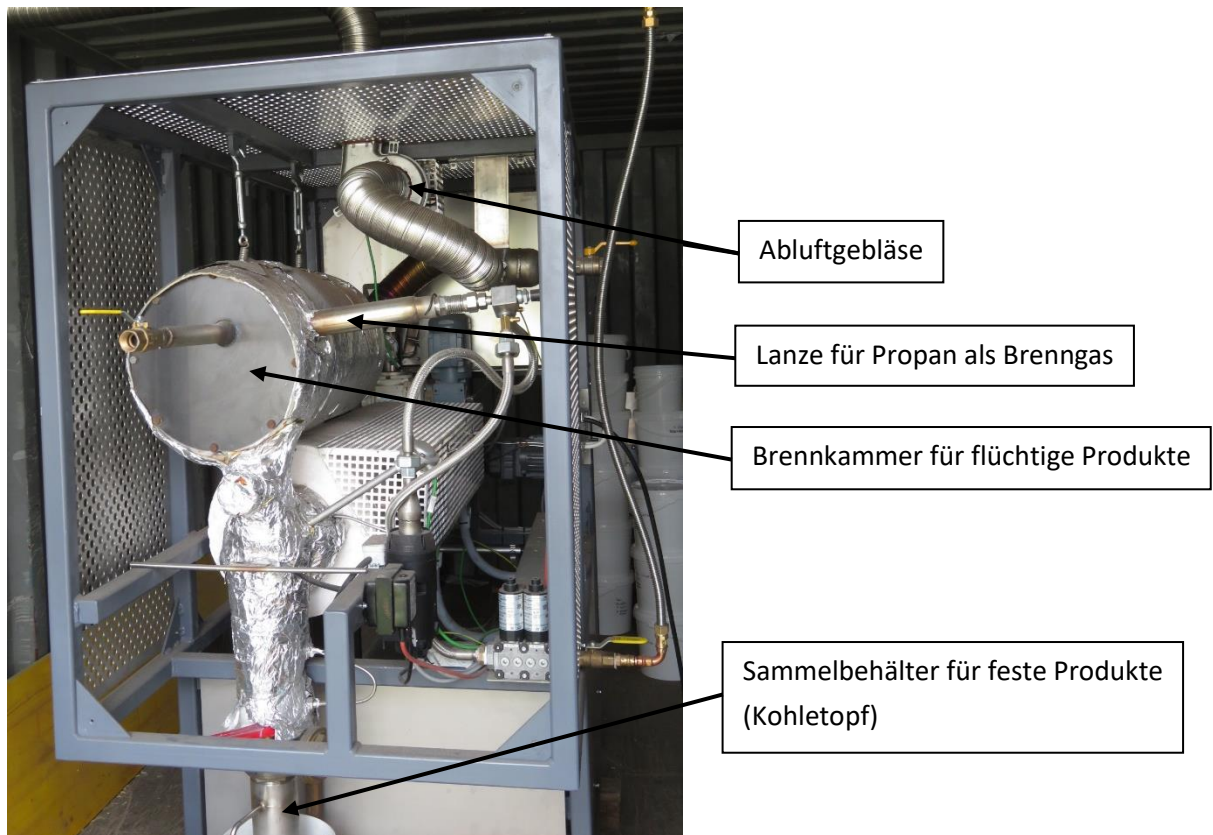


Abbildung 8: Vorderansicht des PYREKA-Reaktors mit weiteren Details aus Abbildung 7



Erneuerte Inputmaterial-Zuführung

Abbildung 9: Umgebauter und gasdicht gemachter Probeneintrag (Komponente 1 aus Abbildung 7).



Spülgas-Eingang

Durchflussregler für Spülgas

Abbildung 10: Eingang für Stickstoff als Spülgas

Der Gasstrom wird nach diesem Eingang in zwei Ströme geteilt, welche in den vorderen und den hinteren Teil des Reaktors geleitet werden. Bei störungsfreiem Betrieb ist mit diesem

Reaktor ein Materialdurchsatz von bis zu 2 kg h⁻¹ Ausgangsmaterial mit einer Biokohlen-Ausbeute von 15-35 % möglich. Ein Beispiel für den Vergleich von Ausgangsmaterial und pyrolysiertem Produkt ist exemplarisch für Holzhackschnitzel in Abbildung 11 gezeigt.



Abbildung 11: Für die Pyrolyse vorbereitete Holz-Hackschnitzel (rechts) und das nach Pyrolyse bei 550 °C erhaltene Karbonisierungsprodukt (links).

Ergebnisse

Mit dem beschriebenen Reaktor wurden Karbonisierungsprodukte (Biokohlen) aus vier verschiedenen Eingangsmaterialien bei je vier verschiedenen Pyrolyse-Temperaturen in Mengen von ca. 0.5 – 1.0 kg hergestellt (siehe Tabelle 2), um für die weitere analytische Charakterisierungen, Sorptionsversuche, Batch- und Säulenversuche zur Verfügung zu stehen. Durch Nutzung von Synergismen war es möglich, 16 anstatt der im Antrag geplanten 10 Biokohlen herzustellen. Zuzüglich zu den ersten 12 Kohlen (vier Materialien bei je drei Temperaturen) wurden nachträglich weitere zwei Kohlen bei 650°C hergestellt. Außerdem wurde bei zwei Kohlen, die bei 750°C hergestellt wurden eine thermische Nachbehandlung bei 100°C bzw. 300°C durchgeführt.

Als Referenzmaterial zu den in diesem Arbeitspaket hergestellten Biokohlen wurde die Aktivkohle Hydraffin A 8x30 (Donau Carbon GmbH, 60388 Frankfurt) verwendet.

Tabelle 2. Übersicht hergestellter Biokohlen

Ausgangsmaterial	Pyrolysetemperatur [°C]	Bezeichnung	Input Masse [kg]	Biokohlen Masse [kg]	Ausbeute [%]
Marillenkerne	350	A350	3.5	1.21	35.19
Marillenkerne	550	A550	3.5	0.74	21.51
Marillenkerne	750	A750	3.5	0.58	16.75
Holzhäcksel	350	W350	3.0	0.84	28.13
Holzhäcksel	550	W550	2.4	0.40	17.11
Holzhäcksel	650	W650	2.5	0.38	15.30
Holzhäcksel	750	W750	2.4	0.32	13.57
Miscanthus	350	M350	3.0	0.61	20.20
Miscanthus	550	M550	3.0	0.56	18.60
Miscanthus	750	M750	3.0	0.41	13.77
Sonnenblumen- kernschalen	350	S350	3.0	0.79	26.33
Sonnenblumen- kernschalen	550	S550	3.0	0.68	22.67
Sonnenblumen- kernschalen	650	S650	3.0	0.62	20.77
Sonnenblumen- kernschalen	750	S750	3.0	0.57	18.87

AP 1.3 – Chemische Grundcharakterisierung und Auswahl der Kohlen

Die chemische Grundcharakterisierung der Kohlen ist neben der hydraulischen Charakterisierung (AP 1.4) sowie der Bestimmung der Sorptionsisothermen (AP 1.5) entscheidend für die Auswahl von je zwei Biokohlen je Schadstoffgruppe (CKW, PAK), welche in AP 1.6 und AP 2.3 in Batch- und Säulenversuchen auf ihre Eignung als Filtermaterial in Biofiltern zur Grundwasserreinigung untersucht wurden. In diesem Arbeitspaket wurden die in AP 1.2 hergestellten Biokohlen physikalisch chemisch untersucht, wobei die Erfordernisse der European Biochar Certificate (EBC) Richtlinie für die Bewertung der ermittelten physikalisch/chemischen Parameter als entscheidend erachtet wurde. Das wesentliche Resultat von AP 1.3 war die Empfehlung der Biokohlen A550, A750, W550, W750, sowie S550 und S750 als potentielle geeignete Filtermaterialien.

Durchführung der physikalisch/chemischen Charakterisierung

Vor der Pyrolyse wurde der Kohlenstoff- und Stickgehalt (C, N) des Eingangsmaterials mit einem Elementar-Analysator gemessen (Thermo Scientific™ FLASH 2000 CHNS/O Analyzer). Zuvor wurde das Material bei 60 °C getrocknet und in einer Kugelmühle (Retsch Mixer Mill MM 200) mit 15 Hz für 2 min zerkleinert.

Die Biokohlen wurden im Labor von Eurofins Umwelt Ost GmbH auf die für das EBC-Zertifikat erforderlichen Parameter mit den in Tabelle 3 gelisteten Verfahren gemessen.

Tabelle 3: Analyseverfahren für die Charakterisierung der Biokohlen.

Parameter	Analyseverfahren
Probenvorbereitung	DIN 51701-3
Wassergehalt	DIN 51718
Aschegehalt (550 °C)	Analog DIN 51719
Kohlenstoff, Wasserstoff	DIN 51732
Stickstoff	DIN 51732
Schwefel	DIN 51724-3
Sauerstoff (berechnet)	DIN 51733
Karbonat-CO ₂	DIN 51726
C _{org} (berechnet aus C _{tot} and C-Karbonat)	Calculation
H/C und O/C	Calculation
Spurenelemente B, Cd, Cu, Ni, Hg, Zn, Cr, B, Mn im Mikrowellen-Auflschluss	EN ISO 17294-2 /DIN 22022-4/-1
Hauptelemente P, Mg, Ca, K, Na, Fe, Si, S im Schmelzaufschluss	EN ISO 11885 /DIN 51729-11
PAK (EPA)	EN 16181 (Extraktion mit Toluol)
pH-Wert	DIN ISO 10390 (CaCl ₂)
Dichte	Based on VDLUFA Bd. I A 13.2.1
Leitfähigkeit (Salzgehalt)	BGK, Kap. III. C2
Spezifische Oberfläche nach BET	DIN ISO 9277

Ergebnisse der physikalisch/chemischen Charakterisierung

Die Analysen der Ausgangsmaterialien auf die Hauptelement Kohlenstoff und Stickstoff sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen für pflanzliche Ausgangsstoffe typische Gehalte, wobei die Marillenkerne durch den Weichkern-Anteil etwas höhere Stickstoff-Konzentrationen als die anderen Materialien aufwiesen.

Tabelle 4: Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalte der Input-Materialien vor der Pyrolyse

Input-Material	C in wt%	N in wt%
Marillenkerne (A)	51,75	1,48
Holzhäcksel (W)	48,66	0,31
Miscanthus (M)	46,68	0,16
Sonnenblumenkernschalen (S)	47,44	0,66

Bei den Analysen auf die für eine EBC-Zertifizierung wichtigen Parameter standen vor allem 2 Indikatoren im Vordergrund: die spezifische Oberfläche als Maß für das Sorptionspotential und die PAK-Konzentration als bei Biokohlen kritischster Parameter für die Einteilung in bestimmte Qualitätsklassen. Die spezifische Oberfläche (SSA) der produzierten Kohlen stieg mit der Pyrolysetemperatur an und zeigt bei allen Eingangsmaterialien nach einer Verkohlung bei 750 °C die höchsten Werte (Tabelle 5). Die beobachteten SSA-Werte von etwa 350-450 m² g⁻¹ kennzeichnen für unbehandelte Biokohlen bereits sehr gute Qualitäten, werden allerdings durch physikalische oder chemische Modifikation bei der Aktivkohleherstellung mit Werten von 800-1500 m² g⁻¹ noch deutlich übertroffen. Die PAHK-Ergebnisse zeigen, dass die Kohlen nach einer Pyrolyse von 350 und 550 °C zwar (mit 1 Ausnahme) die Grenzwerte für den landwirtschaftlichen Einsatz erfüllen (EBC-Agro: 6 mg PAH_{16EPA} kg⁻¹), die PAK-Konzentrationen nach der Pyrolyse bei 750 °C jedoch bei 2 der 4 Materialien den Grenzwert für industriellen Einsatz jedoch um 8 bzw. 60 % überschreiten (EBC-Material: 30 mg PAH_{16EPA}/kg). Deshalb wurden nachträglich die davon betroffenen Ausgangsmaterialien (W, S) auch bei 650°C pyrolysiert, um festzustellen, ob eine Temperatur zwischen 550°C und 750°C eine temperaturbedingt erhöhte spezifische

Oberfläche liefert, als auch PAK Gehalte unter dem EBC-Agro Grenzwert von 6 mg PAH_{16EPA} kg⁻¹. Die Ursachen der hohen PAH-Gehalte bei zwei 750°C-Varianten sind offenbar in reaktorspezifischen Teer-Neubildungsreaktionen zu suchen. Ob dieser Effekt auch bei Reaktoren im kommerziellen Maßstab auftritt oder durch die spezifische Geometrie und Spülgas-Dynamik der Laborpyrolyse-Anlage bedingt ist, müsste in separaten Experimenten im größeren Produktionsmaßstab untersucht werden.

Tabelle 5. Ausgewählte Analysenergebnisse der produzierten Biokohlen. Bei Angabe von zwei Temperaturen (z.B. 750/100) je Biokohle wurde eine thermische Nachbehandlung zur potentiellen Reduktion der PAK-Gehalte durchgeführt.

Input Material	Temperatur in °C	Spezifische Oberfläche in m ² g ⁻¹	Asche in wt%	pH	PAH in mg kg ⁻¹
Marillenkerne	350	n.n.	3.6	7.3	0.1
Marillenkerne	550	178.17	4.9	8.1	2.1
Marillenkerne	750	362.62	6.4	8.9	0.7
Holzhäcksel	350	5.16	1.9	8.9	0.7
Holzhäcksel	550	263.8	2.3	8.3	5.6
Holzhäcksel	650	330.78	13.7	9	3.5
Holzhäcksel	750	423.54	3	9.3	32.4
Holzhäcksel	750/300				13.5
Miscanthus	550	215.62	8.6	9.2	4.8
Miscanthus	750	453.32	10.9	9.4	26.2
Sonnenblumenkernschalen	350	7.54	8.6	10	7.4
Sonnenblumenkernschalen	550	82.97	10.6	9.1	2
Sonnenblumenkernschalen	650	154.43	18.4	9.5	2
Sonnenblumenkernschalen	750	361.83	12.6	10.9	48.4
Sonnenblumenkernschalen	750/100				86.9

Physikalisch/chemische Eigenschaften der Aktivkohle (Referenzmaterial)

Als Referenzmaterial für die produzierten Biokohlen wurde die Aktivkohle Hydraffin A 8x30 mesh (Donau Carbon GmbH), nach Absprache mit dem Produzenten über deren Eignung für das vorliegende Projekt, ausgewählt. Hydraffin A 8x30 erfüllt die Anforderungen für wasserextrahierbare Substanzen gemäß DIN EN 12 915 und eignet sich für die Trinkwasserbehandlung (lt. Datenblatt).

Tabelle 6. Kenndaten Hydraffin A. Die genannten Daten basieren auf Untersuchungen der Aktivkohle im Anlieferungszustand und Analysemethoden gemäß ASTM (American Society for Testing and Materials). Zu Verfügung gestellt von Donau Carbon GmbH.

Parameter	Parameterwert
Körnung (mesh)	8 x 30
Schüttdichte (kg m ⁻³)	360 ± 30
Wassergehalt (Gew.-% beim Abpacken)	< 5
pH-Wert	8-11
Härte (Gew.-%)	Ca. 90
Jodadsorption (mg g ⁻¹)	>1100
BET-Oberfläche (m ² g ⁻¹)	Ca. 1250
Aschegehalt (Gew.-%)	Ca. 12

In Punkto Adsorption von Naphthalin (NAP) und Tetrachlorethen (PCE) konnte der Hersteller leider keine Daten für die Hydraffin A bereitstellen. Stattdessen wurden uns Daten der sehr ähnlichen, aber schwächer adsorbierenden Aktivkohle Hydraffin 30 N zur Verfügung gestellt, die als Ankerpunkt zum Vergleich mit den selbst durchgeführten Adsorptionsversuchen mit Hydraffin A verwendet wurden.

Tabelle 7. Adsorptionsparameter für Hydrffin 30N durchgeführt bei 20°C Wassertemperatur laut Hersteller Donau Carbon GmbH.

Schadstoff	Adsorptionsmodell	K_f	$1/n$	Korrelationskoeffizient
NAP	Freundlich	132	0.42	0.96
PCE	Freundlich	136	0.45	1.00

Die chemisch/physikalische Grundcharakterisierung der Aktivkohle wurde nachträglich bei der Firma Eurofins GmbH durchgeführt, da der Aktivkohlehersteller diese nicht bereitstellen konnte und somit eine detaillierte Analyse der Sorptionsprozesse Lücken aufgewiesen hätte. Die zusätzlichen Analysen lieferten einen ausschlaggebenden Beitrag bei der wissenschaftlichen Verwertung der Projektergebnisse. So konnten wir das im Zuge des Projektes untersuchte Phänomen der Kohlenstoffisotopenfraktionierung bei der Sorption von chlorierten Ethenen an Biokohlen und Aktivkohle mit der Porengrößenverteilung in Verbindung bringen und diese in einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlichen (Leitner et al., 2023b).

Auswahl auf Grund der physikalisch/chemischen Charakterisierung

Die Elementanalytik der Biokohlen zeigte, dass der Kohlenstoff-Gehalt immer über 73 % lag (Tabelle 8). Das molare H/C_{org}-Verhältnis lag mit einer Ausnahme einer bei 350 °C produzierten Kohle immer unter 0.7 und das O/C_{org}-Verhältnis immer unter 0.4, welche ebenfalls wesentliche Qualitätsparameter für Biokohlen nach European Biochar Certificate (EBC) sind. Kleiner werdende Verhältnisse nach höherer Pyrolyse-Temperatur charakterisieren höhere Resistenzen dieser Kohlen gegen biologischen Abbau sowie besonders hohe aromatische Kondensationsgrade, welche erfolgreiche Karbonisierungsprozesse kennzeichnen.

Tabelle 8: Ausgewählte Analysenergebnisse der produzierten Biokohlen und der Aktivkohle (Charakterisierung durch eurofins Austria).

Input Material	Temp. °C	BET m ² g ⁻¹	Ash wt%	pH	PAH mg kg ⁻¹	C wt%	C _{org} wt%	H wt%	O wt%	N wt%	S wt%	H/C	O/C
Marillenkerne	350	-	3.6	7.3	0	74	74	4.8	16.1	1.83	0.1	0.78	0.164
Marillenkerne	550	178	4.9	8.1	2	83	83	2.8	8	1.63	0.0	0.40	0.072
Marillenkerne	750	362	6.4	8.9	1	89	88	1.1	3	1.47	0.1	0.15	0.025
Holzhäcksels	350	5	1.9	8.9	1	77	77	3.9	17.9	0.22	0.0	0.60	0.176
Holzhäcksels	550	264	2.3	8.3	6	90	90	2.8	5.1	0.55	0.0	0.37	0.043
Holzhäcksels	650	331	13.7	9.0	4	83	81	0.9	4.1	0.69	0.1	0.13	0.037
Holzhäcksels	750	424	3.0	9.3	32	95	94	1.1	1.2	0.77	0.0	0.13	0.010
Miscanthus	550	216	8.6	9.2	5	85	84	2.3	4.5	0.54	0.2	0.32	0.040
Miscanthus	750	453	10.9	9.4	26	84	84	0.9	3.4	0.75	0.2	0.13	0.030
Sonnenblumenkernschalen	350	8	8.6	10	7	76	76	3.4	11.7	1.51	0.3	0.52	0.115
Sonnenblumenkernschalen	550	83	10.6	9.1	2	83	83	2.1	4.7	1.21	0.2	0.30	0.043
Sonnenblumenkernschalen	650	154	18.4	9.5	2	73	73	0.8	4.8	3.1	0.4	0.13	0.049
Sonnenblumenkernschalen	750	362	12.6	10.9	48	83	82	0.9	4.1	1.17	0.3	0.13	0.037
Hydraffin A	-	1100	8.6	9.1	0	89	89	0.2	1.4	0.8	0.5	0.03	0.010

Nach Zusammenschau der Ergebnisse der chemischen Grundcharakterisierung konnte eine Empfehlung für die Kohlen A550, A750, W550, W650 sowie S550 und S650 ausgesprochen werden (Axxx – Marillenkernkohle, Wxxx – Holzhäckselkohle, Sxxx – Sonnenblumenkernschalenkohle; xxx – Pyrolysetemperatur). Diese Empfehlung berücksichtigt auch den im Laufe der hausintern durchgeführten Untersuchungen als kritisch bewerteten Parameter der mechanischen Stabilität (siehe dazu auch AP 1.4). Gerade die Miscanthus-Kohlen zeigten eine sehr instabile Gestalt, die bei einer Verwendung als Filtermaterial vermutlich zu Filterblockaden führen würden und deshalb ohne Empfehlung blieben. Kohlen, die nicht weiter getestet wurden, waren auf Grund zu hoher PAK Konzentrationen oder zu kleiner spezifischer Oberflächen ausgeschieden worden.

Kohlenstoffisotopenverhältnisse der Kohlen und Kohlenstoffquellen

Die Auswertung und Interpretation der Daten in AP 2.3 und 2.4 machten es notwendig, die Kohlenstoffisotopenverhältnisse der verwendeten Kohlen, sowie der Kohlenstoffquellen für den anaeroben mikrobiellen Abbau von chlorierten Ethenen und zum in Durchführung befindlichen aeroben mikrobiellen Abbau von Naphthalin zu bestimmen. Dazu wurden gemahlene Feststoffproben mittels Elementaranalyse- Isotopenverhältnismassenspektrometrie (EA/IRMS) analysiert.

Das Kohlenstoffisotopenverhältnis ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in einer Substanz (zB PCE (C_2Cl_4)) wird nachfolgend durch den Parameter $\delta^{13}\text{C}$ angegeben. Dieser Parameter stellt einen relativen Messwert dar, da $\delta^{13}\text{C}$ relativ zu einem Standard mit bekanntem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnis berechnet wird. Auf Grund der geringen natürlichen Verhältnisse von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ auf unserem Planeten wird der $\delta^{13}\text{C}$ gewöhnlich in ‰ angegeben.

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{Probe}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{Standard}}} - 1$$

Standardisiert bzw. normiert wird $\delta^{13}\text{C}$ im vorliegenden Bericht auf das internationale Referenzmaterial Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB). Ebenfalls in diesem Bericht wird das Wasserstoffisotopenverhältnis ($\delta^2\text{H}$) behandelt, dass der gleichen Berechnung folgt, jedoch bezieht sich der $\delta^2\text{H}$ -Wert auf einen anderen Standard (Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW)).

Tabelle 9. Kohlenstoffisotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}$ in ‰ $\pm$ einfacher Standardabweichung (SD)) der Kohlen und mikrobiellen Kohlenstoffquellen

Material	$\delta^{13}\text{C}$ in ‰	SD
Marillenkernbiokohle (A750)	-23.9	0.1
Holzhackschnitzelbiokohle (W550)	-27.0	0.4
Aktivkohle Hydraffin A4	-21.7	0.4
Ethanol 96%	-25.4	0.7
Ethanol pur.	-13.7	0.6
Acetat (wasserfrei)	-11.1	0.2
Acetat (Trihydrat)	-49.4	0.3
Laktat	-9.6	0.4
Naphthalene (natural abundance)	-26.3	0.1
Naphthalene (^{13}C -labelled)	+63.9	1.4

Die in Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse fließen in die Auswertung der mikrobiellen Gemeinschaften beim anaeroben Abbau von chlorierten Ethenen und dem aeroben Abbau von Naphthalin (AP 2.4) ein. Dabei soll herausgefunden werden, welche Kohlenstoffquellen für den mikrobiellen Metabolismus primär herangezogen werden und ob dies auch den Zugriff auf organische Verbindungen auf der Kohlenoberfläche umfasst. Nachfolgend sei auf die Ergebnisse von AP 2.4 verwiesen.

AP 1.4 – Charakterisierung der hydraulischen Eigenschaften

Zur Bestimmung der hydraulischen Eigenschaften wurden die hydraulische Leitfähigkeit K_s , die Substanzdichte ρ_s , die Lagerungsdichte ρ_b und die Porosität n bestimmt. Auf eine Korngrößenanalyse wurde verzichtet, da das Material zuvor gesiebt wurde (2-0.5 mm). Aus rein hydraulischer Sicht wären theoretisch alle getesteten Biokohlen als Filtermaterial geeignet. Einige sind schwerer handhabbar aufgrund der Tatsache, dass die Partikel beim Packen nicht stabil waren und leicht zerfallen (v.a. Miscanthus). Besonders stabil war das Material aus Marillenkernen. Für Filtersysteme mit Biokohle aus Marillenkernen wäre aufgrund der hohen Lagerungsdichte hier mehr Material für die Füllung notwendig als für andere Biokohlen. Da die Unterschiede der hydraulischen Eigenschaften der Biokohlen nicht groß waren und somit kein limitierender Faktor beim Betrieb eines Filters zu sein scheinen, wurde die finale Auswahl des Filtermaterials hauptsächlich aufgrund der chemischen Eigenschaften getroffen; Biokohle aus Miscanthus wurde aber aufgrund seiner geringen Stabilität ausgeschlossen.

Durchführung und Ergebnisse

Die hydraulische Leitfähigkeit K_s wurde mit Hilfe der Falling Head Methode und in Triplikaten für alle Biokohlen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen sehr hohe hydraulische Leitfähigkeiten der Biokohle in der Größenordnung von 10^{-1} bis $10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ (Abbildung 12). Die Größenordnungen sind vergleichbar mit Kies- oder anderen Sandfiltern. Biokohlen, die bei niedrigeren Temperaturen hergestellt wurden, weisen tendenziell niedrigere Leitfähigkeiten auf, was eine Konsequenz der unterschiedlichen Porosität ist, aber sicherlich keine signifikanten Unterschiede sind. Da alle Biokohlen vergleichsweise hohe hydraulische Leitfähigkeiten haben, wäre jedes der Materialien für den Filter geeignet. Bei den Versuchen ist aufgefallen, dass das Material der Biokohlen unterschiedlich leicht handhabbar und stabil ist. Am stabilsten und wenigsten leicht brüchig waren die Biokohlen aus Marillenkernen (A). Langfristig könnte sich die geringere Stabilität auf die hydraulische Leitfähigkeit im Filter auswirken, da feinkörniges, brüchiges Material im Laufe des

Filterbetriebes ggf. mit dem Wasser verlagert werden könnte, sich am Auslass des Filters ansammeln und somit die hydraulische Leitfähigkeit verringern könnte.

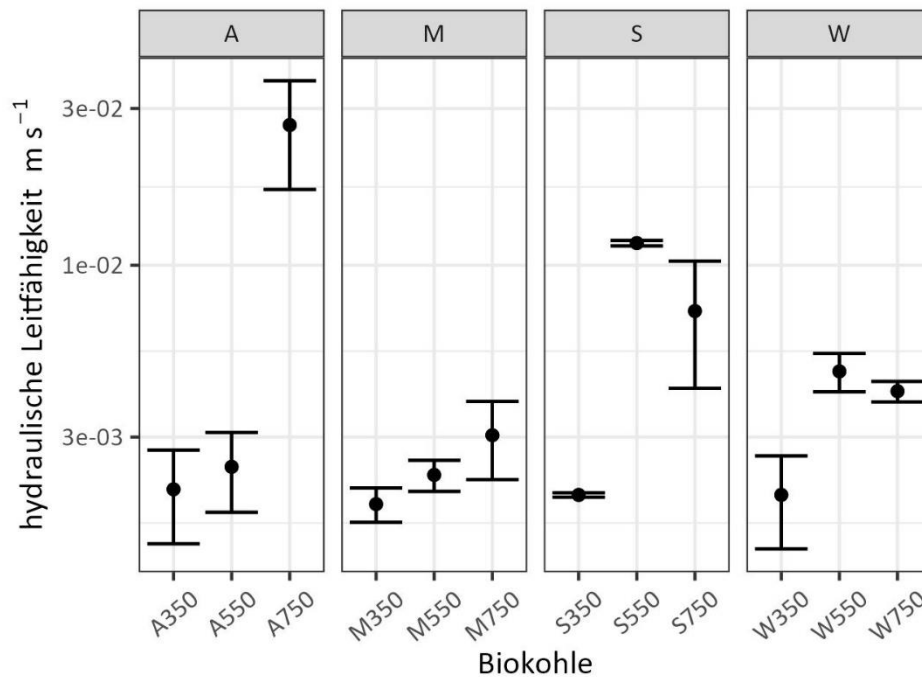


Abbildung 12: Hydraulische Leitfähigkeiten der unterschiedlichen Biokohlen bestimmt über die Falling Head Methode; Probenbezeichnung (x-Achse): Der Buchstabe beschreibt die Biomasse, welche für die Herstellung der Biokohlen verwendet wurde (M = Miscanthus; A = Marillenkerne; S = Sonnenblumenkernschalen, W = Holzschnitzel) und die Zahl gibt die Herstellungstemperatur in °C an.

Die Substanzdichte der Biokohle wurde mittels Pyknometer und über Wägung bestimmt. Aufgrund der biporösen Struktur der Biokohle war es wichtig, das Material für mindestens 48 Stunden im entgasteten Wasser zu lassen, so dass potentiell eingeschlossene Luft in den innerporösen Strukturen entweichen konnte. Dies war bei den meisten Versuchen erfolgreich, wobei immer noch einige wenige Partikel auf der Oberfläche des Wassers geschwommen sind (v.a. Biokohle aus Holzhackschnitzel (W)). Um Fehler zu minimieren, wurden die Versuche in Duplikaten durchgeführt. Die Werte der Substanzdichte variieren stark zwischen 1.1 bis 2.0 g cm⁻³ (Abbildung 13). Bis auf Biokohle aus Sonnenblumenkernschalen (S) weisen die Biokohlen, produziert bei geringeren Temperaturen, geringere Substanzdichten auf. Die Substanzdichte selber ist kein Kriterium zur Wahl eines Filtermaterials, wird aber benötigt, um zusammen mit der Lagerungsdichte auch die Porosität zu bestimmen. Dies sind wiederum wichtige Eigenschaften, um auf (i) die

Menge an benötigtem Material, (ii) Porenvolumen und somit (iii) Aufenthaltszeiten des Grundwassers im Filter schließen zu können.

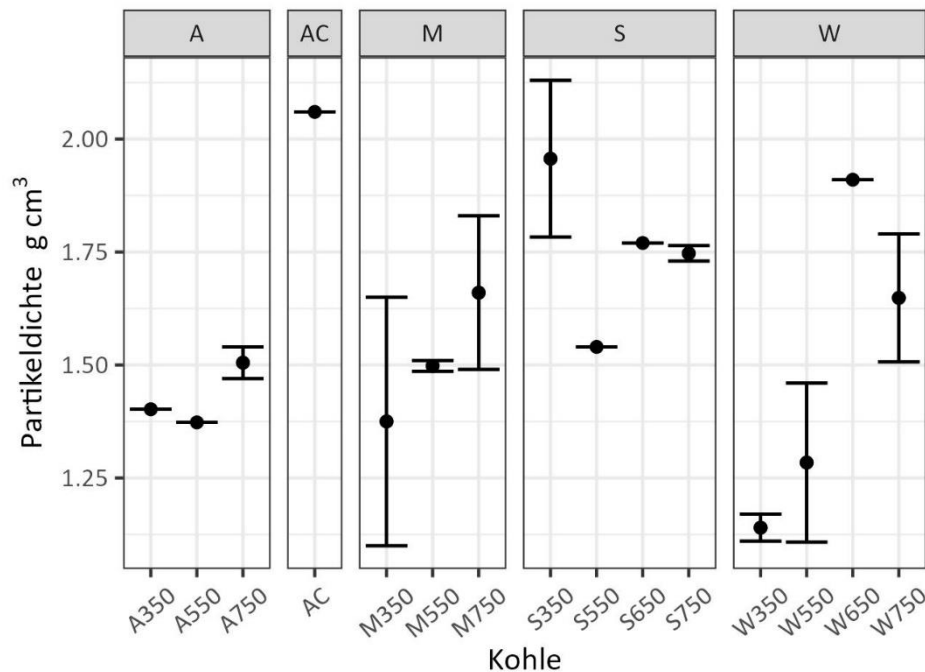


Abbildung 13: Partikeldichte (Substanzdichte) der unterschiedlichen Kohlen bestimmt über Pyknometer. Probenbezeichnung (x-Achse): Der Buchstabe beschreibt die Biomasse, welche für die Herstellung der Biokohlen verwendet wurde (M = Miscanthus; A = Marillenkerne; S = Sonnenblumenkernschalen, W = Holzschnitzel) und die Zahl gibt die Herstellungstemperatur in °C an. AC steht für die Aktivkohle Hydrarffin A.

Für die Bestimmung der Lagerungsdichte wurden Zylinder mit bekanntem Volumen mit Biokohle gefüllt und gewogen. Die Lagerungsdichte schwankt zwischen 0,1 und 0,36 g cm⁻³ und ist für alle Marillenkernkohlen und für die Sonnenblumenkernschalenkohle bei 350°C deutlich höher als bei den anderen Kohlen (Abbildung 14). Somit wäre der Materialienbedarf für eine deutlich höher (ca. 90 g pro Säule) als im Vergleich zu den anderen Materialien (ca. 30 g pro Säule). Aufgrund der höheren Lagerungsdichte sind auch die Porositäten der A-Kohlen und der S-Kohle bei 350°C geringer (Abbildung 14). Diese schwanken zwischen 75 und 95%. Auch wenn höhere Porositäten auf eine höhere Aufenthaltszeit hindeuten, besteht die Gefahr der Etablierung von präferentiellen Fließwegen, so dass auf alle Fälle bei der Packung der Filter/Säulen auf eine dichte und regelmäßige Packung zu achten ist.

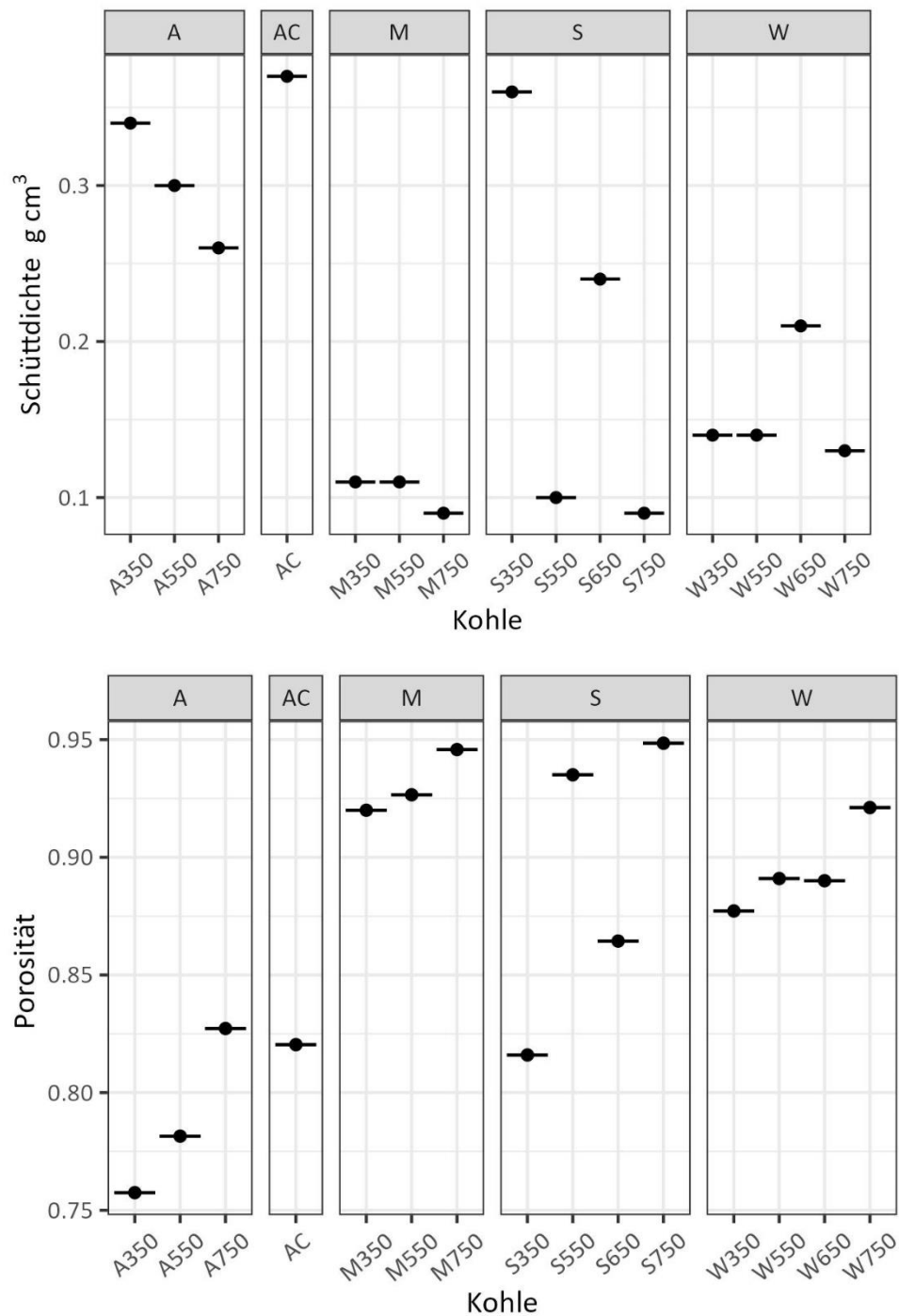


Abbildung 14: Bestimmte Schüttdichte (oben) und berechnete Porosität (unten) der unterschiedlichen Kohlen. Der Buchstabe beschreibt die Biomasse, welche für die Herstellung der Biokohlen verwendet wurde (M = Miscanthus; A = Marillenkerne; S = Sonnenblumenkernschalen, W = Holzschnitzel) und die Zahl gibt die Herstellungstemperatur in °C an. AC steht für die Aktivkohle Hydrffin A.

Auswahl auf Grund der hydraulischen Eigenschaften

Aus Sicht der hydraulischen Eigenschaften sind alle Biokohlen als Filtermaterial theoretisch geeignet, da die hydraulische Leitfähigkeit hoch ist und sich nicht wesentlich zwischen den Materialien unterscheidet. Die Lagerungsdichte ist für die Marillenkernkohlen höher, sodass hier mehr Material für die Füllung der Säulen bzw. der Filter notwendig wäre. Deshalb müssten hier eventuell auch ökonomische Gesichtspunkte bei der Wahl des Filtermaterials durch höhere Kosten bei der Produktion berücksichtigt werden.

Problematisch zu sehen ist die geringe Stabilität der aus Miscanthus hergestellten Biokohlen, so dass bei der Packung der Filter oder im Langzeitbetrieb nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich Feinpartikel am Filterboden anreichern und somit die hydraulische Leitfähigkeit verändern könnten (Filterblockade). Ein weiterer kritischer Aspekt ist die teilweise eingeschlossene Luft aufgrund der Innerpartikelporosität. Daraus resultierender Auftrieb oder Auswirkungen auf die Filterwirkung kann vermindert werden, in dem das Material dicht gepackt wird und zusätzlich mit entgastem Wasser vorgespült wird, um mögliche Gaseinschlüsse langsam zu lösen, so dass das System ggf. anoxisch wird bzw. der gesamte Porenraum genutzt werden kann.

Da die Unterschiede der hydraulischen Eigenschaften nicht groß sind und somit nicht ein limitierender Faktor beim Betrieb eines Filters zu sein scheinen, wurde die finale Auswahl des Filtermaterials hauptsächlich aufgrund der chemischen Eigenschaften getroffen.

AP 1.5 – Charakterisierung des Sorptionsverhaltens der Kohlen

Neben dem Adsorptionsverhalten von Naphthalin (NAP) und Tetrachlorethen (PCE) umfasst dieser Bericht auch die beim mikrobiellen Abbau von PCE involvierten Metaboliten Trichlorethene (TCE), *cis*-Dichlorethen (cDCE), Vinylchlorid (VC) und Ethen. Im Rahmen von Vorversuchen zur Sorptionskapazität und –kinetik am Beispiel von PCE, bei denen alle in AP 1.2 hergestellten Kohlen getestet wurden, konnten die zwei vielversprechendsten Biokohlen identifiziert werden. Die Auswahl berücksichtigte zusätzlich die Ergebnisse der chemisch/physikalischen Grundcharakterisierung laut AP 1.3 und AP 1.4. In weiterer Folge wurden die Parameter der Freundlich-Isotherme und Lagergren Sorptionskinetik für PCE, TCE, cDCE, VC, Ethen und NAP für die Biokohlen A750 (Marillenkerne, pyrolysiert bei 750°C), W550 (Holzhackschnitzel, pyrolysiert bei 550°C) und die Referenzaktivkohle (AC, Hydriffin A) im 2-Phasen-System (Wasser/Kohle) bestimmt.

Vorversuche

Sorptionskinetik und -kapazität

Tetrachlorethen (PCE) ist ein leicht flüchtiges organisches Lösungsmittel (aliphatischer Kohlenwasserstoff) und bedarf einer bedachten und versierten Handhabung um Fehlerquellen bei der Versuchsdurchführung zu minimieren und eine ungeschützte menschliche Exposition zu unterbinden. Für die Bestimmung der Adsorptionskinetik und -kapazität wurden die Kohlen auf 0.63 – 2.0 mm nass gesiebt. Die Kohlen (200 mg Biokohle bzw. 20 mg Aktivkohle) wurden in 65 mL Glasgewindeflaschen eingewogen, vollständig mit Milli-Q Wasser aufgefüllt, mit gasdichten Mininert- Verschlüssen (Vici AG, Schweiz) verschlossen und auf einem Überkopfschüttler bei ca. 6 rpm gelagert. Wässrige Proben wurden in regelmäßigen Abständen gezogen und die PCE-Konzentration bestimmt. Die Zugabe von PCE zu den Versuchsflaschen erfolgte auf unterschiedlichen Wegen (pure PCE-Zugabe, PCE-Zugabe mittels wässriger Lösung, PCE-Zugabe mittels wässriger PCE/Methanol-Lösung). Die Zugabe mittels PCE/Methanol-Lösung (molares

Methanol/Wasser Verhältnis $< 0,005$ (Munz and Roberts, 1986) konnte eindeutig als die am besten geeignete Methode identifiziert werden, die besonders bei der Zugabe von PCE und PCE-Metaboliten in unterschiedlichen Ausgangskonzentration große Vorteile zeigte.

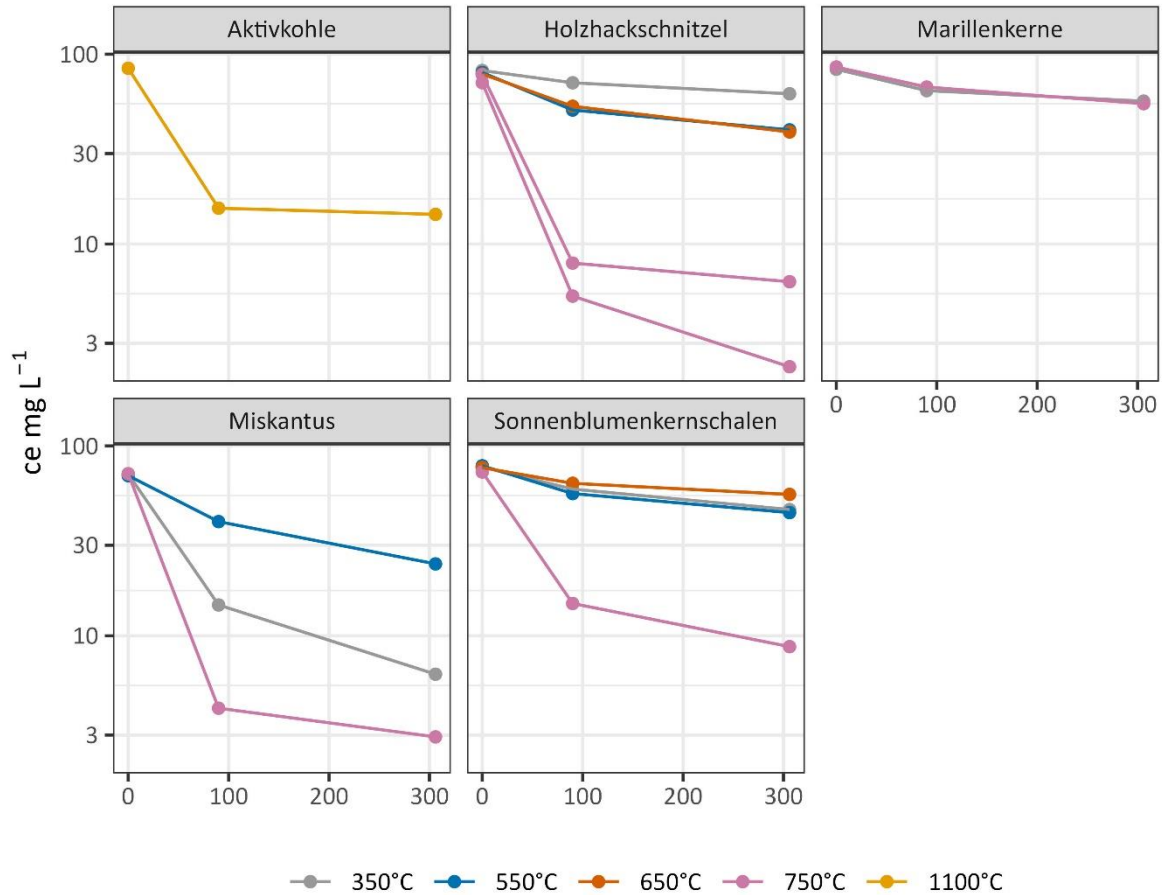


Abbildung 15: Vorversuche zur Sorptionskinetik von PCE auf den Kohlen, durchgeführt mit allen bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellten Biokohlen.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Vorversuche zur Sorptionskinetik von PCE und den hergestellten Biokohlen sowie der kommerziell erhältlichen Referenzaktivkohle Hydrarffin. Von entscheidender Bedeutung bei der Interpretation von Abbildung 15 ist nicht die quantitative Abnahme der PCE-Konzentration in der wässrigen Phase (die jeweiligen Kohleneinwaagen waren nicht für alle Kohlen ident), sondern die zeitliche Entwicklung des PCE-Konzentrationsverlaufs. Der dargestellte Versuch hatte zur Aufgabe die Zeit bis zum PCE-Equilibrium im Phasengemisch von wässriger Lösung und fester Phase (Kohlenoberfläche) zu bestimmen. Für die anschließenden Hauptversuche mit dem Ziel der Bestimmung der Freundlich-Sorptionsparameter muss die Zeit bis zum Equilibrium bekannt sein, da der Versuchsablauf somit auf zwei Probenahmen reduziert werden kann (Null-

Zeitpunkt, Equilibrium). Bei hoher Adsorptionskapazität ist es nicht möglich Probenahmen zwischenzeitlich durchzuführen, da das dafür benötigte Probenvolumen derart hoch ausfällt, dass es das Sorptionsgleichgewicht stark beeinflussen würde und die Ergebnisse im Equilibrium verfälscht. Auf Grund der Ergebnisse in Abbildung 15 sowie daran anschließenden Schadstoff und Kohlen-spezifischen Versuchen wurde eine Dauer von sieben Tagen für das Erreichen des Sorptionsgleichgewichts festgelegt.

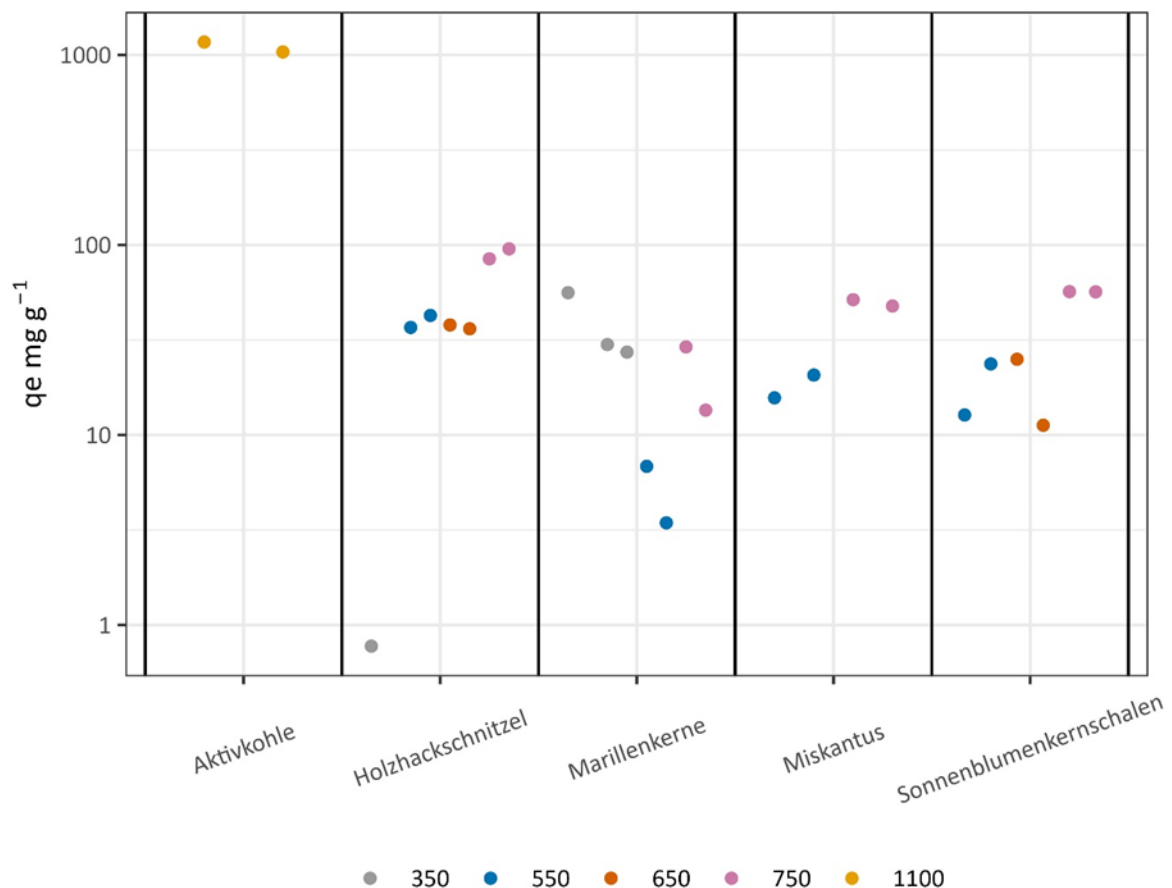


Abbildung 16: Vorversuche zur Sorptionskapazität von PCE auf den Kohlen, durchgeführt mit allen bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellten Biokohlen.

Wie bereits im Vorfeld absehbar, hatte die Aktivkohle die mit Abstand höchste Sorptionskapazität für PCE (Abbildung 16). Bei den Biokohlen zeigte sich eine Abhängigkeit in Bezug auf die Herstellungstemperatur und spezifischen Oberfläche (AP 1.3). Jene Kohlen, die bei 750°C pyrolysiert wurden, zeigten im Vergleich zu jenen bei 650°C, 550°C und 350°C im Allgemeinen ein höheres Sorptionsvermögen von PCE. Trotz hoher Sorptionskapazitäten mussten die Miscanthuskohlen leider auf Grund ihrer mechanischen Instabilität verworfen werden, da diese in der praktischen Anwendung einen Filter sofort verstopfen würden bzw.

das Filtermaterial aufschwimmen, oder es zur Ausbildung von präferenzielle Fließwegen kommen könnte.

Die vielversprechendsten Kohlen waren somit S750 und W750, also Kohlen aus Sonnenblumenkernschalen oder Holzhackschnitzeln pyrolysiert bei 750°C. Die Kohlen S750 und W750 wurden jedoch auf Grund der Überschreitung des Grenzwertes, laut europäischem Biokohlezertifikat (EBC, 2022), für den Gehalt an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) von 30 mg g⁻¹ exkludiert, da man sonst in den Konflikt käme ein selbst schon kontaminiertes Filtermaterial zur Abreinigung von kontaminiertem Grundwasser zu verwenden. Eine Reduktion der PAK Gehalte mittels nachträglicher Temperaturbehandlung (100°C bei S750 und 300°C bei W750) wurde zwar versucht, brachte aber keine nennenswerten Erfolge mit sich, wodurch die Kohlen S750 und W750 als potentiell best-geeignete Kohlen verworfen werden mussten. Schlussendlich waren die Kohlen A750 und W550 die besten Optionen und wurden gemeinsam mit der Aktivkohle in den Hauptversuchen verwendet.

Hauptversuch – Sorptionskinetik CKW, Ethen, NAP

Für die Durchführung der Sorptionsisothermen muss die Dauer bis zum Erreichen des Equilibriums des Adsorbats (CKW, NAP) zwischen der festen (Adsorbents - Kohlen) und flüssigen (wässrigen) Phase bekannt sein. Die Laborversuche folgten jener Methode, die im nachfolgenden Kapitel zu den Sorptionsisothermen beschrieben wird und verwendet wurde, nur, dass in regelmäßigen Abständen Proben von den Glasgefäßen gezogen und analysiert wurden um die Sorptionskinetik zu erfassen und die Dauer bis zum Equilibrium zu bestimmen. Für die Sorptionsisothermen ist neben der initialen Schadstoffanalytik nur noch jener Messzeitpunkt im Equilibrium von Bedeutung. Je nach Kohle und Schadstoff wurde ein Equilibrium unterschiedlich schnell erreicht (Tabelle 10). Während für AC das Equilibrium nach 20 Stunden erreicht wurde, dauerte es bei der Biokohle W550 20-92 Stunden und bei A750 zwischen 80 und 168 Stunden. Für A750 zeigte sich, dass nach Ablauf von ca. 7 Tagen auch nur ein quasi-Equilibrium erreicht wurde, da es auch noch danach zu geringer fortlaufender Schadstoffadsorption kommt. Die Sorptionskinetik konnte mit der Lagergren Reaktionskinetik beschrieben werden. Das Erreichen des Equilibriums wurde als Schadstoffphasenverschiebung von <5% zwischen zwei Probenanalysezeitpunkten definiert.

$$\ln(q_e - q_t) = \ln(Kq_e) - Kt$$

Verwendet wurde die linearisierte Form der Lagergren Reaktionskinetik für eine Pseudo- Erste Ordnung mit q als Beladung des Adsorbent mit Schadstoffe in mg g^{-1} zum Zeitpunkt t und im Equilibrium e , sowie der Konstante K . Diese Konstante K (Stunde^{-1}) schwankte zwischen den Kombinationen von Kohle und Schadstoff und bewegte sich im Bereich von $-2 \cdot 10^{-4}$ und $-5 \cdot 10^{-4}$ (Tabelle 10).

Tabelle 10. Übersicht Sorptionsequilibrium (t_{equi} in Stunden) und der Parameter der Sorptionskinetik nach Lagergren (K) sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2)

	AC			W550			A750		
	t_{equi}	K	R^2	t_{equi}	K	R^2	t_{equi}	K	R^2
PCE	20			92	-5.E-4	0.99	80	-6.E-4	0.98
TCE	20			92	-5.E-4	0.99	140	-5.E-4	1.00
cDCE	20			44			153	-5.E-4	1.00
VC	20			20			153	-3.E-4	0.99
Ethen	149	-5.E-4	0.56	29			168	-2.E-4	0.78

Hauptversuch – Sorptionsisothermen CKW, Ethen, NAP

Die experimentelle Durchführung zur Bestimmung der Sorptionsisothermen gliederte sich in die folgenden Schritte. Erst wurden Stammlösungen mit den Schadstoffen hergestellt. PCE, TCE, cDCE und VC wurden dafür in Methanol gelöst, Ethen in Aceton und Naphthalin in Ethanol. Über die Stammlösungen können die Schadstoffe als flüssiges Konzentrat in exakter Menge den Versuchsgefäßen zugegeben werden. Es wurde darauf geachtet, dass keine Sekundärlösungsmittelleffekte (Lösungsmittel der Stammlösungen) auftreten. Dazu wurde die maximale Zugabe von Stammlösungen mit 1 Vol% der zugegebenen Wassermenge in den Versuchsgefäßen begrenzt. Bereits zuvor wurden die Kohlen einer Nasssiebung unterzogen, um die Hauptfraktion (0.63 mm – 2 mm (Sandfraktion)) zu isolieren und somit die Interpretation der Ergebnisse vergleichbar zu machen. Im Anschluss an die Nasssiebung wurden die Kohlen bei 40°C getrocknet.

Die Versuche zur Bestimmung der Sorptionsparameter je Kohle gliederten sich in die zwei Schadstoffgruppen PCE, TCE, cDCE, VC, Ethen und NAP. Für PCE, TCE, cDCE und VC wurden 25 mg AC, 100 mg W550, 100 mg A750 in 65 ml Glasgefäße eingewogen, mit MilliQ-Wasser

aufgefüllt und mit Mininert-Kappen gasdicht verschlossen. Bei Ethen wurden 120 mL Glasgefäße und jeweils 1 g Kohle verwendet und bei NAP wurden ebenfalls 65 mL Glasgefäße, jedoch mit jeweils 200 mg Kohle, verwendet. Für PCE und cDCE wurde noch zusätzlich die Sorptionskapazität für den in AP 2.3 als Füllmaterial verwendeten Quarzsand überprüft. Dafür wurden 10 g Quarzsand in 120 mL Glasgefäße mit MilliQ-Wasser gemischt. Allen Versuchsansätzen wurde Kontrollen beigelegt, die nur mit MilliQ-Wasser gefüllt waren. Über das in den Mininert-Kappen integrierte Ventil wurde Stammlösung mittels gasdichter Spritze zugegeben. Die Zugaben der an Stammlösung variierten zwischen 2 und 500 µL und waren auf die schadstoffspezifischen analytischen Quantifikationslimit (30, 30, 50, 50 und 110 nmol L⁻¹ für PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen) und Löslichkeitslimit in der wässrigen Phase abgestimmt. Anschließend an den Schadstoffspike wurde eine wässrige Probe, zur Bestimmung der Anfangskonzentration, gezogen und analysiert. Danach wurden die Glasgefäße in einem Überkopfschüttler bis zum Erreichen des Sorptionsequilibriums (sieben Tage) bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Im Equilibrium wurden die Glasgefäße abermals beprobt und die Schadstoffgehalte bestimmt.

Schadstoffanalytik

Die Analyse der wässrigen Proben zum Zeitpunkt t=0 und im Equilibrium erfolgte durch zwei nach Schadstoffgruppe getrennten (1. Gruppe: chlorierte Kohlenwasserstoffe (PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen), 2. Gruppe: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Naphthalin)) Methoden. Die Methode zur Analyse der Komponenten der 1. Gruppe blieb während der Projektlaufzeit, auf Grund der langjährigen methodischen und experimentellen Erfahrung mit den involvierten Chemikalien, unverändert und wurde deckungsgleich in den Arbeitspaketen AP 1.5, AP 1.6 und AP 2.3 verwendet. Hingegen war die Arbeit mit Naphthalin eine neue Herausforderung, wodurch es zu kontinuierlichen Anpassungen und Verbesserungen in der Analytik kam. So wurden die Sorptionsisothermen für Naphthalin mit zwei unterschiedlichen Analysemethoden durchgeführt. Der wesentliche Unterschied lag dabei in der Extraktionsmethodik von Naphthalin aus wässrigen Proben. Während bei Ersterer eine Purge&Trap Extraktion zur Anwendung kam, die auf Grund der zu geringen Flüchtigkeit von Naphthalin ein deutlich höheres Quantifikationslimit aufwies, konnte durch den Umstieg auf eine flüssig/flüssig Extraktion sowohl das Quantifikationslimit verringert und die Messunsicherheiten deutlich reduziert werden. Nachfolgend findet sich die schlussendlich in unserem Labor etablierte Methode für die Analyse von Naphthalin aus wässrigen Proben sowie unsere Standardmethode für die

Analyse von chlorierten Kohlenwasserstoffen und Ethen zur Analyse der Stoffgehalte und deren stabilen Isotopenverhältnisse ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$).

Chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) und Ethen

Wässrige Proben (1-10.000 μL) wurden in 20 mL Glasgefäße (23 × 79 mm, Plastikschräubkappe mit Loch und PTFE-beschichtetem Silikon Septum) überführt, in denen MilliQ-Wasser für ein finales Volumen von 10 mL vorgelegt wurde. Die Glasgefäße werden anschließend umgehend in den Purge&Trap Autosampler (VSP400, IMT GmbH, Vohenstrauß, Deutschland) transferiert. Für die Analysemethode werden die 20 mL Glasgefäße für 20 Minuten mit Helium geblubbert (Purge) um die flüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffe und Ethen aus der wässrigen Phase und dem Headspace der Glasgefäße in eine mit flüssigem Stickstoff auf -90°C gekühlte und mit Tenax TA gefüllten Adsorberfalle zu überführen. Nach 20 Minuten wird die Falle (Trap) schlagartig auf 200°C aufgeheizt um die darin sorbierten Analyten auf eine GC-Säule (GS-Gas-Pro, 30 m, 0.32 mm ID, Agilent GmbH) in einem Trace GC Ultra (Thermo Scientific GmbH) zu überführen. Anschließend wird das GC-Temperaturprogramm (40°C für 2,5 min; auf 140°C mit $40^\circ\text{C min}^{-1}$ aufheizen und für 2 min halten; auf 240°C mit $20^\circ\text{C min}^{-1}$ und für 5 min halten) gestartet, um unterschiedliche Retentionszeiten für die einzelnen Analyten zu erhalten. Am Auslass der GC-Säule (Trärgas Helium, Eingangsdruck 1200 mbar) wird der Gasstrom (Helium + Analyten) kontinuierlich im Verhältnis 1:9 getrennt. Ein Teil wird in ein single-quadrupol Massenspektrometer (qMS, ISQ, Thermo Scientific) und neun Teile in einen Oxidations/Reduktionsreaktor (O/R-Reaktor, 1000°C) geleitet. Im qMS werden die Analyten identifiziert und quantifiziert. Im O/R-Reaktor werden die Analyten in CO_2 umgewandelt um dieses repräsentativ für den jeweiligen Analyten in einem Isotopenmassenspektrometer (IRMS, Delta V Advantage, Thermo Scientific) auf ihr Verhältnis an stabilen Kohlenstoffisotopen ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) zu untersuchen. Repräsentativ dafür wird das Kohlenstoffisotopenverhältnis mit dem Parameternamen „ $\delta^{13}\text{C}$ “ für jeden Analyten als Analyseergebnis ermittelt und liefert entscheidende Informationen über die jeweilige Entstehung und den Verbleib während des Transportes durch einen Biofilter, in dem sowohl Sorptions- als auch Abbauprozesse stattfinden können.

Das Quantifikationslimit (IRMS) für PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen lag bei 10, 4, 4.5, 3 und 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Die Messunsicherheit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (IRMS) lag bei 0.3, 0.2, 0.3, 0.1 und 0.1 ‰ (Leitner et al., 2018, 2023b).

Jede Messequenz beinhaltete neben Proben der jeweiligen Versuche von AP 1.5, AP 1.6 und AP 2.3 mindestens drei Kalibrationsstandards sowie Blank-Messungen. Während für die Blank-Messungen nur Milli-Q Wasser in die Messgefäße eingefüllt wurde, kam es bei den Kalibrationsstandards zusätzlich zur Zugabe von 5-25 µL einer Kalibrationslösung. Es wurden zwei Kalibrationslösungen verwendet. Eine mit PCE, TCE, cDCE und VC in einer wässrigen Lösung sowie einer aus Ethen in einer wässrigen Lösung. Für erstere wurden 3.3 – 2.4 µL purer Substanz (PCE, TCE, cDCE) sowie 1 mL einer 2000 µg mL⁻¹ Vinylchlorid Lösung in Methanol in ein mit Milli-Q Wasser gefülltes 250 mL Glasgefäß (inkl. Rührknochen) gefüllt und mit einer Mininert-Kappe verschlossen (Sollkonzentration bei Herstellung: 131, 131, 128, 126, 130 µmol L⁻¹). Dieser Kalibrationsstandard wurde horizontal in einem Kühlraum bei 5°C gelagert und während den Entnahmen für Messequenzen stets leicht Kopfüber bewegt, um Verlusten aus dem anfangs 1 mL Headspace vorzubeugen. Auf Grund der unterschiedlichen Halbbarkeit (bei Ethen ca. 3 Monate) wurde der Kalibrationsstandard für Ethen getrennt hergestellt. Dazu wurden 750 µL Ethen in einem 60 mL Glasgefäß, gefüllt mit Milli-Q Wasser und Rührknochen, transferiert. Die Handhabung war bei beiden Standardlösungen gleich. Für Ethen wurden weitere drei Kalibrationslösungen (Ethen: 500, 750, 1000 µL) hergestellt, die nur episodisch verwendet wurden, um die Stabilität der kontinuierlich verwendeten Kalibrationslösung zu überwachen und zu entscheiden, wann dieser erneuert werden muss. Abbildung 17 zeigt den zeitlichen Verlauf der jeweiligen Messintensitäten (AreaAll der Analytenpeaks laut Chromatogramm der IRMS *m/z*-Intensitäten relativ zum jeweils zugegebenen Volumen an Kalibrationslösung) je Messequenz am Beispiel des Zeitraums während des PCE-Säulenversuchs. Der zeitliche Drift der AreaAll-Werte zeigte bei PCE, TCE, cDCE und VC, relativ zu den Werten am Versuchsbeginn, über einen Zeitraum von ca. 6 Monaten nur geringe Verluste, welche bei der Evaluierung der Proben aus dem Säulenversuch linear korrigiert wurden und schlussendlich die oben angegebenen Quantifikationslimita erreicht werden konnten. Es ist anzumerken, dass die Werte der AreaAll nicht nur durch potentielle Verluste aus den Kalibrationslösungen entstehen, sondern auch durch die Abnutzung der Verbrauchselemente des Messsystems an sich. Im Fall der Kalibrationslösung von Ethen ist jedoch klar ersichtlich, dass Ethen in der Kalibrationslösung nach ca. 3 Monaten nur noch ca. 50% des Ausgangswertes zeigt (Abbildung 17), weshalb über die Dauer des PCE-Säulenversuchs zwei Ethen-Kalibrationslösungen verwendet wurden.

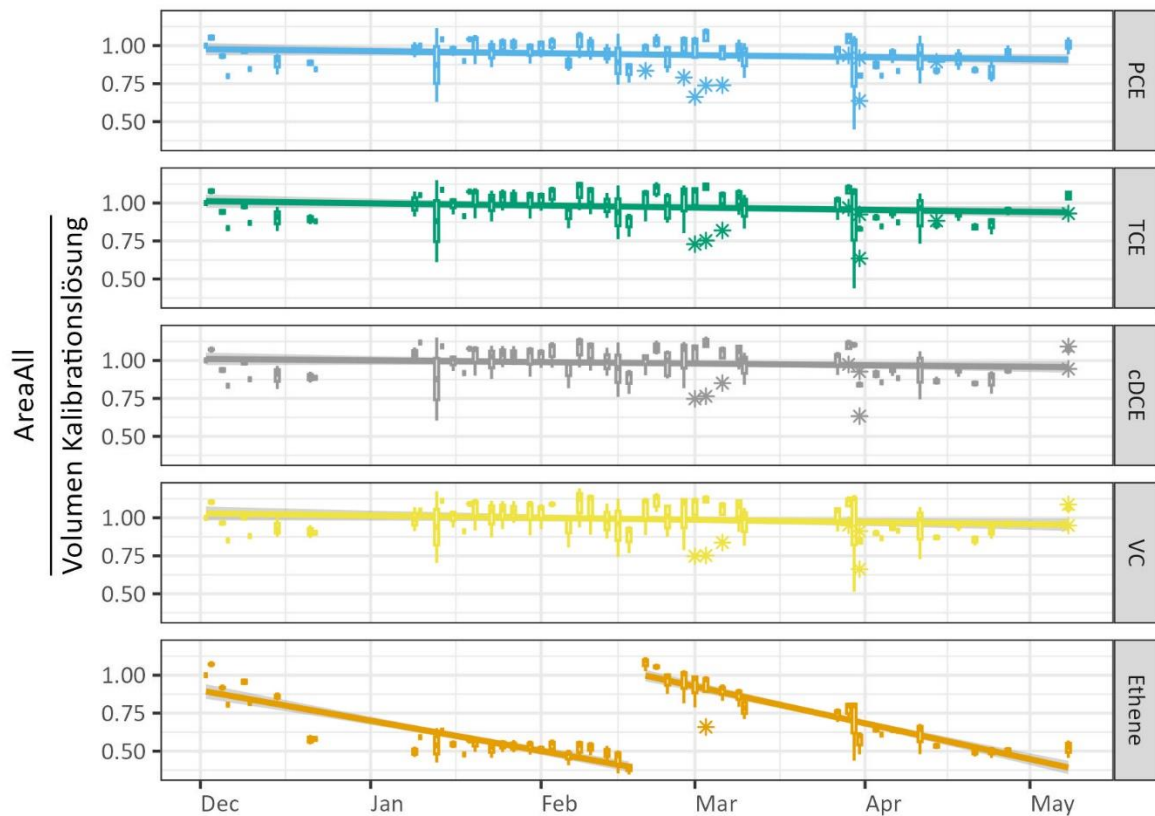


Abbildung 17: Stabilität der Kalibrationsstandards für PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen am Beispiel der Kalibrationsstandardlösungen während des PCE-Säulenversuchs (AP 2.3). Dargestellt sind die Rohmesswerte.

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auf der VPDB-Skala von PCE, TCE und cDCE wurden separat, auf einem Elementaranalysator gekoppelt an ein IRMS (EA-IRMS) unter Verwendung von zertifizierten Kalibrationsstandardsubstanzen, bestimmt (PCE: $-27.51 \pm 0.13 \text{ ‰}$ ($n=5$), TCE: $-29.81 \pm 0.08 \text{ ‰}$ ($n=3$), cDCE: $-25.94 \pm 0.02 \text{ ‰}$ ($n=5$)). Die Werte für VC und Ethen wurden relativ zu PCE, TCE und cDCE bei der Analyse der Kalibrationsstandards und relativ zum $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite) Wert des CO_2 -Analysegases, welches bei allen IRMS-Messungen in unserem Labor verwendet wird, abgeschätzt (ca. -31.0 ‰ und -28.3 ‰).

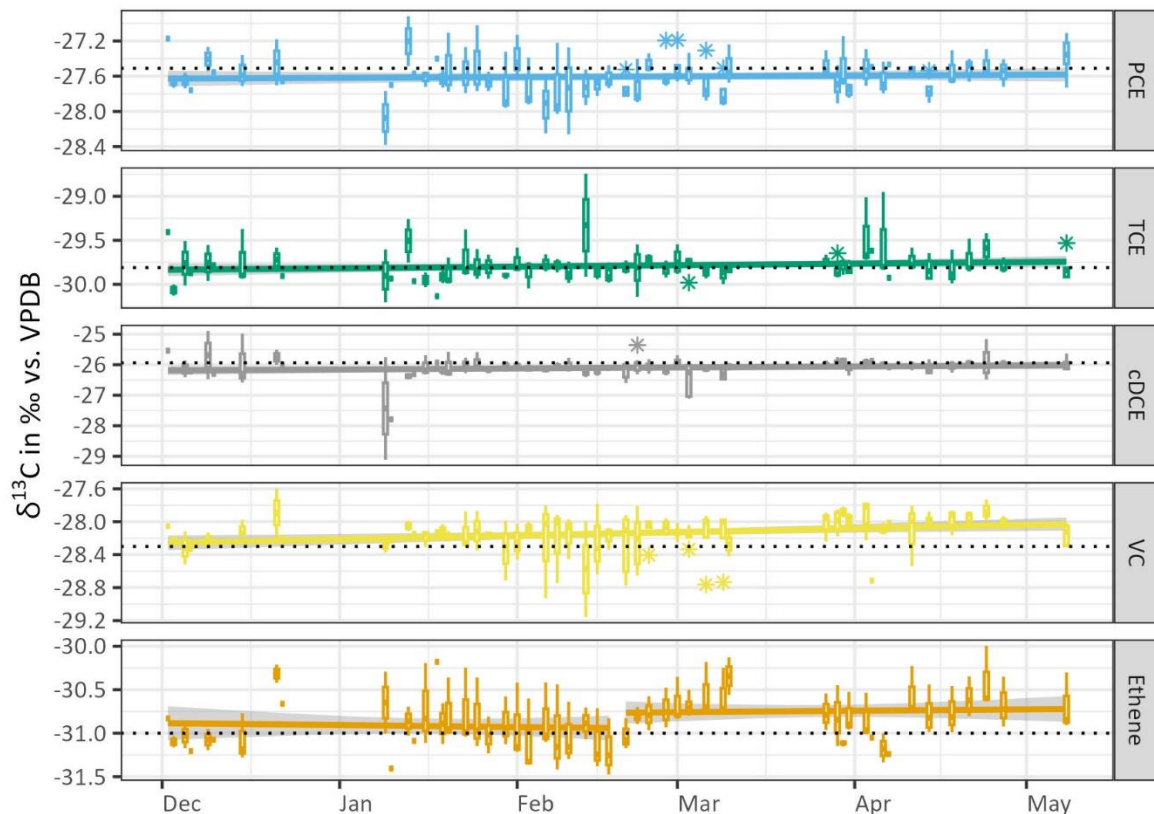


Abbildung 18: Stabilität der Kohlenstoffisotopenverhältnisse (als $\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. VPDB) von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen in den Kalibrationsstandards am Beispiel der Kalibrationsstandardlösungen während des PCE-Säulenversuchs (AP 2.3). Dargestellt sind die Messrohwerte und die Sollwerte laut EA-IRMS Analyse sind als punktierte Linie dargestellt.

Die in Abbildung 18 dargestellten Messrohwerte der Kohlenstoffisotopenverhältnisse (als $\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. VPDB) von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen zeigt wiederum für Ethen die höchsten Schwankungen im zeitlichen Verlauf. Das Auswertungsverfahren der Messrohdaten (in Anlehnung an Jochmann et al. (2006) und Paul et al. (2007)) berücksichtigte den zeitlichen Trend und lieferte im Endeffekt die für alle Analyten sehr ähnlichen, oben angegebenen, Messunsicherheiten.

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Für die Analyse von Naphthalin (NAP) wurden bis zu 1.500 μL Probenvolumen bzw. 5-20 μL NAP-Kalibrationslösung mit 300 μL Iso-Oktan in 1,5 mL Glasgefäßen (PP-Schraubkappe mit Loch und PTFE-Silikon Septum) überführt, für 60 sec auf einem Vortex-Mixer bei 2500 rpm

geschüttelt und anschließend bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert um die Phasentrennung von Wasser und Iso-Oktan zu beschleunigen. Während dieser flüssig/flüssig Extraktion wird NAP von der wässrigen Phase in die organische Phase (Iso-Oktan) überführt und kann anschließend analysiert werden. Dazu wurden bis zu 100 µL der Iso-Oktan Phase in 1.5 mL Glasfläschchen, die mit 100 µL Glasinserts versehen waren, überführt. Die NAP-Analyse erfolgte auf dem gleichen Messaufbau (GC-MS/C-IRMS) der auch für die chlorierten Kohlenwasserstoffe und Ethen verwendet wurde. Maßgebliche Unterschiede gab es jedoch beim verwendeten Autosampler, der GC-Säule und den Methodenparametern (Trärgaseinlassdruck, Temperaturprogramm, Ventilschaltzeitpunkte).

NAP wurde mittels Direktinjektion von 0.5 bis 4 µL Iso-Oktan Phase mittel 10 µL Spritze (SGE) durch einen Combi PAL Autosampler in den 3 mm - 600 µL splitless-Liner des GC injiziert. Der Helium-Trärgaseinlassdruck lag bei 170 kPa, die Liner-Temperatur bei 280°C und die Splitless-Time bei 60 sec. Das Temperaturprogramm der GC Säule (TG-5 MS, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm Film, Thermo Scientific) lautete 70°C für 3 min, mit 20 °C min⁻¹ auf 130°C, mit 9°C min⁻¹ auf 160°C und mit 50°C min⁻¹ auf 310°C, welche für 2 min gehalten wurden. Ab dem GC-Säulenausgang ähnelte die Methode für NAP jener von CKW und Ethen.

Die Quantifikation von NAP erfolgte mittels qMS und IRMS ($\delta^{13}\text{C}$ bzw. $\delta^2\text{H}$ Analyse). Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse zur Quantifikation der Kalibrationslösung mit allen drei Messvarianten, die alle eine ähnlich gute Wiederfindung der NAP-Sollkonzentration (gepunktete Linie) im zeitlichen Verlauf und den Messunsicherheiten zeigen. Die Ergebnisse zur Quantifikation von Proben aus den Versuchen in AP 1.6 und AP 2.3 beschränken sich jedoch auf die Quantifikation mittels qMS, da diese Methode ein deutlich geringeres Quantifikationslimit (47 µg L⁻¹) hatte. Die Limita zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ bzw. $\delta^2\text{H}$ (IRMS), aus deren Analyse wie gesagt auch der NAP-Gehalt in einer Probe bestimmt werden kann, lagen bei 190 µg L⁻¹ und 4.1 mg L⁻¹ (Abbildung 20). Die Messunsicherheit für $\delta^{13}\text{C}$ bzw. $\delta^2\text{H}$ war zwar im Vergleich zu den CKW mit $\pm 2.2 \%$ und $\pm 5.6 \%$ deutlich höher, während NAP in der Kalibrationslösung in zeitlicher Hinsicht stabiler (geringere Flüchtigkeit von NAP und starke Bindung mit dem Lösungsmittel) war (Abbildung 20).

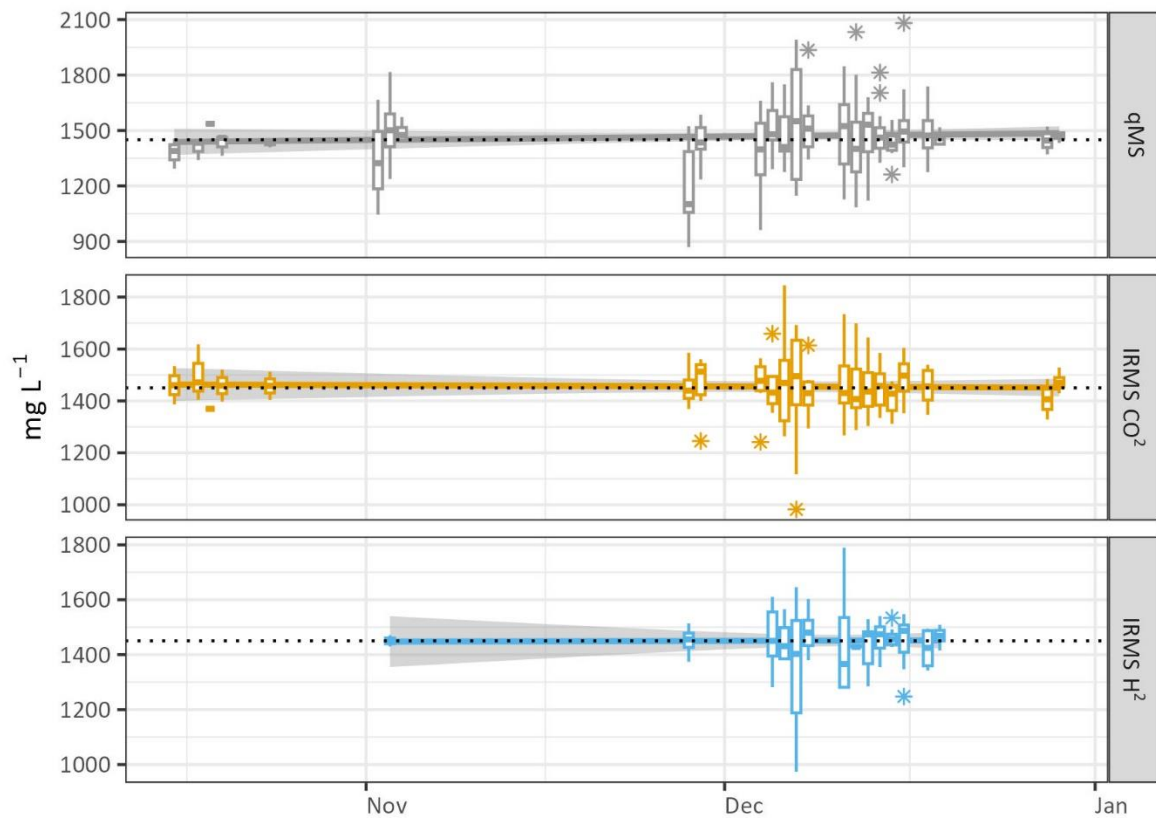


Abbildung 19: Stabilität des Kalibrationsstandards (Wiederfindung, Reproduzierbarkeit) für NAP am Beispiel der Kalibrationsstandardlösungen während des NAP-Säulenversuchs (AP 2.3). Dargestellt ist die Wiederfindung der Soll-Konzentration (punktierter Linie).

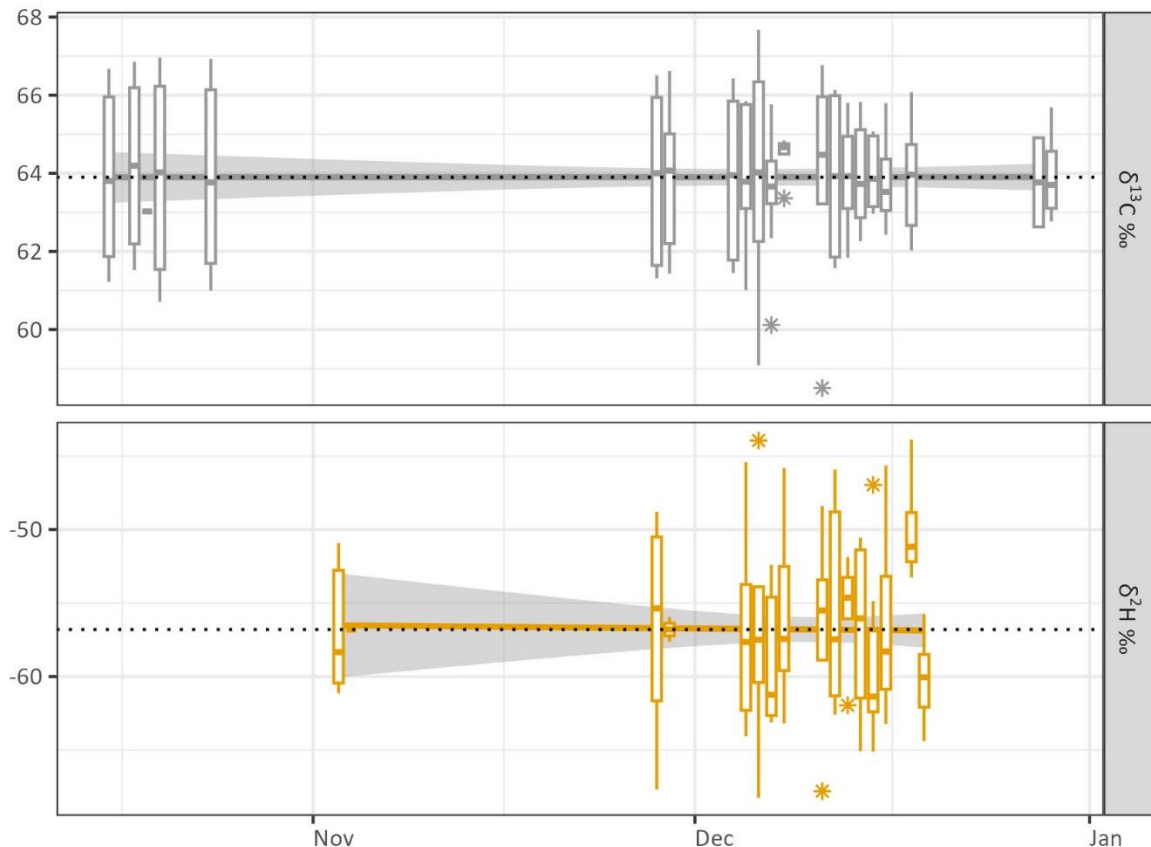


Abbildung 20: Isotopenverhältniswerte des NAP Kalibrationsstandards für Kohlenstoff und Wasserstoff ($\delta^{13}\text{C}$ bzw. $\delta^2\text{H}$) während des NAP-Säulenversuchs

Für die Herstellung der Kalibrationslösung von NAP wurden 0.029 g pures kristallines NAP in ein 20 mL Gasgefäß (inkl. Rührknochen) eingewogen und mit Ethanol puriss. (20 mL) aufgefüllt. Das verfügbare pure NAP verfügt über ein natürliches Kohlenstoffisotopenverhältnis, welches mittel EA-IRMS Messungen bestimmt wurde ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB: $-26,29 \pm 0.03$ ‰, $n=10$). Anschließend wurden 30 μL einer $1 \text{ g L}^{-1} \text{ }^{13}\text{C}_{10}$ -NAP in Ethanol puriss. Lösung (NAP: 99 Atom % ^{13}C) zugegeben um eine Kalibrationslösung mit einem finalen $\delta^{13}\text{C}$ von $+63.4 \pm 1.4$ ‰ und einer NAP-Konzentration von $1,45 \text{ g L}^{-1}$ zu erhalten. Neben der Kalibrationslösung für Probenanalysen wurde eine zweite NAP-Stammlösung mit einer höheren Soll-Konzentration von ca. 35 g L^{-1} auf selbigem Weg hergestellt. Diese wurde für die Zugabe von NAP in den Säulenversuchen von AP 2.3 verwendet und wies einen finalen $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB von $+57.8 \pm 0.22$ auf.

Die Berechnung der Zugabe (n) von NAP mit natürlichem ($_1$) und ^{13}C -gelabletem ($_2$) NAP ergibt sich aus

$$\frac{n_1 * F_1 + n_2 * F_2}{n_1 + n_2} = F_{1+2}$$

mit der Molmenge (n) und ¹³C-Molbruch ($F_{1+2} = {}^{13}\text{F} = {}^{13}\text{C}/({}^{12}\text{C}+{}^{13}\text{C})$), sowie bekanntem ¹³F₁ (0,0107689 ± -26,3 ‰) und ¹³F₂ (1) und der Verknüpfung von ¹³C-Molbruch (F) und ¹³C-Verhältnis (R)

$${}^{13}\text{R} = \frac{{}^{13}\text{F}}{1 - {}^{13}\text{F}}$$

um den gewünschten δ¹³C-Wert der Kalibrationslösung mittels

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{{}^{13}\text{R}_{1+2}}{{}^{13}\text{R}_{\text{VPDB}}} - 1$$

mit ¹³R_{VPDB} = 0.0111802.

Die Notwendigkeit mit ¹³C-gelabeltem NAP zu arbeiten, ergab sich aus der damit eröffneten Möglichkeit den mikrobiellen Abbau von NAP und Ethanol über deren ¹³C/¹²C Verhältnis zu trennen. Das Endprodukt beim mikrobiellen Abbau von NAP und Ethanol ist CO₂. Im Rahmen des Säulenversuchs wurde gasförmiges CO₂ analysiert um damit mit Hilfe seines Kohlenstoffisotopenverhältnisses auf mikrobielle Mineralisierung von NAP zu schließen. Ethanol wurde auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit von NAP (ca. 30 mg L⁻¹) verwendet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass den Säulen definierte Mengen an NAP, aus einer ¹³C-gelabelten 35 g L⁻¹ NAP in Ethanol puriss. Stammlösung zugeführt wurde.

Kohlendioxid beim aeroben Abbau von NAP in Ethanol

Neben der Analyse von NAP wurde im Säulenversuch von NAP wie zuvor erwähnt auch CO₂ (via Gasbench/IRMS-Methode) analysiert um auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit von NAP und dem zu erwartenden hohen Sorptionsvermögen auf den Kohlen, einen mikrobiellen Abbau von NAP indirekt über die Bildung von CO₂, als Endprodukt, nachzuweisen. Details zur verwendeten Analytik (Gasbench/IRMS) können unserer Publikation (Leitner et al., 2023a) entnommen werden. Für die Analyse des CO₂ im Headspace der Reservoirbehälter des Säulenversuchs wurden 20 – 1000 µL an Gasphase entnommen und in CO₂-freie 12 mL Glasgefäße (Labco Exetainer), mit einer Gasspritze transferiert und laut unserer Methode analysiert. Zur Quantifizierung und Referenzierung

des Kohlenstoffisotopenverhältnisses von CO₂ wurde pures CO₂ aus einer Gasflasche mit referenziertem $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB entnommen und im Volumen von 1-7 μL gleichermaßen den CO₂-freien Glasgefäßen zugegeben um eine CO₂-Konzentration von 92 – 645 ppm in den Glasgefäßen zu erhalten. Für die Kalibration wurden neben CO₂-freien Kontrollgefäßen je Messsequenz mindestens drei Kalibrationsgefäße mit unterschiedlicher CO₂-Zugabe hergestellt und analysiert.

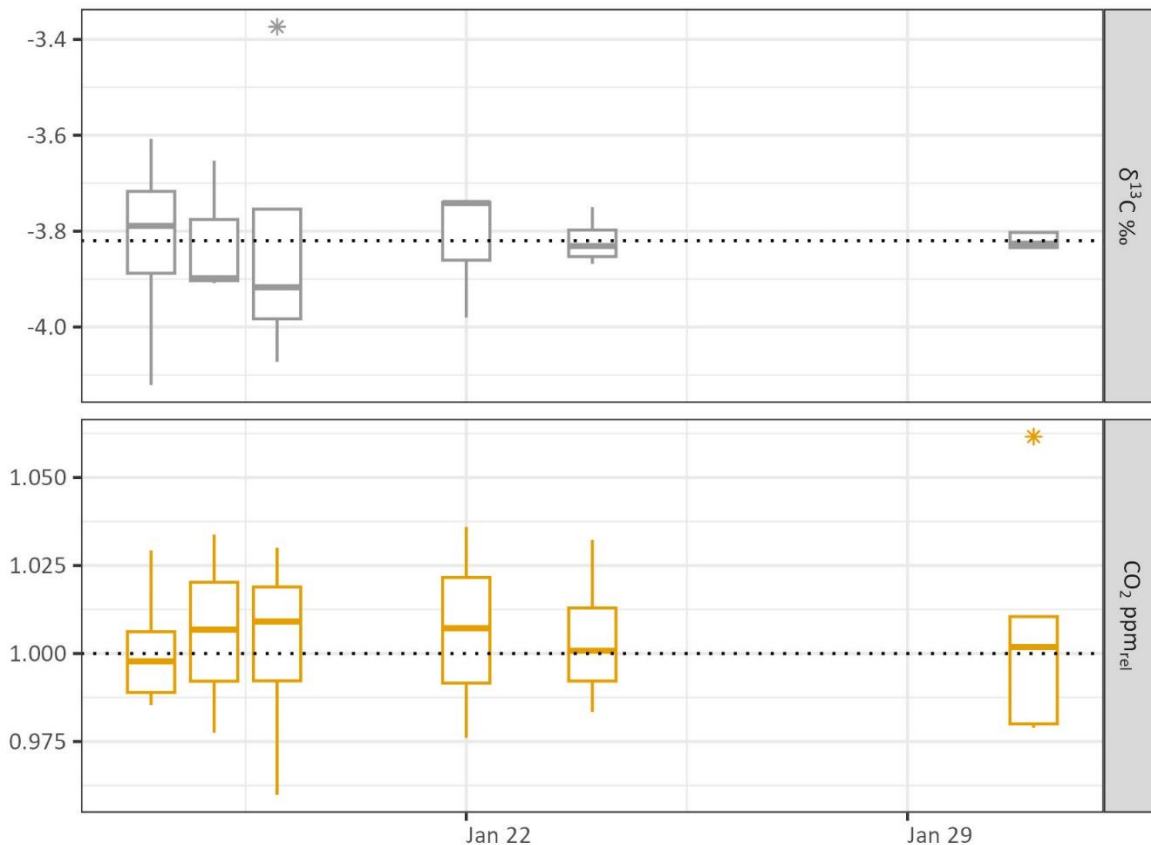


Abbildung 21: Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der Sollwerte (punktierte Linie) von $\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. VPDB und Gehalt (ppm lt. Analyse im Verhältnis zum Sollwert ($\text{CO}_2 \text{ ppm}_{\text{rel}}$)) des CO₂-Kalibrationsgases mittels Gasbench/IRMS Analyse während des NAP-Säulenversuchs.

Die Reproduzierbarkeit der CO₂-Kalibrationsgas-Sollwerte für $\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. VPDB und Gehalt (ppm) während des NAP-Säulenversuchs sind in Abbildung 21 dargestellt und zeigten im zeitlichen Verlauf eine einfache Standardabweichung von ± 0.15 ‰ ($\delta^{13}\text{C}$ ‰) und $\pm 2,4\%$ (berechneter Gehalt lt. Analyse im Verhältnis zur Sollwert ($\text{CO}_2 \text{ ppm}_{\text{rel}}$)).

Parameter der Freundlich- Sorptionsisothermen CKW, Ethen, NAP

Für die Auswertung der Adsorptionsisothermen nach Freundlich (Freundlich, 1906) wurde die logarithmierte Form

$$\log(q_e) = \log(Kf) + \frac{1}{n} * \log(c_e)$$

verwendet, wobei q_e die Beladung des Adsorbents in mg g^{-1} (Masse Adsorbat (Schadstoff) bezogen auf die Masse Adsorbent (Kohle)) und c_e , die Konzentration des Adsorbats in der wässrigen Lösung (mg L^{-1}) darstellen. Kf und $1/n$ stellen den Freundlich-Koeffizient und den Freundlich-Exponent dar, die mittels linearer Regression berechnet werden. Tabelle 11 zeigt die Zusammenstellung aller im Projekt bestimmter Freundlich-Sorptionsparameter. Neben der Sorptionsisotherme nach Freundlich ist auch die Sorptionsisotherme nach Langmuir für die Beschreibung der betrachteten Schadstoffe geeignet. Letztgenannte zeigte in der Auswertung geringere Korrelationskoeffizienten als jene nach Freundlich und wurde schlussendlich in Abstimmung mit der Fachliteratur (Zytner et al., 1989; Erto et al., 2010; Schreiter et al., 2018; Rossi et al., 2021) als zweitrangig und daher nicht maßgeblich erachtet. Für die Gegenüberstellung der Sorptionsparameter zwischen den Schadstoffen und Kohlen wurden die Freundlich-Parameter für die CKW und Ethen transformiert (Chen et al., 1999) und konnten dadurch visuell (Abbildung 22) dargestellt werden.

Tabelle 11. Übersicht der Sorptionsparameter lt. Freundlich für die Aktivkohle Hydriffin A, Marillenkern-Biokohle A750 und Holzschnitzel-Biokohle W550 für die Schadstoffe PCE, TCE, cDCE, VC, Ethen und NAP.

Schadstoff	Kohle	Anzahl Punkte	Kf	1/n	R ²
PCE	A750	7	1.25	0.72	0.94
PCE	AC	43	188.36	0.51	0.95
PCE	W550	45	6.52	0.45	0.89
TCE	A750	7	1.46	0.69	0.91
TCE	AC	26	47.69	0.53	0.95
TCE	W550	23	6.69	0.46	0.96
cDCE	A750	7	0.90	0.70	0.95
cDCE	AC	24	8.25	0.54	0.96
cDCE	W550	22	6.87	0.60	0.96
VC	A750	7	0.77	0.75	0.94
VC	AC	13	3.08	0.72	0.94
VC	W550	14	3.26	0.63	0.97
Ethen	A750	8	0.10	0.71	0.93
Ethen	AC	7	0.10	0.74	0.96
Ethen	W550	8	0.16	0.66	0.94
NAP	A750	8	6.52	0.40	0.96
NAP	AC	8	370.4	0.49	0.92
NAP	W550	16	0.52	0.59	0.91

Die Parameter der Freundlich Isotherme zeigten, dass die Sorptionskapazität von AC für PCE, TCE und NAP deutlich höher als bei den produzierten Biokohlen W550 und A750 ist. Die mikrobiellen PCE-Metabolite cDCE, VC und Ethen wurden jedoch von den Biokohlen im Vergleich zur Aktivkohle in ähnlicher Intensität sorbiert. Kommt es zur Anreicherung von Metaboliten bei einem unvollständigen mikrobiellen Abbau von PCE und TCE können die Biokohlen somit in ähnlichem Ausmaß Metabolite sorbieren, wodurch im Hinblick auf die

Eignung als Absorber die Biokohlen der Aktivkohle gleichgestellt werden können und damit eine ähnliche Abreinigungsleistung des kontaminierten Grundwassers erreicht werden kann. Aus wirtschaftlicher Betrachtung erschließt sich somit ein klares Argument für die Verwendung von Biokohlen anstatt von Aktivkohle, wenn der mikrobielle Abbau von PCE und TCE in der Anwendung im Feld sichergestellt werden kann.

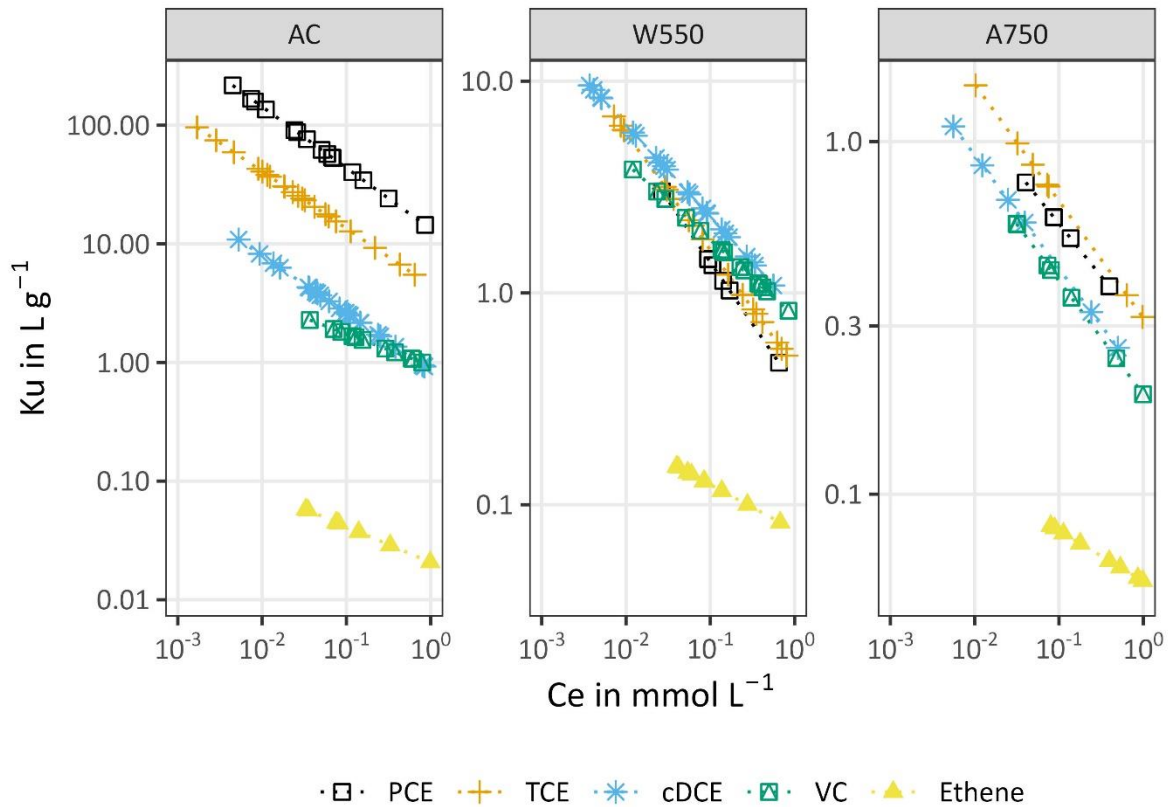


Abbildung 22: Sorptionsisothermen von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen für die Kohlen AC, A750 und W550

NAP zeigte eine sehr hohe Affinität zur Sorption an die AC und sehr geringe Sorptionskapazitäten bei den produzierten Biokohlen. Auf Grund der kontinuierlichen Verbesserung der für NAP in diesem Projekt etablierten analytischen Messmethoden, wurden die Versuche zur Bestimmung der Freund-Isothermen-Parameter für NAP mit zwei verschiedenen Messmethoden durchgeführt, wobei die zweite, letztgültige Methode zu deutlichen Verbesserungen in der Bestimmung der Freundlich-Parameter führte und nur diese in Tabelle 11 angeführt wurden.

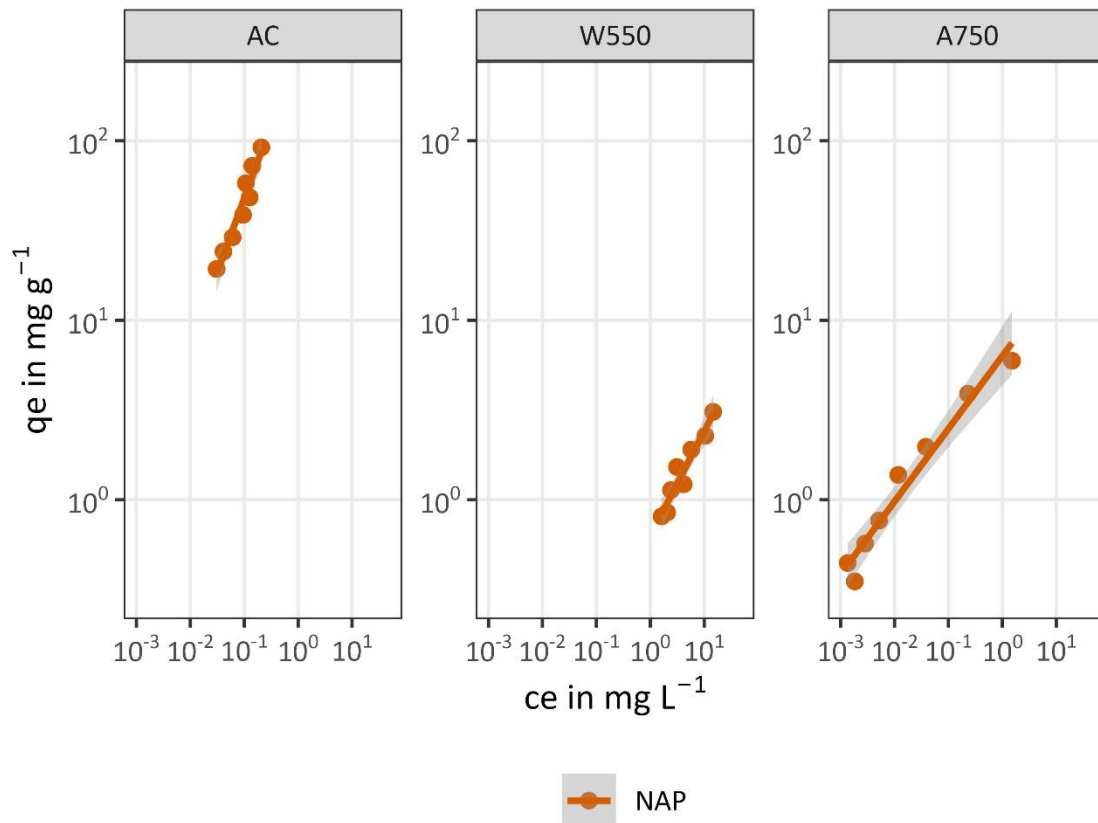


Abbildung 23: Sorptionsisothermen von NAP für die Kohlen AC, A750 und W550

Stabilisotopenfraktionierung im Sorptionsequilibrium CKW und Ethen

Für die Schadstoffgruppe der chlorierten Ethene konnte durch die in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten zum ersten Mal eine signifikante Fraktionierung beim stabilen Kohlenstoffisotopenverhältnis im Sorptionsgleichgewicht festgestellt werden. Die bereits publizierten Ergebnisse (Leitner et al., 2023b) zeigten, dass die in der Praxis verwendeten Grenzwerte zur Unterscheidung von mikrobiellen Abbauprozessen und abiotischen Transport/Sorptionsprozessen durch den Einsatz von CSIA zu gering sind, und somit auf einer Altlast ein Schadstoffabbau fälschlicherweise als gegeben angenommen werden könnte.

Sorptionskapazität Quarzsand

Die Versuchsdurchführung zur Bestimmung der Sorptionskapazität des in den Säulenversuchen (AP 2.3) verwendeten Quarzsands entsprach jener der Kohlen und wurde exemplarisch für PCE und cDCE durchgeführt. Der in den Säulenversuchen verwendete Quarzsand wurde mittels Nasssiebung auf die Kornfraktion 0.63-2.0 mm gesiebt und anschließend in ca. 10%iger Salzsäure für drei Tage gelagert, um organische Verunreinigungen, die die Sorptionskapazität beeinflussen/verfälschen könnten, zu entfernen. Auf Grund der vorbeugenden Säurebehandlung sollten Sorptionsprozesse von NAP, PCE oder PCE-Metaboliten an der anorganischen Quarzsandoberfläche ausgeschlossen werden können. Zur Beweissicherung wurden deshalb Sorptionsversuche nur mit den Schadstoffen PCE und cDCE durchgeführt, die als für die übrigen Schadstoffe repräsentativ erschienen. Sollten diese nicht am Quarzsand sorbieren, ist davon auszugehen, dass auch die übrigen mikrobiellen PCE-Metaboliten TCE, VC und Ethen bzw. NAP nicht vom Sand sorbiert werden.

Der Sorptionsversuch wurde mit fünf unterschiedlichen Startkonzentrationen von PCE und cDCE in der wässrigen Phase durchgeführt. Die fünf Versuchsgefäße wurden mit jeweils 10 g Quarzsand gefüllt und mit deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 120 mL aufgefüllt. Zwei Kontrollen, ohne Sandzugabe und mit der jeweils höchsten bzw. niedrigsten Schadstoffzugabe, ergänzten die Versuche. Die Versuchsgefäße wurden regelmäßig beprobt, um die verbliebene Schadstoffkonzentration in der wässrigen Phase zu bestimmen und zwischenzeitlich auf einem Orbitalschüttler bei ca. 150 rpm gelagert.

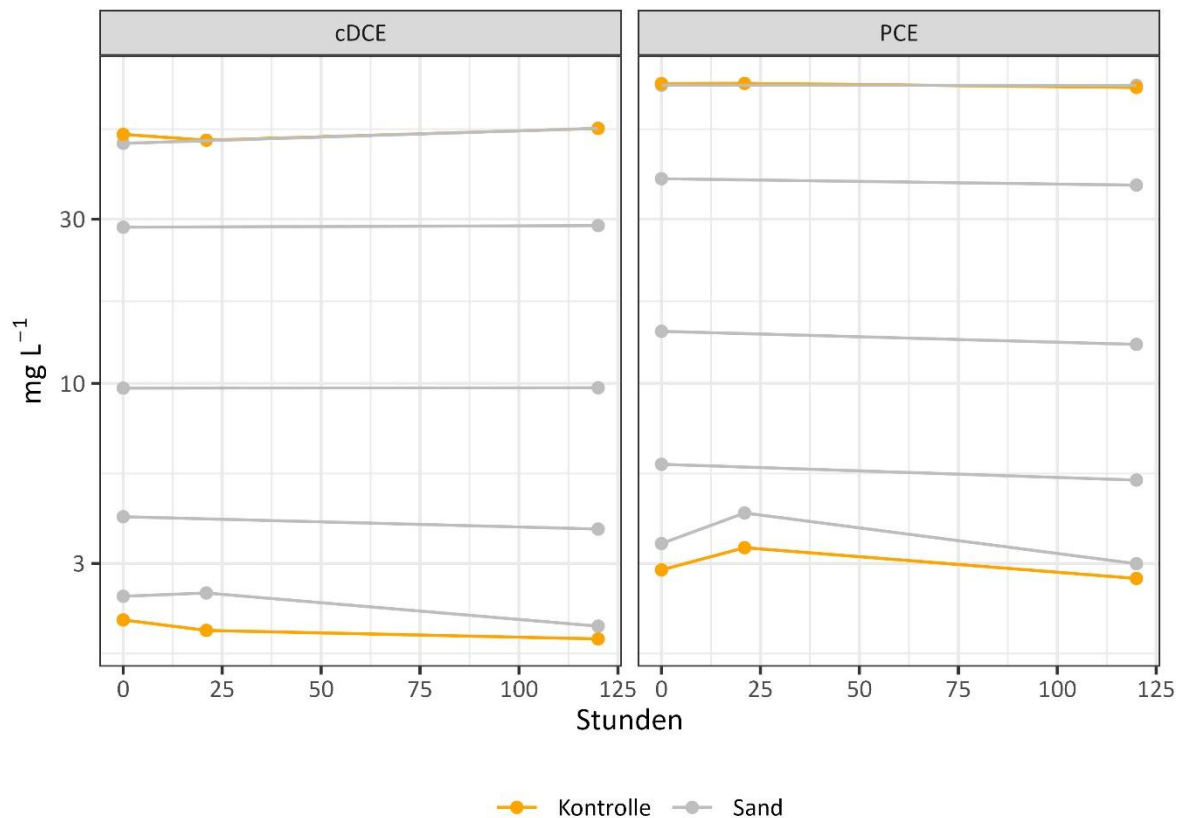


Abbildung 24: Sorption von PCE, cDCE an Quarzsand (Stoffkonzentration in der wässrigen Phase).

Die Ergebnisse in Abbildung 24 zeigten, dass es zu keinem offenkundig wahrnehmbaren Konzentrationsabfall in der wässrigen Phase in allen fünf Ansätzen mit unterschiedlicher Startkonzentration kam. Die Kontrollen verhielten sich ähnlich zu den mit Quarzsand angesetzten Versuchsgefäßen, wodurch sich der experimentelle Versuchsaufbau in seiner Aussagekraft bekräftigte. Die Versuche bestätigten somit die Annahme, dass der in den Säulenversuchen verwendete Quarzsand nicht zum Sorptionsgeschehen von chlorierten Ethenen beiträgt und somit jegliche Sorption auf die verwendeten Kohlen zurückgeführt werden kann.

AP 1.6 – Etablierung schadstoffabbauender Konsortien auf den Kohlen

Im Arbeitspaket 1.6 wurden in Rahmen von Batchversuchen zwei kommerzielle (KB1; Bioclear) sowie mehrere institutseigene schadstoffabbauende mikrobielle Konsortien für den PCE Abbau untersucht. Für den Naphthalinabbau wurden eine abbauende Kultur aus dem Sedimentationsbecken der Altlast W18 – Gaswerk Simmering angereichert. Neben den selektierten Biokohlen (W550 und A750) sowie Aktivkohle wurde im Laufe der Versuche auch das Nährmedium und das Redoxmittel variiert und optimiert. Die Batchversuche mit PCE zeigten, dass der mikrobielle Abbau von PCE in Gegenwart von Aktivkohle (AC) am geringsten ausfiel. In Gegenwart der Biokohlen konnte ein vollständiger PCE Abbau beobachtet werden, wobei die Biokohle W550 in Kombination mit dem Konsortium kb1, die höchste Abbaueffizienz zeigte. Auch für den Schadstoff Naphthalin konnte nachgewiesen werden, dass eine Kombination von Biokohle - A750 zeigte im Batchversuch eine bessere Eignung als W550 - und mikrobiellem Konsortium eine potentiell die Filterlaufzeit verlängernde Strategie für das Design von Pump&Treat und in-situ Filteranlagen zur Grundwasserreinigung sein könnte.

Mikrobielle Konsortien PCE

Die Batchversuche bedienten sich an drei verschiedenen Quellen an schadstoffabbauenden mikrobiellen Konsortien. Es wurden zwei kommerziell erhältliche Kulturen (KB1®, Sirem, Kanada; Bioclear, Boclear earth bv, Niederlande), die durch die Hersteller frei zur Verfügung gestellt wurden), sowie institutseigene Kulturen verwendet. Mit der Firma Sirem wurde zusätzlich ein Kooperationsabkommen zu Forschungszwecken abgeschlossen. Die institutseigenen Konsortien stammten aus einem früheren Forschungsprojekt (ISOMON (2013-2017), gefördert durch das Amt der Niederösterreichischen Landesregierung und dem European Regional Development Fund (ERDF), die aus Sedimentproben von der Altlast Schwertberg (O43 Putzerei Lengauer, OÖ) über mehrere Jahre in unserem Labor verwendet

und angereichert wurden. Letztgenannte sowie die kommerziellen Konsortien sind zur vollständige Dechlorierung von PCE und seiner Metaboliten zu Ethen befähigt (Yan et al., 2009; Leitner et al., 2017).

Versuchsdurchführung PCE

Die Batch wurden in 120 mL Serumflaschen hergestellt und beinhalten neben einem anaeroben wässrigen Medium (pH = 7.0, Redox-Potential (Eh) < -150 mV) ein Inokulum von ca. 10 mL der jeweiligen Kultur sowie einen minimalen Headspace von ca. 0.5 – 1.0 mL. Für die Herstellung des wässrigen anaeroben Mediums (auf Grundlage von Löffler et al. (2005)) gliederte sich in die nachfolgenden Herstellungsschritte und gibt die Bestandteile per Liter Medium an.

- Zugabe von 900 mL HQ-Wasser (Milli-Q®) in einen 1 L Erlenmeyer Kolben, sowie die Bereitstellung einer 1 L Schott Flasche mit Rührknochen und einer roten Verschlusskappe.
- Zugabe von 10 mL Salzlösung (per Liter: NaCl, 100 g; MgCl₂ x 6H₂O, 50 g; KH₂PO₄, 20 g; NH₄Cl, 30 g; KCl, 30 g; CaCl₂ x 2H₂O, 1.5 g)
- Zugabe von 1 mL Spurenmetalllösung (per Liter: HCl (25% Lösung, w/w), 10 mL; FeCl₂ x 4H₂O, 1.5 g; CoCl₂ x 6H₂O, 0.19 g; MnCl₂ x 4H₂O, 0.1 g; ZnCl₂, 70 mg; H₃BO₃, 6 mg; Na₂MoO₄ x 2H₂O, 36 mg; NiCl₂ x 6H₂O, 24 mg; CuCl₂ x 2H₂O, 2 mg)
- Zugabe von 1000 µL einer 1 g L⁻¹ Resazurin Lösung (0.1% w/v, Redoxindikator). Das Medium färbt sich blau.
- Auffüllen des Erlenmeyer Kolbens mit HQ-Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL.
- Transfer der Lösung im Erlenmeyer Kolben in die bereitgestellte Schottflasche.
- Austausch des gelösten Sauerstoffs bei kräftigem Sprudeln durch das Einblubbern von Stickstoffgas mittels Glasfritte für ca. 10 Minuten. Kontrolle des gelösten Sauerstoffgehaltes mittels Sauerstoffsonde. Der Gehalt sollte von anfänglich 8 mg L⁻¹ auf ca. 0.05 mg L⁻¹ abfallen.
- Autoklavierung der leichte aufgeschraubten Schottflasche (20 min bei 121°C). Nach dem Autoklavieren muss die rote Verschlusskappe unverzüglich vollständig

geschlossen werden, bevor sie nach vollständiger Abkühlung auf Raumtemperatur in eine mit Argon und Stickstoff gespülte Glovebox (Restsauerstoffgehalt < 70 ppm) überführt werden kann. Alle nachfolgenden Schritte zur Finalisierung des Mediums erfolgen in der Glovebox.

- Zugabe von 2.4 mL einer 2.3 mol L^{-1} wasserfreien Natrium Azetat Lösung (CH_3COONa), um im Medium eine Konzentration von 6 mM zu erhalten.
- Zugabe von 0.8 mL Milchsäure (85% Reinheit), um im Medium eine Konzentration of 4 mM zu erhalten.
- Natriumazetat und Milchsäure stellen die Kohlenstoffquelle für den anaeroben Abbau der chlorierten Ethene dar. Bei einem Elektronenbedarf von 1:30 kann somit 40 mg L^{-1} PCE vollständig zu Ethen abgebaut werden.
- Zugabe von ca. 2.75 mL 2 M Na_2CO_3 Stammlösung um den pH-Wert auf ca. 7.0 anzugeben (wenn Ti(III)-Citrat als Reduktionsmittel verwendet wird).
- Anschließend erfolgt die Zugabe des Reduktionsmittels, wobei dabei zwei unterschiedliche Reagenzien getrennt voneinander zur Anwendung kamen, um deren Auswirkung auf die mikrobielle Gemeinschaft und den Abbau von chlorierten Ethenen abzuklären.
- Zugabe von 10 ml Ti(III)-Citrat Stammlösung (pH-Wert = 7; Herstellung: 5 ml Ti(III)Cl_2 -Lösung mit 50 ml 0.2 M Natriumcitrat-Stammlösung in einem Erlenmeyer Kolben inkl. Rührknochen mischen (58.8 g L^{-1} Natriumcitrat-Dehydrat (294.1 g mol^{-1}) und auf 1 L mit Milli-Q Wasser auffüllen (Zehnder and Wuhrmann, 1975)).
- Zugabe von 9 mL einer 9 mM Natriumsulfid Lösung ($120 \text{ g Na}_2\text{S} \times 9 \text{ H}_2\text{O}$ auf 1 L Milli-Q Wasser).
- Zugabe von ca. 10 mL einer 1.6 M NaHCO_3 Stammlösung um den pH-Wert auf ca. 7.0 anzupassen (wenn Na_2S als Reduktionsmittel verwendet wird).
- Das Redoxpotential sollte nach Zugabe des Reduktionsmittels bei ca. -240 mV Eh liegen (Kontrollmessung des pH-Wertes und Redoxpotentials mit WTW-Handmessgeräte) und die Farbe des Mediums sollte von blau/rosa auf farblos (bei Eh < 100 mV) wechseln.

- Zugabe von ca. 100 ml PO_4 Pufferlösung (13.6 g KH_2PO_4 ; 17.4 g K_2HPO_4); Rührknochen; in 1 L Erlenmeyer Kolben überführen und mit Milli-Q Wasser auf 1 L auffüllen und pH-Wert (soll: 7.0) kontrollieren.
- Zugabe von 200 μL einer 250 mg L^{-1} Vitamin B12 (Cyanocobalamine) Lösung um im Medium 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ zu erhalten.
- Transfer des Medium in 120 mL Serumflaschen (Verschluss: PTFE-beschichtete graue Butyl-Gummi Stopper und Aluminium Krimpdecken).
- Ausschleusen des Mediums bzw. der befüllten Serumflaschen.
- Zugabe von PCE (3-5 μL) mittels 5 bzw. 10 μL gasdichter Mikroliterspritze.
- Lagerung der Serumflaschen auf einem Horizontalschüttler bei ca. 100 rpm in einem vor Tageslicht geschützten Raum bei 25°C Raumtemperatur.

Die PCE-Zugabe kann mehrmals wiederholt werden bevor das Medium auf Grund von absinkendem pH-Wert bzw. steigendem Redoxpotential, aufgebrauchter Kohlenstoffquellen oder einer inhibierenden Konzentration von nicht weiter abgebauten PCE-Metaboliten (unvollständiger PCE-Abbau) ausgetauscht werden muss.

Ergebnisse Batchstudien PCE

Die Batchversuche gliederten sich in mehrere Abschnitte. Im ersten Schritt wurden kontrolliert, ob nach PCE-Zugabe ein vollständiger Abbau von PCE zu Ethen bei jedem mikrobiellen Konsortium beobachtet werden kann. Anschließend wurde versucht, speziell die institutseigenen Kulturen weiter anzureichern und deren längerfristiges Abbauverhalten zu untersuchen, da für die Säulenversuche von AP 2.3 eine kontinuierliche Laufzeit von ca. einem halben Jahr angestrebt wurde. In einer weiteren Phase wurde den Batch Kohle (AC, A750, W550) zugegeben um deren Auswirkung auf den CKW-Abbau zu untersuchen. Zusätzlich kam es in diesem Abschnitt zum Wechsel des Reduktionsmittels (von Natriumsulfid auf Titan(III)Citrat), da Titancitrat aus Sicherheitsgründen in den Säulenversuchen von AP 2.3 verwendet werden sollte und zuerst sichergestellt werden musste, dass die verwendeten mikrobiellen Gemeinschaften den Verlust der Schwefelquelle verkraften und weiterhin PCE vollständig zu Ethen abbauen können.

Das Abbauverhalten wurde durch die Entnahme von 10 μL Fluid aus den Batch mindestens einmal pro Woche beobachtet. Die Messung erfolgte mittel Purge&Trap Autosampling mit

anschließender Gaschromatographie und der simultanen Detektion der Analyten (PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen) mittels IRMS und qMS. Detail zur Messmethode finden sich in AP 1.5 im Kapitel Schadstoffanalytik.

Kontrollversuche zum mikrobiellen Abbau von PCE

Es ist zu beachten, dass in der nachfolgenden Abbildung 25 die Gesamtzugabe von PCE je Kultur unterschiedlich war. Dies lag daran, dass die Zugabe von PCE auf die individuellen Abbauraten abgestimmt wurde.

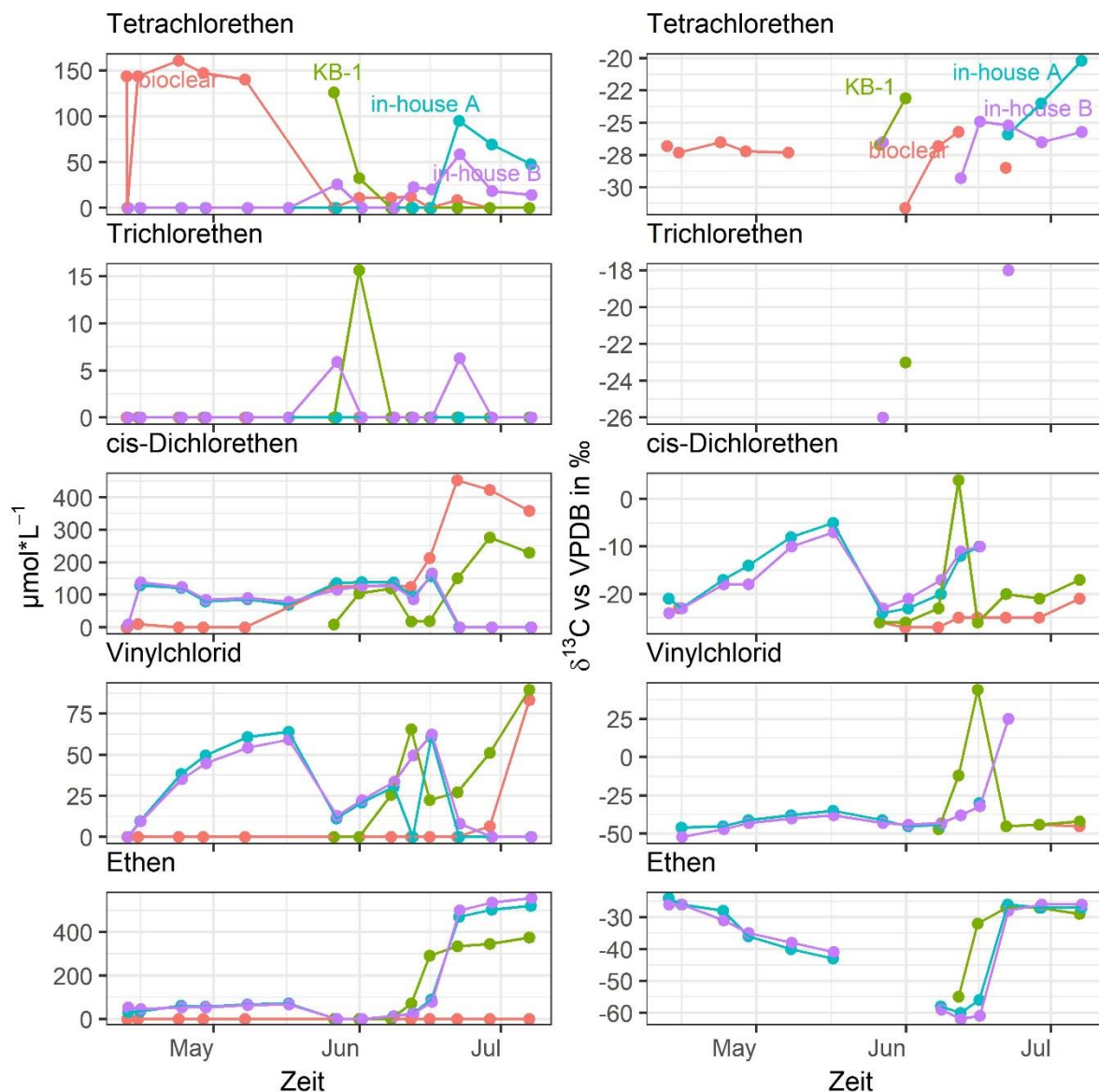


Abbildung 25: Dechlorierung von PCE und seiner Metaboliten nach PCE-Zugabe in Batch aus KB-1, bioclear und institutseigenen (iH) Kulturen. Links: zeitlichen Konzentrationsverlauf

von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen. Rechts: zeitliche Veränderung des stabilen Kohlenstoffisotopenverhältnisses ($\delta^{13}\text{C}$ vs VPDB in ‰).

Sowohl die institutseigenen als auch die mit kb1 inokulierten Batch zeigten einen vollständigen Abbau von PCE zu Ethen. Flaschen inokuliert mit dem bioclear Konsortium zeigten hingegen einen unvollständigen Abbau durch die Akkumulation von cDCE und Vinylchlorid. Abbildung 26 zeigt je eine Flasche mit dem Inokulum von bioclear, KB-1 und einem institutseigenen Konsortium mit klaren Unterschieden in Punkto Biofilmentwicklung, mit großen Flocken (bis 5 mm) bei bioclear und feinen Flocken (1 mm) bei KB-1. Die institutseigenen Kulturen zeichnen sich hingegen durch weitaus feinere Partikel aus, die nach leichtem Schütteln eine Durchsicht verhindern.



Abbildung 26: Batchflaschen mit Inokulum der Kulturen von bioclear (links), KB-1 (Mitte) und einem institutseigenen Konsortium (rechts)

Zu Beginn der Versuche wurde nur Natriumazetat als Kohlenstoffquelle zugegeben. Es zeigte sich, dass die institutseigenen Kulturen, die nur an Natriumazetat gewöhnt sind, mittels diesem PCE zu Ethen abbauen können. Hingegen benötigte die KB1-Kultur Laktat um PCE vollständig abbauen zu können.

Versuchsreihe zur mikrobiellen Interaktion mit Bio- und Aktivkohle

Im Anschluss an die Anreicherung der hauseigenen mikrobiellen Gemeinschaften, welche einen vollständigen mikrobiellen Abbau von PCE zu Ethen zeigten, wurden in einem 2-Phase-Experiment Kohlen und mikrobielle Kulturen gemeinsam inkubiert. Dadurch konnte das mikrobielle Abbauverhalten in der Gegenwart eines Adsorbents (AC, A750, W550) studiert werden. Die erste Phase diente der Akklimatisierung der mikrobiellen Gemeinschaften an die geänderten Umweltbedingungen (kompetitive Schadstoffverteilung) und dem proof-of-concept für einen Biofilter aus der Kombination von Schadstoffsorption und -abbau. Die zweite Phase widmete sich der Quantifizierung der Schadstoffverteilung und dessen Abbau.

Auf Grund des Nachweises eines vollständigen Abbaus wurden für diese Batchstudie die zwei institutseigenen mikrobiellen Konsortien (10214 $\triangleq$ „iH“ und 102121) und die kommerzielle Kultur kb1 verwendet. Die lt. AP1.3 und AP1.5 vielversprechende Biokohlen W550 und A750, sowie die Referenzaktivkohle Hydrffin A (AC) kamen zum Einsatz und wurden auf deren Interaktion mit den drei schadstoffabbauenden mikrobiellen Konsortien hin untersucht. Dazu wurden jeweils 1 g Kohle mit 115 mL anaerobem wässrigem Medium in 120 mL Glasflaschen gasdicht verschlossen und mit 1 mL Inoculum aus dem angereicherten Kulturen beimpft. In der ersten Phase wurde vor der Zugabe des Inoculums pures PCE in jenem Ausmaß zugegeben um eine PCE-Konzentration vom ca. 30 mg L⁻¹ in der wässrigen Phase im Equilibrium mit den Kohlen zu gewährleisten. Dies sollte die Akklimatisierung der mikrobiellen Gemeinschaften erleichtern, da PCE in ausreichender Menge aus der wässrigen Phase aufgenommen werden konnte. In der zweiten Phase wurde zu Beginn das wässrige Medium getauscht, um eine ausreichende Nährstoffverfügbarkeit für Phase zwei zu gewährleisten und eine Nährstofflimitierung beim CKW-Abbau ausschließen zu können. Des Weiteren konnte dadurch auch der pH-Wert und das Redoxpotential (Eh) auf die Startwerte von 7.0 und < -150 mV zurückgesetzt werden um auch diesbezüglich Limitierungen ausschließen zu können. Alle Kombinationen aus mikrobiellen Konsortien und Kohle wurde in Triplikaten hergestellt. Außerdem wurde in der zweiten Phase nach zwei Wochen Laufzeit in jeweils einem Triplikat der 16 Versuchsgruppen (Kontrolle (ohne Kohle, mit iH, mit 102121, mit kb1), AC (ohne Inokulum, mit iH, mit 102121, mit kb1), W550 (ohne Inokulum, mit iH, mit 102121, mit kb1) und A750 (ohne Inokulum, mit iH, mit 102121, mit kb1) das ursprünglich verwendete Medium mit Natriumsulfid als Reduktionsmittel gegen das gleich Medium aber mit Titancitrat als Reduktionsmittel ausgetauscht. Da Natriumsulfid für den Menschen giftig ist, wurde versucht durch den Wechsel auf Titancitrat eine potentielle Exposition während des

Säulenversuchs, bei dem eine Vielzahl der Arbeitsschritte außerhalb einer Glovebox durchgeführt werden, ausschließen zu können.

Die mikrobiellen Konsortien bestehen aus einer Vielzahl von Bakterien, von denen einige wenige für den Abbau von PCE verantwortlich sind. Für den vollständigen Abbau von PCE zu Ethen sind nur wenige Bakterienarten befähigt, wobei der Abbau von PCE bis cDCE oder VC von einer größeren Gruppe von Arten durchgeführt werden kann. Daher ist eine kontinuierliche Versorgung mit PCE notwendig um alle in den PCE-Abbau involvierten Bakterien aktiv zu halten. Da die Versuchsreihen 1 und 2 inkl. dem Wechsel des Reduktionsmittels auf den jeweils vorangehend etablierten mikrobiellen Gemeinschaften basieren, werden nachfolgend nur die Endergebnisse der mit Titancitrat angesetzten Batch der 16 Versuchsgruppen angeführt und diskutiert. Außerdem stellt die Versuchsgruppe „Kontrolle ohne Kohle“ das Inokulum für den Säulenversuch dar und ist daher maßgebend für den weiteren Projektverlauf.

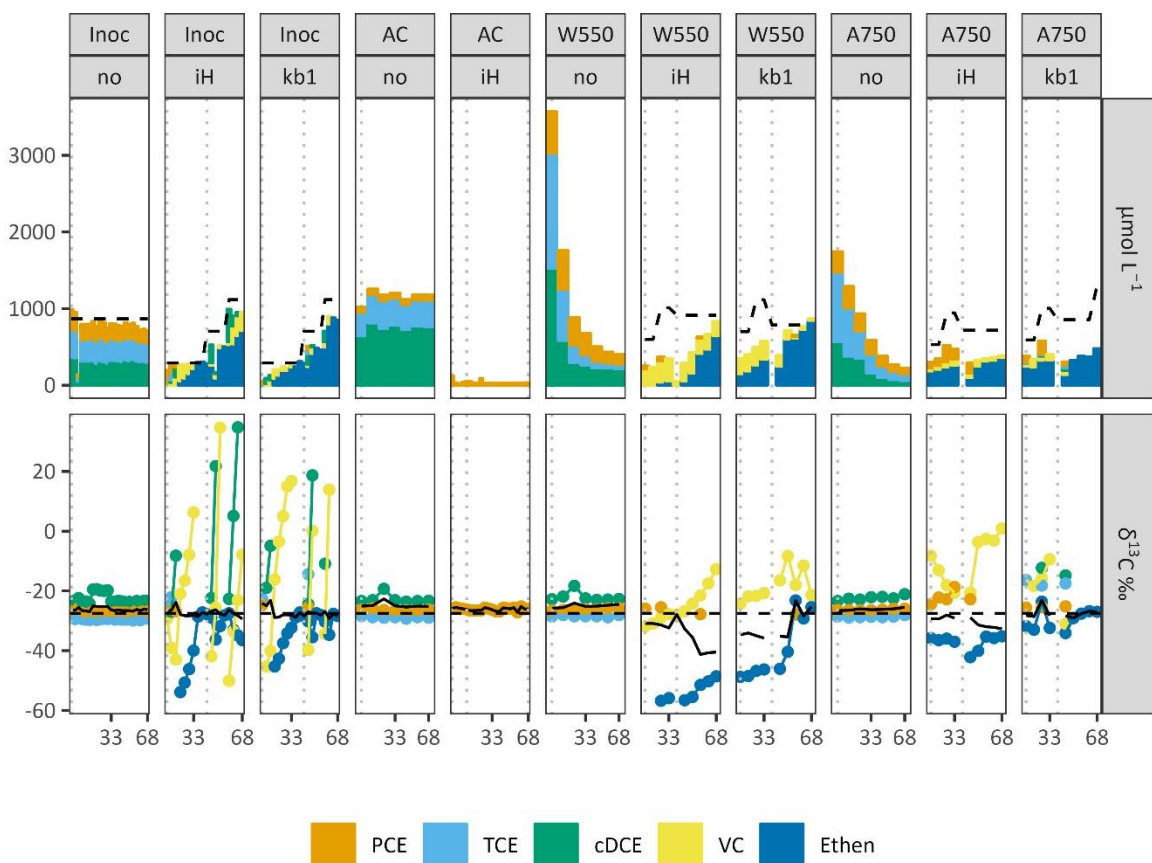


Abbildung 27: Ergebnisse der Batchversuche mit Titan(III)citrat aus Phase 2 mit der Angabe der Konzentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$) und dem Kohlenstoffisotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$) je CKW (PCE, TCE, cDCE, VC) und Ethen für die Kombinationen von Inokulum (no $\hat{=}$ kein Inokulum, iH

(10214), kb1) und Kohle (no $\triangleq$ keine Kohle, AC, W550, A750) über einen Zeitraum von 68 Tagen. PCE-Zugabe als vertikale gepunktete Linien, Schwarze Linien zeigen den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert als Summe aller CKW und Ethen dar. Die horizontalen gestrichelten Linien zeigen für Inoc bzw. bei iH und kb1 von W550 und A750 die Summe der PCE-Zugaben an und die Sollwerte der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des zugegebenen PCE.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der finalen Phase der Batchversuche mit PCE. Bei den Kontrollen ohne Inokulum und ohne (Inoc – no) bzw. mit Kohle (AC – no, W550 – no, A750 – no) sieht man, dass die zugegebenen CKW und Ethen (Anmerkung: Batch mit Inokulum wurde nur PCE zugegen) im Fall von Inoc – no und AC – no ein rasch einsetzendes und kontinuierliches Equilibrium in der wässrigen Phase zeigten, wobei die Biokohlen eine langfristig sich steigernde Sorptionskapazität zeigten. Es sei hinzugefügt, dass die Zugabe von CKW und Ethen nicht bei allen Kohlenarten im gleichen Ausmaß erfolgte, da dies laut Abbildung 27 den Anschein haben könnte. Die Zugabemengen von PCE, TCE, cDCE und Ethen zu den Kontrollen betrugen in Summe 3900, 950, 350 und 100 μmol bei AC, W550, A750 und der Kohlen-freien Kontrolle und ergaben sich aus den Sorptionsergebnissen von AP 1.5. Auf Grund der $\delta^{13}\text{C}$ -Analysen der CKW und Ethen lässt sich an Hand der konstanten Werte erkennen, dass es zu keinerlei mikrobiellem Abbau kam und lediglich Sorptionsprozesse bei den mit Kohle hergestellten Batch von Statten gingen. Ganz im Gegenteil dazu und unter Berücksichtigung dass nur PCE dem inokulierten Batch zugegeben wurde, sieht man bei diesen neben der Entstehung von PCE-Metaboliten (TCE, cDCE, VC, Ethen) auch die für den mikrobiellen Abbau charakteristische Kohlenstoffisotopenfraktionierung anhand der starken zeitlichen Tendenz in der Veränderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Am wichtigsten ist jedoch, dass in allen Flaschen, außer jenen mit AC, PCE vollständig bzw. maßgeblich zu Ethen abgebaut wurde und damit eine Kombination aus Abbau und Sorption unter der Verwendung von Biokohle möglich ist. Bzgl. AC vermuten wir, dass auf Grund der hohen Sorptionskapazität für PCE und den damit verbundenen hohen PCE Dosen die zugegebenen Inokula einem zu hohen Stress ausgesetzt waren um ausreichend PCE-Metabolite zu produzieren, dass diese in der wässrigen Phase detektiert werden konnten. Abschließend ist hervorzuheben, dass sich in der Biokohle W550 trotz der in Relation zu A750 höheren Sorptionskapazitäten und besonders in Verbindung mit dem Inokulum kb1 einen vollständigen Abbau von PCE zu Ethen zeigte. Dies bekräftigt die Funktionstüchtigkeit des in diesem Projekt angedachte Filterdesign zusätzlich. Offensichtlich sind auch sorbierte CKW für den mikrobiellen Abbau verfügbar, und somit könnte die Sorptionskapazität des Sorbents langfristig unausgeschöpft bleiben.

Mikrobielle Konsortien NAP

Dazu wurden Proben, die im Rahmen von AP1.1 gezogen wurden, unter aeroben Bedingungen in 2.3 L Schottflaschen zusammen mit Tullner Leitungswasser inkubiert. Nach der Zugabe von NAP wurde dessen Konzentrationsveränderung in der wässrigen Phase sowie stabiles Kohlen- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnis laut der Analysemethode in AP 1.5 – Kapitel Schadstoffanalytik überwacht. Nachdem ein Abbau von NAP einsetzte, wurde wie für PCE mehrere Versuchsreihen zur kontinuierlichen Anreicherung und Selektion der mikrobiellen Gemeinschaften durchgeführt und schließlich gemeinsam mit den Kohlen inkubiert.

Versuchsdurchführung NAP

Die hergestellte Anreicherungskultur (Ursprung: Wasserprobe aus Sedimentationstank der Altlast W18 – Gaswerk Simmering) wurde unter der Verwendung von zwei basalen Mineralsatzmedien fortlaufend durch die Zugabe von Naphthalin (gelöst in Ethanol puriss) und Sauerstoff weiter angereichert und der jeweilige Konzentrationsverlauf von Naphthalin dokumentiert. Neben dem verwendeten Medium Bushnell-Haas (Bushnell-Haas, https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CCG/EU/Becton-Dickinson/Product-Information/DIF003_EN%20Bushnell_Haas_Broth.pdf) wurde ein weiteres getestet, da die Verwendung des Bushnell-Haas Mediums eine ungewollt hohe Sauerstoffzehrung mit sich brachte und diese nicht ausschließlich auf den Abbau von Naphthalin zurückgeführt werden konnte. Der hohe Sauerstoffverbrauch wurde vermutlich durch die extrem hohen Stickstoff-Zugaben verursacht. Die Wahl des zweiten Mediums (Uhlik et al. (2009), doi: 10.1128/AEM.00466-09) entfiel auf eines, dass bereits für den aeroben mikrobiellen Abbau von Naphthalin verwendet wurde.

Die Zusammensetzung des Bushnell-Haas Mediums per Liter war 0.2 g MgSO_4 , 0.02 g CaCl_2 , 1.0 g KH_2PO_4 , 1.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1.0 g KNO_3 , 0.05 g FeCl_3 . Die Zusammensetzung des Uhlik Mediums per Liter war 1.0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.7 g KH_2PO_4 , 10.955 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.01 g FeSO_4 , 0.2 g MgSO_4 . Die zwei Anreicherungskulturen (jeweils 1 mL Inoculum aus der Anreicherungskultur) wurden in 1 L Schottflaschen mit 300 mL des jeweiligen Mediums hergestellt und gleichen dem Aufbau der Reservoirgefäße laut AP 2.1. Die Zugabe von Naphthalin erfolgte in Dosen von ca. 10 mmol aus einer 50 g L^{-1} Ethanol Lösung. Eine erneute Zugabe erfolgte jeweils nachdem Naphthalin nicht mehr in der

wässrigen Phase detektiert werden konnte. Der Konzentrationsverlauf von Naphthalin wurde dazu mittels GC/qMS-C/IRMS analysiert und quantifiziert.

Ergebnisse Batchversuche NAP

Der Vergleich der beiden Mineralmedien und deren Einfluss auf den aeroben Abbau von Naphthalin durch die Anreicherungskultur zeigte in Abbildung 28 keine eindeutigen visuell erkennbaren Unterschiede. Naphthalin wurde in beiden Mineralmedian, nach dessen Zugabe von jeweils ca. 10 mmol (vertikale Linien), innerhalb von ca. 100 Stunden abgebaut. Eine Abschätzung der jeweiligen Abbauraten (approximiert Anhand der Konzentrationsveränderung zwischen den Probenahmezeitpunkten und ohne Annahme einer Abbaukinetik) zeigte jedoch, dass das mikrobielle Konsortium im Uhlik-Medium eine

deutlich höhere Abbaurate ($0.64 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1} \pm 0.32$) als im Bushnell-Medium ($0.18 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1} \pm 0.13$) aufwies.

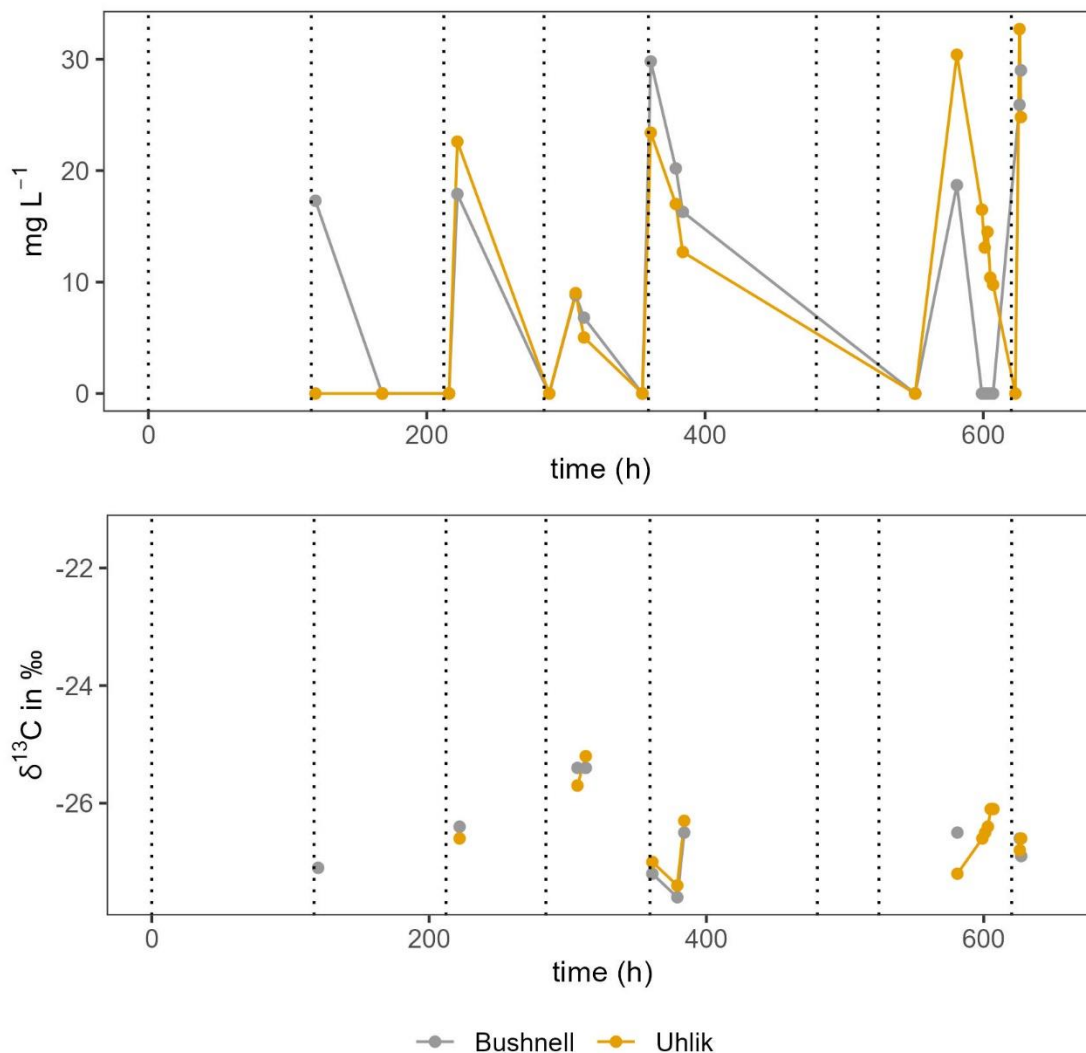


Abbildung 28: Vergleich des Konzentrations- und Kohlenstoffisotopenverhältniss-Verlaufs von Naphthalin (mg L^{-1} , $\delta^{13}\text{C}$ in ‰) unter Verwendung der Mineralmedien It. Bushnell und Uhlik inokuliert mit dem angereicherten mikrobiellen Konsortium. Vertikale Linien geben den Zeitpunkt der Naphthalin-Zugabe zu beiden Medien wieder.

Visuell klar erkennbar war außerdem der Unterschied bei der Sauerstoffzehrung, der durch die Zugabe des Redoxindikators Resazurin zu beiden Medienansätzen in einem Farbumschlag von rot/rosa nach farblos/blass-rosa angezeigt wurde (Abbildung 29). Zusätzlicher Sauerstoff wurde zwar in beiden Fällen zur Verfügung gestellt, jedoch strömt dieser nur dann in das Reservoirgefäß, wenn ein Unterdruck (durch Sauerstoffverbrauch) von $> 8 \text{ mbar}$ entsteht. Beschränkt sich der Sauerstoffkonsum auf den Abbau der jeweils

zugegebenen Menge an Naphthalin und Ethanol (Zugabe Naphthalin als Ethanollösung) führt der entstehende Unterdruck zu einem ausreichenden Sauerstoffausgleich über den mit Sauerstoff gefüllten Gassack. Kommt es in Abhängigkeit der Zusammensetzung des Mineralmediums zu einer zusätzlichen Sauerstoffzehrung auf Grund von z.B. Ammoniumoxidation, kippt das Medium und kann längerfristig nicht unter aeroben Verhältnissen betrieben werden. Grund dafür ist, dass das Design des Reservoirgefäßes auf die Druckveränderungen durch den alleinigen Abbau der zugegebenen Menge an Naphthalinlösung abgestimmt ist. Das rechte Bild in Abbildung 29 (jeweils links: Uhlik, jeweils rechts: Bushnell) veranschaulicht durch die blassere Rotfärbung die höhere Sauerstoffzehrung im Bushnell-Medium und könnte eine Erklärung für die geringeren Abbauraten im Vergleich zur Uhlik-Anreicherungskultur gewesen sein.

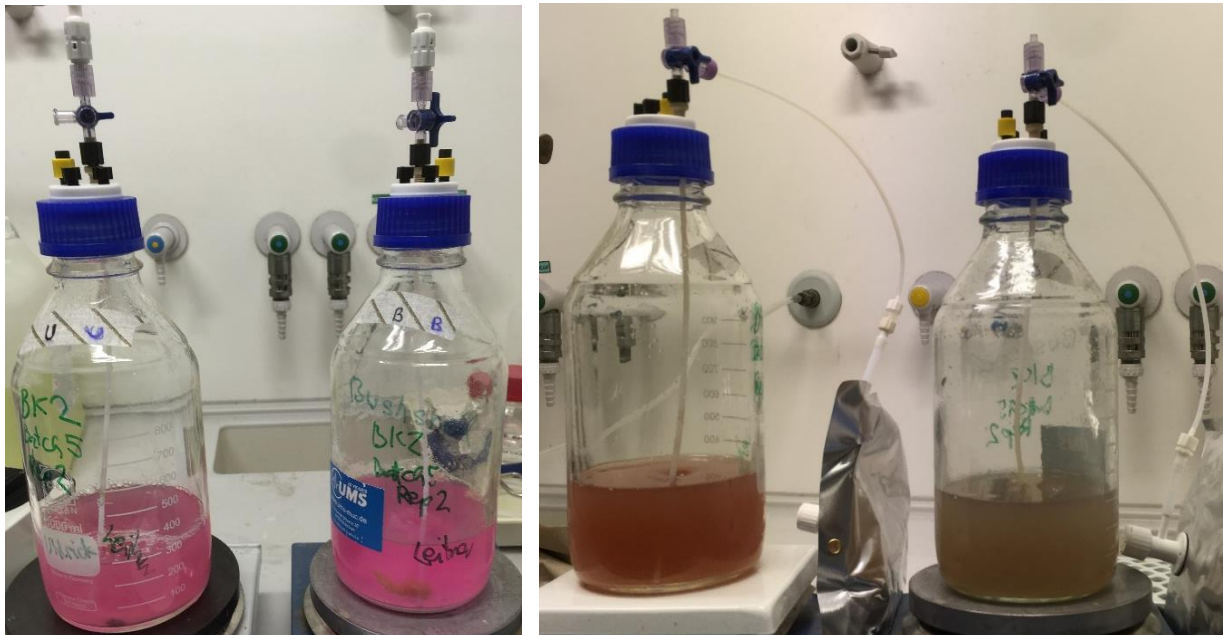


Abbildung 29: Anreicherungskulturen im Mineralmedium lt. Uhlik (jeweils links) und Bushnell (jeweils rechts) zu Beginn der Anreicherung (links) und nach 10 Wochen (rechts).

Versuchsreihe zur mikrobiellen Interaktion mit Biokohle

Nach vier Versuchsreihen ohne Biokohle erfolgte abschließend eine Versuchsreihe mit Biokohlezugabe (W550, A750) um deren Einfluss auf den mikrobiellen NAP-Abbau zu untersuchen. In der fünften Versuchsreihe wurden Flaschen mit 300 mg Biokohle und 60 ml Mill-Q Wasser hergestellt, welche in Summe je vier Flaschen ohne Biokohle, mit W550, mit A750 sowie zwei zusätzliche Kontrollen ohne Biokohle umfassten. Anschließend wurde NAP über eine Ethanol-Stammlösung zugegeben, um eine NAP-Konzentration von ca. 30 mg

L⁻¹ in der wässrigen Phase im Sorptions- bzw. Lösungsgleichgewicht zu erhalten (Phase „Sorption“ in Abbildung 30). Der Batch wurde anschließend im Dunkeln und bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler bei 150 rpm gelagert und regelmäßig beprobt. Nach 49 Stunden wurde den jeweils vier Flaschen ohne Biokohle, mit W550 und mit W750 ein mikrobielles Inokulum aus Versuchsreihe vier injiziert und konzentriertes Medium verabreicht um ein Endvolumen von 80 mL und eine Headspace von 40 mL in den Batchflaschen zu erhalten. Anschließend wurde das weitere Sorptions- und mikrobielle Abbaugeschehen in der Phase „Sorption/Degradation“ für weitere 96 Stunden beobachtet. Abschließend wurde NAP mittels Iso-Oktan aus dem inokulierten Batch extrahiert und dessen Gehalt bestimmt (Phase „Desorption“, Abbildung 30).

Die Ergebnisse laut Abbildung 30 zeigten, dass nach der Zugabe des Inokulums („Sorption/Degradation“) die NAP-Konzentration in der wässrigen Phase weiter abfiel und nach 48 Stunden kein gelöstes NAP in den inokulierten Batch mit Biokohle mehr detektiert werden konnte. Währenddessen konnte gelöstes NAP in den nicht-inokulierten Batch mit Biokohle weiterhin detektiert werden, wobei die andauernde Abnahme von gelöstem NAP auf ein quasi-Equilibrium und andauernde womöglich Diffusions-getriebene Sorptionsprozesse schließend lässt. In den Kontrollen, ohne Inokulum und ohne Kohle, blieb die NAP Konzentration relativ konstant über die gesamte Versuchsdauer, während die Kontrollen mit Inokulum und ohne Kohle immer ein wenig geringere NAP-Gehalte zeigten, die einen mikrobiellen NAP-Abbau vermutet lassen. Schlussendlich konnte nach NAP-Extraktion („Desorption“) im Anschluss an die Phase „Sorption/Degradation“ gezeigt werden, dass die Gehalte von sorbiertem NAP in den inokulierten Batch mit Biokohle geringer waren als jene, die ohne Inokulum und mit Biokohle hergestellt wurden. Diese Ergebnisse deuten abermals darauf hin, dass ein mikrobieller Abbau in der Gegenwart von Biokohle (A750, W550) stattgefunden haben muss.

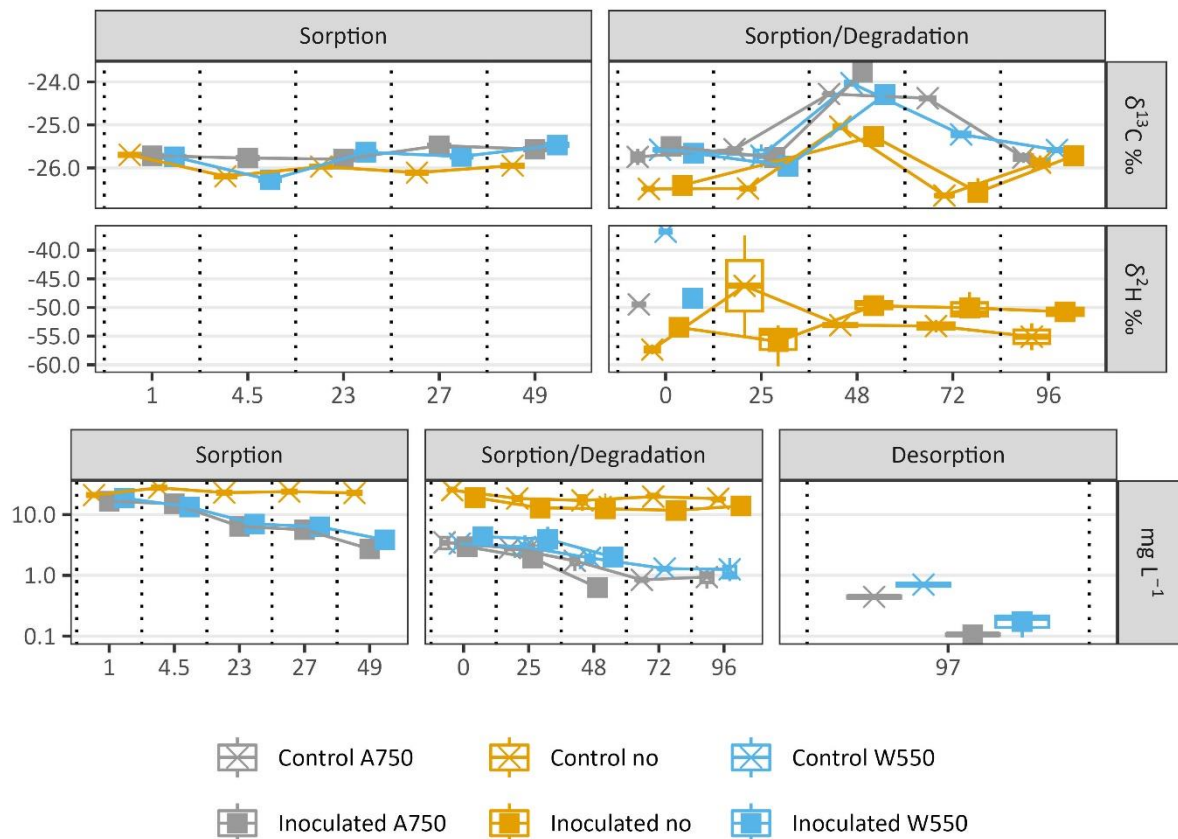


Abbildung 30: Ergebnisse NAP-Batchversuch mit/ohne Inokulum (Control, Inoculated) bzw. mit/ohne Biokohle (A750, W550, no). Dargestellt sind die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$, $\delta^2\text{H} \text{ ‰}$) sowie die Konzentration (mg L^{-1}) von Naphthalin während der Versuchslaufzeit (in Stunden) in der wässrigen Phase während des jeweiligen Versuchsabschnitte (Sorption, Sorption/Degradation, Desorption).

Aus Perspektive der $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^2\text{H}$ -Werte konnte ein mikrobieller Abbau nicht eindeutig nachgewiesen werden, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der inokulierten und nicht inokulierten Flaschen zeigten. Auf Grund der geringen Wasserlöslichkeit von NAP und der Rahmenbedingungen des Batch- und Probenahme-Setups war es leider nicht möglich bei derart geringen NAP Gehalten Kohlen- bzw. Wasserstoffisotopenfraktionierung im residualen NAP der wässrigen Phase auf Grund von mikrobiellen Abbauprozessen nachzuweisen. Außerdem ist die laut Literatur zu erwartende Isotopenfraktionierung bei mikrobiellen NAP-Abbau (e.g. Morasch et al. (2002) im Vergleich zu den CKW relativ gering, wodurch dessen Erfassung zusätzlich erschwert wird. Abschließend muss auch ergänzt werden, dass wir nur NAP und keines seiner Metaboliten analytisch erfassen konnten, weshalb wir für den Säulenversuch mit NAP in AP 2.3 eine komplett andere Methodik und begleitende Analytik zur Anwendung brachten, die deutlich

sensitiver ist und mit welcher auf den Mineralisierungsgrad von NAP, also dem vollständigen Abbau von NAP bis CO_2 geschlossen werden kann.

AP 2.1 Design und Aufbau der Säulenversuche

Es wurden sieben Edelstahlsäulen (Länge = 25 cm, ID = 3.5 cm) mit der Möglichkeit zur Probenahme an drei Stellen äquidistant entlang des Fließweges sowie am Säulenausgang und in den Reservoirgefäßen konzipiert. Der Aufbau der Säulen erfolgte vertikal in Strömungsrichtung. Die Säulen wurden am Ein- und Ausgang mit Quarzsand gefüllt und verfügten über eine ca. 5 cm mächtige Kohlenfüllung im zentralen Abschnitt. Der Säulendurchmesser entsprach mehr als dem 10-fachen der größten Kornfraktion (2 mm). Das Verhältnis von Säulenlänge zu Säuleninnendurchmesser war ca. 1:7, um eine Limitierung der Transportprozesse ausschließen zu können. Als Schlauchmaterial zwischen Säule, Pumpe und Reservoir wurde PTFE verwendet um eine ausreichende Dichtheit und chemische Resistenz gegenüber den Schadstoffen (CKW, Ethen, PAK) zu gewährleisten. Am Ausgang von zwei Säulen wurde eine Durchflussszelle zur kontinuierlichen Überwachung von pH-Wert und Redoxpotential installiert welche über Datenlogger kontinuierlich erfasst und aufgezeichnet wurden. Der Fluss (5 mL min^{-1}) durch die Säulen wurde über eine Peristaltikpumpe gesteuert, wobei die Verweilzeit in den Säulen ca. 41 Minuten betrug. Das für die Peristaltikpumpe verwendete Schlauchmaterial war auf die jeweiligen Schadstoffe abgestimmt. Die Säulenversuche liefen kontinuierlich bis zu einem halben Jahr und wurden in einem Klimaschrank mit Absaugung und bei konstanten 25°C in Dunkelheit durchgeführt.

Versuchsaufbau PCE

Abbildung 31 und Abbildung 33 zeigen das Design und dessen praktische Umsetzung im Säulenversuch für PCE. Die verwendete Peristaltikpumpe (Ismatec IPC, Cole-Parmer GmbH, Deutschland, Stopperschläuche: PharMed® BPT 2,8 mm ID, 4.5 mm AD, Saint-Gobain Performance Plastics, Frankreich) steuerte dafür parallel den Fluss durch alle sieben Säulen. Die Schlauchlängen wurden so gering wie möglich gehalten, wodurch sich ein tatsächliches Schlauchvolumen von ca. 10.5 mL ergab welches weitestgehend ein 1.5/3.0 mm bzw. an Kopplungsstellen 4/6 mm PTFE-Schlauch war (Abbildung 32). Insgesamt beinhaltete jede der

sieben Säulen inkl. Reservoirgefäß ca. 1100 mL wässriges anaerobes Medium (pH-Wert: 7,0; Redoxpotential E_h : < -150 mV, Details siehe AP 1.6 – Versuchsdurchführung PCE), ca. 400 g Quarzsand, 3.5 bis 10.5 g Kohle (je nach Schütt- und Feststoffdichte, siehe AP 1.4, bzw. 0 g in der Kontrollsäule) und einen Headspace (Luftvolumen) im Reservoirgefäß von ca. 130 mL. Alle Feststoffe (Quarzsand, Kohle) waren auf die Kornfraktion 0.63 – 2.0 mm nass-gesiebt. Jene zwei Säulen die zusätzlich mit einer Durchflussszelle (Messung pH-Wert und Redoxpotential, Füllvolumen: ca. 86 mL) ausgestattet waren erhielten weitere 86 mL anaerobes Medium. Die Herstellung und Zusammensetzung des anaeroben Mediums sind in AP 1.6 angeführt. Es wurden insgesamt sieben Säulen mit unterschiedlichen Kombinationen aus Kohle und Inokulum hergestellt. Davon war eine Säule nur mit Quarzsand und ohne Kohle gefüllt und erhielt kein Inokulum. Weiters wurden je zwei Säulen mit AC, W550 und A750 sowie Quarzsand gefüllt und je Kohle mit einem der beiden mikrobiellen Inokula beimpft. Das jeweilige Inokula (500 µL aus den Anreicherungskulturen (iH, kb1 aus AP 1.6) wurde direkt in den mit Kohle gefüllten Säulenabschnitt, über die Butyl-PTFE-Septum-gedichtete Probenahmestelle, injiziert.

Auf Grund der Sorptionskapazität der verwendeten Kohlen (A750, W550, AC) wurden die Säulen nicht vollständig, sondern nur über eine Länge von ca. 5 cm, rund um den zentralen Probenahmepunkt (Abbildung 31) in Säulenlängsachse mit Kohle gefüllt (ca. 25 – 35 cm³). Das übrige Volumen von ca. 230 cm³ wurde mit Quarzsand gefüllt. Durch den abschnittswisen Einbau von Quarzsand und Kohle konnten zusätzlich Aussagen über Verlagerungs- und/oder Zonierungsprozesse sowie die Affinität zur Etablierung eines Biofilms auf dem Kohlenmaterial getroffen werden. Des Weiteren musste weniger Schadstoffe (PCE), der in Folge zur Kontamination des Filtermaterials verwendet werden. Abschließend sei noch erwähnt, dass eine Erhöhung der Kohlenmenge außerdem im Zuge der Beladung dieses mit PCE das Risiko birgt, während des Beladungsprozessen auf Grund der dafür notwendigen Schadstofffrachten die mikrobiellen Gemeinschaften irreversibel zu stören bzw. abzutöten, wie dies am Beispiel der Batchversuche für AC in AP 1.6 dargestellt werden konnte.

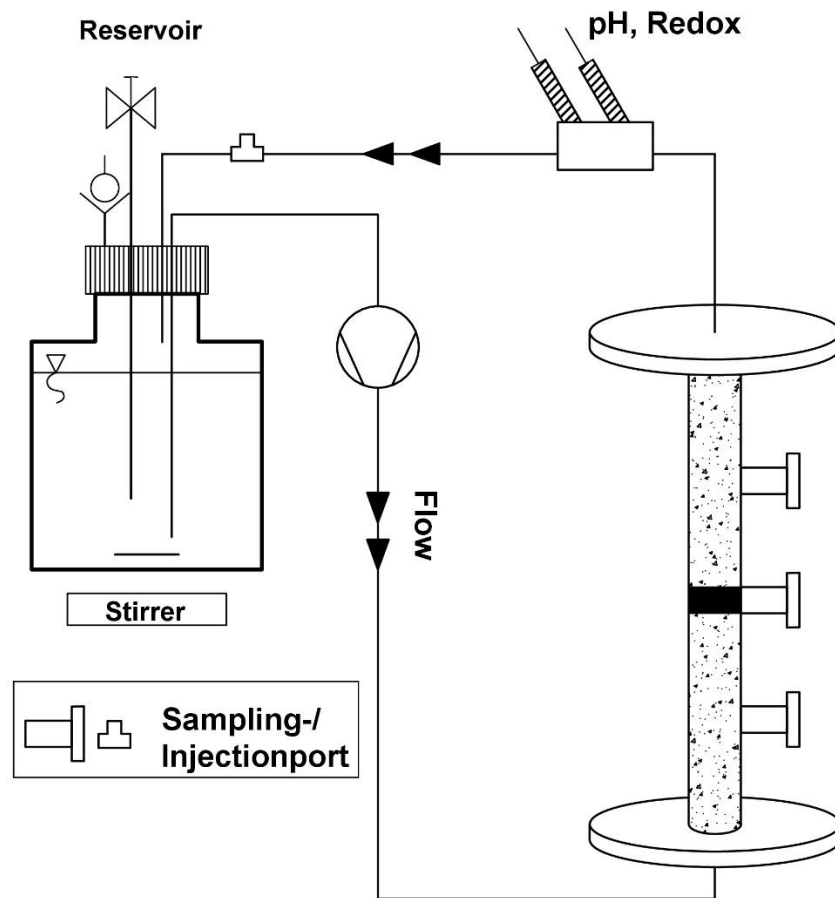


Abbildung 31: Design Säulenversuch PCE



Abbildung 32: Aufbau Säule (ohne Reservoir) für den Säulenversuch PCE



Abbildung 33: Durchführung Säulenversuch PCE

Wie in Abbildung 33 und Abbildung 34 ersichtlich verfügte jede Säule über ein Reservoir (ein Liter Schottflasche), dass als Ausgleichsbehälter, zur Pufferung von Druckveränderungen auf Grund des mikrobiellen Abbaus von PCE, als Nährstoffreservoir bzw. als Sichtfenster zur visuellen Kontrolle (Biofilmbildung, Verwendung Redoxindikator) fungierte. Jedes Reservoir wurde mit einer VICI Cap mit mindestens vier Durchführungen ausgestattet. Neben Schlaucheingang und -ausgang, verfügte jede Kappe über ein Überdruckventil (Öffnung bei > 0.1 bar) und einen PTFE-Schlauch, welcher wie der Schlauchausgang bis nahe an den Boden des Reservoirs reichte (Schlaucheingang endete im Headspace zur visuellen Kontrolle des Flusses), gekoppelt mit einem 3-Wege-Ventil, um bei Bedarf Nährstoffe, Reduktions- und/oder pH-Pufferlösungen zuzuführen bzw. Proben zur Kontrolle des pH-Wertes zu entnehmen.



Abbildung 34: Aufbau Reservoirverschluss (Vici Safety-Cap) mit zwei Verbindungsschläuchen zum Säuleneingang und -ausgang, Überdruckventil, 3-Wege-Ventil für die Zugabe von z.B. Reduktionsmittel, Pufferlösung.

Bereits während der Herstellung der Säulen (Abbildung 35) für den anaeroben Abbau von PCE wurde darauf geachtet den Sauerstoffzutritt zur ungesättigten Säule sowie den Sauerstoffgehalt des wässrigen Mediums so gering wie möglich zu halten.

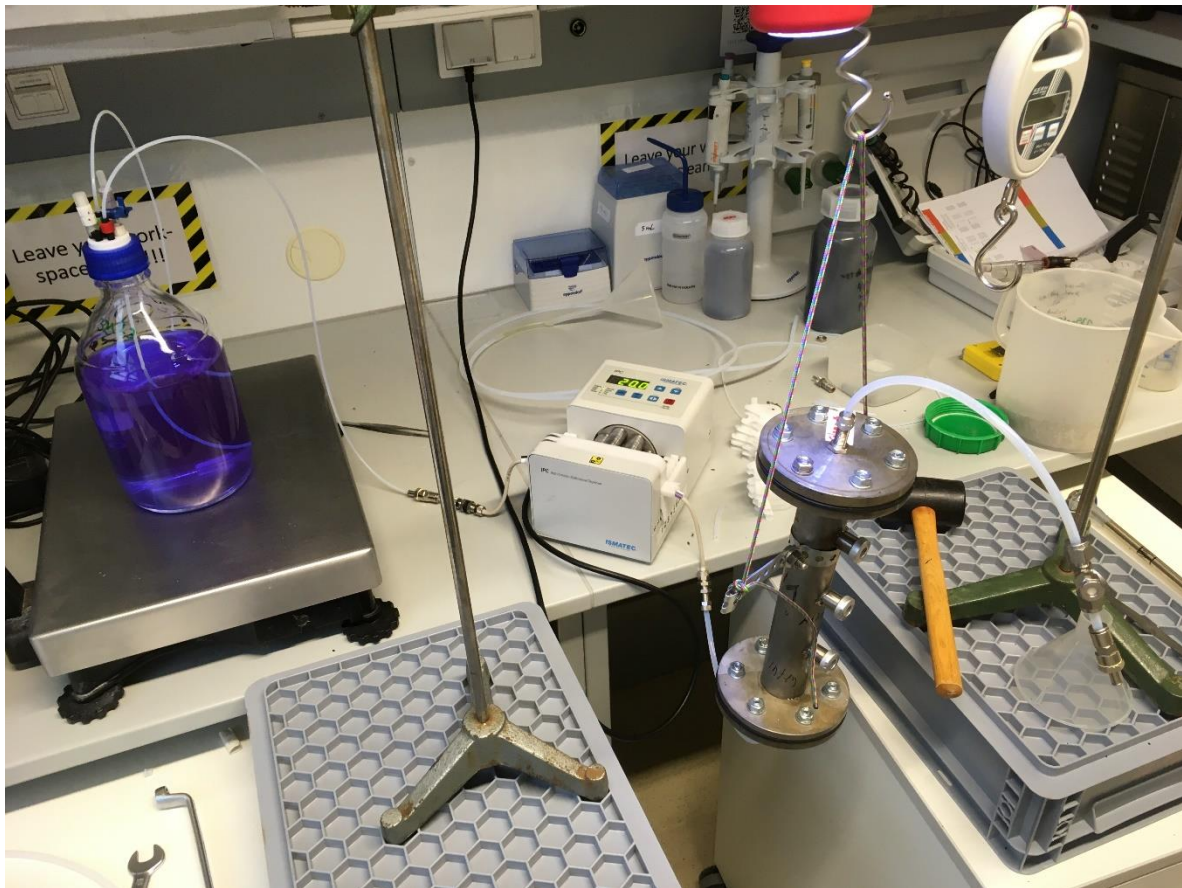


Abbildung 35: Herstellungsprozedere Säulen PCE, Abbildung zeigt Sättigungsprozess der Säule mit anaerobem Medium (vor Zugabe des Reduktionsmittels Titan(III)Citrat) aus einem Vorratsbehälter, dessen Füllstand über den Sättigungszeitraum überwacht wurde.

Neben der Zugabe von Pufferlösung oder Reduktionsmittel war es über das 3-Wege-Ventil in Verbindung mit dem Überdruckventil möglich das wässrige Medium sowie den Headspace der Reservoirbehälter mit Stickstoff zu spülen. Bei Bedarf hätte damit der gelöste Sauerstoff auf ein Level von ca. 0.005 mg L^{-1} abgesenkt werden können.

Die Zugabe von PCE erfolgte in purer Form mittels Mikroliterspritze (in Dosen von 30 – 100 μL) über den in Strömungsrichtung ersten Probenahmepunkt nach dem Säuleneingang und damit direkt in den ersten mit Quarzsand gefüllten Abschnitt. Bis zum 28.2.2022 wurde PCE, sowie im Fall der Kontrollsäule ohne Inokulum und Kohle TCE, cDCE und Ethen, über den der jeweiligen Säule nachgeschalteten Probenahmepunkt zugegeben. Davon wurde jedoch abgegangen, da durch die dem Kohlefenster vorgeschaltete Injektionsstelle potentielle Verluste minimert werden könnten, da die Substanzen unmittelbar im Kohlefenster sorbiert bzw. bereits mikrobiell abgebaut werden können. Die Probenahme für die Analyse der CKW

in der wässrigen Phase erfolgte immer über den der Säule nachgeschalteten Probenahmepunkt.

Bei einem in allen Säulen gleichen und konstanten Fluss von 5 mL min^{-1} löst sich die zugegebene PCE Phase (DNAPL) im wässrigen Medium und wird dabei durch den anschließenden Abschnitt mit Kohlefüllung, den zweiten Quarzsandabschnitt und ins Reservoirgefäß transportiert. Von dort aus re-zirkuliert das gelöste PCE bis es entweder sorbiert oder mikrobiell abgebaut wird. Die Zugabe der mikrobiellen Kulturen (jeweils $500 \mu\text{L}$ Inokulum) erfolgte nach einer Anlaufphase von ca. 2-3 Wochen direkt in den mit Kohle gefüllten Abschnitt. Während der Anlaufphase, in der die Säulen in ein konstantes anaerobes Milieu überführt wurden (Zugabe Reduktionsmittel, pH-Puffer), die hydraulische Funktionstüchtigkeit sichergestellt wurde, die Beprobungsmethodik und das pH bzw. Redox-Monitoring getestet wurde, kam es auch bereits zur ersten PCE-Zugabe. Es zeigte sich, dass es eine ein bis drei Wochen dauernde Anpassungsphase benötigt, um in den jeweiligen, mit unterschiedlichen Kohlen gefüllten, Säulen zu konstanten Bedingungen, die einen anaeroben mikrobiellen Abbau von PCE und PCE-Metaboliten erlauben, kommt. Bereits frühere Publikationen haben auf diesen Umstand hingewiesen und haben darauf hingewiesen, dass bei einem Wechsel von anaeroben zu aeroben und wieder anaeroben die mikrobielle Gemeinschaft derart gestört werden kann, dass es Monate dauern kann, bis sie sich davon erholt (e.g. Amos et al., 2008).

Versuchsaufbau Naphthalin

Abbildung 36 zeigt das Design für den Säulenversuch zum aeroben Abbau von Naphthalin. Der Versuch wird wie für PCE re-zirkulierend über ein Reservoir betrieben. Die Pumprate betrug ebenfalls 5 mL min^{-1} . Das Material der Stopper-Schläuche für die Peristaltikpumpe wurde für die nötige chemische Resistenz gegenüber Naphthalin auf Viton Fluran HCA abgeändert. Die Füllung der Säule mit Kohle erfolgte wieder nur abschnittsweise, jedoch auf Grund der zu erwartenden höheren Abbauraten bei ähnlichen Sorptionskapazitäten, in gesteigerter Mächtigkeit. Im Gegensatz zum Säulenversuch mit PCE entschieden wir uns diesmal dafür das gleiche Kohlenvolumens in die Säulen einzubauen (12 g AC; 5 g W550; 9 g A750). Der Kohlenfüllung vor- und nachgeschaltet waren wieder Quarzsandfenster.

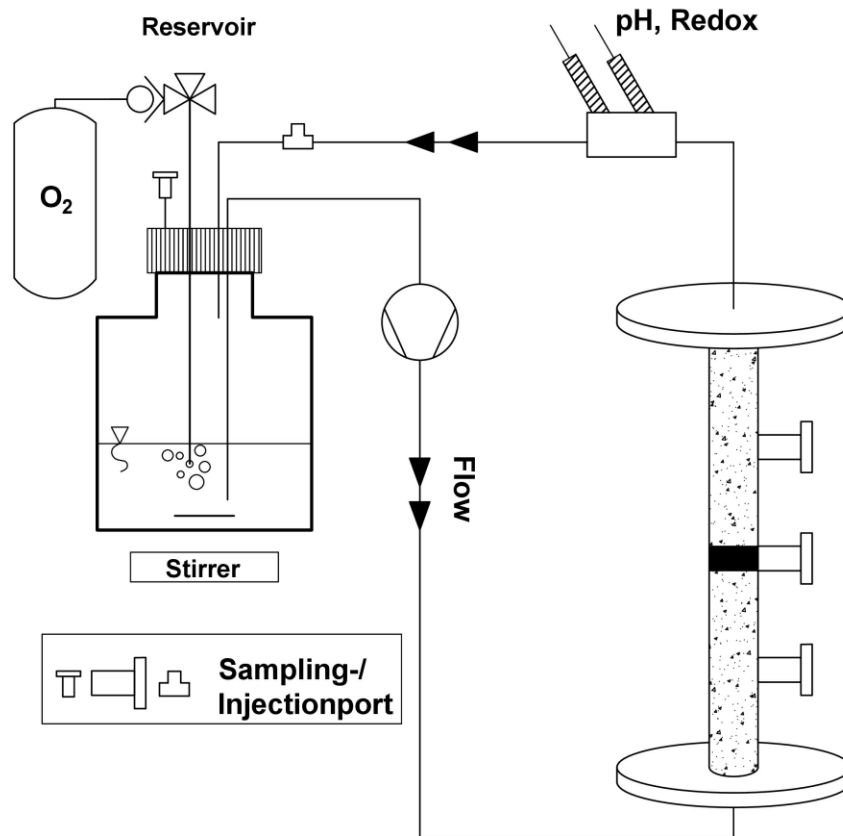


Abbildung 36: Aufbau des Säulenversuch für den aeroben Abbau von Naphthalin

Der Abbau von Naphthalin sollte unter aeroben Bedingungen erfolgen, wofür ausreichend Sauerstoff zur Verfügung stehen muss, da es ansonsten zu anoxischen Verhältnissen kommt, die den aeroben Abbau von Naphthalin zum Erliegen bringen und wiederum die mikrobielle Gemeinschaft schädigen könnten. Aus diesem Grund wurde der Füllstand in den Reservoirgefäßen (wässriges Medium) auf ca. 300 mL reduziert (Abbildung 37), um neben dem gelösten Sauerstoff auch eine 1 L umfassende Gasphase als potentielles Sauerstoffreservoir zu Verfügung zu stellen.

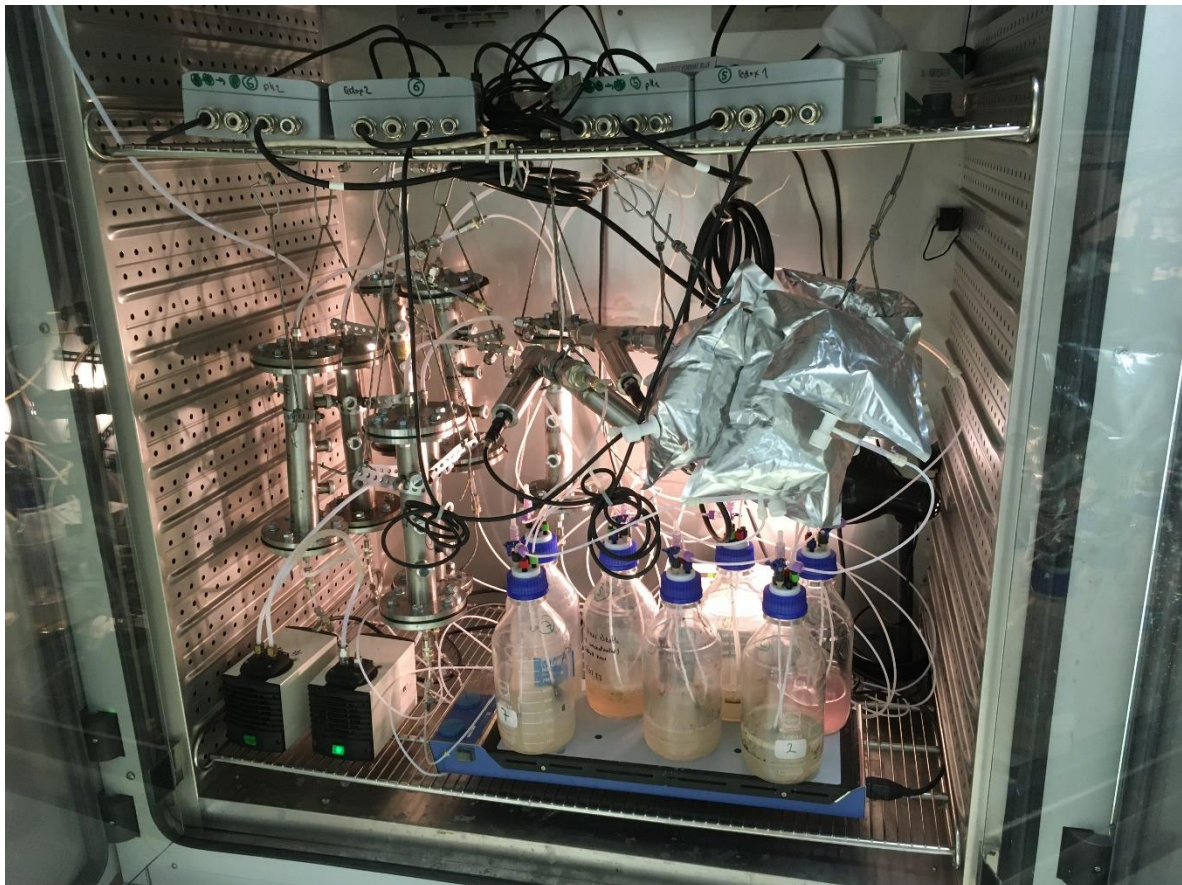


Abbildung 37: Durchführung Säulenversuch NAP

Durch die Versuche in AP 1.6 konnte der beim Einsetzen des Sauerstoff-zehrenden Naphthalin Abbaus entstehende Unterdruck in den Reservoirgefäßen in Abhängigkeit zur Naphthalin-Zugabe bereits gemessen werden. Dadurch war abschätzbar wie viel Sauerstoff bereitgestellt werden musste, um die Säulenversuche kontinuierlich und ohne jegliche Öffnung der Reservoirgefäße betreiben zu können. Im Unterschied zum PCE Säulenversuch wurde dazu eine Schlauchdurchführung, die einerseits bis in das wässrige Medium reichte und anderen Endes an der Außenseite der Verschlusskappe über ein Unterdruckventil (Einweg-Scheiben-Rückschlagventil, weiblich Luer-Lock, Öffnungsdruck ≤ 8 mbar, gefiltert, ABS) mit einem 1 L Gassack (Restek Gas Sampling Bag, Multi-Layer Foil, 1L, 7"x7" mit Polypropylen, gefüllt mit purem Sauerstoff) verbunden war (Abbildung 38). Bei einem Unterdruck von > 8 mbar im Reservoirgefäß konnte dadurch zusätzlicher Sauerstoff einströmen, um die Möglichkeit zum aeroben Abbau von Naphthalin zu gewährleisten.

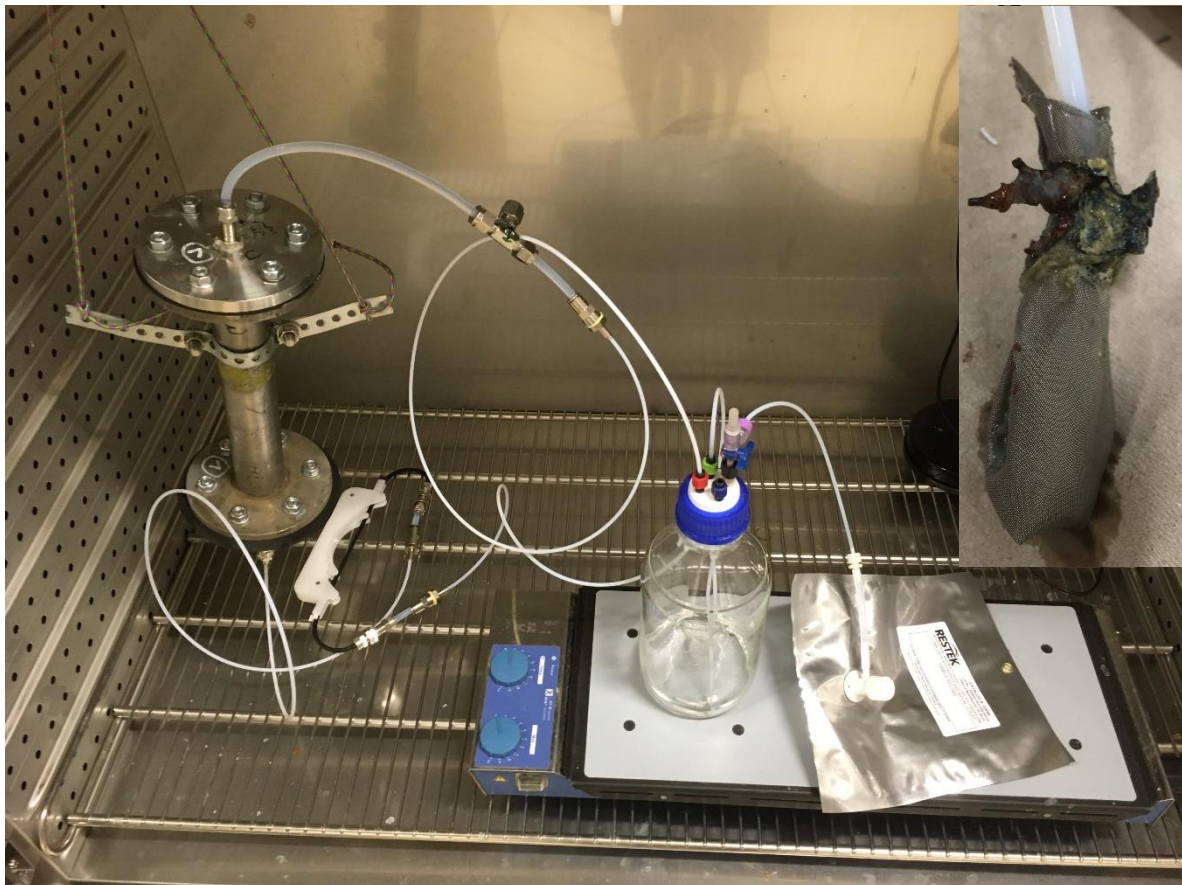


Abbildung 38: Versuchsaufbau Säulenversuch NAP (ohne Säulenfüllung und Sättigung mit aerobem Medium). Rechts oben: nachträglich installierter Einlassfilter vom Reservoir am Ende der Versuchslaufzeit.

Der zweite große Unterschied im Versuchsaufbau stellte der zusätzliche Probenahmepunkt an der Reservoirverschlusskappe dar, der mittels PTFE-beschichtetem Silikonseptum die Entnahme von gasförmigen bzw. wässrigen Proben ermöglichte (Abbildung 36). Für den Säulenversuch standen wiederum sieben Säulen zur Verfügung, wobei bei zwei Säulen kontinuierlich der pH-Wert und das Redoxpotential gemessen und aufgezeichnet wurden. Da im Vergleich zu den anaeroben Säulenversuchen mit PCE nur eine angereicherte mikrobielle Kultur verwendet wurde, konnten je Kohle (AC, W550, A750) zwei Säulenreplikate hergestellt werden und somit die Reproduzierbarkeit der Abbau- und Sorptionsprozesse je Kohle überprüft werden. Als Inokulum wurde die im Uhlik-Medium angereicherte Kultur aus AP 1.6 verwendet. Das Inokulum wurde wieder direkt in den mit Kohle gefüllten Abschnitt injiziert (je 500 μL). Durch die Batchversuche in AP 1.6 wurde, wie erwartet, deutlich, dass die Biofilmentwicklung im Gegensatz zum anaeroben PCE-Abbau als dramatisch einzuschätzen ist und ein Säulen-Clogging zu erwarten ist. Als sich dies während der Durchführung der NAP-Säulenversuche manifestierte und der Fluss durch

manche Säulen kontinuierlich zum Erliegen kam, wurde ein Einlassfilter aus Edelstahl (Maschenweite 0,1 mm) am Schlauch am Reservoirausgang (siehe Abbildung 38) befestigt, der das Clogging-Problem am Säuleneingang beseitigte. Daran anschließend konnte kein Säulen-Clogging mehr beobachtet werden.

Die Wasserlöslichkeit von NAP ist ca. 4-mal geringer als jene von PCE (30 mg L^{-1} vs. 130 mg L^{-1}). Aus diesem Grund wurde die NAP-Zugabe, die wiederum in die Strömungsrichtung erste Sandfenster der Säulen erfolge, mittels Ethanol-Stammlösung (ca. 35 g L^{-1}) bewerkstelligt.

Beim aeroben Abbau von Naphthalin entstehen wie auch beim anaeroben Abbau von PCE zahlreiche Metaboliten (e.g. Mohapatra and Phale, 2021). Aus analytischer Sicht ist das Monitoring von Naphthalin und dessen Metaboliten jedoch deutlich aufwendiger und Ressourcen-intensiver, da nicht alle Substanzen mit der gleichen analytischen Methode gemessen werden können. Des Weiteren sind die beim Abbau von Naphthalin entstehenden Metaboliten zahlreicher, noch schlechter in Wasser löslich und tendenziell umweltschädlicher als ihr Edukt. Daher ist eigentlich nur der vollständige Abbau (Mineralisierung) von Naphthalin zu CO_2 von Interesse. Aus diesem Grund wurde die Analyse von wässrigen Proben aus den Säulen auf die Bestimmung der Kohlen- und Wasserstoffisotopenverhältnisse und des Massengehaltes von Naphthalin beschränkt. Der Nachweis über den vollständigen Abbau von Naphthalin wurde über die Analyse von Gasproben aus dem Reservoir geführt. Dabei wurde das beim Abbau von Naphthalin entstehende CO_2 analysiert. Zwar ähnelt das Kohlenstoffisotopenverhältnis von CO_2 in der Luft ($\delta^{13}\text{C}$ ca. -8‰) nicht jenem das beim Abbau des von uns verwendeten Naphthalins ($\delta^{13}\text{C}$: -26‰) entsteht, jedoch wird neben Naphthalin auch das über die Ethanollösung zugegebene Ethanol ($-14\text{‰} \leq \delta^{13}\text{C} \leq -25\text{‰}$) von den aeroben Organismen verarbeitet. Um das entstehende CO_2 klar von jenem aus Ethanol unterscheiden zu können, wird für die Versuche Naphthalin mit einem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von ca. 60‰ hergestellt (siehe AP 1.5 – Schadstoffanalytik).

Durch dieses sogenannte leichte „labelling“ des Kohlenstoffisotopenverhältnisses von Naphthalin kann sowohl über den vollständigen Abbau von Naphthalin geurteilt werden, als auch die beim mikrobiellen Abbau involvierten Organismen innerhalb ihrer mikrobiellen Gemeinschaft (AP 2.4) deutlicher voneinander abgegrenzt werden.

AP 2.2 – Charakterisierung der Transporteigenschaften

Der instrumentelle Aufbau aus AP 2.1 wurde benutzt, um das konservative Transportverhalten der Biokohlen und der Aktivkohle zu untersuchen. Es wurden Transportdurchgangskurven für reine Aktivkohle, reine W550 und A750 Biokohle bestimmt. Die Ergebnisse des Salztracers zeigten, dass sich Salz v.a. in der Aktivkohle, im Gegensatz zur Biokohle W550, nicht konservativ verhält und mit der Aktivkohle interagiert; in der Biokohle A750 wurde ebenfalls ein leichter aber vernachlässigbarer Einfluss des Salzes auf das Transportverhalten gefunden. Ob dies bei der Aktivkohle zu Beeinträchtigungen bei der Reinigung von Grundwasser führen könnte und das Sorptionsverhalten von Schadstoffen beeinflusst, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Isotopentracers zeigten, dass immobiles Wasser und somit Diffusionsprozesse mehr relevant in der Aktivkohle und W550 als in A750 sind. Leichte Unterschiede in der Dispersivität zwischen den Materialien wurde gefunden, welche aber für eine kontinuierliche Beschickung von Filtern mit Schadstoffgemischen wenig relevant ist.

Versuchsdurchführung und Zielsetzung

Es wurden Tracerversuche in Säulenversuchen (Abbildung 39) durchgeführt, um die Transporteigenschaften der Biokohlen W550 und A750 mit der Aktivkohle AC zu vergleichen. Dazu wurden drei Säulen jeweils mit reiner W550, A750 und AC gefüllt. Kalziumchlorid (CaCl_2) oder Natriumchlorid (NaCl) und deuteriertes Wasser (mit schwerem Wasserstoffisotop (^2H) angereichertes Wasser) wurden als Dirac-Impuls injiziert und die Tracerkonzentrationen am Auslass der Säule bei unterschiedlichen Durchflussraten untersucht. Sowohl die Messung bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten als auch die Nutzung zweier Tracer mit unterschiedlichen Diffusionseigenschaften ermöglicht dabei eine Aussage über immobiles Wasser und somit der Inneraggregatporosität der Materialien zu untersuchen, was später auch entscheidend für den Umsatz von Schadstoffen im Filter sein kann.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass das Verhalten des Salztracers in der AC nicht konservativ, sondern retardierte war (Abbildung 39). Das heißt, dass sich Ionen in einem AC-Filter nicht konservativ verhalten würden und mit der Oberfläche der AC interagieren. Ob das auch das Sorptionsverhalten von Schadstoffen beeinflusst, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden. In der getesteten Biokohle W550 wurde ein solches Verhalten nicht gefunden, sondern Salz und Deuterium verhielten sich sehr ähnlich (Abbildung 39). Dieses Verhalten wurde bei allen getesteten Fließraten von 3.7 ml/min bis 0.37 ml/min gefunden. Bei der Biokohle A750 war der Salztracer bei allen Fließraten schneller als Deuterium. Dies könnte auf Anionenausschluss hinweisen, also einen beschleunigten Transport in der Mitte von Poren aufgrund negativer Ladung an der Oberfläche der Biokohle A750. Ein anderer Grund könnten das nicht konservative Verhalten von Salzen in A750 sein.

Die Ergebnisse von Deuterium, sowohl in der getesteten Biokohle W550 als auch in der Aktivkohle (Abbildung 39), zeigen leichte Unterschiede im Transport bei unterschiedlichen Durchflussraten. Dieses Verhalten (Abnahme der Maximalkonzentration und längeres Tailg mit abnehmender Durchflussrate) zeigt, dass immobiles Wasser -vermutlich verursacht durch die Innerporosität der Materialien- beim Transport eine wichtige Rolle spielen kann in Abhängigkeit der Durchflussraten von Filtersystemen. Je geringer die Durchflussraten, desto höher steigt der Einfluss der Diffusion am Transportprozess von Schadstoffen. Bei der Biokohle A750 wurde ein solches Verhalten nicht beobachtet, so dass hier alle normalisierten Tracerkurven bei unterschiedlichen Fließraten zur selben Zeit zu beobachten sind. Somit wird in dieser Biokohle ein Großteil des Wasservolumens durchströmt, und der Anteil an immobilem Wasser scheint gering zu sein. Auffällig ist, dass die Dispersivität, welche die Breite der Kurve definiert, bei höheren Fließraten höher ist, diese aber normalerweise unabhängig von der Fließgeschwindigkeit sein sollte. Dies könnte auf eine leichte Reduzierung der hydraulischen Leitfähigkeit durch Feinmaterial hinweisen, was allerdings nicht verifiziert werden kann.

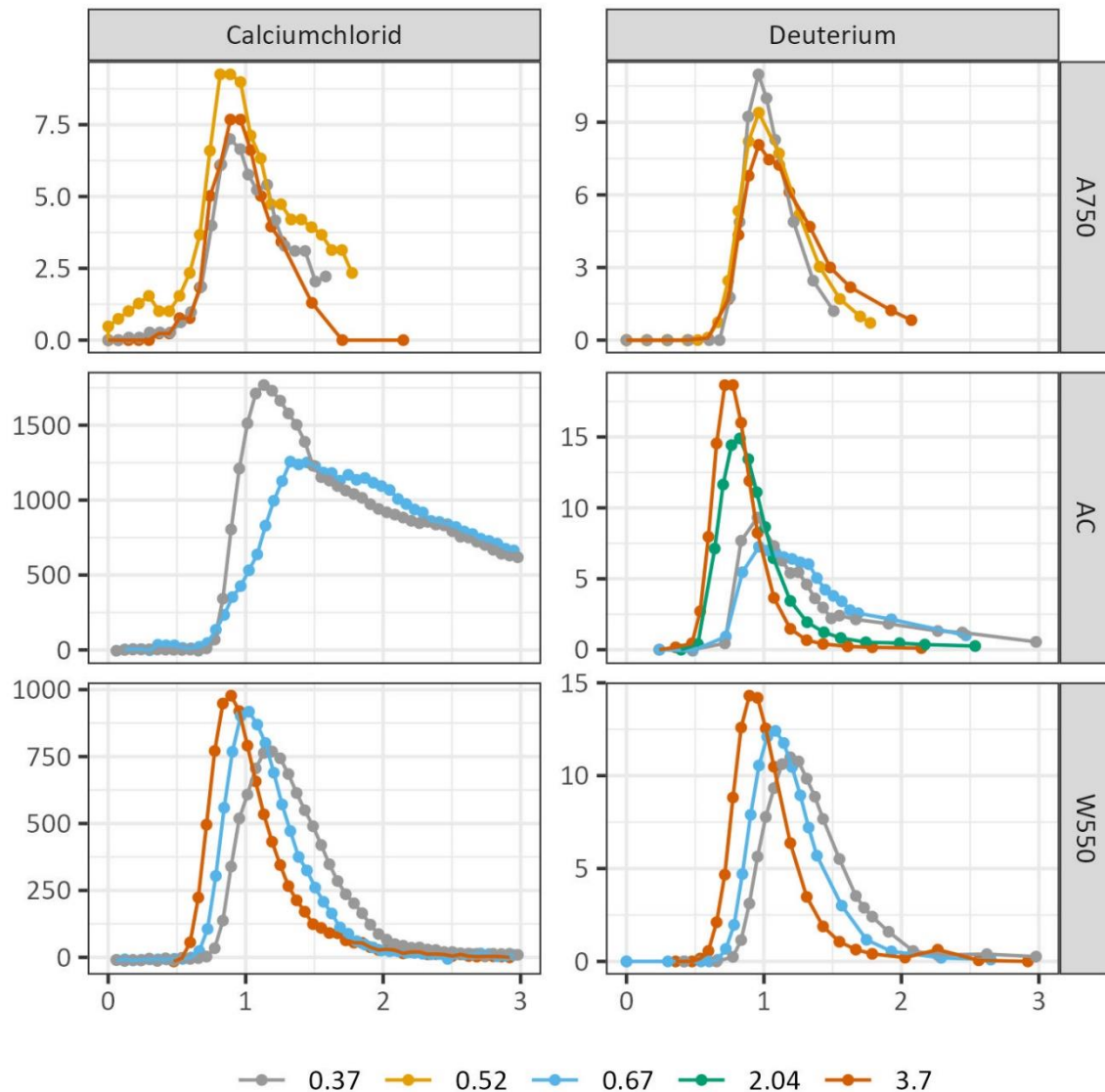


Abbildung 39: Normalisierte Tracerkonzentrationskurven (Calciumchlorid und Deuterium in L^{-1}) der Biokohlen A750 und W550 sowie der Aktivkohle (AC) bei unterschiedlich, farblich gegliederten Durchflussraten ($ml\ min^{-1}$) in Abhängigkeit des ausgetauschten Porenvolumens (x-Achse).

Der Vergleich der normalisierten Deuterium-Kurven in den Biokohlen und der Aktivkohle bei gleichen Durchflussraten lässt keine allgemeine Aussage zum Transportverhalten zu (Abbildung 39). Bei höheren Fließraten ($3.7\ ml/min$) ist die Verweilzeit des Tracers, und somit auch potentieller Schadstoffe, in der Aktivkohle geringer als in den Biokohlen (Abbildung 39). Hier ist die höchste Verweilzeit bei Biokohle A750 gegeben, was aber eben

aufgrund des Einflusses von Feinmaterial begründet sein könnte (siehe oben). Die Dispersivität, also die Variabilität der Fließwege und der Fließgeschwindigkeiten, ist bei der Aktivkohle geringer als bei den Biokohlen, so dass die Tracerkurven eine breitere Verteilung aufweisen. Diese Unterschiede sind bei geringen Fließraten (0.37 ml/min) weniger stark ausgeprägt. Hier ist das Transportverhalten in der Aktivkohle und A750 fast ident. W550 weist einen verzögerten Transport auf und der Schwerpunkt der Kurve liegt deutlich über der Porenvolumen von 1, was auf möglichen Einfluss von Diffusion und somit immobilem Wasser im Material hindeutet.

AP 2.3 – Monitoring – Schadstoffabbau und Sorption

Die Säulenversuche in AP 2.3 stellen den Kern des Projektes CHARBAK da, und dienen dazu die Projekthypothese, dass eine Kombination aus Schadstoff-sorbierenden Biokohlen und Schadstoff-abbauenden mikrobiellen Gemeinschaften dazu genutzt werden können um die Lebensdauer eines z.B. ex-situ Grundwasserfilters zu erhöhen und dessen Betriebskosten zu senken. Die Säulenversuche zum anaeroben Abbau von CKWs (initiale PCE-Kontamination) liefen über eine Gesamtversuchsdauer von ca. 6 Monaten und jene zum aeroben Abbau von Naphthalin (NAP) über ca. 4 Monate. Die Säulen wurden dazu mit den laut AP 1.3, 1.4 und 1.5 ausgewählten und in AP 1.2 produzierten Biokohlen bzw. einer Aktivkohle abschnittsweise gefüllt, mit PCE bzw. NAP kontaminiert, mit den in AP 1.6 angereicherten anaeroben bzw. aeroben mikrobiellen Konsortien inokuliert und das Abbau- und Sorptionsgeschehen, sowie die Parameter pH-Wert und Redoxpotential überwacht. Für beide Säulenversuche konnte ein anaerober Abbau von PCE bzw. ein aerober Abbau von NAP zusätzlich zur Schadstoffsorption an den Kohlen eindeutig nachgewiesen werden. Das jeweilige Ausmaß war abhängig von der Kombination von Kohle und mikrobiellem Konsortium und zeigte die Funktionstüchtigkeit des in diesem Projekt hypothetisierten Biofilters zur Verlängerung der Filterlaufzeit.

Säulenversuch PCE

Der Säulenversuch wurde in einem Klimaschrank bei einer konstanten Temperatur von 25°C in einem mit einer aktiven Luftabsaugung ausgestatteten Raum in Dunkelheit durchgeführt (Abbildung 33). Der Versuch lief von Anfang Dezember 2022 bis Mitte Mai 2023. Details zum Versuchsaufbau und –durchführung finden sich in AP 2.1 – Versuchsaufbau PCE.

Monitoring von pH-Wert und Redoxpotential

Während des Säulenversuchs wurde der pH-Wert und das Redoxpotential (mV_H – vs. H_2 -Elektrode) kontinuierlich am Ausgang von zwei Säulen (je ein Säulenduplikat von A750 und W550) in einer Durchflusszelle mit einem Datenlogger aufgezeichnet (Abbildung 40).

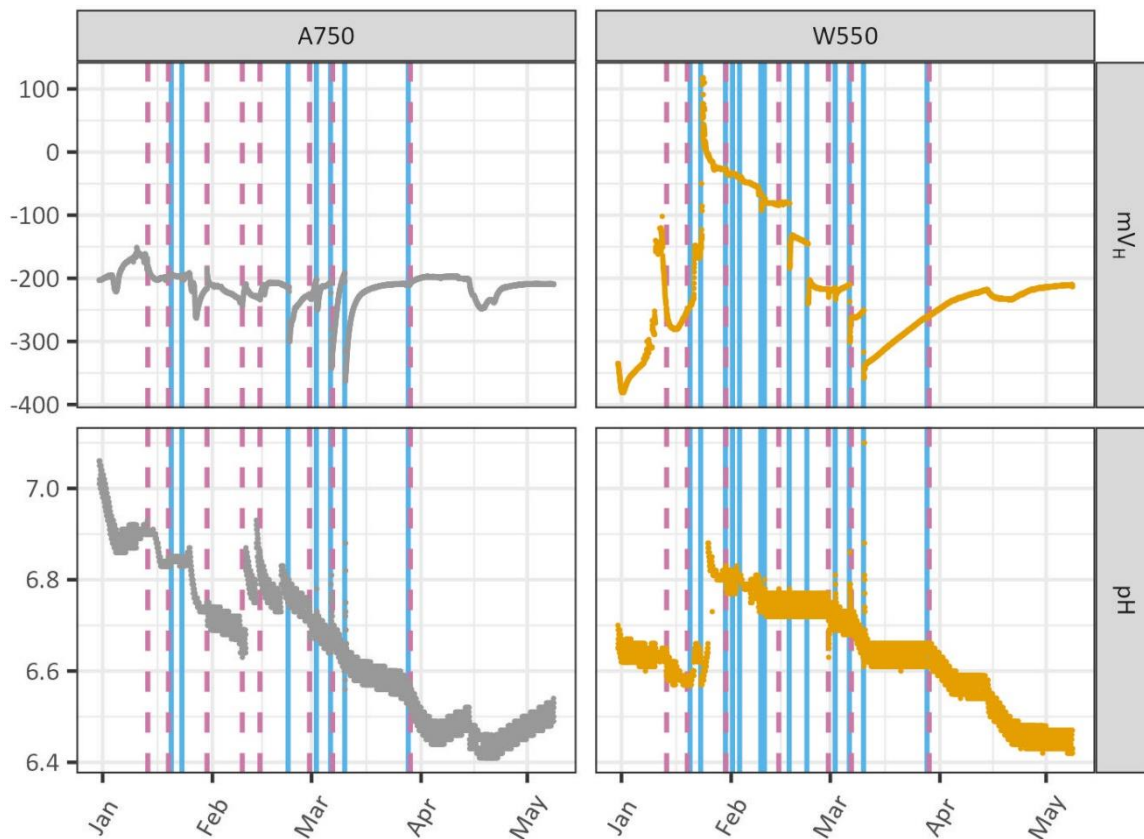


Abbildung 40: zeitlicher Verlauf von pH-Wert und Redoxpotential (mV vs. H_2 -Elektrode) am Säulenausgang von zwei mit Biokohle teil-gefüllten Säulen (A750, W550), die mit dem in-house Inokulum beimpft wurden. Vertikale Linien zeigen eine Zugabe von PCE (violett) bzw. Reduktionsmittel (blau).

Laut Abbildung 40 waren die Redoxbedingungen und der pH-Wert über eine Versuchsdauer von ca. 4,5 Monate fast durchgehend (kurzfristiger Ausschlag beim Redoxpotential (W550) über -100 mV) dafür geeignet CKW (PCE, TCE, cDCE, VC) mikrobiell unter anoxischen Bedingungen abzubauen. Der pH-Wert zeigte zwar eine kontinuierliche Versauerung der Säulen, wobei ein Abfall von 7,0 auf 6,4 den mikrobiellen Abbau von CKW noch nicht zum Erliegen bringen sollte. Das Absinken des pH-Wertes ist aber auch ein potentieller Indikator dafür, dass CKW mikrobiell abgebaut werden, bzw. mikrobielle Aktivität in den Säulen gegeben ist. Während ein Abfall des Redoxpotentials durch mikrobielle Aktivität erklärt

werden können, war der Anstieg des Redoxpotentials höchst wahrscheinlich dem Gasaustausch mit Umgebungsluft inkl. Sauerstoff geschuldet. Die Ursache bzw. der Ort des Gasaustausches konnte leider nicht identifiziert werden, wobei anzumerken ist, dass der Säulenaufbau dicht gegenüber Flüssigkeitsaustritten war. Bei jeder Probenahme für die CKW-Analytik bzw. Zugabe von PCE wurde jeder Säule ein wenig (ca. 50 µL Titan(III)Citrat-Lösung) Reduktionsmittel als Ausgleichsvolumen bzw. zum Spülen der Spritze und der Injektionsstelle zugeführt. Zusätzlich dazu kam es episodisch zu individuellen Zugaben größerer Mengen an Reduktionsmittel (50 – 5000 µL, blaue Vertikalen in Abbildung 40) um ein Redoxpotential < -200 mV zu erhalten.

Die zeitliche Entwicklung des pH-Wertes und des Redoxpotentials in den übrigen fünf Säulen wurde nicht kontinuierlich überwacht. Zwar konnte der pH-Wert über pH-Messstreifen episodisch kontrolliert werden, wobei alle Säulen einen pH-Wert im Bereich von 7,0 – 6,4 aufwiesen, das Redoxpotential konnte jedoch nicht kontrolliert werden. Aus diesem Grund sah das Filterdesign die Verwendung eines Redoxindikators (Resazurin als Bestandteil des anaeroben Mediums) vor. Unter anoxischen Verhältnissen ist dieser farblos und schlägt bei einem Redoxpotential von ca. 0 mV auf rosa um. Leider wurde erst im Rahmen der Säulenversuch mit NAP klar, dass der Redoxindikator von den Kohlen innerhalb weniger Tage vollständig sorbiert wird und damit keine visuelle Kontrolle des Redoxregimes in den übrigen vier Säulen, die mit Kohle gefüllt waren, möglich war. Die Kontrollsäule, die nur mit Quarzsandfüllung und ohne mikrobiellem Inokulum gefüllt war, wobei Resazurin nicht sorbiert wurde, zeigte leider fast kontinuierlich oxische Verhältnisse (rosa gefärbtes Reservoirgefäß der Kontrollsäule (Abbildung 33)), die sich auch nach der Zugabe von Reduktionsmittel rasch wieder einstellten. An der Kontrollsäule wurde im Laufe der Versuchszeit sogar ein Drucktest durchgeführt. Dieser ergab, dass ein Überdruck von 2 bar innerhalb von 24 Stunden im Versuchsaufbau (Säule inkl. Schläuche und Reservoir) gehalten werden konnte und somit theoretisch nur VC und Ethen über einen ausreichend hohen Partialdruck verfügen um den Versuchsaufbau zu verlassen. Schlussendlich wurden alle Verschraubungen zusätzlich mit Sekundenkleber verschlossen, der Erhalt von anoxischen Verhältnissen in der Kontrollsäule war trotzdem nicht möglich. Die Auswirkungen und Implikationen auf die übrigen sechs Säulen blieben ungewiss und werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert. Als Fazit konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass PCE und PCE-Metaboliten während der Versuchslaufzeit über die Gasphase verloren gingen.

Ergebnisse anaerober Abbau PCE

Die Veränderung der Massenkonzentration (in $\mu\text{mol L}^{-1}$) und des Kohlenstoffisotopenverhältnisses ($\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$) von PCE und PCE-Metaboliten (TCE, cDCE, VC, Ethen), wobei PCE, TCE, cDCE und VC unter der Abkürzung „CKW“ zusammengefasst werden, wurde durch die regelmäßige Beprobung (ca. alle 2-3 Tage) und umgehenden Analyse von Proben der wässrigen Phase aus dem Probenahmepunkt nach dem Säulenausgang erfasst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 für den Zeitraum von Mitte Jänner bis Mitte Mai 2023 dargestellt. Die ersten ca. 30 Versuchstage wurden zur Stabilisierung der chemisch/physikalischen Verhältnisse in den Säulen und der Erprobung der Abläufe für das Monitoring des mikrobiellen PCE Abbaus verwendet. Die Zugabe des mikrobiellen Inokulums (500 μL aus den in-house (iH) und kb1 Anreicherungskulturen aus AP 1.6) erfolgte ebenfalls erst nach dieser Probephase.

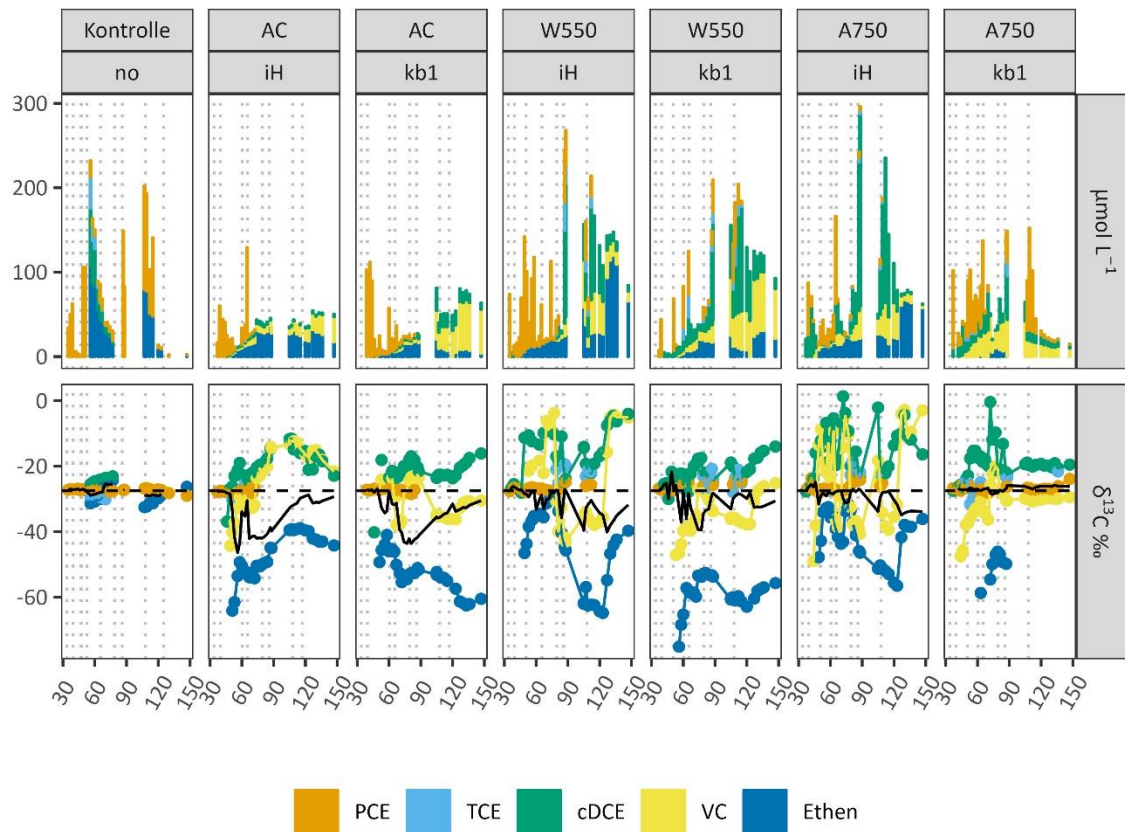


Abbildung 41: Ergebnisse zum Monitoring der sieben Säulen, gefüllt mit Quarzsand (Kontrolle), sowie zusätzlich abschnittsweise mit Kohle (AC, W550, A750). Diese sechs Säulen erhielten zusätzlich ein Inokulum (iH oder kb1). Dargestellt ist die Massenkonzentration in der wässrigen Phase ($\mu\text{mol L}^{-1}$) und das diesbezügliche Kohlenstoffisotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}$ in ‰ von CKWs (PCE, TCE, cDCE, VC) sowie Ethen. Vertikale gestrichelte Linien zeigen den Zugabezeitpunkt von PCE bzw. von PCE, TCE, cDCE oder Ethen im Fall der Kontrollsäule. Die horizontale gestrichelte Linie zeigen den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des zugegebenen PCE. Die durchgehende schwarze Linie zeigt den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Summe an gemessenen CKW und Ethen.

Abgesehen von der Kontrollsäule (Kontrolle) wurde den übrigen sechs Säulen ausschließlich PCE zugeführt, wodurch alle in Abbildung 41 dargestellten PCE-Metaboliten durch Umwandlungsprozesse (z.B. reduktive Dehalorespiration durch anaerobe Mikroorganismen) entstanden sein müssen. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von PCE und PCE-Metaboliten zeigen eine deutlich stärkere Variabilität der Parameterwerte im Vergleich zur Kontrollsäule, welcher neben PCE auch PCE-Metaboliten (Kontrolle für Massenbilanzierung, Austauschprozesse mit dem verfüllten Quarzsand) zugegeben wurde. die starke Veränderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ist in den inokulierten Säulen (AC iH und kb1, W550 iH und

kb1, A750 iH und kb1) ein eindeutiges Indiz dafür, dass die PCE Metaboliten aus dem zugegeben PCE durch Abbauvorgänge (zweifelsfrei mikrobiellen Ursprungs) entstanden sind. Als Grenzwert für die Unterscheidung von Advektion, Dispersion und Sorption, die nur zu einer vergleichsweise geringen Veränderung des $\delta^{13}\text{C}$ -Werte führen können, wird in der Praxis meist ein Grenzwert von $\pm 2 \text{ ‰}$ angesetzt, der in den inokulierten Säulen eindeutig überschritten wird (Hunkeler et al., 2008). In der Kontrollsäule konnte genau das Gegenteil beobachtet werden, da die Veränderung der jeweiligen Stoffkonzentrationen, mit der Ausnahme von Ethen, nur eine geringe Veränderung ihrer $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zeigte (Abbildung 42). Zusätzlich zeigte die Veränderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ein deutliches Muster des sukzessiven mikrobiellen Abbaus von PCE und PCE-Metaboliten, wonach das jeweilige Edukt (zB cDCE) sukzessive weniger negative Werte hatte (^{13}C -Anreicherung) und das dazugehörige Produkt (zB VC) parallel versetzt zum Edukt ebenfalls sukzessive weniger negative Werte zeigte, welche schlussendlich beim Ausgangswert von PCE (gestrichelte Linie in Abbildung 41) endeten (zB Säule AC-kb1, W550-kb1). Alle inokulierten Säulen zeigten die Bildung von Ethen, welches nur bei der vollständigen Dechlorierung von PCE entsteht und aus umwelttoxikologischer Sicht unbedenklich ist. Der Massenanteil von Ethen gegenüber den CKWs zeigte Unterschiede, wobei die Biokohlesäulen W550 und A750 mit dem iH-Inokulum einerseits die höchsten Konzentrationen an Ethen in der wässrigen Phase des Filters besaßen und zweitens auch den vollständigsten Abbau von PCE durch einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert am nächsten zum PCE-Ausgangswert aufwiesen. Im Vergleich dazu war das vorrangige Endprodukt in den Säulen mit Aktivkohle (AC), sowie in Verbindung mit dem kb1-Inokulum (durch die Umstellung des Reduktionsmittels nicht mehr im selben Zustand, als bei Anlieferung durch den Hersteller) Vinylchlorid (VC), das umwelttoxikologisch bedenklicher als PCE, TCE oder cDCE ist und keinesfalls das PCE-Endprodukt in einem Pump&Treat Grundwasserfilter sein sollte. Parallel zu den Säulenversuchen wurden beide Säuleninokula in Batchversuchen, wie in AP 1.6 beschrieben, jedoch ohne Kohlenzugabe, fortgesetzt, wobei dabei beide Inokula den vollständigen Abbau von PCE zu Ethen sowie eine vollständige Wiederfindung der zugegebenen Menge von PCE (gestrichelte Linie) aufwiesen.

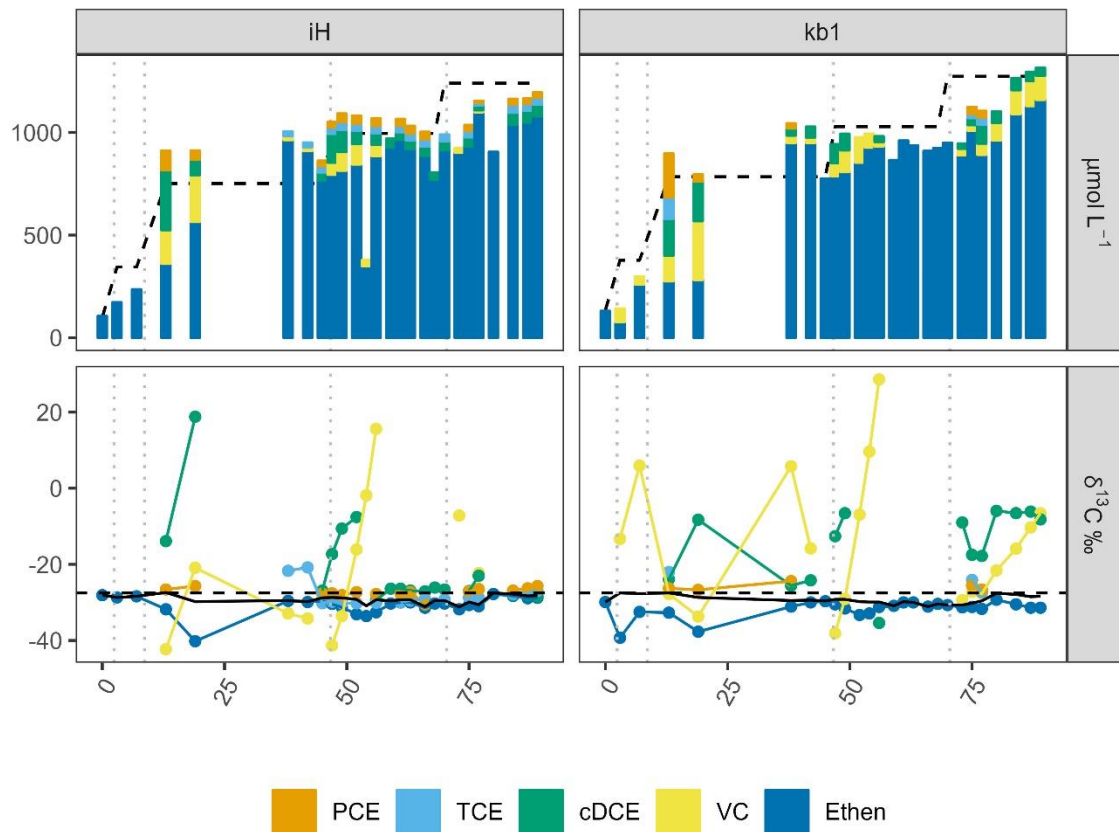


Abbildung 42: Inokula der Säulenversuch, die in einem Batchversuch während des Säulenversuchs weitergeführt wurden und keine Kohle beinhalteten.

In den AC-Säulen (iH, kb1) wurde zwar ebenfalls Ethen gebildet, dessen Massenanteil und vor allem dessen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zeigten jedoch, dass der Abbau von VC und damit die Bildung von Ethen anfangs gleich zu den Biokohlesäulen war, jedoch nach ca. 100 Tagen zum Erliegen kam ($\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ethen blieben auf konstantem Niveau bzw. wurden sukzessive negativer (^{12}C -Anreicherung)). Grund dafür könnten zB unbemerkte Veränderungen in den chemischen Rahmenbedingungen in der jeweiligen Säule gewesen sein (zB nicht ausreichend reduktive Bedingungen für den Abbau von VC zu Ethen, welches im Vergleich zur übrigen PCE-Abbauskaskade das geringste Redoxpotential erfordert), da der pH-Wert und das Redoxpotential nur bei W550-iH und A750-iH kontinuierlich überwacht werden konnten. Als klares Fazit über den vollständigen Abbau von zugeführtem PCE lässt sich festhalten, dass die Biokohlesäulen W550-iH und A750-iH die beste Abbaupformance auf Grund der Analyse von Proben der wässrigen Phase in den Filtern zeigte.

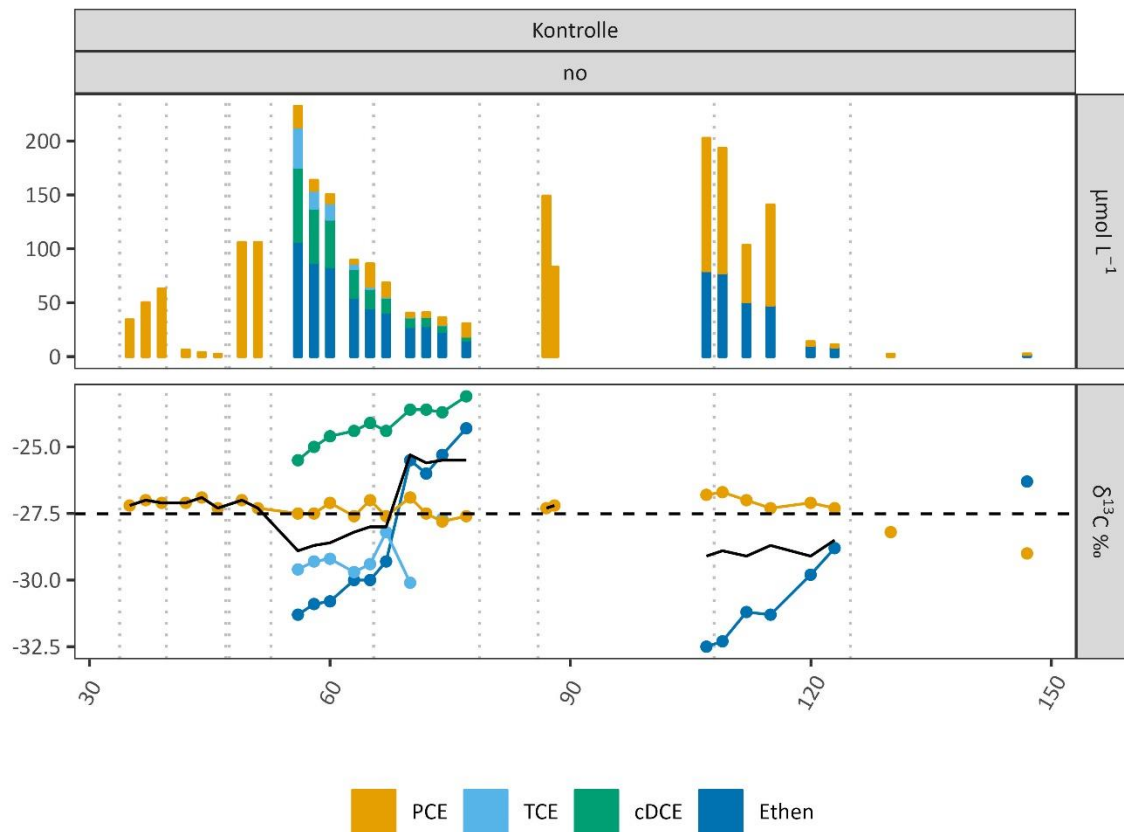


Abbildung 43: Vergrößerung der Ergebnisse der Kontrollsäule (nur Quarzsand, keine Kohle, kein mikrobielles Inokulum) aus Abbildung 41.

Im Vergleich zu den Batchversuchen, war die Massenbilanzierung der PCE-Zugaben in den Säulenversuchen durch die Zugabe von Kohle nicht allein durch die Analyse der wässrigen Phase möglich, da CKW laut den Ergebnissen in AP 1.5 durch alle drei Kohlen sorbiert werden können. Außerdem war der Versuchsaufbau für AP 2.3 im Vergleich zu AP 1.6 deutlich komplexer und stellte uns vor die Herausforderung langfristig anoxische Verhältnisse in kontinuierlich mit rezirkulierendem Filtrat durchströmte Filter zu gewährleisten. Zusätzlich sollte der Aufbau aus Säule, Pumpe, Schläuchen und Kopplungen derart gasdicht sein, um den Verlust der hoch flüchtigen PCE-Metaboliten (VC und Ethen (Partialdruck Ethen: ca. 40 bar)) zu unterbinden. Um die Gasdichtheit zu überwachen bzw. zu eruieren, war die Kontrollsäule nur mit Quarzsand (laut AP 1.5 keine Sorption von PCE und PCE-Metaboliten) und ohne Inokulum hergestellt worden. Leider konnten die dotierten Mengen an PCE, TCE, cDCE und Ethen nur über kurze Zeiträume im Säulenaufbau gehalten werden. Der Grund dafür muss schlussendlich, nachdem sich eine Vielzahl anderer Option als unrealistisch erwiesen, das in der Verschlusskappe des Reservoirgefäßes verbaute Überdruckventil gewesen sein (Abbildung 34). Dieses Sicherheitsventil sollte die Schläuche

der Peristaltikpumpe und den gesamten Säulenaufbau vor Überdrücken schützen, wobei der Öffnungsdruck des Ventils bei einem Differenzdruck von 0.1 bar lag, welcher beim Abbau von PCE zu Ethen rein rechnerisch an Hand des Lösungsgleichgewichtes und des resultierenden Drucks in der Gasphase des Reservoirgefäßes nie hätte erreicht werden können (berechneter maximaler Überdruck: 0,02 bar). Da es keinerlei Flüssigkeitsaustritte im Säulenaufbau gab, alle Materialien CKW nicht sorbieren bzw. laut Hersteller ausreichend chemisch widerstandsfähig sind, war die einzige Erklärung für die erst langfristig erkennbaren Verluste an zugegebenen CKW und Ethen ein kontinuierlicher fugativer Verlust durch die Überdruckventile, die mitunter auch den Zutritt von Umgebungsluft in die Kontrollsäule erlaubten und an der rosa-Färbung des Redoxindikators in der Kontrollsäule, jeweils ca. 24-Stunden nach Reduktionsmittelzugabe, angezeigt wurde. Im Fall der potentiellen Verluste an Ethen würde laut Literatur (Mundle et al., 2012) auch noch die Option bestanden haben, dass das Ethen durch fakultativ anaerobe Bakterien (z.B. *Mycobacterium*) abgebaut worden ist. Diese Option erschien durchaus legitim. Zum Ersten zeigte der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Ethen eine gehaltabhängige ^{13}C -Anreicherung, wodurch ein Anreicherungsfaktor (ϵ in ‰) von -5.7 ‰ (p-value < 0,05) berechnet werden konnte, der ein starkes Indiz für einen Ethen-Abbau ist. Zum Zweiten konnte im Rahmen der DNA-Amplikonsequenzierung von Säulenproben (AP 2.4) das Bakterium *Mycobacterium* nachgewiesen. Da *Mycobacterium* auch in anderen Säulenproben nachgewiesen wurden, könnte auch dort ein Ethen-Abbau stattgefunden haben, welcher aber auf Grund der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ethen, die den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des zugegebenen PCEs nie überschritten (keine ^{13}C -Anreicherung gegenüber dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von PCE (gestrichelte Linie in Abbildung 41)) haben, nur insignifikant gewesen sein kann.

Neben Verlagerungen von gelösten CKW und Ethen in die Gasphase ist die Sorption an den Kohlen ein gewollter Prozess. Mit Hilfe der in AP 1.5 bestimmten Sorptionsparameter einer jeden Kohle und für jedes CKW bzw. Ethen kann die auf Grund ihrer Gehalte in der wässrigen Phase resultierende sorbierte Fraktion berechnet werden. Ist die Sorptionskapazität jedoch derart hoch, dass sie zu Konzentrationen in der wässrigen Phase unterhalb der Bestimmungsgrenze (auf Grund eines versuchstechnischen Limit beim Probenvolumen (10 mL)) führt, kann die sorbierte Fraktion nur über eine direkte Desorption des Kohlenmaterials bestimmt werden, welche am Ende des Säulenversuchs durchgeführt wurde und nachfolgend diskutiert wird.

Desorption CKW aus Säulenversuch PCE

Am Ende des Säulenversuchs kam es zur invasiven (nur nach Öffnung und damit vollständigen Störung der Säulen) Beprobung der Säulen. Es wurde sowohl der Quarzsandabschnitt vor der Kohleschicht, in welchen PCE zwecks Zugabe stets injiziert wurde, als auch die in Strömungsrichtung nachgeschaltete Kohleschicht beprobt um die sorbierte Fraktion an PCE und PCE-Metaboliten zu bestimmen. Extrahiert wurde mit Toluol als Lösungsmittel (in Anlehnung an DIN EN 15527:2009-09, die im Rahmen des EBC-Zertifikates für die PAK-Analytik zur Anwendung kommt (EBC, 2022)).

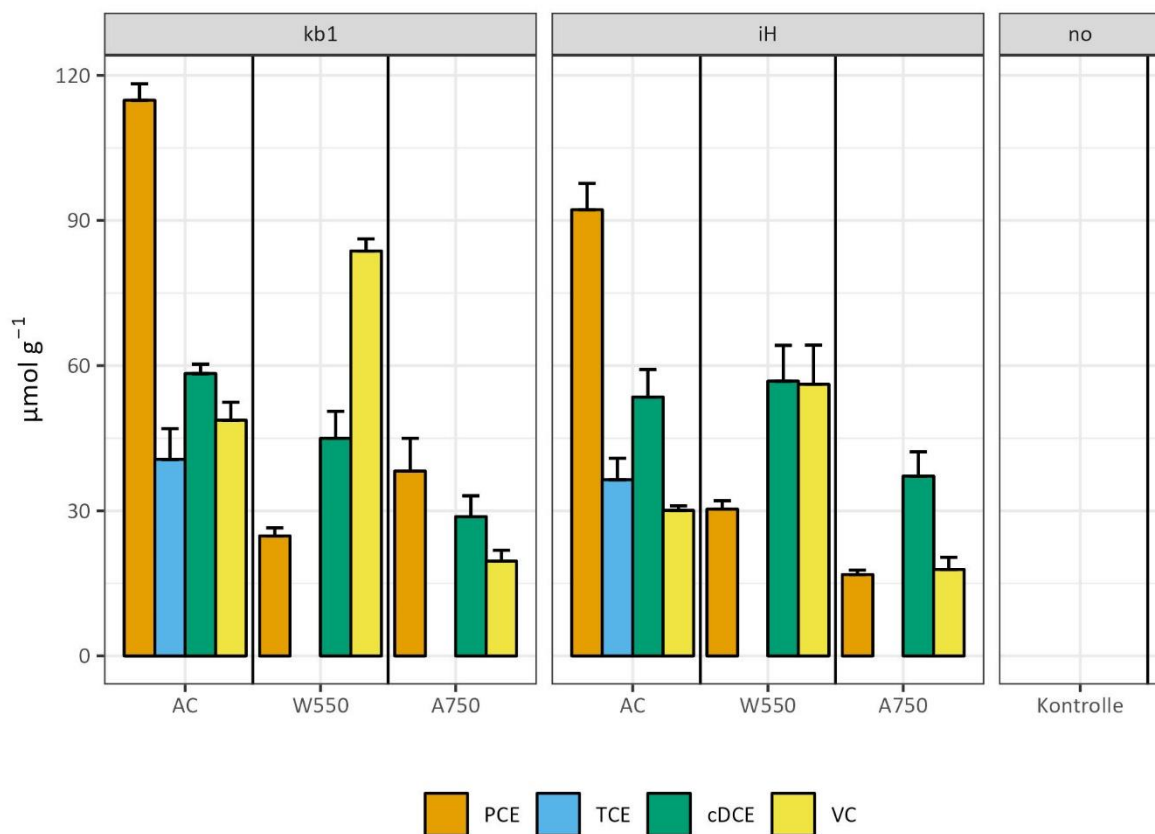


Abbildung 44: Desorbierte CKWs (PCE, TCE, cDCE, VC) in $\mu\text{mol g}^{-1} \pm 1$ Sigma der Messunsicherheit ($n=4$) von Kohlenproben (AC, W550, A750), gruppiert nach Inokulum (kb1, iH, Kontrolle), am Ende des Säulenversuchs für PCE mittels Toluol-Extraktion.

Für die Toluol-Extraktion wurde ca. 1 g nasses Kohlenmaterial bzw. Quarzsand (trocken: 0.2 – 0.6 g) aus den Säulen mit 40 mL Toluol in Glasgefäßen vermischt und für 72 h bei 250 rpm auf einem Orbitalschüttler gelagert. Anschließend wurden die Toluolextrakte mittel Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Um Diffusionsprozesse in und durch das Schlauchmaterial der Peristaltikpumpe im Rahmen der

Ursachenklärung zu den im vorherigen Kapitel besprochenen fugativen Verluste wurden außerdem 1 g des je Säule verwendeten Peristaltikschlauches ebenfalls mit Toluol extrahiert. Leider war es mit der verwendeten Methode nicht möglich sorbiertes Ethen zu quantifizieren bzw. das Kohlenstoffisotopenverhältnis der sorbierten Stoffe zu bestimmen. Im Fall von potentiell sorbiertem Ethen kann jedoch auf Grund der Ergebnisse von AP 1.5 davon ausgegangen werden, dass der Anteil an Ethen im Verhältnis zu den CKWs eher gering ausfällt und für die Massenbilanz keinen signifikanten Anteil an der Sorbat-Gesamtmenge darstellt.

Tabelle 12. Ergebnisse der Toluolextraktion an Kohlen- und Sandproben am Ende des Säulenversuchs mit PCE-Zugabe.

Säule	In Säule g	PCE μmol	TCE μmol	cDCE μmol	VC μmol	Summe μmol	Verhältnis zur PCE- Gesamtzugabe
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0%
AC-kb1	7.5	857	303	435	363	1787	42%
AC-iH	10.4	959	379	556	313	1967	46%
W550-kb1	3.8	93	0	169	315	554	14%
W550-iH	3.6	108	0	203	200	484	13%
A750-iH	9.1	154	0	339	163	577	14%
A750-kb1	9.5	364	0	274	186	687	17%

Die Ergebnisse der Toluolextraktion zeigten, dass weder in den Quarzsandproben, noch in den Proben der Peristaltikschläuche CKW nachgewiesen werden konnten. Hingegen zeigten die Toluolextrakte der Kohlen (Tabelle 12 und Abbildung 44), dass nicht nur zugegebenes PCE, sondern auch PCE-Metaboliten aus dem anaeroben mikrobiellen Abbau durch die Inokula iH und kb1, von den Kohlen desorbiert werden konnten. Auf Grund der Sorptionsparamter, die in AP 1.5 bestimmt wurden, war anzunehmen, dass PCE und TCE maßgeblich auf der AC sorbiert werden sollte, wobei die Sorption von cDCE und VC auf den Biokohlen (W550, A750) ähnlich jener auf der Aktivkohle (AC) sein kann. Dass die Sorptionskapazität der Biokohle W550 sogar jene von AC in Punkte VC übertrifft. Beim

Vergleich von W550-kb1 und AC-kb1 sieht man, dass bei 1/3 der Kohlemenge gleich viel VC sorbiert war und dass bei sehr ähnlichem Gehalt in der wässrigen Phase (Abbildung 41). Dies deutet darauf hin, dass die Sorptionskapazität von VC auf W550 mitunter dreimal so hoch ist, wie jene von AC, wodurch eine Biokohle im Vergleich zur Aktivkohle speziell bei einem unvollständigen PCE-Abbau von VC einen höheren Schutz vor fugativen Emission von VC bzw. ein besseres Retentionsvermögen von VC bietet. Die Gesamtwiederfindung des zugegebenen PCE war in Summe am Stärksten durch die Unterschiede bei der sorbierter Menge an PCE und TCE geprägt, wodurch die Gesamtwiederfindung (Summe desorbierter (gemessen), gasförmiger (berechnet) und flüssiger (gemessen) Fraktion) in den AC-Säulen bei 44-48% und den Biokohlesäulen W550 und A750 bei 17-18%.

Interaktionen von Sorption und mikrobiellem Abbau

Durch die Zusammenschau von Abbildung 41 und Tabelle 12 lässt sich argumentieren, dass eine Kombination aus Kohle und Biofilm (durch Inokulum) eine legitime Option für die Schadstoffentfernung aus kontaminiertem Grundwasser darstellt. Auf Grund der anzunehmenden fugativen Verluste durch die Überdruckventile der Reservoirverschlüsse konnte eine Massenbilanzierung der PCE-Gesamtzugabe zu den Säulen leider nicht geschlossen werden, bzw. der mikrobielle Abbau von Ethen ausgeschlossen werden. Ungeachtet dessen kann durch die Interpretation der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der CKW und Ethen davon ausgegangen werden, dass die mikrobiell verfügbare Schadstofffraktion in den Säulen W550-iH und A750-iH vollständig zu Ethen umgewandelt wurde. Auf Grund der im Vergleich zu Sanierungsvorhaben im Feld eher kurzen Laufzeit der Säulenversuche von einem halben Jahr, bleibt jedoch noch ungeklärt wie verfügbar die sorbierten CKW Fraktionen für den mikrobiellen Abbau sind, speziell, wenn die Schadstofffrachten vergleichsweise gering sind oder nur episodisch auftreten. Inwiefern die mikrobielle Gemeinschaft durch die Art der Kohlen beeinflusst wurden, wird in AP 2.4 behandelt.

Fazit

Der Säulenversuch mit PCE wurde als Erfolg gewertet, da die maßgebliche Hypothese des Projektes, dass durch eine Kombination aus mikrobiellem Abbau und Sorption, die Filterlaufzeit verlängert werden kann, bestätigt werden konnte. Beide Inokula (kb1 (kommerzielle Kultur) und iH (institutseigenes Konsortium, das im Jahr 2014 aus Proben der Altlast Schwertberg gewonnen wurde)) zeigten einen mikrobiellen Abbau von PCE bis Ethen, wobei die Säulen mit iH-Inokulum den Umsatz von Ethen über die gesamte Versuchslaufzeit aufrechterhalten konnte und bei kb1-Säulen PCE nur bis VC abgebaut wurde. Die Frage nach

der am besten geeigneten Kohle lässt sich nicht eindeutig beantworten, da die Aktivkohle-Säulen, eine höhere Sorption von PCE und TCE, jedoch in Vergleich zur Biokohle W550 geringere Sorption von cDCE und VC zeigten und die Frage nach der Bioverfügbarkeit von sorbierten CKW noch ungeklärt bleibt. Auf Grund unserer Ergebnisse würden wir jedoch die Verwendung von Biokohle als Alternative zur Aktivkohle als vielversprechend und empfehlenswert ansehen.

Säulenversuch NAP

Der Säulenversuch wurde in einem Klimaschrank bei einer konstanten Temperatur von 25°C in einem mit einer aktiven Luftabsaugung ausgestatteten Raum in Dunkelheit durchgeführt (Abbildung 37). Der Versuch lief von Oktober 2023 bis Ende Jänner 2024. Detail zum Versuchsaufbau und der –durchführung finden sich in AP 2.1 – Versuchsaufbau Naphthalin. Zusammenfassend wurden sieben Säulen, jeweils zwei Säulen mit den Kohlen AC, W550, A750 und einer Quarzsand-Kontrolle, welche mit dem Inokulum aus AP 1.6 beimpft wurden, aufgebaut. Nach Zugabe von „leicht“ ¹³C-gelabeltem NAP wurde der mikrobielle Abbau und die Sorption unter aeroben Verhältnisse beobachtet.

Monitoring von pH-Wert und Redoxpotential

Während des Säulenversuchs wurde der pH-Wert und das Redoxpotential (mV_H – vs. H₂-Elektrode) kontinuierlich am Ausgang von zwei Säulen (je ein Säulenduplikat von A750 und W550) in einer Durchflusszelle mit einem Datentracker aufgezeichnet und in Abbildung 45 dargestellt.

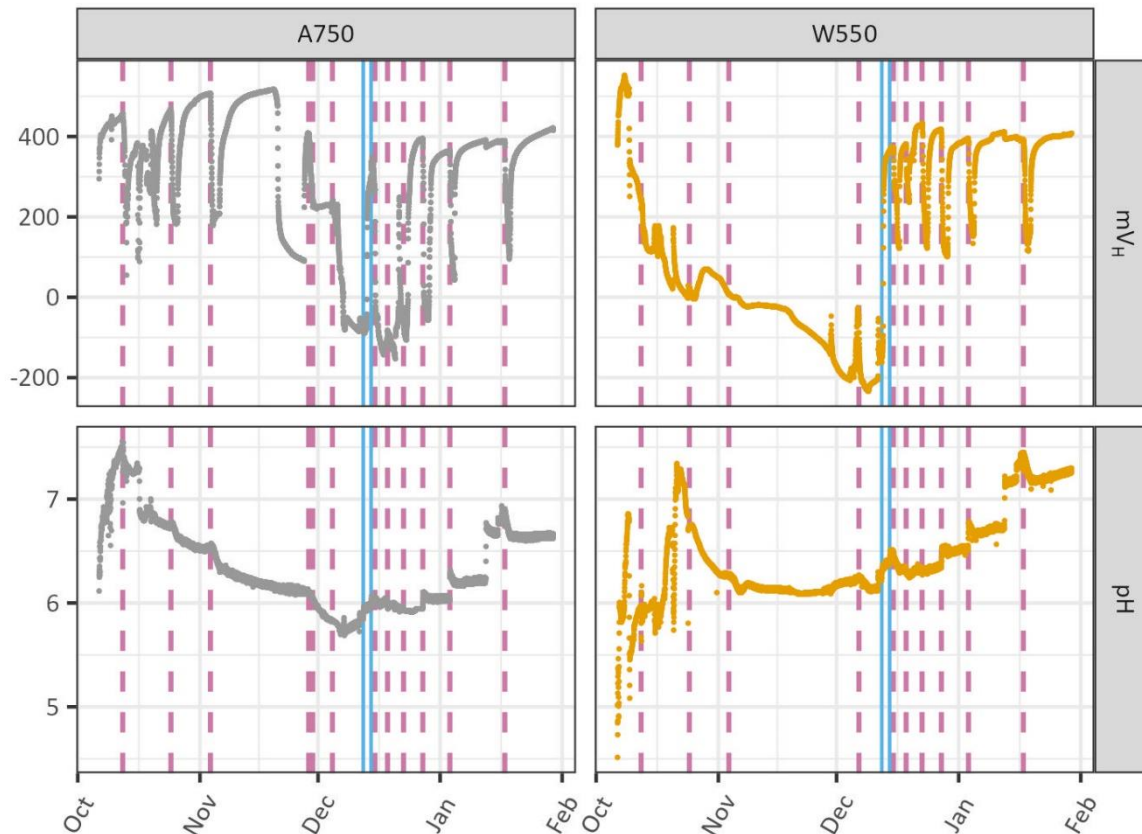


Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf von pH-Wert und Redoxpotential (mV vs. H₂-Elektrode) im Säulenversuch NAP am Ausgang von zwei Säulen (je ein Säulenduplikat von A750 und W550). Vertikale Linien zeigen die Zugabe von NAP (violett) bzw. die Belüftung der Reservoirbehälter je Säule (blau).

Der pH-Wert bewegte sich während der Zugaben von NAP (vertikale violette Linien) im Bereich von 6-7, welcher geeignete Bedingungen für den mikrobiellen Abbau von NAP darstellt. Das nach NAP-Zugabe unmittelbare Absinken und wieder Ansteigen des Redoxpotentials deutete auf eine kurzfristig einsetzende Sauerstoffzehrung hin, welche sich aber durch den laut Säulenversuchsaufbau bereitgestellten Sauerstoff rasch wieder ausglich. Mit NAP und Ethanol (Lösungsmittel für die NAP-Zugabe) wurden mikrobiell leicht verfügbare Kohlenstoffquellen bereitgestellt. Eine Korrelation von Sauerstoffbedarf und einsetzender mikrobieller Aktivität durch den Abbau von NAP und/oder Ethanol lieferte erste Hinweise für einen funktionierenden Biofilter.

Ergebnisse aerober Säulenversuch NAP

Wie bereits in AP 2.1 detailliert dargestellt verlief der Säulenversuch in zwei Etappen. Während in der ersten Etappe die Lösung der Probleme mit Clogging durch das Biofilmwachstum am Säuleneingang, sowie der Etablierung eines Biofilms durch die mehrmalige Zugabe von NAP in einer Ethanol-Stammlösung umfasste, widmete sich die zweite Phase dem Nachweis des mikrobiellen NAP-Abbaus und der Unterscheidung von NAP-Abbau und NAP-Sorption. Der Beginn der zweiten Phase ist durch die vertikalen blauen Linien in Abbildung 45 dargestellt, welche den Zeitpunkt einer initialen Belüftung der Reservoirgefäße markieren. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass das wässrige Medium vollständig mit Luftsauerstoff gesättigt wird und damit in allen Säulen die gleichen Anfangsbedingungen für einen mikrobiellen NAP-Abbau vorliegen.

NAP wurde in einer Ethanol-(EtOH)-Stammlösung zugegeben (geringe Wasserlöslichkeit von NAP, sicherere und exaktere Handhabung als die Zugabe von NAP in kristalliner Form), wobei beide Substanzen eine mikrobielle Kohlenstoffquelle darstellen. Neben dem mikrobiellen Abbau wird NAP zusätzlich auch an den Kohlen sorbiert, somit ist der Nachweis von Abbauprozessen durch die alleinige Analyse der NAP-Gehalten in der wässrigen Phase nicht einwandfrei nachweisbar bzw. stößt an das analytische Quantifikationslimit ($47 \mu\text{g L}^{-1}$). Die Ergebnisse des NAP-Monitorings für alle Säulen ist dazu in nachfolgender Abbildung 46 dargestellt.

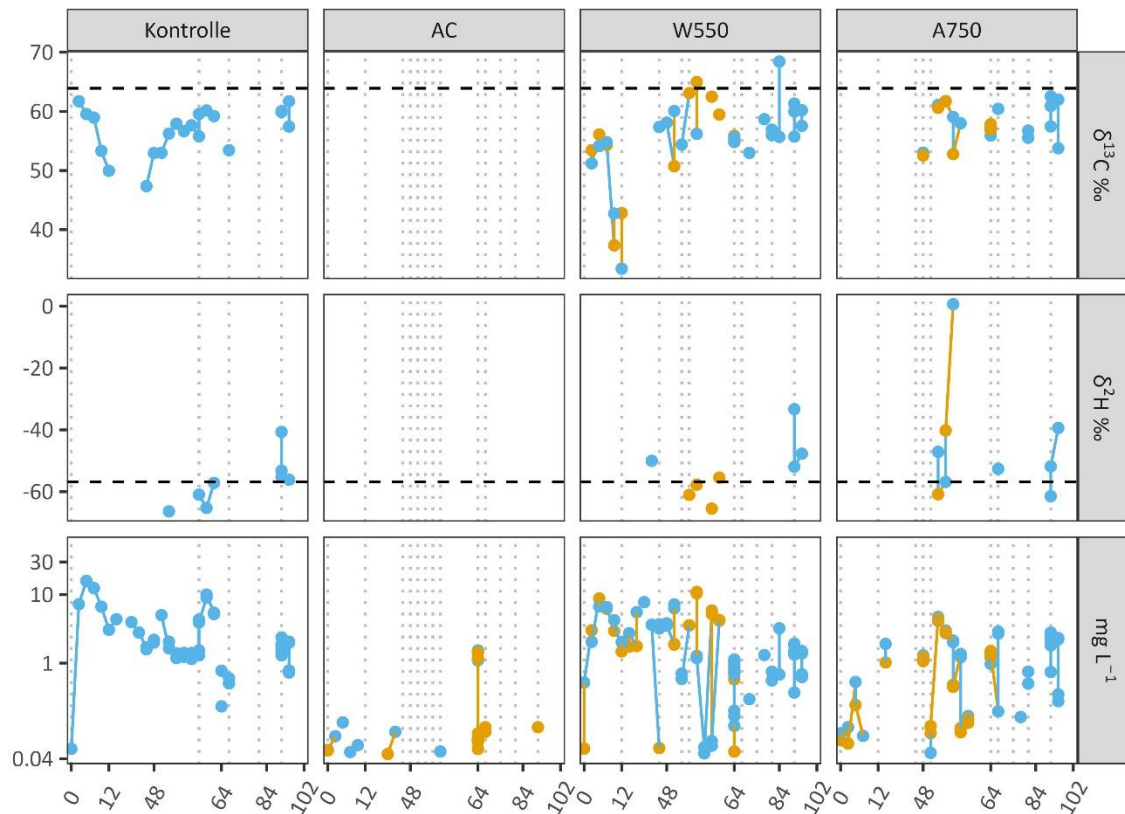


Abbildung 46: NAP-Monitoring im Säulenversuch ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, mg L^{-1}) (y-Achse) mit einer farblichen Trennung der identen Säulenreplikate von AC, W550 und A750, sowie der einfachen Kontrolle ohne Kohle über den Versuchszeitraum von 102 Tagen (x-Achse).

Deshalb wurde die jeweilige Mineralisierung von EtOH und NAP zu CO_2 und damit der dezidierte Nachweis, dass NAP und dessen zahlreiche Metaboliten (Mohapatra and Phale, 2021) vollständig abgebaut wurden, durch die Analyse des in den Säulen entstehenden CO_2 erbracht. Dazu mussten wir jedoch das Kohlenstoffisotopenverhältnis des Ethanols (EtOH) bestimmen und das NAP derart modifizieren (^{13}C -Labeling), um für eine ausreichende Unterscheidung von EtOH ($\delta^{13}\text{C} = -13,7 \pm 0,6 \text{ ‰}$) und NAP ($\delta^{13}\text{C} = +57,8 \pm 0,2 \text{ ‰}$) zu sorgen um das entstandene CO_2 seinem Edukt zuordnen zu können. Anschließend konnte aus der Analyse des entstandenen CO_2 und dessen Kohlenstoffisotopenverhältnis auf den jeweiligen anteiligen Abbau von EtOH und NAP geschlossen werden. Die NAP-Zugabe wurde außerdem derart abgeändert, dass nur einem Säulenreplikat von AC, A750 und W550 in der zweiten Phase NAP in Ethanol verabreicht wurde, während das zweite Säulenreplikat sowie die Kontrollsäule nur Ethanol erhielten. Dadurch konnte auch der Einfluss von NAP auf die mikrobielle Aktivität (wird mehr oder weniger EtOH mineralisiert) untersucht werden,

sowie eine Referenz gegenüber dem kombinierten Abbau von EtOH und NAP geschaffen werden.

Die nachfolgende Abbildung 47 zeigt die Messergebnisse für die letzte NAP-Zugabe im Rahmen des Säulenversuchs am Beispiel jener Säulenreplikate von W550 und A750, bei welchen der pH-Wert und das Redoxpotential kontinuierlich aufgezeichnet wurden. Zusätzlich zeigt Abbildung 48 die NAP-Konzentration und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in der wässrigen Phase für alle Säulen und gruppiert nach Zugabe von NAP+EtOH und nur EtOH. Über einen Zeitraum von 300 Stunden nach der NAP-Zugabe mittels EtOH-Stammlösung lassen sich folgende Sachverhalte feststellen:

- NAP ($\text{mg}_{\text{NAP}} \text{L}^{-1}$) konnte durch qMS-Analysen der wässrigen Phase nur über einen geringen Zeitraum detektiert werden, wobei auch die nominale NAP-Zugabe (horizontale strichlierte Linie) durch zeitnahe Proben nicht nachgewiesen werden konnte (geringe Wasserlöslichkeit, unmittelbare NAP-Sorption an A750 und W550, mikrobieller NAP-Abbau).
- Eine Fraktionierung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses von NAP ($\delta^{13}\text{C}_{\text{NAP}}$ in ‰) konnte beobachtet werden, wobei durch die geringe Anzahl an Datenpunkten ein mikrobieller Abbau anhand der Berechnung von Fraktionierungsfaktoren nicht möglich war.
- Die mikrobielle Aktivität zeigte sich jedoch einerseits durch den unmittelbar nach NAP-Zugabe einsetzenden Abfall des Redoxpotentials (Konsum des gelösten Sauerstoffs) und andererseits durch die Produktion von CO_2 , welches durch den Abbau von NAP bzw. EtOH entstand.

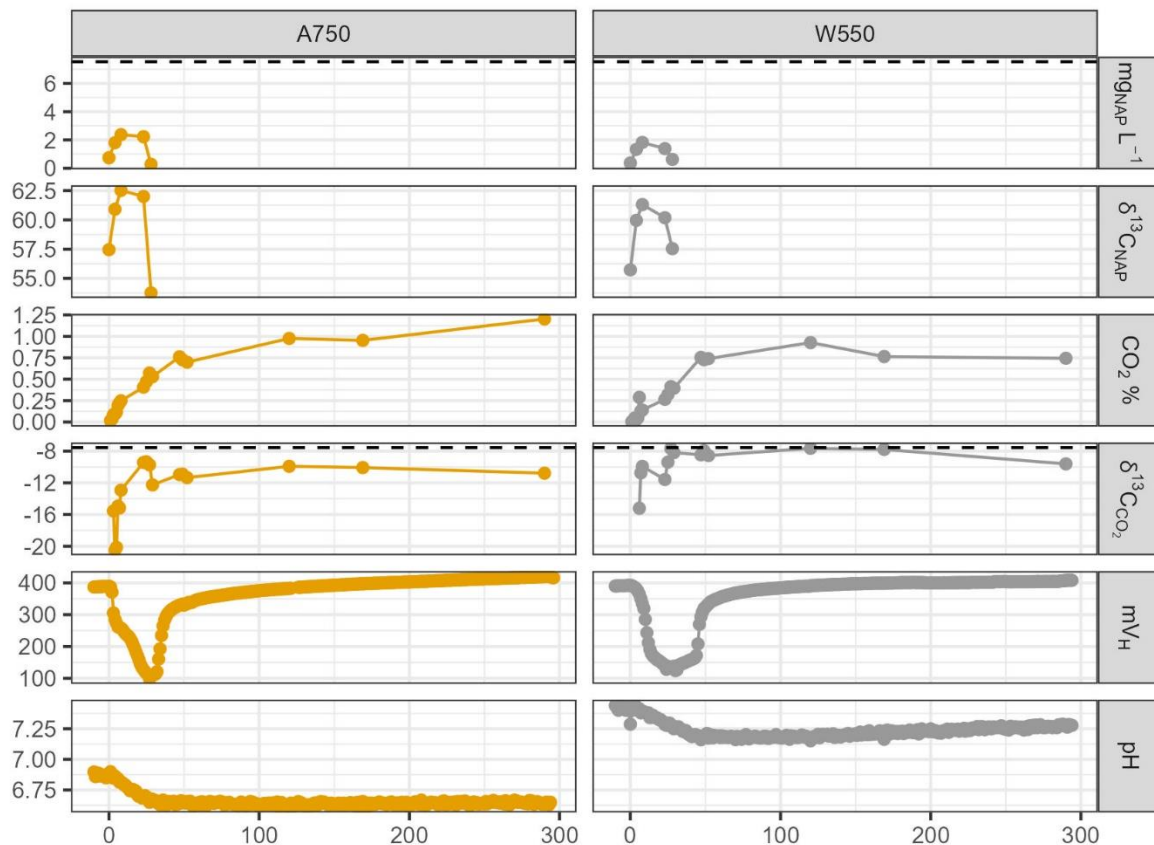


Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf (Stunden) von $\text{mg}_{\text{NAP}} \text{L}^{-1}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{NAP}}$, $\text{CO}_2 \text{ Vol}\%$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, mV_H und pH-Wert nach Zugabe von NAP in EtOH-Stammlösung zu einem Säulenreplikat von A750 und W550 mit mikrobiellem Inokulum. Die horizontale strichlierte Linie zeigt die Sollwerte der NAP-Konzentration laut Zugabemenge bzw. des $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, wenn NAP und EtOH vollständig mineralisiert werden.

- Die Berechnung des NAP-Abbaus anhand des bei der NAP-Mineralisierung entstehenden CO_2 zeigte im Gegensatz zur Berechnung auf Grund des NAP-Konzentrationsverlaufs in der wässrigen Phase eindeutige Vorzüge. Während die NAP-Konzentration in der wässrigen Phase bereits nach ca. 28 Stunden unter das Detektionslimit ($< 47 \mu\text{g L}^{-1}$) gesunken war, zeigte der Konzentrationsverlauf von CO_2 , dass nach 28 Stunden erst ca. 50% des maximalen CO_2 -Gehalts erreicht waren. Dies verdeutlicht, dass die Analyse des NAP-Gehaltes in der wässrigen Phase nicht für die Evaluierung von vollständigem Abbau und/oder Sorptionsprozessen von NAP in einem Biofilter geeignet ist.
- Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des entstandenen CO_2 verlief in Richtung des rechnerischen Sollwertes (Summe von EtOH und NAP), der bei vollständiger Mineralisierung von EtOH und NAP erreicht werden muss.

Ein Nachteil bei der Bestimmung des NAP-Abbaus durch das freigesetzte CO₂ ist, dass der Kohlenstoff aus NAP und EtOH nicht zu 100% in CO₂ umgewandelt wird, da er auch für den Aufbau von Biomasse verwendet wird. Die Ergebnisse der CO₂-Analysen ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ in ‰, Konzentration CO₂ in vol% im Headspace der Reservoirgefäße) der letzten Zugabe (EtOH bzw. EtOH + NAP) für alle sieben Säulen sind in Abbildung 49 dargestellt.

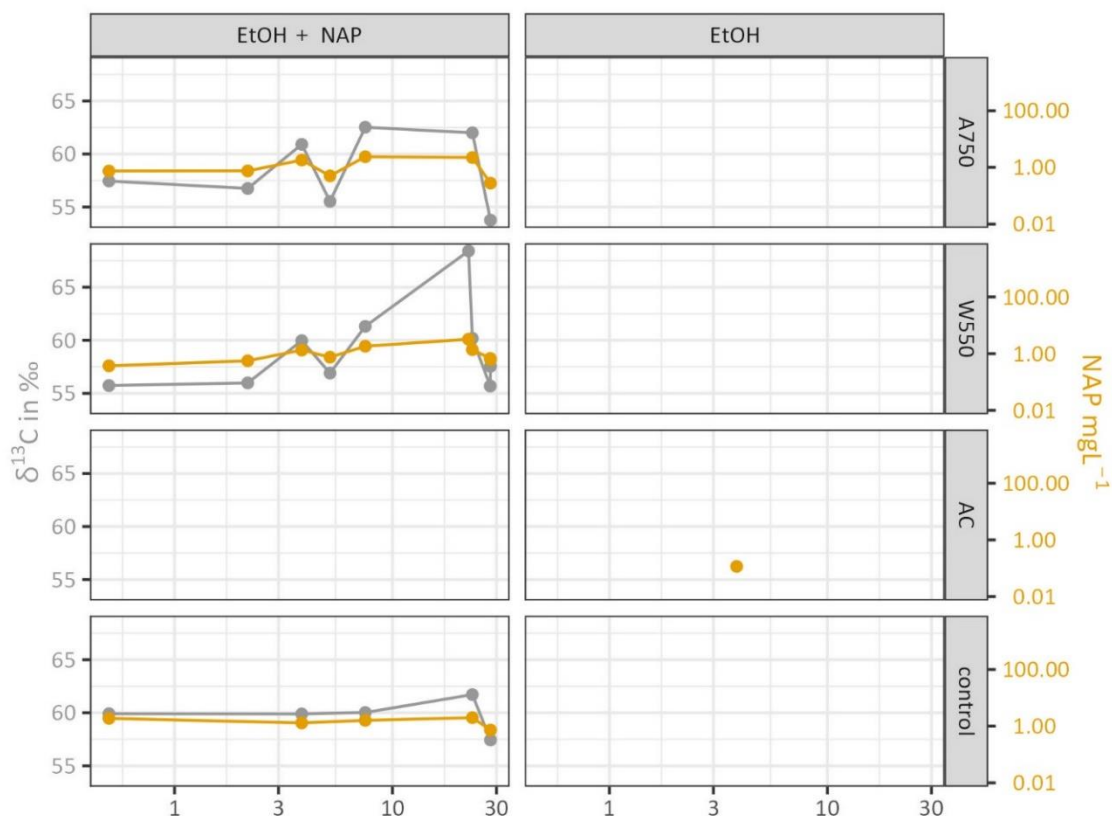


Abbildung 48: Zeitlicher Verlauf (Stunden) der NAP-Konzentration in mg L⁻¹ und des $\delta^{13}\text{C}_{\text{NAP}}$ Wertes in ‰ nach der letzten NAP-Zugabe für die Säulenreplikate von A750, W550, AC und der mit Quarzsand gefüllten Kontrolle, die NAP in einer EtOH-Stammlösung oder nur EtOH erhalten hatten.

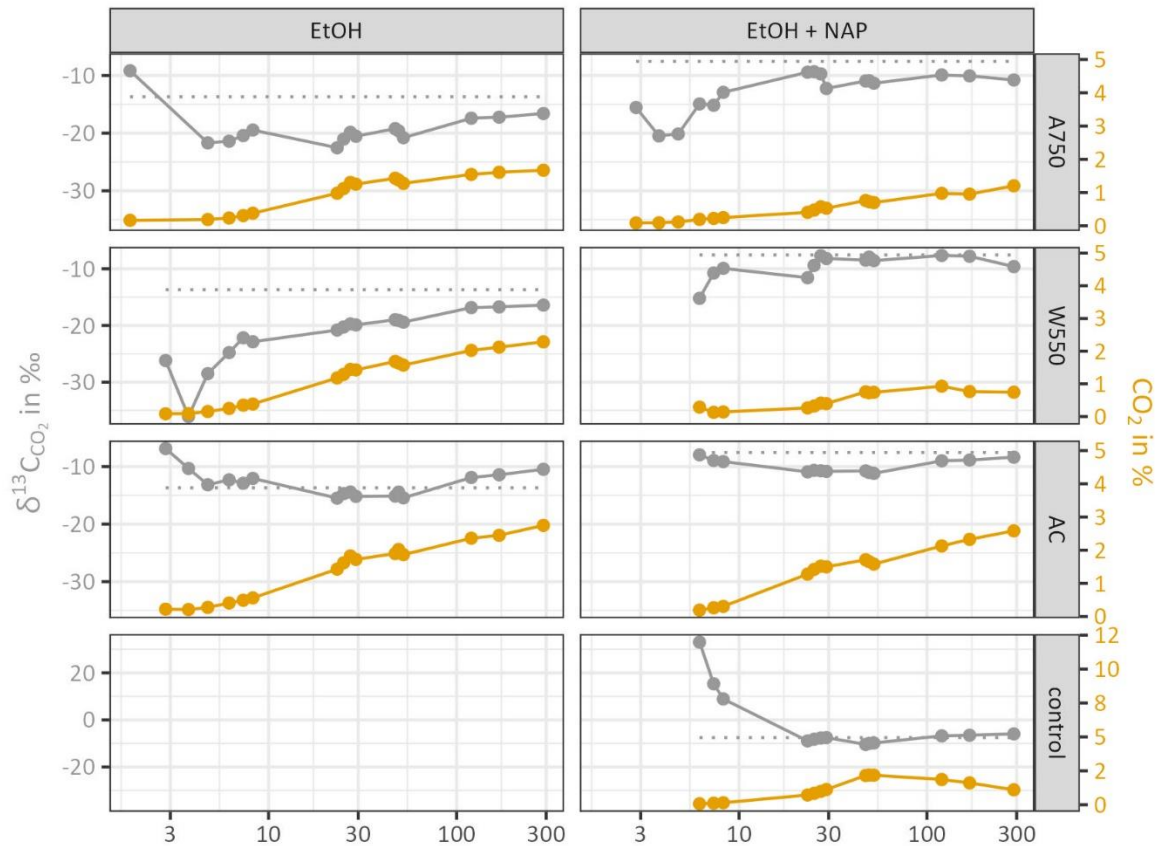


Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf (Stunden) der CO₂ Konzentration in Vol% und des $\delta^{13}\text{C}$ Wertes in ‰ nach der letzten NAP-Zugabe für jene Säulenreplikate von A750, W550, AC und der mit Quarzsand gefüllten Kontrolle, die NAP in einer EtOH-Stammlösung oder nur EtOH erhalten hatten. Die horizontale gepunktete graue Linie illustriert des $\delta^{13}\text{C}$ Wert von Ethanol bzw. NAP in Ethanol an.

Augenmerklich ist die geringere CO₂-Produktion in den Biokohle-Säulenreplikaten (W550, A750) mit NAP+EtOH im Vergleich zur EtOH Zugabe (41% bei W550, 72% bei A750, 94% bei AC). In Anbetracht der bedeutend höheren NAP-Sorptionskapazität der Aktivkohle (AC) und der damit potentiell geringeren mikrobiellen NAP-Verfügbarkeit bzw. Toxizität, könnte die geringere CO₂-Produktion in den Biokohle-Säulenreplikaten darauf hinweisen, dass die Verfügbarkeit von NAP die mikrobielle Aktivität negativ beeinflusste. Da die CO₂-Produktion die gesamte mikrobielle Gemeinschaft, bzw. all jene Organismen, die entweder NAP oder EtOH bzw. NAP und EtOH verwenden können, umfasst, bleibt noch unbeantwortet wie hoch die anteilige NAP-Mineralisierung an der Gesamtmenge Kohlenstoff aus NAP und EtOH war. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zeigten für alle Säulen, eine Entwicklung in Richtung der rechnerischen Sollwerte bei einer 100%igen Umwandlung für das aus NAP und EtOH bzw. nur EtOH entstandene CO₂.

Der NAP Anteil am entstandenen CO_2 wurde über ein einfaches Mischungsmodell berechnet, welches die $\delta^{13}\text{C}$ Werte des CO_2 , sowie des NAPs und EtOHs (Sollwerte laut separater Messung) miteinbezieht und nach einem Gleichgewicht aus der Summe der Produkte von $\delta^{13}\text{C}$ und Konzentration von NAP und EtOH gegenüber dem Produkt von $\delta^{13}\text{C}$ und Konzentration des CO_2 sucht. Zuvor wurde aus dem gemessenen gasförmigen CO_2 Gehalt und Isotopie der im Wasser als CO_2 und HCO_3^- gelöste Anteil berechnet und summiert. Diese Summe war der Eingangsparameter für das Mischungsmodell. Das Lösungsgleichgewicht ist abhängig vom CO_2 Partialdruck und dem pH-Wert der Lösung. Der Partialdruck wurde aus der gemessenen CO_2 Konzentration berechnet. Für die Kontroll- und W550 Säulen wurde der pH Wert 7.2 und für die A750 und AC Säulen der pH Wert 6.6 angenommen. Auch die ^{13}C Fraktionierung des CO_2 während der Lösung wurde berücksichtigt (CO_2 Lösung +1.1 ‰, Bildung von HCO_3^- +7.9 ‰). Die Berechnungsergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt und zeigen, dass der Anteil an umgewandeltem NAP in der Kontrolle am höchsten war, jedoch absolut auf Grund der geringen Menge an produziertem CO_2 von der Aktivkohlesäule übertroffen wurden. Der relativ höhere NAP-Abbauanteil könnte mit dem Fehlen eines Sorbents erklärt werden. Für die mit Kohle gefüllten Säulen zeigte sich, dass in den Biokohlesäulen der NAP-Abbau relativ zur Aktivkohle deutlich geringer war. Ursache dafür muss jedoch nicht zwingend heißen, dass die Biokohlen den NAP Abbau behindern, da NAP nicht zur Energiegewinnung, sondern auch zum Aufbau von mikrobieller Biomasse verwendet werden kann. Dies könnte auch die Ursache dafür sein, dass nur etwa 50-80% des via NAP bzw. EtOH zugegebenen Kohlenstoffs als CO_2 wiedergefunden wurden. Im Fall der Aktivkohlesäule „EtOH“, die trotzdem einen anteiligen Abbau von NAP aufweist, merken wir an, dass in der ersten Phase des Säulenversuchs allen Säulen NAP aus der EtOH Stammlösung verabreicht wurde. Da NAP in der ersten Phase an die Aktivkohle (AC) sorbierte, muss davon ausgegangen werden, dass wenn nur noch EtOH zugegeben wird sich ein Sorptionsgleichgewicht mit der wässrigen Phase einstellt und anteiliges NAP wieder bioverfügbar werden kann. Der Vergleich der mikrobiell zu CO_2 mineralisierten Kohlenstoffquellen (NAP, EtOH) zeigt jedoch deutlich, dass EtOH gegenüber NAP präferiert wird, bzw. die mikrobielle Gemeinschaft eine höhere Aktivität an EtOH-katabolisierenden Organismen aufweist.

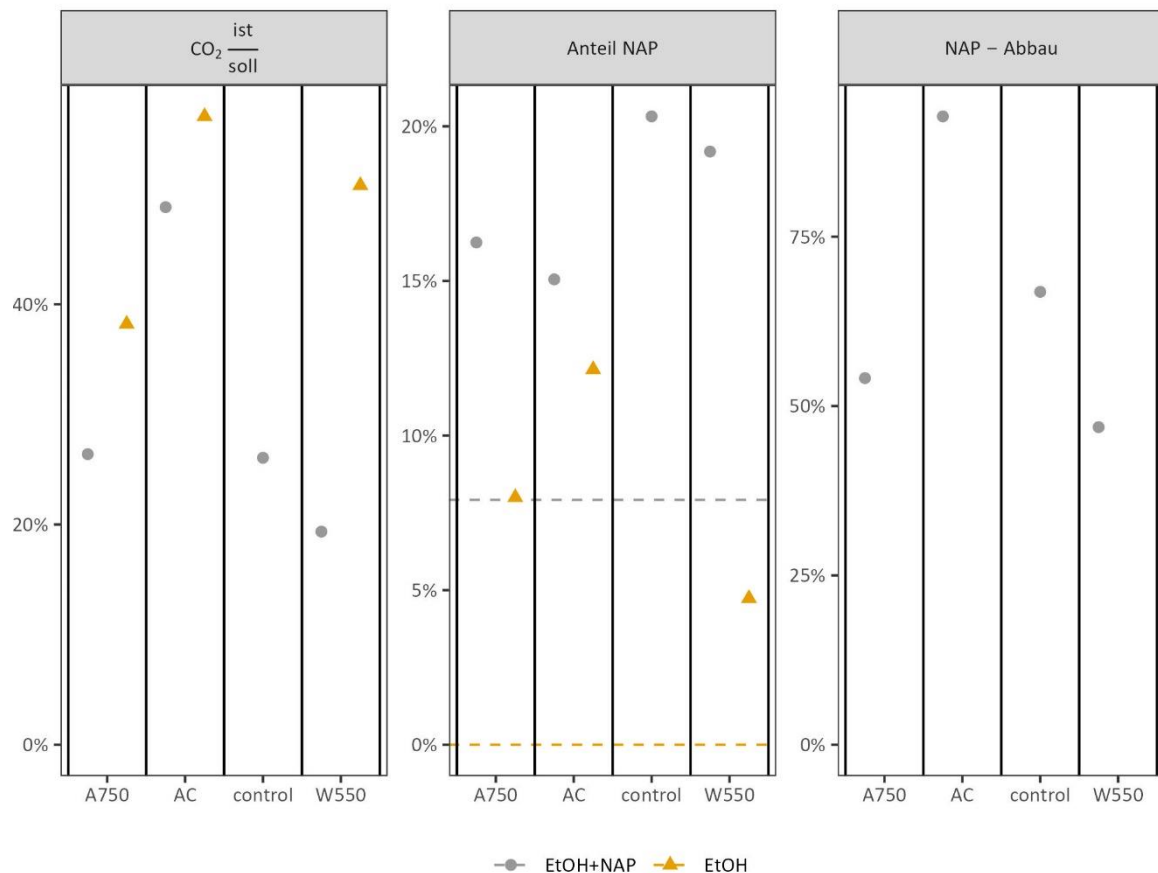


Abbildung 50: Berechnete Anteile von EtOH und NAP im gebildeten CO₂ nach der letzten NAP Zugabe. Dargestellt sind der Anteil an gebildetem CO₂ in Verhältnis zur Kohlenstoffzugabe (EtOH+NAP, EtOH) (CO₂ ist/soll), der molare Anteil von NAP an der Gesamtzugabe aus EtOH und NAP (Anteil NAP) und der Anteil an abgebautem NAP relativ zur NAP-Zugabe (NAP – Abbau). Horizontale strichlierte Linien zeigen den Sollwert laut nominaler Zugabe und Punkte zeigen den berechneten Wert auf Grund der CO₂-Analysen.

Aus der linearen Regression der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und Gehaltsfraktionen (zeitlich sich verändernden Fraktion an NAP bzw. CO₂ relativ zum Maximalgehalt) wurde der Kohlenstofffraktionierungsfaktor (ϵ in ‰) berechnet, der in Punkt Abbauprozesse auf die zu Grunde liegende Abbaukinetik sowie Transportlimitierungen im Abbauprozess schließen lässt. Die Ergebnisse aus Abbildung 51 zeigen, dass sich die Kohlenstoffisotopenfraktionierung bei der Abnahme von NAP in der wässrigen Phase in der Kohlenstofffraktionierung im gebildeten CO₂ wiederfindet. Um den Abbau von EtOH und NAP bei der Zugabe von NAP in einer EtOH-Stammlösung unterscheiden zu können wurde

NAP ^{13}C -gelabelt ($\delta^{13}\text{C}$: +57.8 ‰). Auf Grund dessen kann beim Vergleich der Fraktionierungsfaktoren für gebildetes CO_2 (Gas) klar gezeigt werden, dass NAP zu CO_2 mineralisiert wurde, da diese einen deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen EtOH+NAP und EtOH zeigen, der nur der Mineralisierung von NAP geschuldet sein kann. Im Batch-Versuch wurde noch ungelabeltes NAP ($\delta^{13}\text{C}$: -26 ‰) verwendet, was dazu führt, dass sich die Fraktionierungsfaktoren aus der gleichen Gruppe „EtOH+NAP“ in Richtung der Gruppe EtOH verschieben. Dies liegt daran, weil ungelabeltes NAP ein deutlich ähnlicheres Kohlenstoffisotopenverhältnis im Vergleich zum EtOH ($\delta^{13}\text{C}$: -13.7 ‰) aufweist.

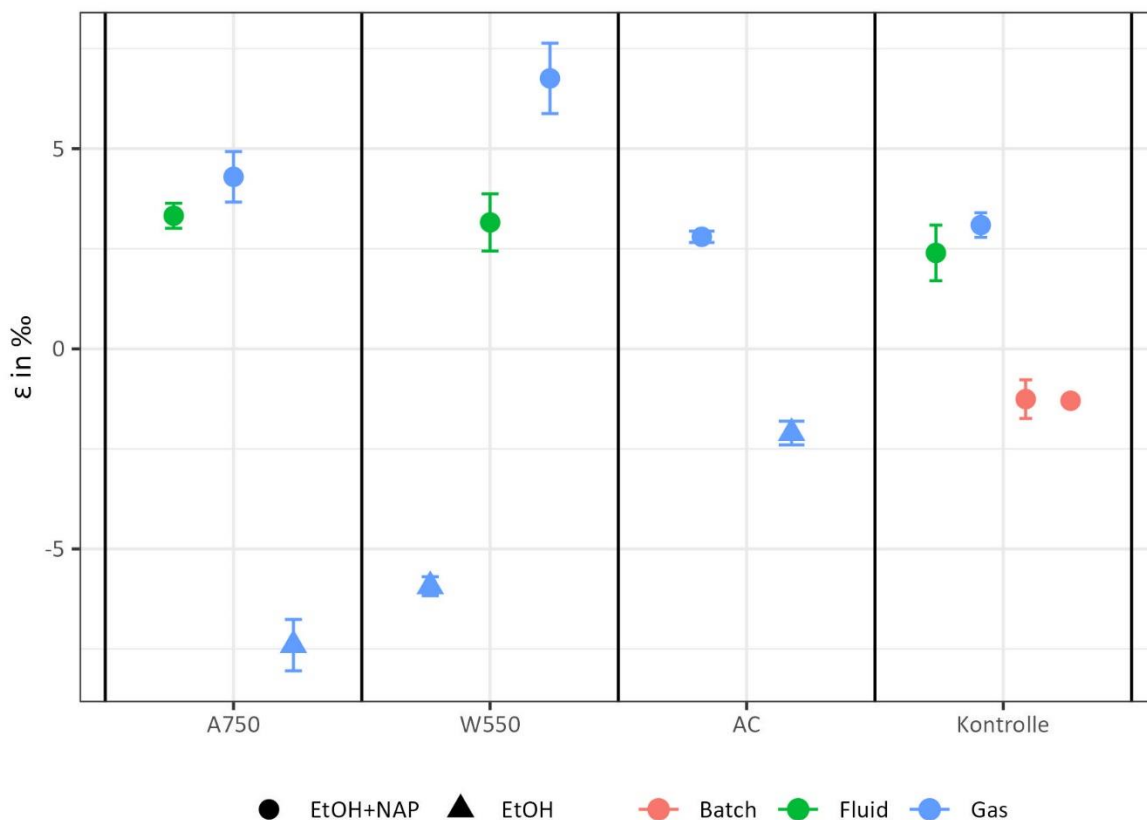


Abbildung 51: Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren (ϵ in ‰) berechnet aus der NAP-Konzentration in der wässrigen Phase im Säulen- und Batch Versuch (Fluid, Batch) und aus dem gebildeten CO_2 im Säulenversuch (Gas). Die Fraktionierungsfaktoren sind gruppiert nach den letzten beiden Zugaben (EtOH+NAP, EtOH), wobei zuvorgehend beide Gruppen EtOH+NAP erhielten.

Die Abbauraten in Abbildung 52 zeigen, dass NAP deutlich schneller in den Biokohlesäulen als in den Aktivkohlesäulen aus der wässrigen Phase verschwindet, was auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit für den mikrobiellen Abbau schließen lassen könnte. Es kann zwar die

mikrobielle Assimilation nicht von Sorptionsprozessen an den Kohlen unterschieden werden, jedoch ist durch die Ergebnisse zur Sorptionskinetik von AP 1.5 bekannt, dass NAP schneller und in höherem Ausmaß an die AC sorbiert, als an die Biokohlen und somit die höheren Abbauraten in den Biokohlesäulen eine bessere Bioverfügbarkeit rechtfertigen könnten. Die Mineralisierung von NAP (Gas) ist deutlich langsamer als die Abnahme von NAP in der wässrigen Phase (Fluid), was durch den schrittweisen Abbau von NAP zu NAP-Metaboliten bis hin zu CO₂ erwartbar ist. Der Vergleich der Abbauraten im Batch- und Säulenversuch (Fluid) zeigt, dass die mikrobielle Aktivität im Säulenversuch höher gewesen sein muss und dass Transport- und Sorptionsprozesse im Säulenaufbau keine negative Auswirkung zu haben scheinen. Werden nur die Bildungsraten von CO₂ betrachtet lässt sich kein Unterschied zwischen dem Abbau von EtOH+NAP und nur EtOH erkennen. Auf Grund dessen ist der EtOH-Abbau maßgebend für die Bildung von CO₂ verantwortlich, was durch das molare Kohlenstoffverhältnis zwischen NAP und EtOH in der zugegebenen Stammlösung (1:40) erklärt werden kann.

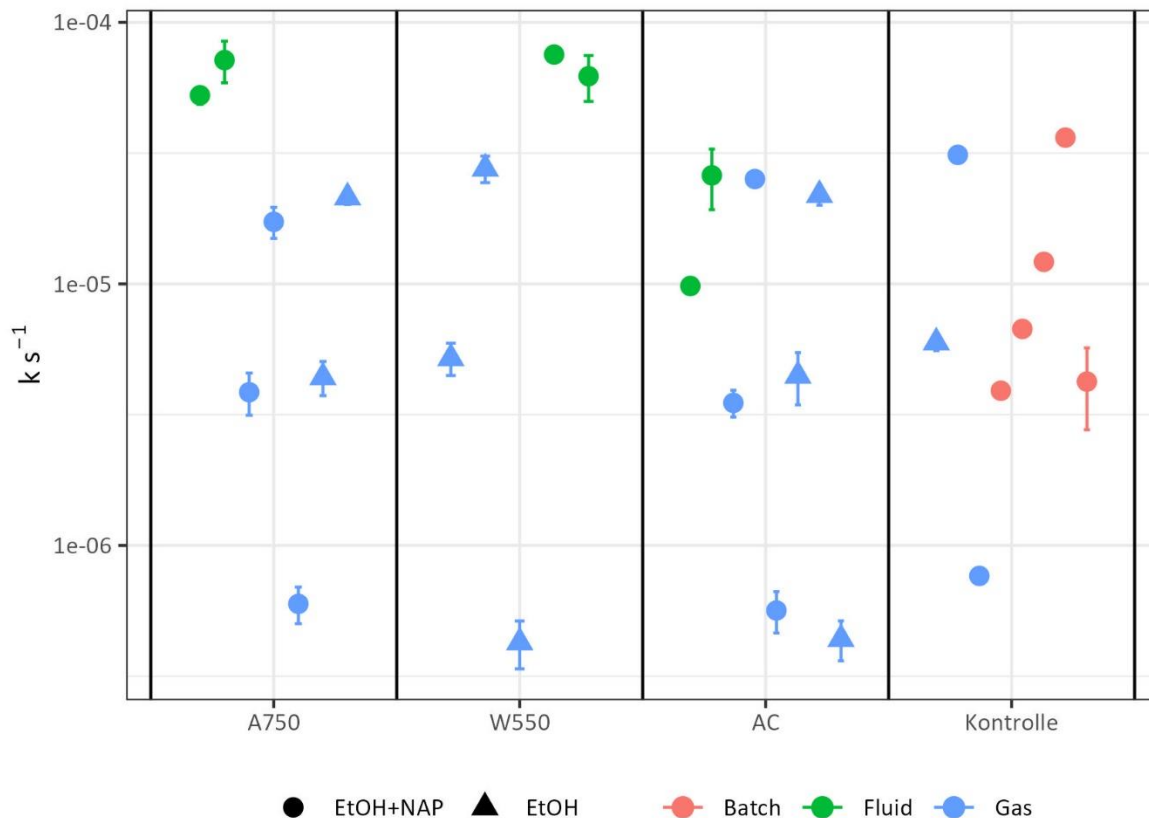


Abbildung 52: Abbauraten (k in s^{-1}) berechnet aus der NAP-Konzentration in der wässrigen Phase im Säulen- und Batch-Versuch (Fluid, Batch) und aus dem gebildeten CO_2 im Säulenversuch (Gas). Die Abbauraten sind gruppiert nach den letzten beiden Zugaben (EtOH+NAP, EtOH), wobei zuvorgehend beide Gruppen EtOH+NAP erhielten.

Desorption NAP aus Säulenversuch NAP

Am Ende des Säulenversuchs wurden Proben aus den Säulen (Sand in, Kohle, Sand out) und den Reservoirgefäßen gezogen. Ein Teil der Probenmenge wurde für die Desorption von NAP mittels Toluol-Extraktion verwendet. Der Ablauf des Desorptionsversuchs war ident zu jenem im Säulenversuch PCE, jedoch gleich die Probenanalyse der für das NAP-Monitoring aus wässrigen Proben. Abbildung 53 zeigt die Extraktionsergebnisse in μmol_{NAP} pro Gramm Feststoff in der Säule bzw. pro mL Medium im Reservoirgefäß. Die Gesamtmengen an Feststoff waren im Abschnitt „Sand in“ und „Sand out“ im Mittel über alle Säulen bei 186 ± 12 g, im Kohlenabschnitt 12.1 g in den AC-Säulen, 5.0 g in den W550 Säulen, 9.0 g in den A750 Säulen und in den Reservoirgefäßen 240 ± 40 mL (Abweichung auf Grund der zwei mit Durchflusszelle ausgestatteten Säulen). Die dargestellten Ergebnisse sind danach gruppiert, ob die letzten beiden Kohlenstoffquellen-Zugaben NAP in der Ethanol-Stammlösung oder

nur Ethanol umfassten. Der erste Blick verdeutlicht, dass NAP maßgebend nur an den Kohlen sorbiert und nicht am Sand oder gelöst in Reservoir vorliegt. Die Aktivkohle zeigte, wie auf Grund der NAP-Isothermen erwartet, die höchste Beladung. Außerdem wird klar, dass NAP auch langfristig an die Kohlen sorbiert, da im Fall der Gruppe „EtOH“ NAP nachgewiesen wurde, trotzdem, dass dieser Gruppe NAP das letzte Mal ca. einen Monat vor Versuchsende zugegeben wurde. Stellt man die absolute Menge an sorbiertem NAP und in ein Verhältnis mit der NAP-Gesamtzugabe während des Säulenversuchs, zeigt die Gruppe „EtOH+NAP“ fast doppelt so hohe Werte wie die Gruppe „EtOH“. Mit dem zusätzlichen Wissen, dass nur ca. 0,4 – 14,0 % der NAP-Gesamtzugabe (W550<A750<AC) am Ende der Versuchslaufzeit sorbiert waren, muss der Hauptteil der NAP-Gesamtzugabe durch die mikrobielle Gemeinschaft assimiliert bzw. abgebaut worden sein. Die Kohlen-spezifischen Unterschiede in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des desorbierten NAP deuten außerdem darauf hin, dass das an den Biokohlen sorbierte NAP biologisch verfügbarer sein könnte, als jenes auf der Aktivkohle.

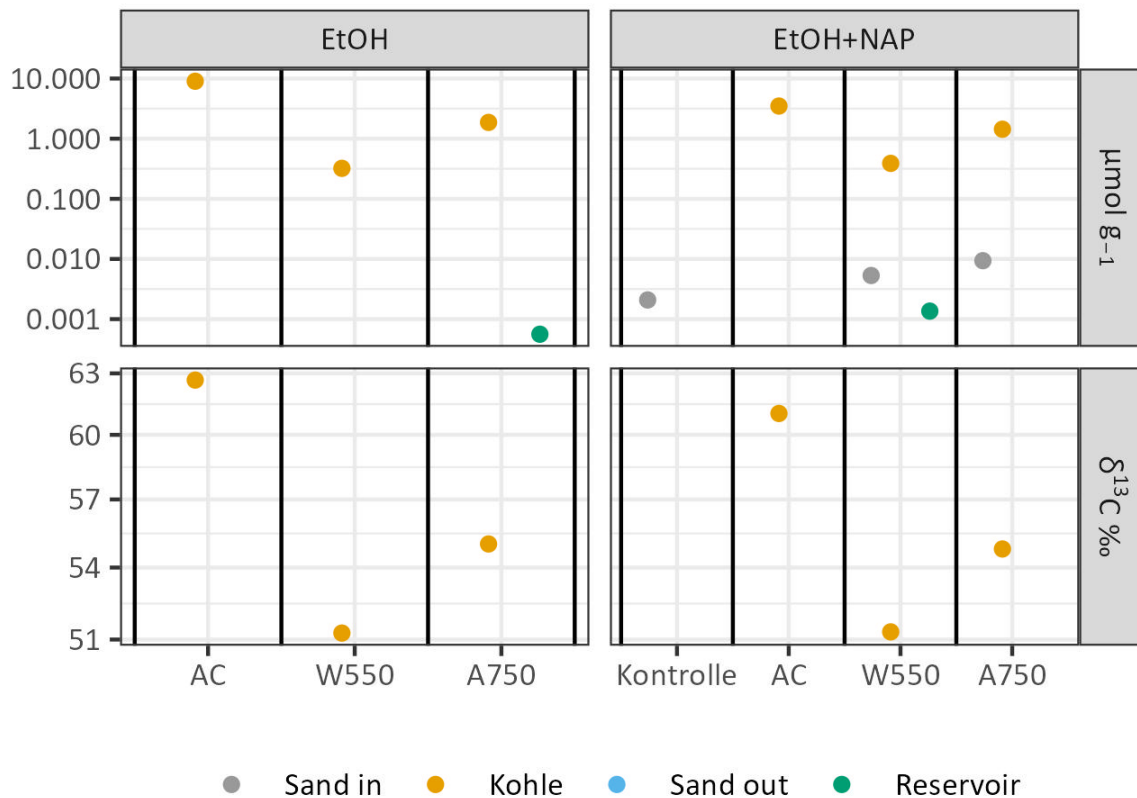


Abbildung 53: Ergebnisse ($\mu\text{mol g}^{-1}$ und ml^{-1} , $\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$) der NAP-Desorption von Proben des Säulenversuchs (Sand in, Kohle, Sand out, Reservoir) entlang des Strömungsweges. Die Säulenduplikate von AC, W550 und A750 sowie die einzelne Kontrolle (Quarzsand) sind nach der Art der letzten zwei Zugaben von entweder NAP in Ethanol (EtOH+NAP) bzw. nur EtOH unterteilt.

Fazit

Der Säulenversuch konnte zeigen, dass NAP durch die zugegebenen mikrobiellen Gemeinschaften unter aeroben Verhältnissen kontinuierlich über eine Versuchslaufzeit von ca. drei Monaten abgebaut werden konnte und dass im Vergleich zu den Säulenversuchen mit PCE Biofilm gebildet wurde. Beim Vergleich Biokohlen mit der Aktivkohle stellte sich heraus, dass die Aktivkohle NAP in höherem Ausmaß retardieren konnte und auch die NAP-Mineralisierung in den Aktivkohlesäulen (inklusive des Reservoirs) am höchsten war. Im Fall von NAP konnte somit ebenfalls gezeigt werden, dass ein zusätzlicher Biofilm in einem Grundwasserfilter die Sorptionskapazität des Filtermaterials durch den Abbau des Sorbats entlastet und zu längeren Betriebszeiten führen könnte.

AP 2.4 – Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften

Im Abschluss an die Batch- und Säulenversuche von AP 1.6 und AP 2.3 wurden die mikrobiellen Gemeinschaften aus der wässrigen und festen Phase extrahiert und mittels 16S-rDNA Amplikonsequenzierung analysiert. Zusätzlich wurde die mikrobielle Biomasse und ihre Kohlenstoffisotopie anhand mikrobieller Phosphorlipidfettsäuren (PLFA) Analyse bestimmt. Somit wurde neben der Identifizierung der maßgebenden Bakterien eine quantitative und funktionelle Betrachtung der mikrobiellen Gemeinschaft erreicht. DNA Analysen der PCE Versuche bestätigten, dass sich sowohl im Batch als auch in den Säulen organo-Halid veratmenden Mikroorganismen (OHRB) etablierten. Die Mikroorganismen besiedeln Biokohlen präferenziell, während die Aktivkohle auf Grund der geringeren Bioverfügbarkeit von PCE gemieden wird. Die mikrobiellen Gemeinschaften wurden durch den Umweltfaktor Kohle bzw. auch durch deren physikalisch/chemische Eigenschaften beeinflusst. Die Etablierung Naphthalin (NAP) abbauender Mikroorganismen in einem aeroben System ist unkompliziert und erfolgt auch spontan (ohne Beimpfung) sofern ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff verfügbar sind. Die lebende mikrobielle Biomasse war in den aeroben Naphthalin Säulen um einen Faktor 4 höher als bei den anaeroben PCE Säulen. Die Verteilung der Mikroorganismen war ähnlich; i.e. stärkere Besiedelung der Biokohle im Vergleich zu der Aktivkohle. Des Weiteren reagieren die Mikroorganismen auf Naphthalinzufuhr mit einer erhöhten mikrobiellen Biomasse und Naphthalineinbau. Mikroorganismen waren auch in der Lage sorbiertes Naphthalin (unter Anwesenheit von Ethanol) umzusetzen.

Mikrobielle Gemeinschaft in den PCE Batch- und Säulenversuchen

DNA-Extraktion, Amplicon-Sequenzierung und Ergebnisanalyse

Für die DNA-Extraktion wurden 1.8 mL wässrige Phase und ca. 0.4 g feuchtes Kohlenmaterial aus den PCE-Batchversuchen und 10 mL wässrige Phase und ca. 0,25 g festes Probenmaterial (Quarzsand, Kohle) am Ende der jeweiligen Versuchslaufzeit geborgen. DNA wurde mittels DNA-Extraktionskit (DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil® Kit, Qiagen, Hillen, Deutschland), laut den Anweisungen des Herstellers, extrahiert und nach Versand an die ISO-akkreditierte Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) analysiert. Unter Verwendung des Primerpaars 341F (5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG'3) und 805R (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC'3) wurden die speziesspezifischen V3 und V4 Regionen der 16S-rRNA der DNA-Proben einer PCR unterzogen und nach Illumina MiSeq V2 Sequenzierung (2x 250 bp Amplikons) durch die gewonnenen Reads der Amplicon-Basensequenzen durch die firmeneigene Bioinformatik bis auf Spezies-Ebene klassifiziert. Die Klassifizierung der Amplikonsequenzen zur Bestimmung der vorhandenen Organismen erfolgte durch die Verwendung der Datenbanken SILVA und RDP, wobei auf Grund der maßgeblich in der Literatur verwendeten Datenbank für die Untersuchung der Organismen beim anaeroben PCE-Abbau die Sequenzierungsergebnisse jene laut Datenabgleich mit SILVA darstellen. Der Vergleich der Ergebnisse laut SILVA und RDP Datenbankenabgleich diente vorrangig der Identifikation und Exklusion von potentiell ominösen Treffern in den Datenbanken und sollte dadurch die Qualität der Daten für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften verbessern. Da die DNA-Sequenzierung unmittelbar nach dem jeweiligen Versuch durchgeführt wurde und damit die Proben der Batchversuche nicht gemeinsam mit den Proben der Säulenversuche sequenziert und gemappt wurden, kam es nach einem ersten Vergleich und einigen Ungereimtheiten bei den Genus-Zuordnungen (*Dehalogenimonas* sp. vs. *Dehalogenimonas* sp.) zu einer von uns neu-beauftragten Bioinformatik durch Microsynth, bei welcher die Amplicon-Daten beider Versuche gemeinsam und mit verschiedenen Datenbanken (SILVA, RDP) ausgewertet wurden. Dieser zusätzlich vergebene Auftrag konnte einige anfängliche Ungereimtheiten beseitigen und lieferte eine homogene Datengrundlage für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften.

Die durch Microsynth bereitgestellten Daten wurden anschließend wie folgt weiter ausgewertet:

- Filterung aller OTUs (operative taxonomic unit) mit einer Signifikanz in der Genus-Zuweisung von >95%
- Vereinigung aller OTUs auf Genus-Ebene
- Filterung aller Genera, die über einen anaeroben, fakultativ anaeroben oder obligat anaeroben Stoffwechsel verfügen (lt. <https://bacdiv.dsmz.de>) und laut Literatur mit dem anaeroben Abbau von PCE in Verbindung gebracht wurden (Atashgahi et al., 2016).

Die gefilterten Daten wurden anschließend auf deren statistisch signifikante ($p < 0,05$) Abhängigkeit von Umweltparametern (Kohle, Inokulum, Probenahmepunkt, ...) untersucht und die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften verglichen. Dafür wurde für jede Ebene im phylogenetischen Stammbaum (Domain, Kingdom, Phylum, Class, Order, Family, Genus) und zwei weiter gefilterte Datensätze (alle Genera, die bekanntermaßen Organohalide veratmen können bzw. nur die Genera *Dehalogenimonas* und *Dehalococcoides*) eine Analyse der Varianzen (ANOVA) der Hauptkomponente mit dem höchsten relativen Eigenwert laut PCoA (principle coordinate analysis) durchgeführt.

Ergebnisse DNA-Analyse

Sowohl im Batchversuch, als auch im Säulenversuch enthielt das kb1 und iH Inokulum nicht nur Bakterien, sondern auch Vertreter aus der Domäne der Archaeen (*Methanoregula*), wobei die Bakterien auf Genus-Ebene mit 13:1 dominierten. Auf Genus Ebene konnten die Bakterien *Acinetobacter*, *Azospira*, *Azospirillum*, *Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas*, *Desulfitobacterium*, *Desulfosporosinus*, *Desulfovibrio*, *Lativibrio*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* und *Sphaerochaeta* identifiziert werden.

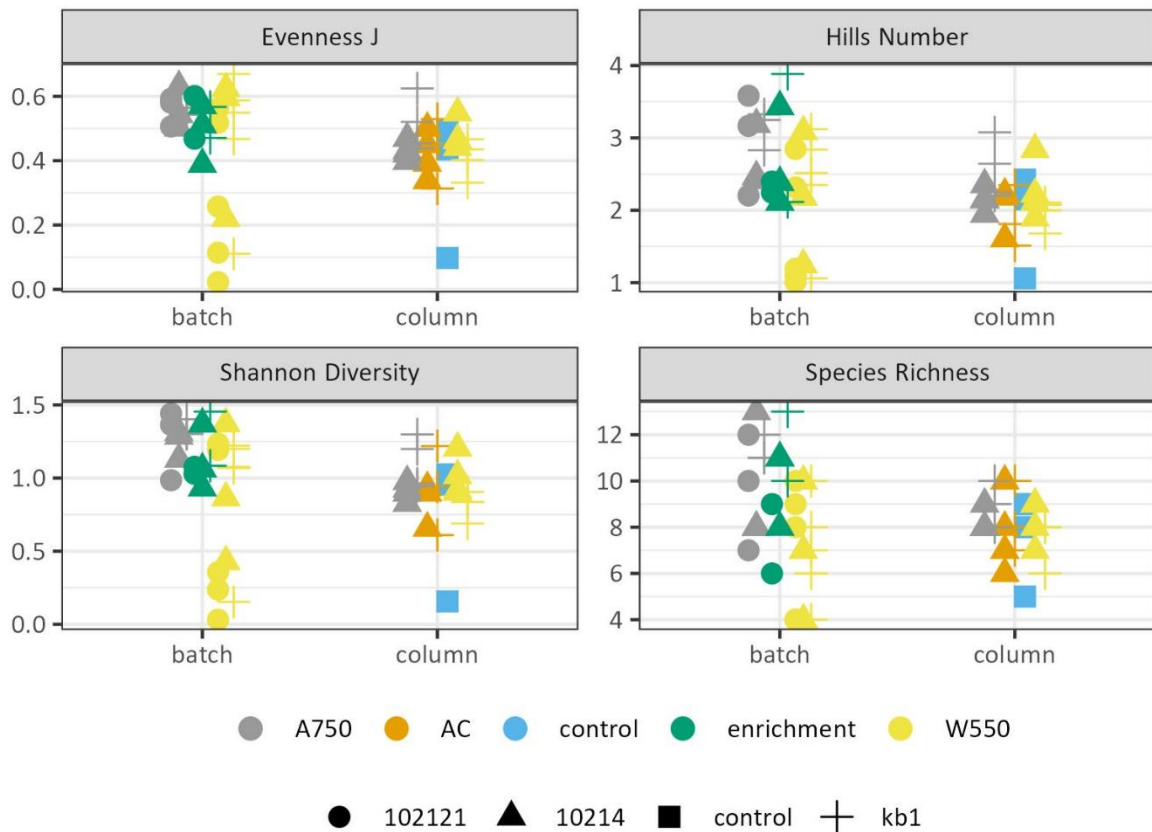


Abbildung 54: Diversitätsindizes (Evenness J, Hills Number, Shannon Diversity, Species Richness) laut DNA-Analyse der Proben aus dem Batch- und Säulenversuch (batch, column) gruppiert nach Behandlung (mit Kohle (A750, AC, W550), ohne Kohle (control), in den Anreicherungskulturen (enrichment) und Inokula (kein Inokulum (control), Instituts-eigene Kulturen (102121, 10214 (iH im Säulenversuch)) und der kommerziellen Kultur (kb1)).

Eine erste Übersicht zur Artendiversität der Inokula im Batch- und Säulenversuch, gruppiert nach Behandlung, zeigt Abbildung 54 an Hand von ökologischen Diversitätsindizes. Abgesehen in der Gegenwart von Biokohle W550 zeigte sich sowohl für die Batchversuche als auch die Säulenversuche, dass die jeweiligen mikrobiellen Gemeinschaften relativ ähnlich, homogen und spezialisiert (geringe Artenvielfalt) sind. Während beim Batchversuch noch beide Instituts-eigenen Anreicherungskulturen (102121, 10214) zur Anwendung kamen, wurde im Säulenversuch nur die potentiell potentere Kultur 10214 (iH) weiterverwendet. Fallen die Datenpunkte der 102121-Kultur in Abbildung 54 weg, wäre die Streuung der W550-assoziierten Proben ebenfalls stark reduziert, wodurch die mikrobiellen Gemeinschaften vollständig homogen erscheinen würden.

Ob nun die Art der Kohle (control, A750, AC, W550), das Inokulum (102121, 10214, kb1), der Probenahmeort (Kohle, Quarzsand, Reservoir) oder das Reduktionsmittel (Natriumsulfid (nur in Batchversuch), Titan(III)Citrat) für die Unterschiede beim Abbauverhalten von PCE und PCE-Metaboliten in den Batch- und Säulenversuchen verantwortlich gewesen sein könnte und dies auf Grund von dadurch hervorgerufenen Veränderungen in der Artenzusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften gezeigt werden, wurde durch eine Varianzanalyse (ANOVA) der Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) erörtert. Dazu wurden die Varianzen der ersten Hauptkomponente laut PCoA (principle coordinates analysis) mittels ANOVA analysiert. Für die PCoA, die eine Untersuchungsmethode für die Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften darstellt, wurden die DNA-Sequenzierungsergebnisse auf der jeweiligen phylogenetischen Ebene Phylum und Genus gruppiert. Für die ANOVA wurden potentiell auf die mikrobielle Gemeinschaft einwirkende Faktoren definiert (Kohlenart, Inokulum, Probenahmepunkt, Reduktionsmittel) und ab einem Signifikanzniveau (p-value) < 0.05 als statistisch signifikant definiert.

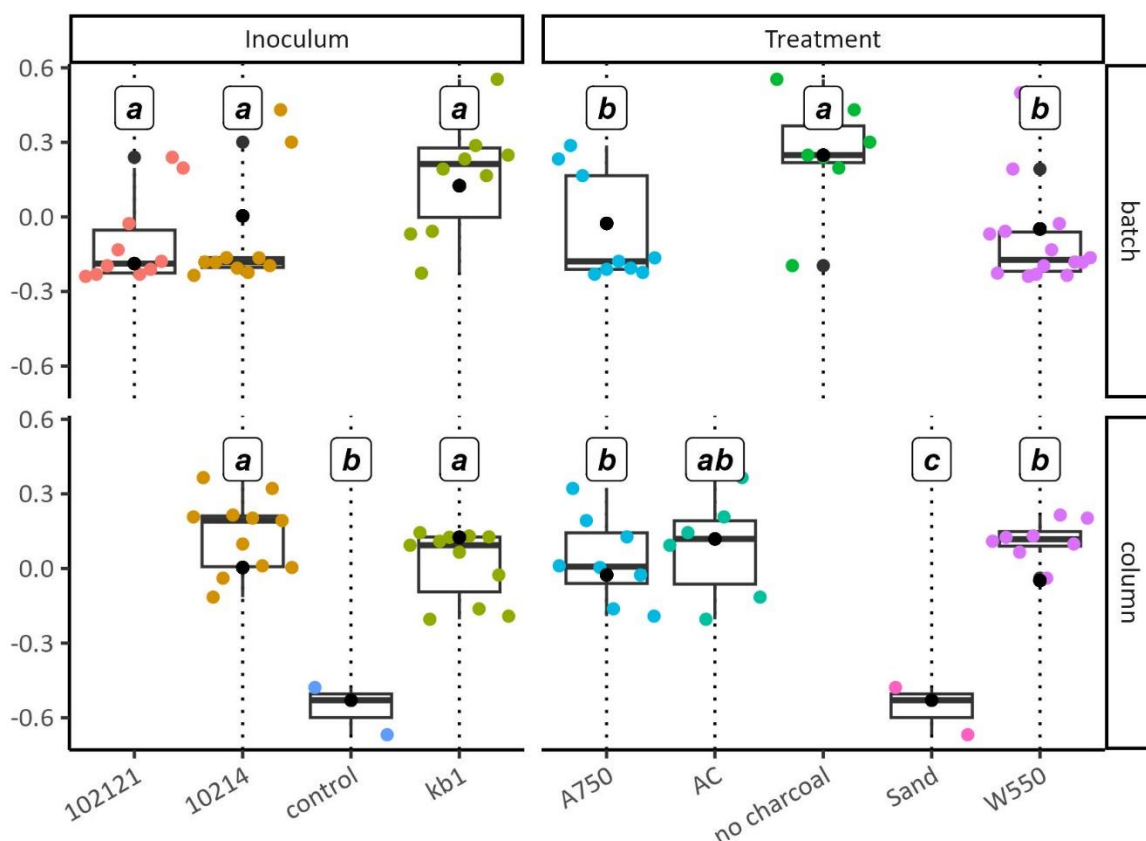


Abbildung 55: ANOVA Ergebnisse der PCoA Ergebnisse an Hand der auf Phylum-Ebene gruppierten DNA-Daten aus den Batch- und Säulenversuchen (batch, column). Signifikante

Abhängigkeiten für die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften ergaben sich auf Grund des Inokulums (102121, 10214, control (kein Inokulum), kb1) und des Treatments (A750, AC, no charcoal (Kontrolle), W550).

Die PCoA der auf Phylum-Ebene gruppierten DNA-Daten des Batch- und Säulenversuchs zeigte durch eine ANOVA, dass sowohl das Inokulum, als auch das Treatment (Exposition der Inokula gegenüber Kohlenart) einen signifikanten Einfluss auf die Unterschiede in den jeweiligen mikrobiellen Gemeinschaften hatte (Abbildung 55). Die Signifikanz der ANOVA für das Inokulum rührte jedoch nur daher, da sich die Kontrolle von allen Inokula (102121, 10214 (iH), kb1) deutlich abgrenzte. Andererseits konnte für die Kohlenexposition, neben einem allgemeinen Einfluss durch Aktiv- und/oder Biokohle im Vergleich zu Quarzsand und reinem Medium, auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Exposition gegenüber Aktivkohle und den beiden Biokohlen nachgewiesen werden.

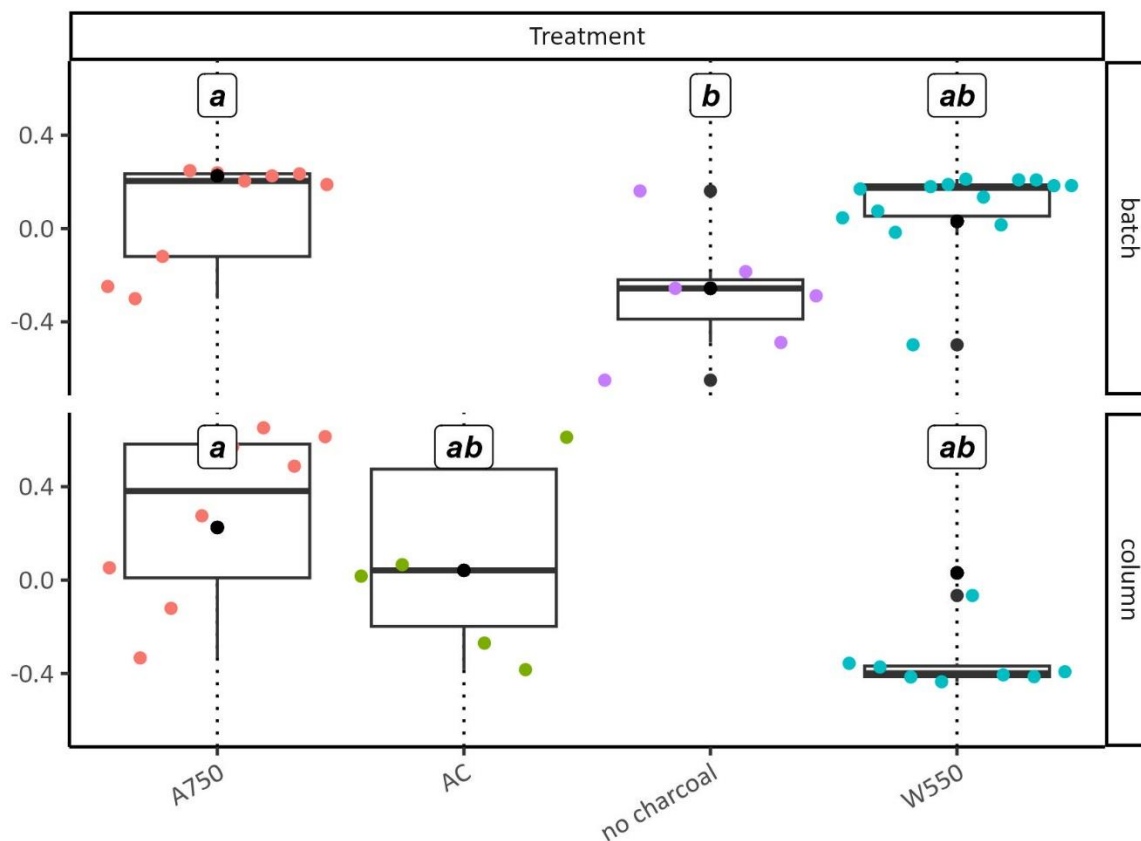


Abbildung 56: ANOVA Ergebnisse der PCoA mit den OHRB (organo-Halid veratmenden Bakterien) Zuordnungen der DNA-Daten des Batch- und Säulenversuchs (batch, column) in signifikanter Abhängigkeit der Kohlen-Exposition (A750, AC, no charcoal (Kontrolle), W550).

Wurden die DNA-Daten nach PCE-Abbauenden Bakterien (OHRB - organo-Halid-veratmende Bakterien) gefiltert, zeigte die ANOVA (Abbildung 56) Unterschiede in der Genus-Zusammensetzung der OHRB zwischen der Kontrolle (no charcoal, wobei im batch die Kontrolle ein Inokulum erhielt, jedoch keines im Säulenversuch) bzw. zwischen einer Exposition zur Biokohle A750 (Gruppe „a“) und der Kohlen AC und W550 (Gruppe „ab“). Somit sind die Unterschiede im PCE-Abbau bzgl. Abbauraten und Endprodukten (VC, Ethen) in den Säulenversuchen (siehe AP 2.3 – Säulenversuch PCE) nicht durch die Zusammensetzung der OHRB zu erklären, sondern von anderen Faktoren wie zB deren jeweiliger Aktivität, Abundanz bzw. den chemisch/physikalischen Verhältnissen in den Säulenabschnitten.

Es konnten sechs Genera, die zu den bekannten OHRB zählen identifiziert werden (*Dehalococcoides*, *Dehalogenimonas*, *Desulfitobacterium*, *Geobacter*, *Desulfovibrio*, *Sulfurospirillum*). Letztendlich ist der PCE-Abbau von deren Aktivität abhängig, sowie

speziell der Genus *Dehalococcoides*, der neben der Umwandlung von PCE zu TCE, cDCE oder VC, auch VC weiter zu Ethen umwandeln kann. Der relative Anteil der jeweiligen OHRB, sowie der übrigen Genera sind für den Säulenversuch in Abbildung 57 dargestellt.

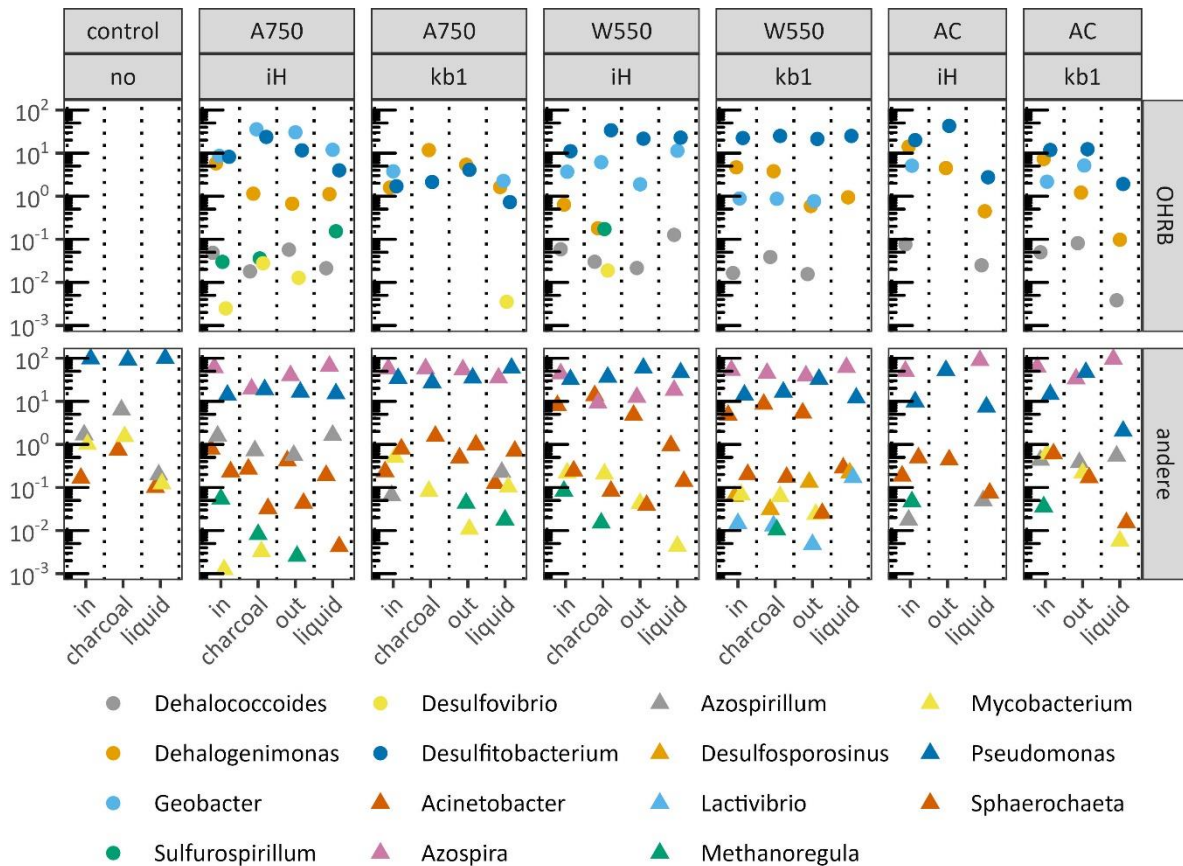


Abbildung 57: Relative Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften laut DNA-Screening der Proben (in, charcoal, out, liquid) aus dem Säulenversuch (Kombination aus Biokohle (A750, W550, AC) und mikrobiellem Inokulum (iH, kb1), gruppiert nach OHRB-Vertretern und den übrigen identifizierten Mikroorganismen (andere).

Interessanter Weise konnte in Säule A750 – kb1, gemeinsam mit der Kontroll-Säule ohne Inokulum, der Genus *Dehalococcoides*, im Vergleich zu allen übrigen Säulen nicht nachgewiesen werden, wobei Säule A750 – kb1 laut AP 2.3 maßgeblich VC und kein Ethen produzierte. Nachdem wir jene Bakterien, die für den CKW-Abbau nötig sind, über das DNS-Screening im mikrobiellen Inokulum nachweisen konnten, wäre es in nächster Folge notwendig, die dabei exprimierten Gene bzw. Enzyme (*PceA*, *TceA*, *VcrA*) zu quantifizieren (e.g. Jugder et al., 2016). Dadurch könnten die Unterschiede beim CKW-Abbau in den Säulen aus quantitativer Sicht genauer untersucht werden. Abschließend sei noch angemerkt, dass die OHRB *Geobacter* und *Desulfotobacterium* (Abbau PCE bis cDCE) einen in Relation hohen

Anteil an der extrahierten mikrobiellen Gemeinschaft (siehe Abbildung 57) ausmachten und damit auch das Instituts-eigene Inokulum (iH) einen hohen Grad an Spezialisierung für den CKW-Abbau zeigte. In weiterer Folge würden wir daher eine technisch-ausgereifte Anreicherung des iH-Inokulums andenken, um das für einen Feldversuch bzw. Biofilter größeren Maßstabs bereitstellen zu können.

Mikrobielle Phospholipid Fettsäuren (PLFA) – Extraktion, Zuordnung und Kohlenstoffquellen

Zur Untersuchung der Biofilmbildung in den Batchversuchen zum anaeroben Abbau von PCE wurden zusätzlich zur DNA-Analyse auch die Phospholipide der lebendigen mikrobiellen Zellen extrahiert und analysiert. Die dabei zur Anwendung gekommene Methode zur Extraktion, Analyse und Quantifikation der Phospholipid-Fettsäuren (PLFA) wird bei Watzinger (2015) beschrieben und wurde an gefriergetrocknetem Material der flüssigen und festen (Kohle) Phase durchgeführt. Im Vergleich zur DNA-Sequenzierung ermöglicht die PLFA Extraktion die direkte Quantifizierung der lebenden mikrobiellen Biomasse, aber mit einer geringen taxonomischen Auflösung. In den Batch- und Säulenversuchen wurden insgesamt 19 verschiedene Fettsäuren nachgewiesen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zuordnung der PLFAs zu den verschiedenen mikrobiellen Gruppen

PLFAs	Mikrobielle Gruppe	Referenz
14:0, 15:0, 16:0, 17:0 18:0	ubiquitär	(Zelles, 1999)
i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0	Gram positive Bakterien	(Zelles, 1999)
16:1w7c, cy17:0, 19:1w7c, cy19:0	Gram negative Bakterien	(Zelles, 1999)
18:1w9c	Gram negative Bakterien Mycobakterium	(Wick et al., 2003; Frostegård et al., 2011)
10Me16:0	Desulfobacter	(Dowling et al., 1988; Löffler et al., 2013)
16:1w6c	Type I Methanotroph	(Bowman et al., 1991, 1993; Watzinger et al., 2008)
16:1w5c	Type I Methanotroph	(Bowman et al., 1991; Watzinger et al., 2008)
17:1w7c	unknown	

Zusätzlich liefert die Messung der Isotopenzusammensetzung der PLFA Informationen für die Identifizierung der Kohlenstoffquelle, welche von den Mikroorganismen verwendet wurde. Wie unter AP1.3 ersichtlich liegt zwischen den Kohlen und den Kohlenstoffquellen Laktat bzw. Acetat ein deutlicher Unterschied im Kohlenstoffisotopenverhältnis $\geq 10 \text{ ‰}$ wodurch die prozentuelle Nutzung der verschiedenen Kohlenstoffquellen abgeschätzt werden kann.

Da wir eine hohe Adsorptionskapazität der Kohlen für organische Substanzen und somit auch der mikrobiellen Fettsäuren vermuten können, wurde die Widerfindung der Lipide in jeder Probe mit einem internen Fettsäure-Standard bestimmt und in die Quantifizierung der Lipidgehalte miteinbezogen. Im Mittel war die Extraktionseffizienz bei Aktivkohle am geringsten, gefolgt von W550 und A750 (Tabelle 14).

Tabelle 14: Extraktionseffizienz der mikrobiellen Biomembranen bestimmt am Gehalt des internen 19:0 PLFA Standards gegen den internen 13:0 FAME Standard (Arithmetischer Mittelwert und einfache Standardabweichung). Verhältnis 13:0/19:0 in der Blindprobe (keine Kohle) wurde als 100% angenommen.

Kohle	Extraktionseffizienz (%)
AC	13 $\pm$ 4
A750	80 $\pm$ 26
W550	57 $\pm$ 10

Ergebnisse der ^{13}C PLFA-Analysen

Im Batchversuch wurden neben der Kohle (AC, A750, W550) auch die Parameter mikrobiologisches Inokulum (1 kommerzielle Kultur und 2 in-house Kulturen) und das Reduktionsmittel (Na_2S und Titan(III)Citrat) variiert, sodass je Behandlungsvariante eine geringe Anzahl von Wiederholungen zu Verfügung stand. Dies schränkte die statistische Auswertung ein. Nichtsdestotrotz stellten wir einen signifikanten Einfluss der Kohle auf die lebende mikrobielle Biomasse, sowie auf einzelne mikrobielle Gruppen und Biomarker-Fettsäuren fest (Abbildung 58; Abbildung 59). Durch eine Dimensionsreduktion der einzelnen Fettsäuren mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde der signifikante Einfluss ($p < 0.001$) der Kohle auf das mikrobielle PLFA-Muster (Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft) in der ersten Hauptkomponente (Eigenwert = 13) bestätigt und eine Wechselwirkung mit dem Inokulum angezeigt. Die Auswirkung der Biokohlen auf die

Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zeigte sich auch durch die Analyse der DNA-Sequenzierungsergebnisse des Batch-Versuches. Des Weiteren ließ sich anhand der DNA Daten ein Einfluss des Reduktionsmittels erkennen, der durch die Verdrängung von Schwefel-reduzierenden Organismen beim Wechsel von Na₂S auf Titan(III)Citrat begründet sein dürfte. Ein Einfluss des Reduktionsmittels auf die lebende mikrobielle Gemeinschaft sowie Gesamtbioasse konnte jedoch an Hand des PLFA-Musters nicht nachgewiesen werden, was u.a. auf die geringe taxonomische Auflösung der PLFA Analyse zurückzuführen ist.

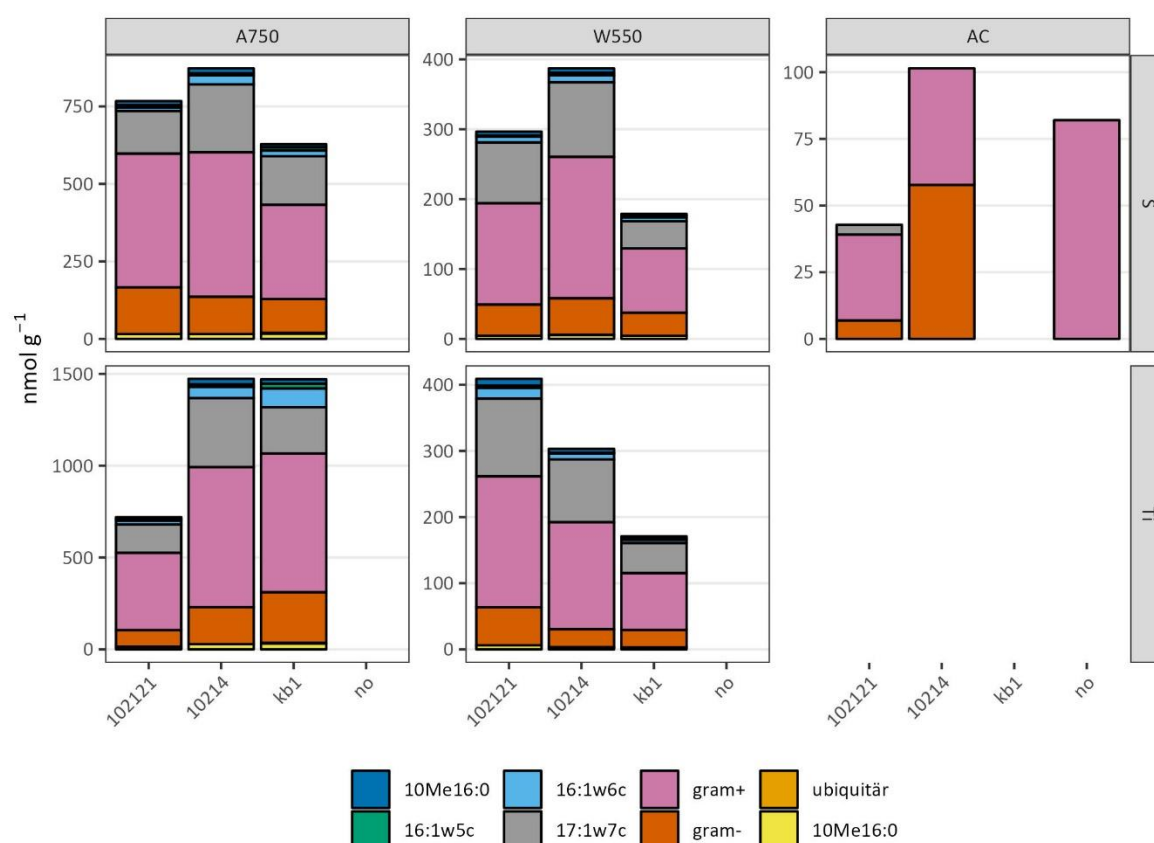


Abbildung 58: Lebende mikrobielle Biomasse des PCE Batchversuches, unterteilt nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie den spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10Me16:0, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 7c auf den Kohlen (AC, A750, W550), welche nicht (no), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder in-house Kulturen (102121 und 10214) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na₂S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert.

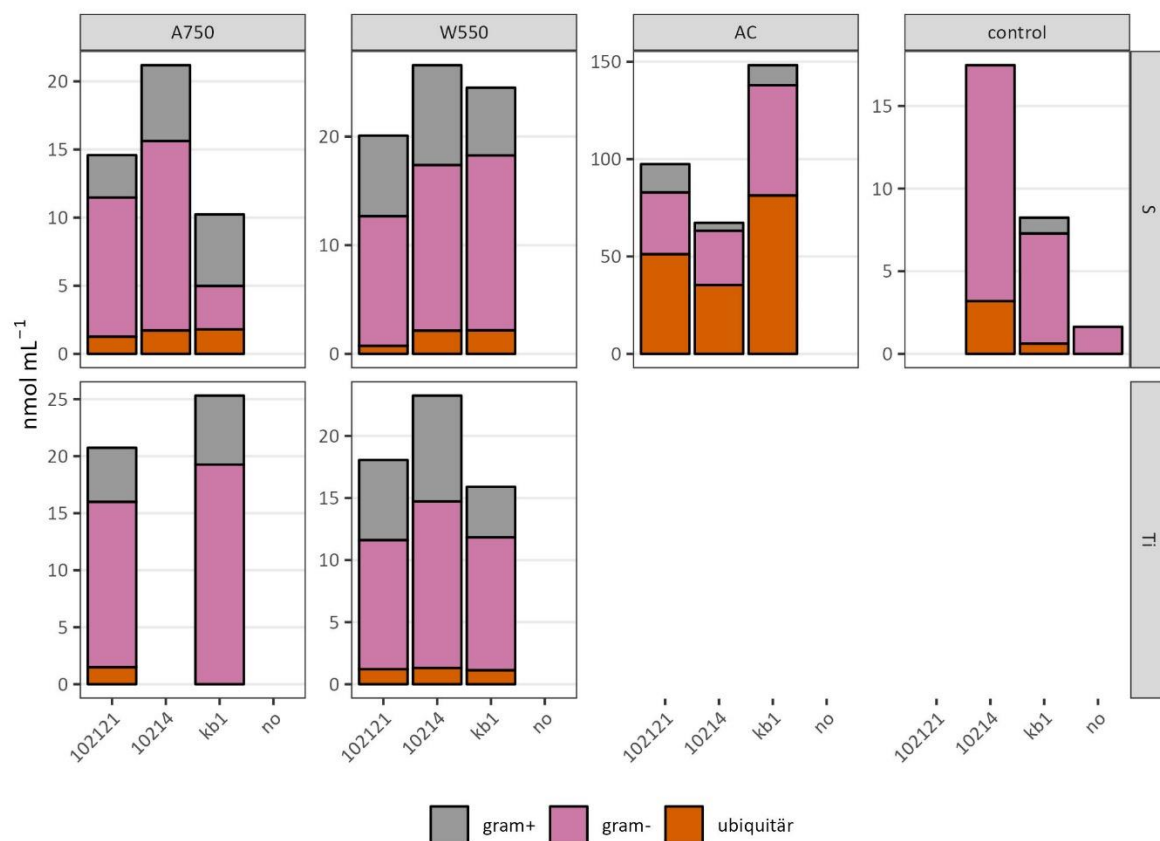


Abbildung 59: Lebende mikrobielle Biomasse des PCE Batchversuches, unterteilt nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie den spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10Me16:0, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 7c in der Flüssigphase des PCE Batchversuches (AC, A750, W550), welche nicht (**no**), mit **kb1** (kommerziell verfügbares Konsortium) oder in-house Kulturen (**102121** und **10214**) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na₂S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert.

Die lebende mikrobielle Biomasse an der Aktivkohle war äußerst gering und lag in manchen Proben unter der Nachweisgrenze. Offensichtlich stellt die Aktivkohle mit ihrem hohen Sorptionsvermögen von organischen Stoffen kein favorisiertes Habitat dar. Je geringer die Sorptionskapazität wurde (A750 geringer als W550) desto besser eignete sich die Kohle als Besiedlungsraum für die mikrobiellen Gemeinschaften der drei Kulturen. Sehr wohl aber fanden wir in der flüssigen Phase (wässriges Medium) der Batches mit Aktivkohle lebende Zellen, während im Gegensatz dazu nur ein geringer Anteil der Mikroorganismen in den Biokohle-Batchversuchen im Wasser flotierte ($p = 0.002$). Die Zusammensetzung im Flüssigmedium unterschied sich signifikant (Hauptkomponente 1 der PCA, $p < 0.001$) von

den sessilen mikrobiellen Gemeinschaften auf der Aktiv- und den Biokohlen. Dies wurde durch die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung bestätigt. Spezifisch für Proben aus der flüssigen Phase war der höhere Anteil an Gram- Bakterien und das Fehlen spezifischer Fettsäuren (i15:0, i16:0, i17:0, 18:1 ω 9c, 16:1 ω 5c, 10Me16:0, 17:1 ω 7c) sowie die Anwesenheit zyklischer Fettsäuren (cy17:0, cy19:0). Auch in den Flüssigproben konnte ein signifikanter Einfluss der Kohlen auf die mikrobielle Zusammensetzung (Hauptkomponente 2 der PCA; $p = 0.005$) nachgewiesen werden.

Der im Anschluss an die Bachversuche durchgeführte Säulenversuch, entwickelte Fettsäurenmuster und somit eine mikrobielle Gemeinschaft welche sich signifikant von Batchversuchen unterschied ($p < 0.001$), obwohl die hinzugegebene mikrobielle Kultur vergleichbar war. Aufschlussreich ist der Vergleich der mikrobiellen Biomasse zwischen den unterschiedlichen Filtern. Die DNA Analyse hatte gezeigt, dass die Mikroorganismen, nach ihrer Zugabe im Kohlefilter die gesamte Säule und das Reservoir besiedelt hatten. Die PLFA Messungen wiesen nach, dass die Besiedelungsdicht vor allem im Quarzsand vor dem Kohlefilter (in) und in den Biokohlen (sorbent) und dort vor allem in der Holzschnitzelbiokohle (W550) am höchsten war. Diesbezüglich sollte noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die PCE Zugabe an der Position „in“ erfolgte. Somit lässt sich schließen, dass eine hoher Verfügbarkeit von PCE und seinen Metaboliten als Energiequelle das Wachstum der Mikroorganismen förderte. Eine geringe Verfügbarkeit auf Grund der hohen Sorptionsfähigkeit der Aktivkohle hinderte die Etablierung einer hohen mikrobiellen Biomasse. Im Aktivkohlefilter konnten keine mikrobiellen PLFAs nachgewiesen werden. Es soll hier aber darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Extraktionseffizienz der PLFAs von der Aktivkohle gering war (rund 10%) und somit die Nachweisgrenze für Aktivkohle entsprechend hoch (10 nmol g⁻¹). Trotzdem und auch im Anbetracht der Batchversuche scheidet Aktivkohle als Sorbent in einem physikalisch-biologischen Grundwasserfilter aus, da sich keine ausreichend große mikrobielle Gemeinschaft etablieren konnte und somit die Voraussetzung für einen nachhaltige Erhalt der Sorptionsfähigkeit durch biologischen Abbau nicht erfüllt werden konnte.

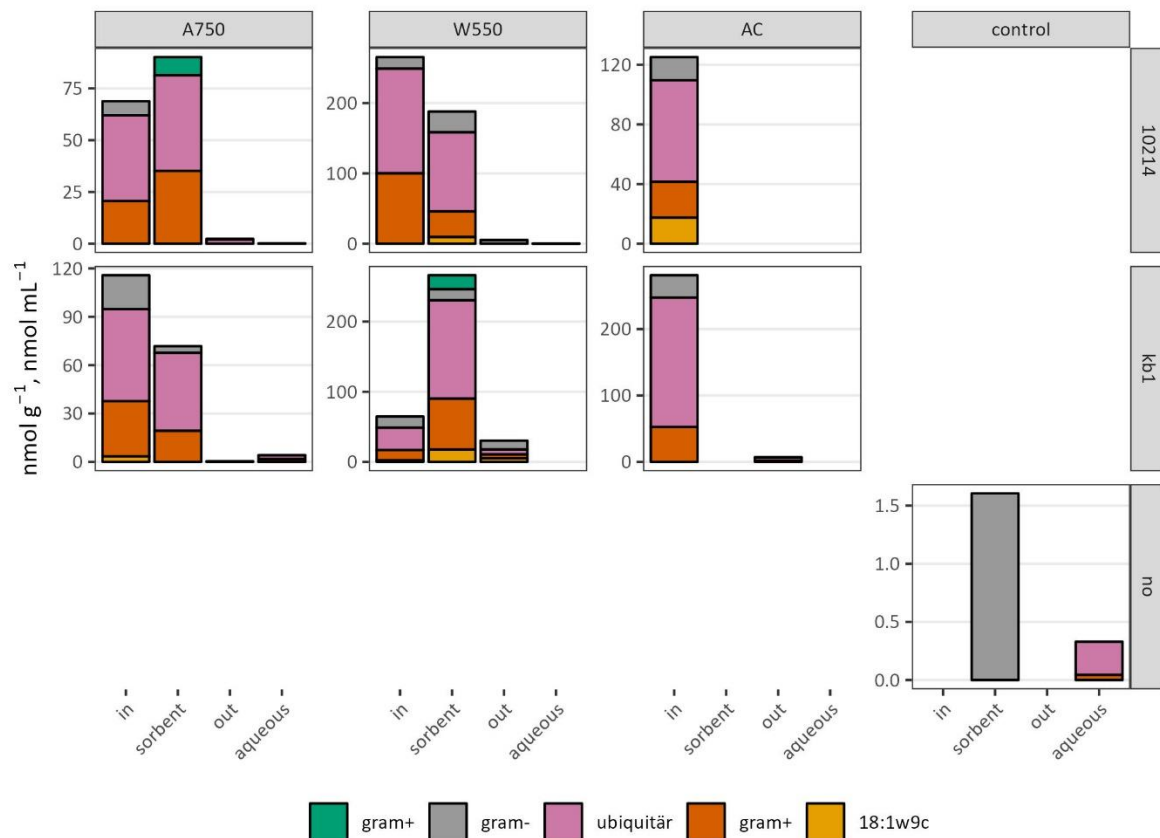


Abbildung 60: Lebende mikrobielle Biomasse im PCE Säulenversuch, summiert nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10Me16:0, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 7c an der Position **in** (Sand - PCE Zugabe), **sorbent** (AC, A750, W550) und **out** (Sand) sowie im **aqueous** (Flüssigmedium = Reservoir), welche nicht (0), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder einer in-house Kulturen (10214) inokuliert waren. Das Flüssigmedium wurde mit Titan(III)Citrat reduziert.

Die Auswertung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse der Batchversuche zeigt signifikant geringe Isotopenwerte ($\delta^{13}\text{C}$) in Aktivkohle als in den Biokohlen ($p < 0.001$) (Abbildung 61). Außerdem hatte die gesamte mikrobielle Biomasse in der Flüssigphase einen höheren Isotopenwert ($p = 0.012$); Dies wurde vor allem auf den erhöhten Isotopenwert in den Gram negativen Bakterien zurückgeführt ($p < 0.001$). Das Abweichen der mikrobiellen PLFA Isotopensignatur von der zugegebenen Kohlenstoffquelle Acetat und Laktat, lässt vermuten, dass hier insbesondere in und an den Biokohlen und vor allem von Gram positiven Bakterien eine andere Kohlenstoffquelle verwendet wird oder ein weiterer stark ^{13}C fraktionierender biochemischer Prozess zeitgleich stattfindet. Naheliegender erscheint die Nutzung von Biokohlbestandteilen, die im Zuge des Herstellungsprozesse u.a. durch

Kondensation von pyrolytischen Gasen entstanden sind, und somit auch mikrobiell verfügbar sein können. Vor allem Gram positive Bakterien sind häufig K-Strategen, die auch schwer abbaubare organische Substanzen nutzen können.

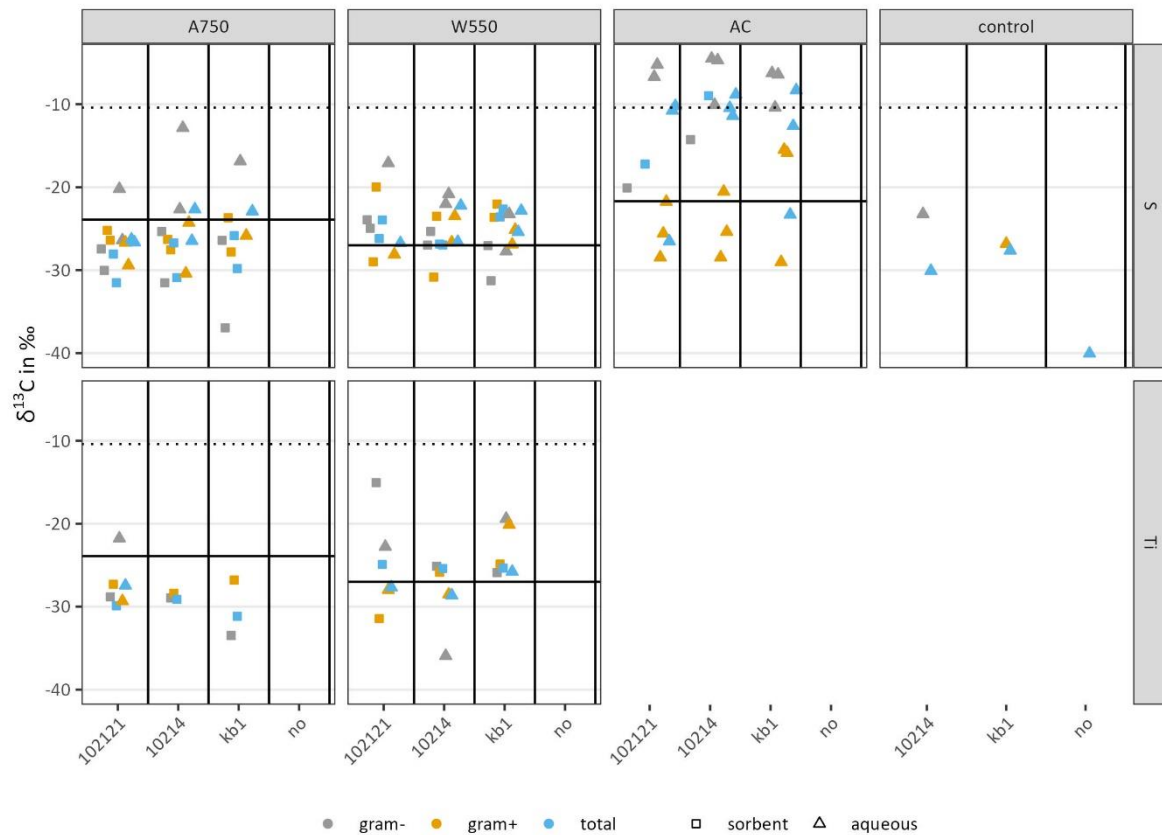
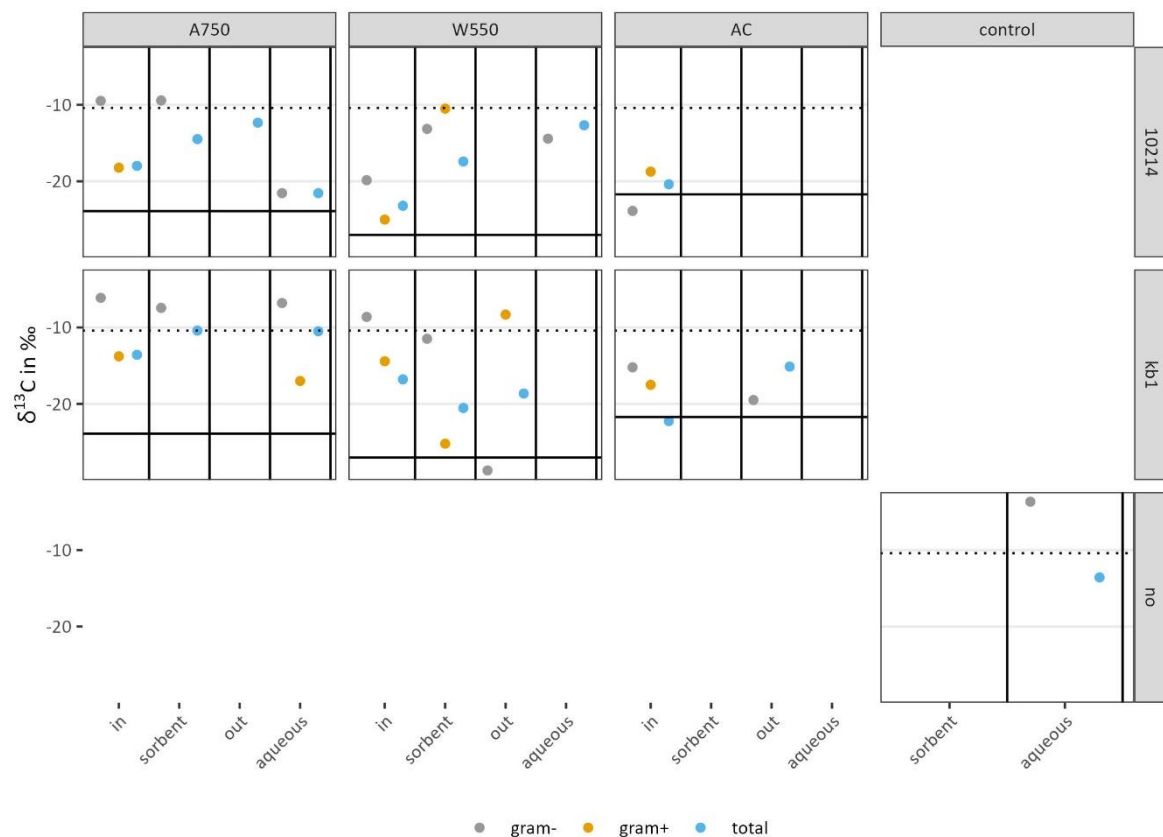


Abbildung 61: Isotopenwerte in Gram positiven Bakterien und Gram negativen Bakterien sowie der gesamten mikrobiellen Biomasse (total) des PCE Batchversuches, im Flüssigmedium (**aqueous**) und auf der Biokohle (**sorbent**) (AC, A750, W550), welche nicht (**no**), mit **kb1** (kommerziell verfügbares Konsortium) oder in-house Kulturen (**102121** und **10214**) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na₂S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert. Die Linien illustrieren die im Versuch vorhandenen Kohlenstoffquellen: $\delta^{13}\text{C}$ Acetat & Laktat -10.4 (punktierte Linie), AC -21.7, A750 -23.9, W550 -27.0 ‰ (durchgängige Linie).

In den Säulenversuche konnte kein signifikanter Unterschied der mikrobiellen PLFA zwischen Aktivkohle und Biokohlen sowie auf Grund der Position (Sand, Biokohle, Reservoir) in der Säule festgestellt werden. Die Isotopenwerte der mikrobiellen PLFA waren meist negativer als die Kohlenstoffquellen Acetat und Laktat (Abbildung 62), sodass auch in den Säulenversuchen von der Nutzung einer alternativen Kohlenstoffquelle (Biokohle) oder

der Präsenz stark ^{13}C fraktionierenden biochemischen Prozessen ausgegangen werden kann.



Abbildungung 62: Isotopenwerte in Gram positiven Bakterien und Gram negativen Bakterien sowie der gesamten mikrobiellen Biomasse (total) im Säulenversuch an der Position **in** (Sand - PCE Zugabe), **sorbent** (AC, A750, W550, Sand) und **out** (Sand) sowie im Reservoir (**aqueous**), welche mit **kb1** oder einer in-house Kulturen (**10214**) inokuliert waren. Das Flüssigmedium wurde mit Titan(III)Citrat reduziert. Die Linien illustrieren die im Versuch vorhandenen Kohlenstoffquellen: $\delta^{13}\text{C}$ Acetat & Laktat -10.4 (punktierter Linie), AC -21.7, A750 -23.9, W550 -27.0 ‰ (durchgehende Linie).

Unter der Annahme, dass bei der Anabolisierung des Kohlenstoffs in die mikrobiellen Fettsäuren eine Fraktionierung von durchschnittlich -2 ‰ stattfindet (Watzinger, 2015), lässt sich mit Hilfe der Massenbilanzformel berechnen, wieviel Prozent der mikrobiellen Biomasse aus Acetat- und Laktat-Kohlenstoff aufgebaut wurde. Im Batchversuch wurde bei der Biokohle A750 kaum Acetat und Laktat einbauen (Tabelle 15). Bei W550 wird rund 30% des Kohlenstoffs von den hinzugefügten Quellen Laktat und Acetat direkt genutzt. Im Gegensatz zu den Biokohlen, verwenden die Mikroorganismen in den Aktivkohleversuchen

vor allem Kohlenstoffs von Laktat und Acetat zum Aufbau ihrer Biomasse. In den Säulenversuchen wird im Schnitt mehr Acetat und Laktat als Kohlenstoffquelle direkt genutzt. Neben der Möglichkeit einer mikrobiellen Nutzung von Biokohle als Kohlenstoffquelle, muss auch berücksichtigt werden, dass Laktat und Acetat über den Umweg einer Methanogenese und folgender Methanoxidation von den Mikroorganismen zum Aufbau ihrer Biomasse verwendet werden. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass auch Ethen, in Folge des vollständigen Abbaus chlorierter Ethene, als Kohlenstoffquelle mikrobiell genutzt und der Kohlenstoff eingebaut wird (Mundle et al., 2012). Methanogenese / -oxidation und Ethennutzung könnten auch den negativen Prozentwert -25% erklären (Tabelle 15). Prozentwerte über 100% weisen auf eine ^{13}C Anreicherung während der Biosynthese hin. Dies ist selten, konnte aber z.B. bei einer Methanogenese unter einer limitierten Verfügbarkeit von Kohlenstoff nachgewiesen werden (Londry et al., 2008; Bradley et al., 2009) sowie bei einer Verwendung des gebildeten ^{13}C angereicherten CO_2 in Folge einer Methanogenese.

Tabelle 15: Prozentueller Anteil von Kohlenstoffquellen Acetat und Laktat in den mikrobiellen PLFA (Arithmetischer Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Werte <100% Prozente verweisen auf die Verwendung alternativer Kohlenstoffquellen (z.B. Biokohle und Ethen) und auf alternative Biosynthesewege (z.B. Methanogenese – Methanoxidation).

Filtermaterial	Batchversuch Kohle	Batchversuch Flüssigmedium	Säulenversuch
AC	93 $\pm$ 51 (n=2)	89 $\pm$ 58 (n=9)	54 $\pm$ 22 (n=3)
A750	-25 $\pm$ 15 (n=9)	4 $\pm$ 15 (n=6)	88 $\pm$ 25 (n=7)
W550	37 $\pm$ 53 (n=9)	20 $\pm$ 13 (n=9)	65 $\pm$ 21 (n=6)

Auf Grund unbekannter zeitgleich mit dem PCE Abbau stattfindender biochemischen Prozesse kann die Nutzung des Biokohle-Kohlenstoffes als C-Quelle von den Mikroorganismen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Somit soll auch in einer zukünftigen Anwendung die Hinzugabe einer Kohlenstoffquelle vorgesehen werden.

Mikrobielle Gemeinschaft in dem Naphthalin Säulenversuch

Die Etablierung Naphthalin (NAP) abbauender Mikroorganismen in einem aeroben System ist relativ unkompliziert und erfolgt auch spontan (ohne Beimpfung) wie die Ergebnisse der Sandkontrollen in den Säulenversuche gezeigt haben. Auf Grund des schnellen mikrobiellen Wachstums und einer hohen mikrobiellen Aktivität spielt im Gegensatz zu den organo-Halid reduzierenden Bakterien (OHRB) die Aufrechterhaltung der Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit eine große Rolle. Des Weiteren gibt es wiederum im Gegensatz zu den OHRB eine große Anzahl NAP abbauender Spezies. Es macht somit auch wenig Sinn hier eine detaillierte molekularbasierte Analyse auf Speziesebene durchzuführen, sondern der Fokus muss auf einer quantitativen Analyse der mikrobiellen Biomasse liegen sowie auf der Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung auf Grund der unterschiedlichen Umweltbedingungen i.e. Filtermaterialien. Dies wurde mit Hilfe der PLFA Analysen für die quantitativen Biomassebestimmung sowie der PLFA-Musterverschiebung beurteilt. Auch die funktionelle Betrachtung der mikrobiellen Gemeinschaften steht im Vordergrund, da sich vor allem unter aeroben Bedingungen eine Reihe von Mikroorganismen etablieren, die nicht primär mit dem Abbau von Naphthalin in Verbindung gebracht werden können. Mit Hilfe der ^{13}C Isotopenmarkierung von Naphthalin soll eine Differenzierung von primär Naphthalin abbauenden Organismen sowie von nicht in den Naphthalin Abbau involvierten Mikroorganismen (z.B. Ethen- oder Biokohle-Kohlenstoff Anabolisierer) gelingen sowie eine Quantifizierung des NAP Anabolismus durchgeführt werden.

Die PLFA Extraktionen und Messungen wurden in Anlehnung an die PCE Versuche durchgeführt. Die Proben wurden beim Zerlegen der Säulen aus dem Sand vor dem Filter „in“, dem Filtermaterial „sorberent“, dem Sand nach dem Filter „out“ und im Reservoir genommen, gefriergetrocknet und je 2.0 g Sand, 0.7 g Kohle und 0.1 g Niederschlag der Flüssigprobe extrahiert.

Ergebnisse der ^{13}C PLFA-Analysen

Die Mikroorganismen etablierten sich hauptsächlich in den Biokohlefiltern mit Konzentrationen von bis zu 1000 nmol g^{-1} PLFA und somit fast 4 Mal höher als in den PCE Säulenversuchen, obwohl letzterer eine längere Versuchsdauer und somit auch Kolonisierungszeit hatte (Abbildung 63). Die mikrobielle Besiedelung war in den anderen NAP Positionen (Sand vor und nach dem Filtermaterial und Flüssigmedium) vergleichsweise gering, wobei aber auffiel, dass bei NAP Zugabe bis zum Ende des Versuches in der Position „in“, höhere PLFA Gehalte nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu etablierten sich die

Mikroorganismen in der Aktivkohle vorrangig in der Position „in“. Ähnlich wie bei den PCE Säulenversuchen, stellt auch beim NAP Abbau die Aktivkohle kein geeignetes Medium für die Etablierung von Mikroorganismen dar und ist für die Verwendung als kombinierter biologischer physikalischer Filter kaum geeignet. Grund dafür ist mit großer Wahrscheinlichkeit die mangelnde Bioverfügbarkeit von Naphthalin in der Aktivkohle, die einen K_f -Wert von 370.4 im Vergleich zu 6.52 und 0.52 der A750 und W550 Biokohlen besaß (AP1.5). Auch höhere mikrobielle Biomasse bei verlängerter NAP Zugabe zeigt, dass die Mikroorganismen auf die Verfügbarkeit von NAP mit einer Erhöhung der Biomasse reagieren nicht aber auf die alleinige Zugabe von Ethanol. Statistische Testverfahren bestätigten einen signifikanten Einfluss der Position in der Säule auf die mikrobielle Biomasse sowie auf die mikrobielle Zusammensetzung (Hauptkomponenten 1 und 2 der PCA der PLFAs). Die Biokohle erhöhte die Biomarker der Gram positiven Bakterien sowie der PLFA 16:1 ω 5c. Gram positive Biomarker und 16:1 ω 5c waren auch jene PLFAs, die signifikant geringere Isotopensignaturen aufwiesen als die Gesamtfettsäuren, was auf eine Verwendung von Biokohle als Kohlenstoffquelle hinweist ($p = 0.002$) (Abbildung 64).

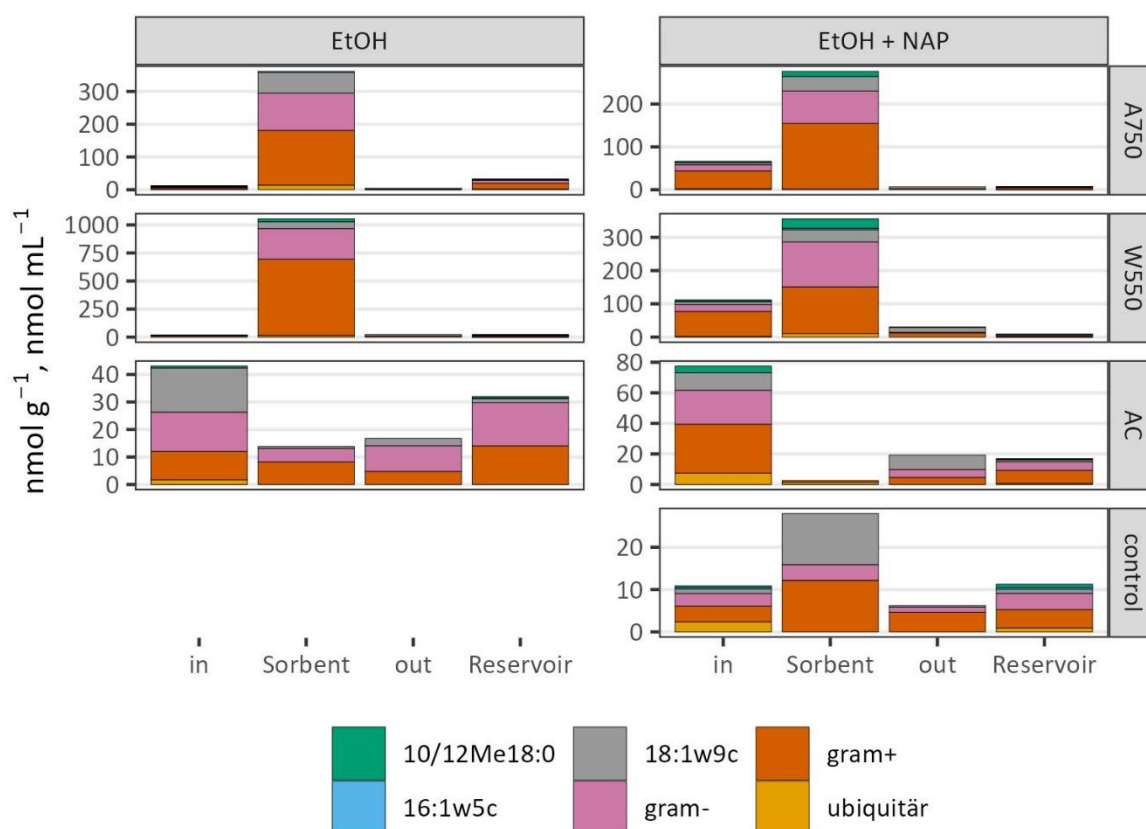


Abbildung 63: Lebende mikrobielle Biomasse (PLFAs) des NAP Säulenversuches, summiert nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre

PLFAs sowie spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10&12Me18:0, 16:1 ω 5c an der Position **in** (Sand - NAP Zugabe), **Sorbent** (AC, A750, W550, Sand) und **out** (Sand) sowie im **Reservoir**, welche mit einer Kultur von der Altlast W18 - Gaswerk Simmering inokuliert waren. Säulen haben im letzten Versuchsmonat entweder nur Ethanol (EtOH) oder Naphthalin in Ethanol (EtOH + NAP) gelöst erhalten.

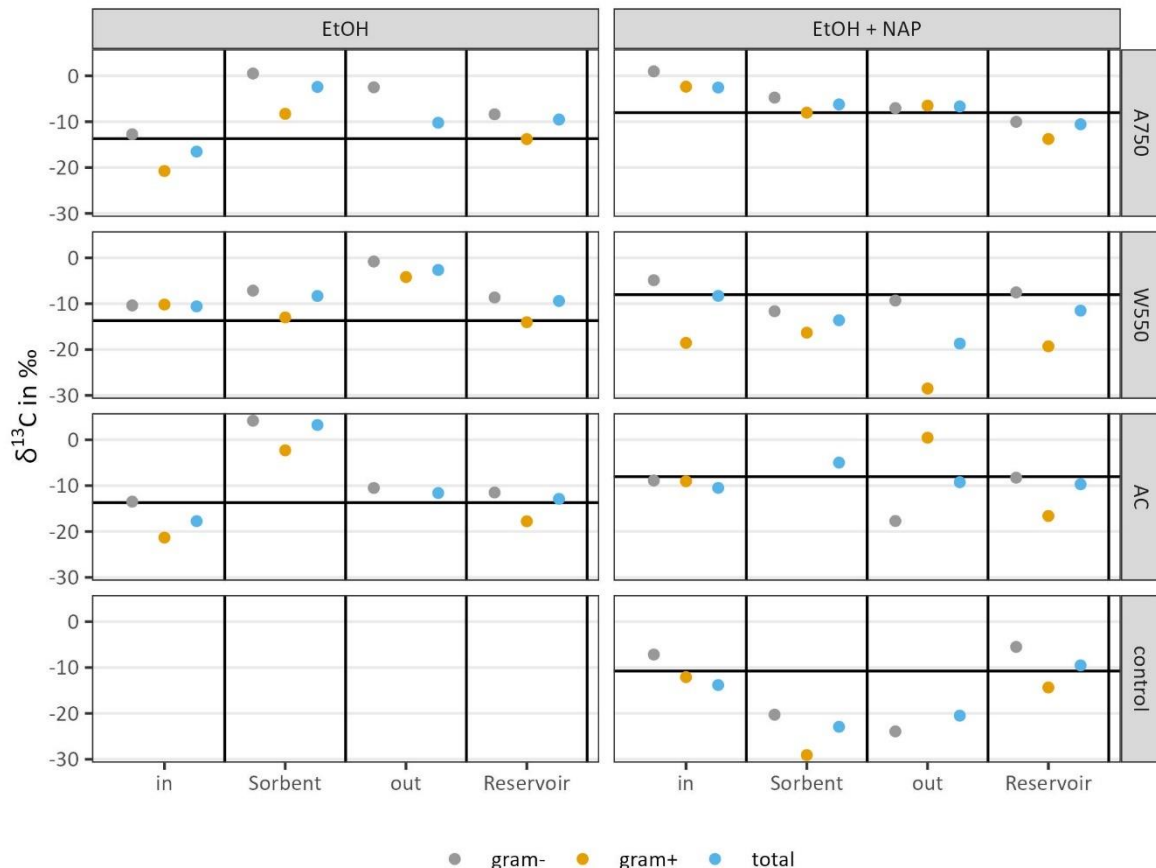


Abbildung 64: Isotopenwerte in Gram positiven Bakterien (gram+) und Gram negativen Bakterien (gram-) sowie der gesamten mikrobiellen Biomasse (total) des NAP Säulenversuches an der Position **in** (Sand - NAP Zugabe), **Sorbent** (AC, A750, W550 und Sand) und **out** (Sand) sowie im **Reservoir**, welche mit einer Kultur von der Altlast W18 - Gaswerk Simmering inokuliert waren. Säulen haben im letzten Versuchsmonat entweder nur Ethanol (EtOH) oder Naphthalin in Ethanol (EtOH + NAP) gelöst erhalten. Die Linien illustrieren die im Versuch vorhandenen leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen ($\delta^{13}\text{C}$ Ethanol -13.7, Naphthalin in Ethanol -8.3 ‰).

Die Isotopenwerte des PLFAs dokumentieren, dass Naphthalin abgebaut wurde (Abbildung 64). Naphthalin stellte aber nicht die alleinige bzw. vorrangige Kohlenstoffquelle dar; Zur

Veranschaulichung: Bei einer ausschließlichen Nutzung von Naphthalin als Kohlenstoffquelle hätten die mikrobiellen PLFA einen $\delta^{13}\text{C}$ Wert von geschätzten 56.3 ‰ (bei einer angenommenen Fraktionierung von -1.5 ‰ für den aeroben Abbau). In allen Versuchen wurde Ethanol als Lösungsvermittler des schwer löslichen Naphthalins hinzugefügt. Der gemessene Isotopenwert von Ethanol war -13.7 ‰. Ethanol ist gut löslich und somit leicht verfügbar und kann von einer Reihe von Mikroorganismen abgebaut werden. Wir erklären die niedrigen Isotopenwerte vor allem durch den Einbau von Ethanol in die mikrobiellen PLFAs. Unter der Annahme dass der Kohlenstoff von Ethanol und NAP im gleichen Verhältnis wie bei der Zugabe eingebaut wird (12.4 Ethanol-C : 1.0 NAP-C; $\delta^{13}\text{C}$ = -8.3 ‰), wurde der prozentuelle Einbau von NAP & Ethanol berechnet. Für die Berechnung erfolge eine Gewichtung auf Grund der Substrat- (Sand und Filtermaterial) bzw. Flüssigkeitsmenge (Volumen des Reservoirs). Über alle inokulierten Filtersäulen gemittelt kommen 102 ± 31 % des anabolisierten mikrobiellen Kohlenstoffs in den PLFAs von NAP & Ethanol, d.h. dass über den Gesamtzeitraum NAP & Ethanol gleichwertig eingebaut wird.

Tabelle 16: Prozentueller Anteil des Naphthalin & Ethanol Kohlenstoffs in den mikrobiellen PLFA (gewichteter Mittelwerte und gewichtete Standardabweichungen). Werte >100 Prozent weisen auf den vorrangigen Einbau von Naphthalin hin. Werte <100 Prozent weisen auf den Einbau von einer alternativen Kohlenstoffquelle (z.B. Biochar) hin. Das Asterix * markiert Säulen, die auch im letzten Versuchsmonat Naphthalinzugaben (EtOH+NAP) erhalten haben.

Säulen / Filtermaterial	Anteil NAP in PLFA (%)
AC*	103 ± 21
AC	84 ± 39
W550	116 ± 26
W550*	91 ± 32
A750*	124 ± 33
A750	94 ± 33

Die mikrobielle Biomasse ist die Summe der einzelnen Fettsäuren und somit der einzelnen mikrobiellen Gruppen. Sobald man die mikrobiellen Gram positive und Gram negative Bakterien getrennt anschaut, sieht man, dass Gram positive Bakterien teilweise geringe

Isotopenwerte besitzen als sie auf Grund eines alleinigen Abbaus durch NAP und Ethanol haben müssten (-8.4‰) (Abbildung 64). Hier ist eine Verwendung von Biokohle- und Aktivkohle- Kohlenstoffs nicht auszuschließen. Unterstützt wird diese These dadurch, dass Gram positive Bakterien häufig K- Strategen sind, welche u.a. schwer abbaubare organische Substanz angreifen können. Gram positive Bakterien machten aber nur einen geringen Prozentsatz der gesamt mikrobiellen Biomasse aus (Abbildung 63), sodass die Auswirkung auf den NAP Abbau wahrscheinlich gering ist.

Unter den mikrobiellen PLFAs, welche den geringsten Isotopenwert und somit den höchsten NAP Einbau verzeichnen konnten, befinden sich Gram negative bakterielle Biomarker (cy17:0, 16:1 ω 7c, cy9:0, 18:1 ω 7c), die u.a. schon in der Literatur als PAH und Naphthalin Abbauer nachgewiesen wurden (Wawra et al., 2018a). Actinobakterien (10Me18:0) oder andere Gram positiven Bakterien, welche im Boden neben Gram negativen Bakterien als PAH Abbauer nachgewiesen wurden (Francesca Cotrufo et al., 2014; Wawra et al., 2018b), waren in unserem Grundwasser-Filter System zwar vorhanden aber nicht vorrangig für den Abbau verantwortlich.

Da die Zugabe von Naphthalin zu dem Säulenversuch dokumentiert wurde, konnte berechnet werden, wieviel des hinzugegebenen Naphthalins in die mikrobielle Biomasse aufgenommen wurde. Hierfür wurde der gesamte Versuchszeitraum genommen, da die mikrobiellen PLFA nur am Ende, beim Zerlegen der Säulen, gemessen werden konnten. Die Werte wurden in mikrobiellen Kohlenstoff mit Hilfe des Umrechnungsfaktors 5.6 (Joergensen and Emmerling, 2006) umgewandelt und als Range mit folgenden Aufnahmen angegeben: neben NAP wird Ethanol gleichwertig eingebaut; Bezugspunkt: Kohlen) und NAP wird eingebaut, Bezugspunkt: Ethanol)

Tabelle 17: Prozentueller Einbau von NAP in die mikrobielle Biomasse in Bezug zu der Gesamtmenge von NAP welches über den gesamten Versuchszeitraum in die Säulen injiziert wurde. 1. Wert: Annahme: NAP wird eingebaut, Bezugspunkt: Ethanol; 2. Wert: Annahme: NAP und Ethanol wird gleichwertig eingebaut, Bezugspunkt: Kohlen. Das Asterix * markiert Säulen, die auch im letzten Versuchsmonat Naphthalinzugaben erhalten haben.

position	sand*	AC*	AC	W550	W550*	A750*	A750
in	1	5 / 7	0 / 2	2 / 2	20 / 19	17 / 13	0 / 1
sorbent	0	0 / 0	0 / 0	5 / 5	0 / 1	2 / 2	5 / 3
out	0	0 / 2	0 / 1	7 / 4	0 / 2	0 / 1	0 / 1

reservoir	7	3 / 3	5 / 5	4 / 4	3 / 3	2 / 2	9 / 9
Total	8	8 / 12	5 / 9	18 / 15	23 / 26	22 / 18	14 / 14

Naphthalin wurde an dem Ort der Zugabe (Position „in“) eingebaut. Sobald die Zugabe gestoppt wird (alle Säulen ohne Asterix *) wird auch Naphthalin verwendet, welches an den Kohlen (Position „sorberent“) zurückgehalten / sorbiert wurde (Tabelle 17). Dies unterstützt unsere Annahme, dass Biokohle den Schadstoff zurückhält und dieser zu einem späteren Zeitpunkt für den mikrobiellen Abbau zu Verfügung stehen. Diese Annahme wird durch den hohen $\delta^{13}\text{C}$ Wert der mikrobiellen PLFA (Abbildung 64) gestützt. Bei Aktivkohle war die mikrobielle Biomasse reduziert, sodass es dort kaum zu einer mikrobiellen Aufnahme von Naphthalin kam. Die geringe Sorptionskapazität von Biokohle und die bessere mikrobielle Besiedelung zeigen sehr gut die geplante Funktionsweise der kombinierten physikalisch-biologischen Biokohlefilter: Naphthalin wird abgebaut und sorbiert & während Zeiten geringer Schadstofffrachten wird das an der Biokohle sorbierte Naphthalin eingebaut. Somit wird einerseits das Überleben der Mikroorganismen bei geringer Schadstofffracht gesichert und andererseits die Biokohle von sorbiertem Schadstoff befreit. Schönheitsfehler bei diesem Versuch war, dass Ethanol als Lösungsvermittler zugegeben werden musste, somit ist unklar, ob die mikrobielle Nutzung und Desorption von Naphthalin auch ohne Ethanol so erfolgreich stattgefunden hätte. Dieses Faktum sollte bei einer praktischen Umsetzung unbedingt berücksichtigt werden.

Massenbilanzierung - Naphthalin

Der Gesamtkreislauf von Naphthalin kann durch den prozentuellen Einbau von NAP in die mikrobielle Biomasse gemeinsam mit den noch in Lösung verbliebenen, veratmeten und am Filter sorbierten NAP dargestellt werden. Idealerweise d.h. sofern alle Quellen und Senke von NAP bekannt und quantifiziert wurden) entspricht die Summe des metabolisierten (Katabolismus = Veratmen zu CO_2 & Anabolismus = Einbau in die mikrobielle Biomasse) und sorbierten NAP dem hinzugegebenen NAP. Mit dieser Methode kann auch nachgeprüft werden, ob relevante Senken (z.B. akkumulierende Metaboliten) existieren. In AP2.3 wurde der Anteil des mineralisierten CO_2 und sorbierten Naphthalins bestimmt. Für Aktivkohle wurde eine 100 % Wiederfindung erreicht. Bei den Biokohlen konnte nur 75 % des Naphthalins wiedergefunden werden. Abbaumetaboliten wurden nicht bestimmt und könnten eine Senke darstellen.

Tabelle 18: Prozentueller Anteil von Naphthalin im CO₂ (mineralisiert) (des letzten Monats), in der mikrobiellen Biomasse (anabolisiert) und an dem Filter und im Reservoir sorbiert. Das Asterix * markiert Säulen, die auch im letzten Versuchsmonat Naphthalinzugaben erhalten haben. Die Mineralisierung konnte nur für das letzte Monat berechnet werden.

position	AC*	AC	W550	W550*	A750*	A750
mineralisiert	93	n.d.	n.d	47	54	n.d
anabolisiert	8	9	5	18	23	22
sorbiert	5	14	0	1	2	3
total	107			71	78	

Fazit

Resümierend bestätigten die DNA-Analysen der PCE Versuche, dass die Anreicherungskulturen (kb1, iH (10214 in AP 1.6)) über die für den vollständigen Abbau von CKW benötigten Organismen verfügten und diese unter den chemisch/physikalischen Bedingungen während des Säulenversuchs nicht nur in der Injektionsstelle des Inokulums (Kohleschicht) präsent waren, sondern auch in den übrigen Probenahmepunkten (Sandschichten, Reservoir) gefunden wurden. Die Quantifizierung der lebenden mikrobiellen Biomasse und deren räumliche Verteilung gelang mittels PLFA. Es zeigte sich, dass die Mikroorganismen und auch jene Gruppen, die den PCE abbauenden Organismen zugeordnet werden können, Biokohlen präferenziell besiedeln, während die Aktivkohle gemieden wird. Dies wird auf die höher PCE-Sorptionsfähigkeit der Aktivkohle und somit geringere Bioverfügbarkeit von PCE lt. AP 1.5 zurückgeführt. Auch im Sand in der Nähe der Injektionsstelle des PCE (= Energiequelle!) konnten ebenfalls größere Mengen an Mikroorganismen nachgewiesen werden. Der Kohlenstoffisotopenwert der Mikroorganismen (¹³C PLFA) verweist bei den mikrobiell besiedelten Biokohlen auf die Nutzung von Biokohle als Kohlenstoffquelle und/oder auf das Vorhandensein stark isotopefraktionierender biochemischer Prozesse wie z.B. Methanogenese/-oxidation. Die statistische Auswertung der DNA-Sequenzierungsergebnisse und der PLFA Muster ergab, dass die mikrobiellen Gemeinschaften durch den Umweltfaktor Kohle bzw. auch durch deren physikalisch/chemische Eigenschaften beeinflusst wird. Somit ist es empfehlenswert die Wahl des Füllmaterials für einen Biofilter (mikrobieller Abbau plus Kohle als Sorbent) nicht nur auf Grund der Sorptionskapazität zu fällen, sondern vor allem auf die

Synergieeffekte, die zu einer dauerhaft aktiven mikrobiellen Gemeinschaft und eine Verlängerung der Filterlaufzeit durch den kontinuierlichen CKW-Abbau führen, zu achten.

Die lebende mikrobielle Biomasse war in den aeroben Naphthalin Säulen um einen Faktor 4 höher als bei den anaeroben PCE Säulen. Die Zugabemenge und die Umweltbedingungen wurde in beiden Fällen optimal gestaltet, d.h. dass immer Schadstoff, Nährstoffe und Elektronenakzeptoren bzw. -donatoren vorhanden waren. Die Verteilung der Mikroorganismen war ähnlich wie in den PCE Abbauversuche; i.e. stärkere Besiedelung der Biokohlefilter im Vergleich zu den Aktivkohlefiltern. Des Weiteren reagierten die Mikroorganismen auf Naphthalinzufuhr mit einer erhöhten mikrobiellen Biomasse und Naphthalineinbau. Sobald die Naphthalinzugabe gestoppt wurde, nutzten die Mikroorganismen Naphthalin, welches von den Biokohlen und der Aktivkohle zurückgehalten wurde. Biokohle wurde in geringen Mengen von Gram positiven Bakterien als Kohlenstoffquelle genutzt. Schlussfolgernd hat Biokohle einen starken positiven Effekt auf die mikrobielle Besiedelung während Aktivkohle negativ wirkt. Mikroorganismen waren in der Lage sorbiertes Naphthalin (unter Anwesenheit von Ethanol) umzusetzen. Diese Vermögen ist ein starker Indikator für die Nachhaltigkeit und das Selbstreinigungspotential der besiedelten Biokohlen. Auf der anderen Seite muss aber bedacht werden, dass mit einer hohen Besiedelung auch die Biofilmentwicklung und somit auch die Cloggingwahrscheinlichkeit zunimmt, was sich wiederum negativ auf die Nachhaltigkeit des Filtersystems auswirkt.

AP 2.5 – Biofilmcharakterisierung

Zur Bestimmung der Biofilm Entwicklung in den Batchversuchen wurde nach den Vorversuchen, welche in AP1.1 beschrieben sind, eine definierte Oberfläche (Glasobjektträger) verwendet, um unterschiedliche Biokohlen vergleichen zu können. Dafür wurde feinkörnig gebrochene Kohle (schluffig/tonig) auf Glasobjektträger mit Hilfe von einem synthetischen Polymer aufgebracht und mit den Konsortien inkubiert. In den mikroskopischen Aufnahmen war eine geringe Biofilmbildung ersichtlich, diese flokkulierte und trat als Cluster auf. In Folge wurden die Bestandteile der EPS nasschemisch extrahiert. In den PCE Versuchen zweigten sowohl Gesamt- und Einzellipide als auch die Gesamtkohlenstoffgehalte äußerst geringe Mengen, teilweise waren sie unter der Nachweisgrenze. In den NAP Säulenversuchen konnten zwar höhere Gehalte an EPS nachgewiesen werden, aber auch diese Mengen reichten nicht aus, um eine detailliertere Charakterisierung der Proteine mittels Nano-LC und Orbitrap MS durchzuführen.

Mikroskopische Untersuchungen

Die Entwicklung von Biofilmen wurde optisch mittels digitalmikroskopischer Aufnahmen (VHX-7000 Keyence) durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger bzw. Biofilme einer Färbung unterzogen, um die Ausdehnung mittels Laser Konfokalmikroskopie zu ermöglichen. Die Färbung erfolgte mit Phloxin und Patentblau um die Aktivität des Biofilms zu erfassen (rosa-rot Färbung zeigt lebenden und aktiven Biofilm, während blau gefärbter Biofilm ältere Kolonien (nicht aktives Biomaterial) erfasst). Die Entwicklung der Biofilme auf den Objektträgern war marginal und wies vor allem an geometrischen Unebenheiten Anzeichen von Hyphenbildung mit einer Größenordnung von 100 bis 600 µm auf. Die identifizierten Biofilme waren weniger direkt an der Oberfläche zu finden, sondern eher flokkuliert und mit Biokohle vergesellschaftet. Exemplarische Aufnahmen mit einer entsprechenden Erklärung sind in den Abbildungen 64 – 73 dargestellt.

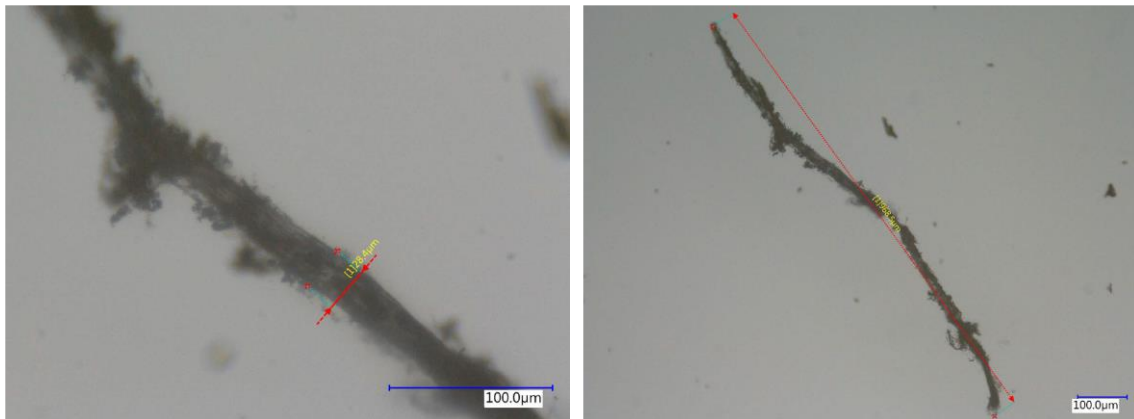


Abbildung 65: Filamentöse Struktur (Probe #51 - AC/kb1) an deren Oberfläche blau gefärbte Kolonien zu erkennen sind (links). Gesamtlänge des Filaments beträgt etwa 1000 µm (rechts).

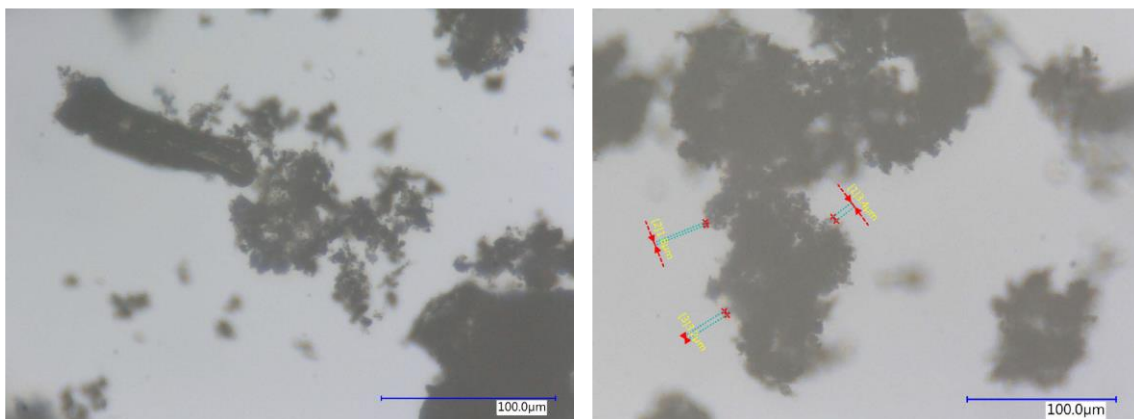


Abbildung 66: Biofilmaggregate und Kohlepartikel (Probe #53 - AC/kb1). Die Mikrobencluster können Aggregate von 50 µm bilden (links). Stärker kondensierte Aggregatkomplexe bilden Strukturen von 200 bis 300 µm und sind auf den Testoberflächen als Mikrobengeflecht verteilt (rechts).

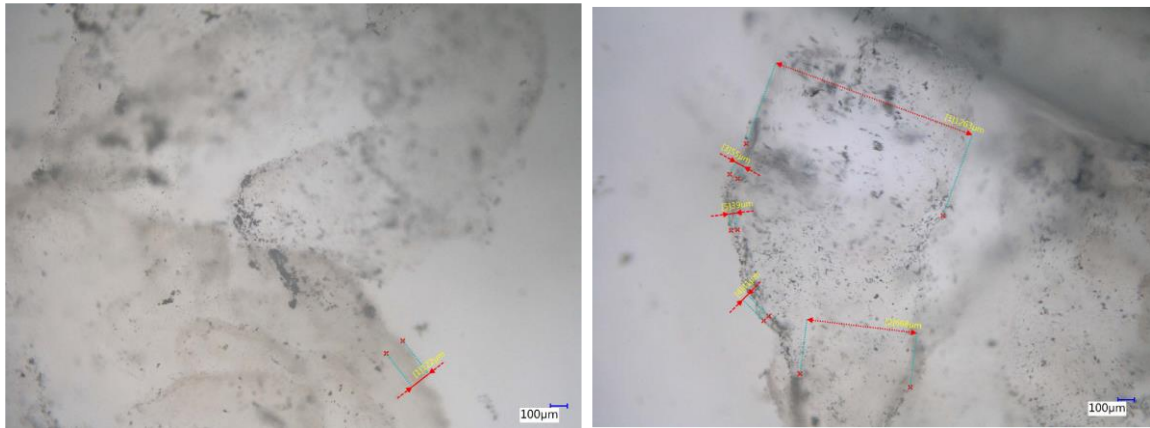


Abbildung 67: Probe # 55 - AC/102121: Freischwimmender Biofilm. Die Makrostrukturen sind gallertige Hüllen, in der Kohle und andere Partikel anhaften oder eingebettet sind (links). Freischwimmender Biofilm mit kutaner Struktur (rechts).

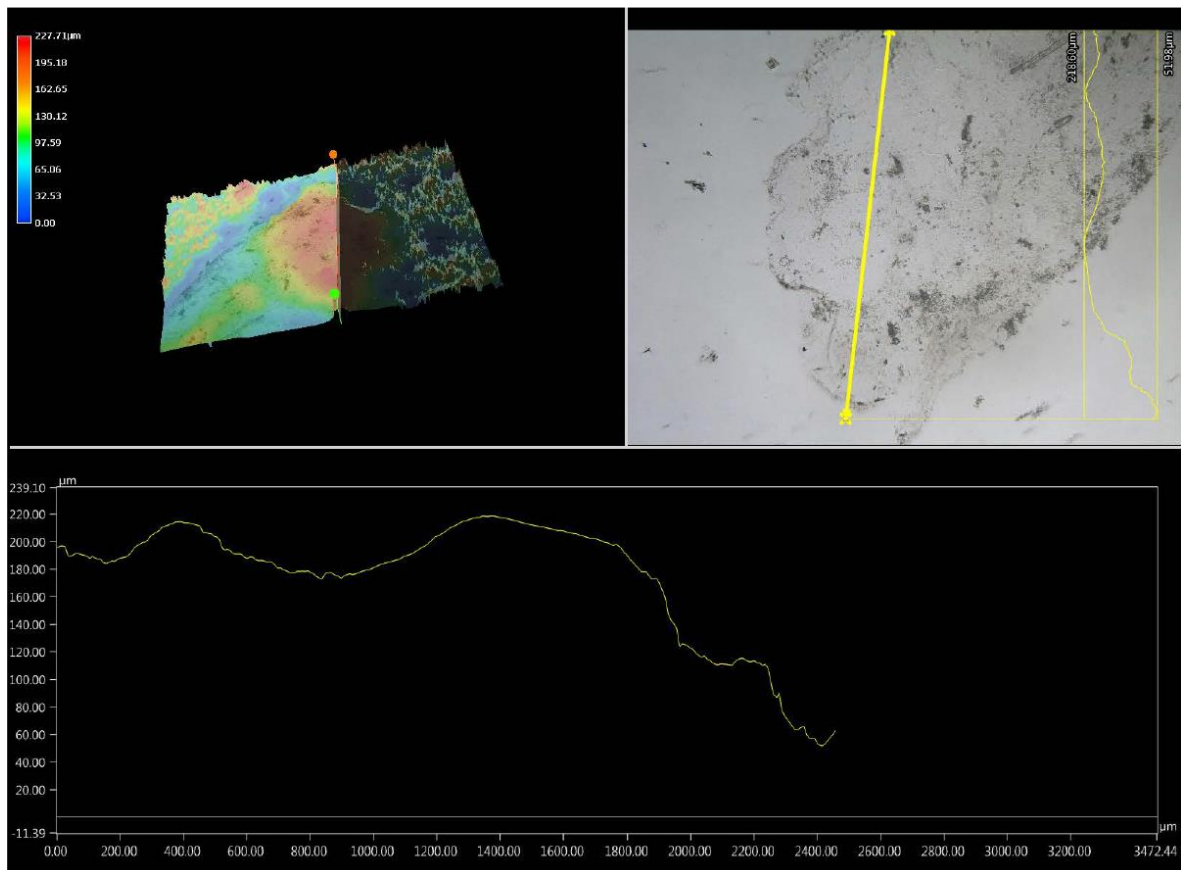


Abbildung 68: Querschnitt (Nord Süd)) Filmdicke gleichförmig zwischen 180 und 160 µm entlang eines Transektes der Probe #59 – AC/10214 auf einer Länge von über 5000 µm.

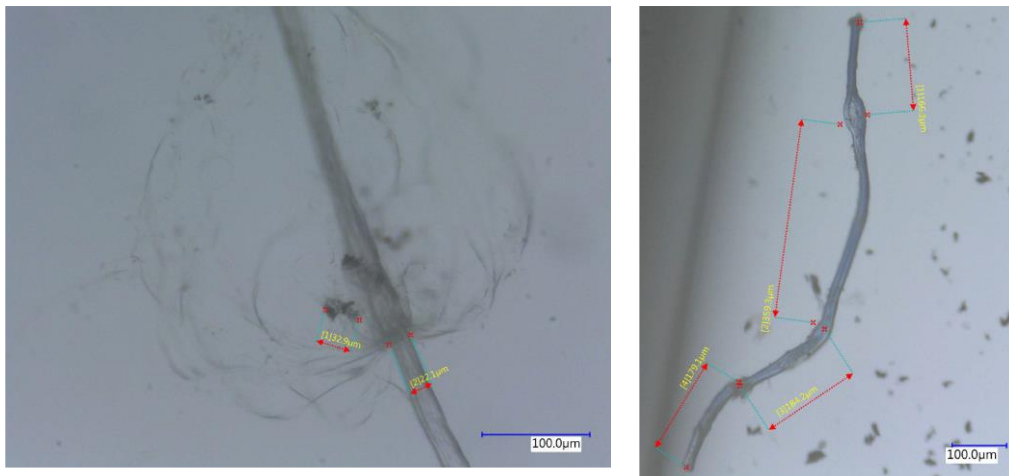


Abbildung 69: Probe #61 – W550/kb1 filamentöse Struktur verzweigt mit aktiven Mikroben Kolonien (links). Einzelfilament Makrostruktur (rechts).

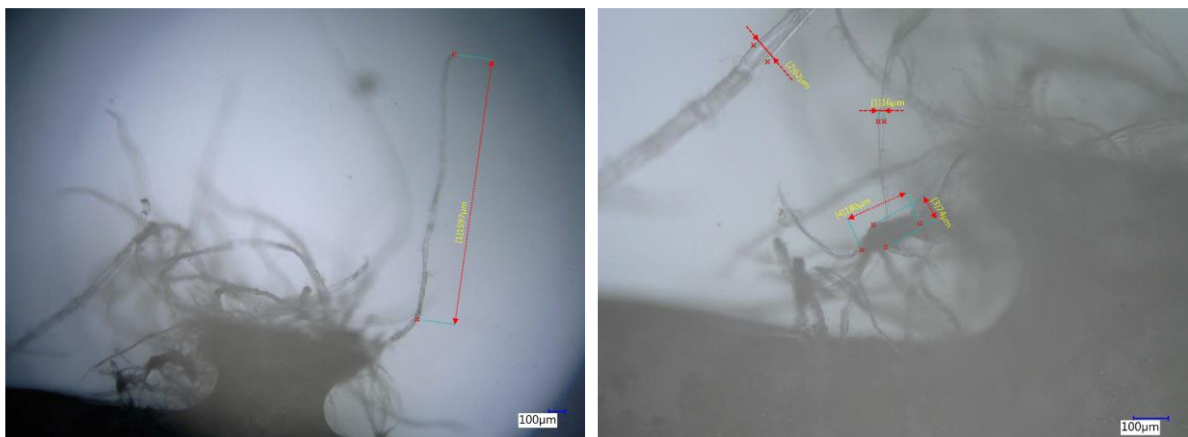


Abbildung 70: Filamentgeflecht an Bruchkante des Glasobjektträgers mit Partikeln und aktiven Mikrobenkollonien (Probe #64 – W550/102121, links). Durchmesser der filamentösen Strukturen. Ausschnitt und Teilansicht des faserartigen organischen Geflechts (rechts).

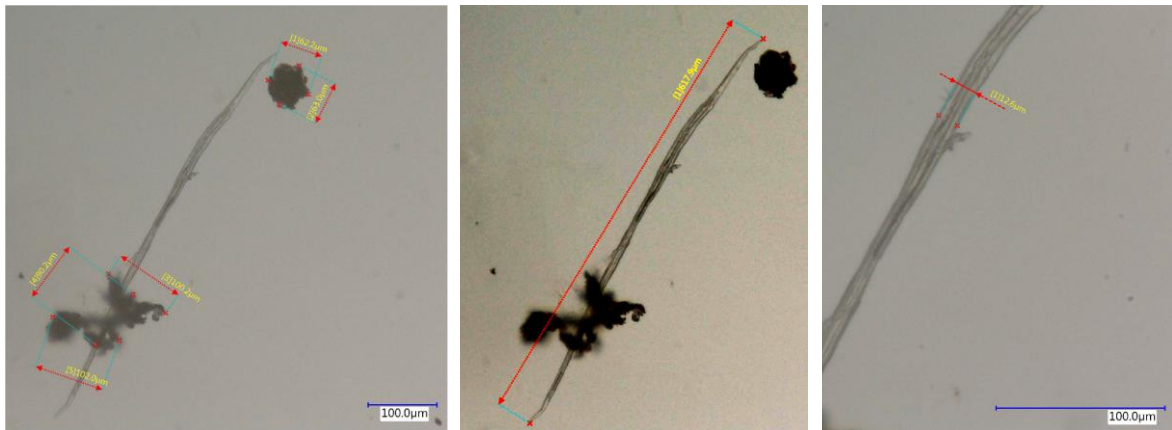


Abbildung 71: Probe #65 – W550/102121: Filament mit freien und aktiven anhaftenden Mikrobenclustern in der Größenordnung von 60 bis 100 µm.

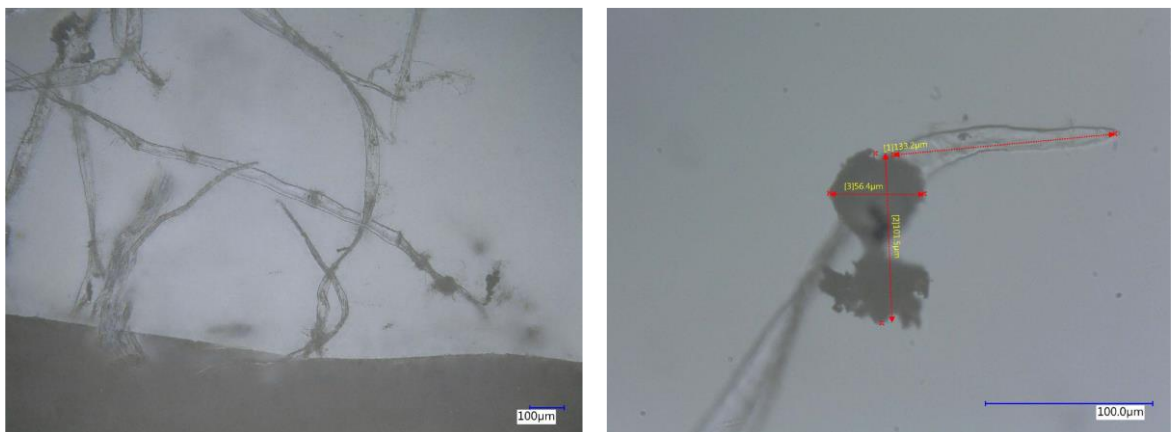


Abbildung 72: Probe #67 – W550/10214: Einzelne Filamente mit anhaftenden Mikrobenkolonien.

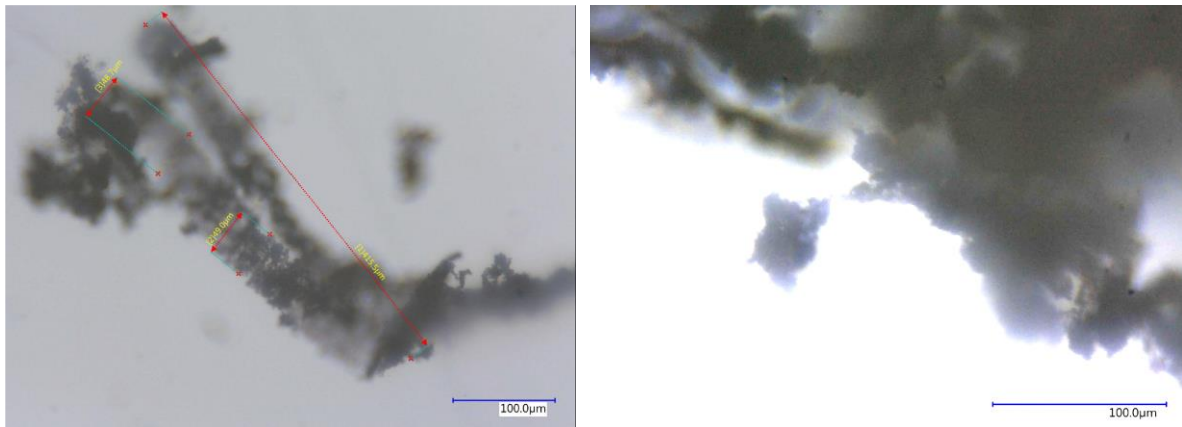


Abbildung 73: Probe #74 – A750/102121: Makrostruktur von aggregierten Mikrobenclustern mit hoher Mikrobe- und Partikeldichte (links) und aktive Mikroben an der Oberfläche des Trägerplättchens (rechts).

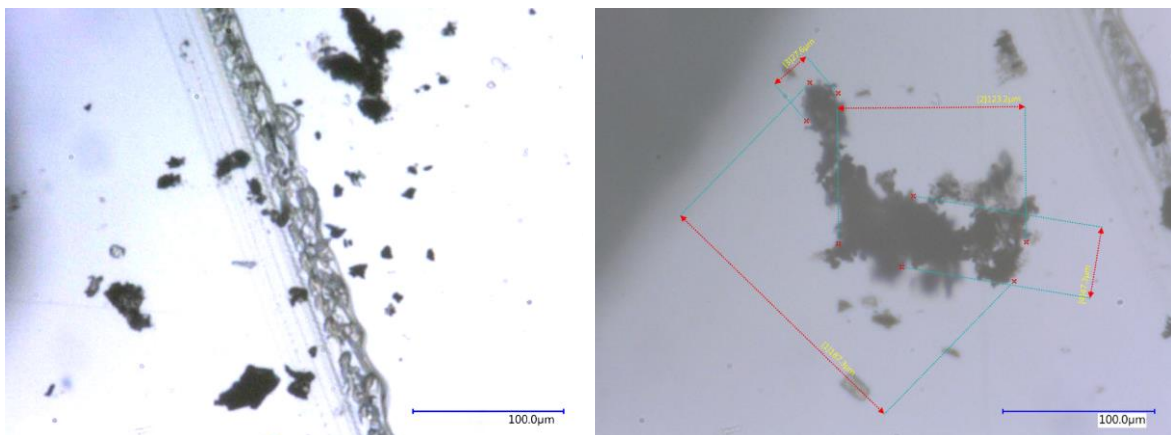


Abbildung 74: Probe #75 – A750/102121: Lebende Zellen im Zellverband, linear aneinandergereiht (grau) und divus verteilte Kohlepartikel (schwarz) (links) und Mikrobencuster mit hoher Partikel- und Mikrobendichte (rechts).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es im PCE Batch Versuch zu einer clusterartigen Ansiedlung von Mikroorganismen kommen kann. Diese Aggregation der Biofilme in Lösung hat möglicherweise eine unvorhersehbare Verteilung der mikrobiellen Aktivität zur Folge. Dies könnte somit auch die PCE-Abbaueigenschaften beeinflussen, weil die Mikroorganismen unterschiedlich intensiv mit dem Schadstoff in Kontakt kommen. Mikroorganismen im Inneren eines Clusters haben erschwerten Zugang zum Schadstoff und auch zu den Kohlenstoffquellen Acetat und Laktat. Zusätzlich erhöht die beobachtete Flokkulation und

die Ansiedlung an stärker unregelmäßigen Oberflächen (wie an den Objektträgern teilweise erkennbar war) das Risiko von Verstopfungen (Clogging) im Filtersystem.

DNA Analysen (AP2.4) zeigen, dass neben den organo-Halid veratmenden Mikroorganismen ein Konsortium mit verschiedensten Bakterien und Archaeen in den Batchversuchen vorhanden war. Die verschiedenen beobachteten mikrobiellen Strukturen bestätigen dies und können somit auf Mikroorganismen hinweisen, die nicht direkt am PCE-Abbau beteiligt sind, aber in der Biofilm-Matrix koexistieren und möglicherweise eine unterstützende Rolle spielen. (Claessen et al., 2014) beschrieb aber auch, dass unterschiedliche morphologische Formen auf idente Mikroorganismen zurückgeführt werden können, wenn diese unterschiedlichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt sind.

Gesamtlipide

Die Analyse der während des anaeroben Abbaus von chlorierten Ethenen entstandenen Biofilmen wurde in einem nächsten Schritt auf die drei wichtigsten Biofilm-Bestandteile (Fette, Kohlehydrate und Gesamtproteine) untersucht. Die Gesamtlipide, welche neben Kohlehydraten und Proteinen sowohl lebende als auch tote mikrobiell produzierte organische Substanzen des Biofilms beschreiben, wurden mit einer adaptierten Methode nach Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, Delaware) extrahiert, derivatisiert und mittel GC-IRMS gemessen.

Im PCE Batchexperiment wurden die Kohlen (Aktivkohle, Biokohle A750 und W550) und auch die Flüssigphase extrahiert. Der Gehalt an Gesamtlipiden war sowohl in Proben der wässrigen Phase (Medium) als der festen Phase (Kohlen) sehr variabel und zeigte keinen Einfluss der Kohle, des Inokulums oder des Reduktionsmittels (Tabelle 19). Prinzipiell war der Gesamtlipidgehalt niedrig und auf Grund des Wissens zu dem jetzigen Status ist es unwahrscheinlich, dass Lipidakkumulation beim anaeroben Abbau von chlorierten Ethenen zu Schwierigkeiten in Bezug auf Biofilmmakkumulation und hydraulischen Problemen (Clogging) führt.

Tabelle 19: Gesamtlipidkonzentration im PCE Batchversuch, summiert wurden die mikrobiellen Fettsäuren zwischen der Kettenlänge C₁₃ und C₁₉ angegeben als nmol C₁₉ g⁻¹ auf den Kohlen (AC, A750, W550) (erste Zahl) oder im Flüssigmedium nmol C₁₉ mL⁻¹ (zweite Zahl) inokuliert mit der kommerziellen mikrobiellem Konsortium **kb1**, den institutseigenen Kulturen **102121** und **10214**, sowie nicht inokuliert (**no**).

Kohle	Reduktionsmittel	kb1	102121	10214	no
AC	Na ₂ S	14.6 / 43.6	6.8 / 5.6	2.3 / 10.3	0.2 / 0.2
A750	Na ₂ S	24.3 / 9.7	9.4 / 2.8	6.8 / 19.8	0.4 / 0.3
A750	Titan(III)Citrat	7.7 / 13.9	10.6 / 14.9	8.9 / 0.0	
W550	Na ₂ S	2.7 / 9.7	5.2 / 13.0	6.0 / 7.1	0.8 / 0.3
W550	Titan(III)Citrat	9.1 / 1.2	28.6 / 6.9	9.0 / 5.7	

Die Gesamtlipidgehalte waren geringer als die mikrobiellen PLFA Gehalte, der entsprechenden Proben. Dies erscheint fraglich, da die PLFA einen Anteil der Gesamtlipide darstellen, und ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Extraktionsmethode und vor allem auf die unvollständigen Methylierung von Glykolipiden und Neutrallipiden sowie Veränderung der Lipide auf Grund der sauren Methylierung zurückzuführen. Außerdem musste bei allen Proben eine Blindwertkorrektur durchgeführt werden. Somit sind die Werte der Gesamtlipidmessung mit einer höheren Unsicherheit behaftet als die entsprechenden PLFA Messungen. Deshalb und nachdem die Gesamtlipidgehalte so gering und auch wenig aussagekräftig waren, wurden die gefriergetrockneten Proben der Extraktion von EPS unterzogen und die Extrakte auf deren Kohlehydratgehalt (Polysaccharide) gemessen.

Exopolymere Substanzen / Kohlehydrate

Extraktion und Messmethode

Die Extraktion folgt einer Methode von (Yang et al., 2019) mit einigen geringfügigen Änderungen von (Pan et al., 2010). Die Messung der Kohlehydrate selbst folgt der Methode von (Masuko et al., 2005).

600 mg Biokohle, 800 mg Sand und 300 mg des gefriergetrockneten Reservoirs wurden mit 7 mL einer Lösung aus 0,9 % NaCl gemischt. Diese Suspension wird zwei Minuten lang in einem Eisbad bei einer Energie von 10 % mittels Ultraschallstab (Sonoplus) beschallt. Diese Beschallungsmethode ist bekannt dafür, dass sie im Vergleich zu einer Erhitzungsmethode eine Verschlechterung der Zellproben vermeidet (Dignac et al., 1998). Darüber hinaus produziert sie keine Reaktionsprodukte und beeinflusst daher nicht die chemische Zusammensetzung des Extrakts (Dignac et al., 1998). Anschließend werden die Proben 10 Minuten horizontal bei 4°C geschüttelt und anschließend 15 Minuten lang zentrifugiert. Schließlich wird der flüssige Teil der Proben mit einem Spritzenfilter mit 0,45 µm Nylonmembran gefiltert, um lose gebundene EPS (LB-EPS) zu extrahieren. LB-EPS sind Substanzen, die indirekt an der Zelloberfläche haften (Yang et al., 2019). Dadurch werden auch Verunreinigungen entfernt, die zukünftige Messungen beeinflussen könnten. Die fest gebundenen EPS (TB-EPS) haften an den Zelloberflächen als periphere Kapseln (Yang et al., 2019). Zur Extraktion der TB-EPS wurde die Probe in 4 ml 0.9 % NaCl resuspendiert und 10 Minuten lang in einem Ultraschallbad beschallt. Das Ultraschallbad hilft, die Bindungen zwischen den TB-EPS und den Zellen der Probe aufzubrechen, vorausgesetzt, ihre Energie ist geringer als die angewandte Beschallungsenergie. Anschließend werden die Proben zentrifugiert und gefiltert.

Die in den gefilterten Proben (TB-EPS-Probe und LB-EPS) enthaltenen Polysaccharide werden anhand ihrer Absorption mit einem Standard aus verschiedenen Mannosekonzentrationen (150 nmol, 75 nmol, 37 nmol, 18 nmol, 9 nmol, 4 nmol, 2 nmol, 1 nmol in 50 µl) verglichen. 50 µL der verschiedenen Konzentrationen des Standards und der verschiedenen Proben werden an verschiedenen Stellen einer Mikroplatte hinzugefügt und mit 150 µl konz. Schwefelsäure und 30 µl 5%iges Phenol vermischt. Anschließend wird die Mikroplatte 5 Minuten lang in ein 90 °C heißes Wasserbad gestellt. Schließlich wird die Absorption all dieser Lösungen mit einem Perkin Elmer-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Konzentration wird in nmol Kohlenhydratäquivalent angegeben. Es wurden drei Absorptionsmessungen für jede Probe (drei Messungen für LB-EPS-Extraktion und drei für TB-EPS-Extraktion für dieselbe Probe) sowie für die verschiedenen Mannosekonzentrationen durchgeführt.

Die Konzentration von Gesamtproteinen erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers, mittels BCA-Methode (Pierce™ Dilution-Free™ Rapid Gold BCA Protein Assay) (Walker, 1994), mit einer Kalibration mittels bovine serum albumin (BSA). Für die Naphtalin Säulenversuche war nur in der LB-Fraktion der Probe A750 liquid und liquid* der Protein Messwert oberhalb der Nachweisgrenze.

Ergebnisse

Im Batchexperiment wurden die Kohlen (Aktivkohle, Biokohle A750 und W550) extrahiert. Der Gehalt an Gesamtkohlehydraten war sehr variabel und zeigte wenig Einfluss der Kohle, des Inokulums oder des Reduktionsmittels (Abbildung 75). Prinzipiell zeigt sich, dass nur an 2 Varianten der Aktivkohle Kohlehydrate nachweisbar waren, wobei hier jeweils eine höhere Konzentration in der stärker gebundenen EPS-Fraktion zu finden war. Für die beiden Biokohlen ergibt sich ein etwas anderes Bild, mit einem höheren Anteil an Kohlen in denen Gesamtkohlehydrate messbar waren, und einem höheren Anteil an Kohlehydraten in der lose gebundenen LB-EPS-Fraktion. Ein Einfluss des Inokulums auf die Kohlehydratkonzentration ist nicht erkennbar.

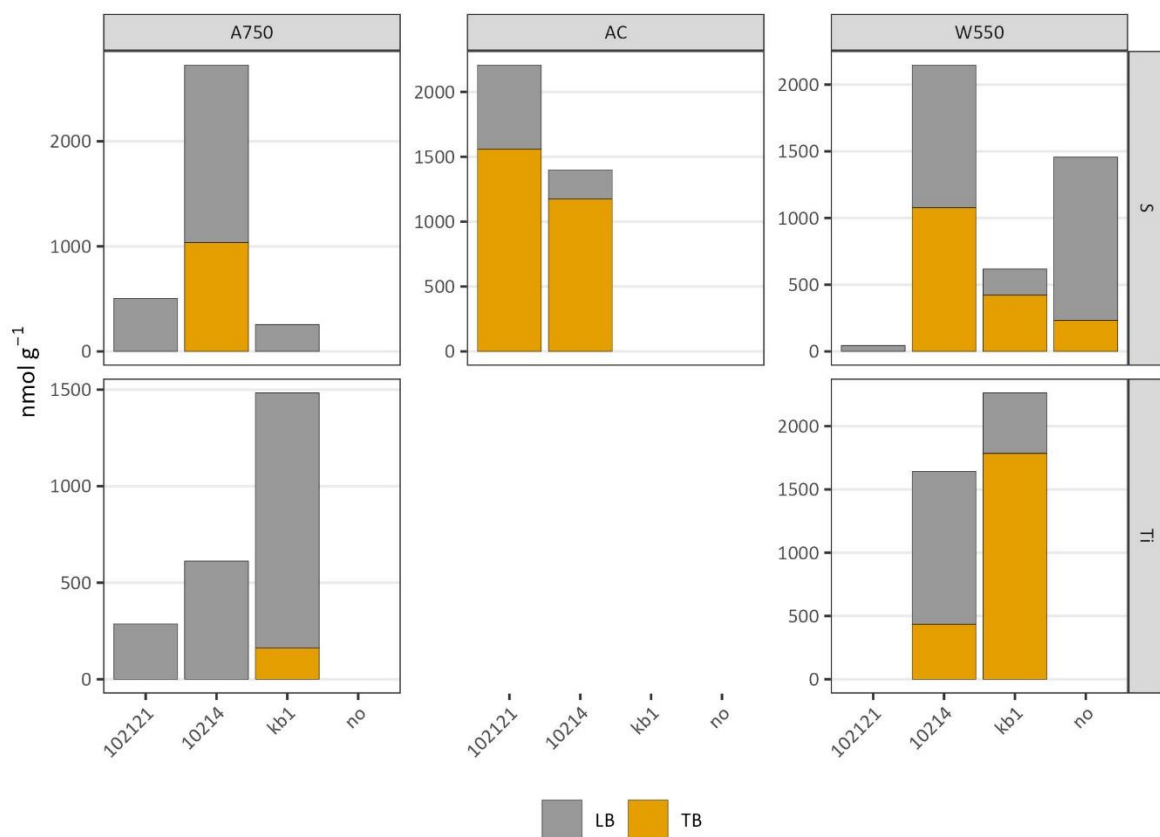


Abbildung 75: Gesamtkohlehydrate in der lose gebundenen EPS Fraktion (LB) und der stark gebundenen EPS Fraktion (TB) des PCE Batchversuches (AC, A750, W550), welche nicht (0), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder 2 in-house Kulturen (102121 und 10214) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na₂S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert.

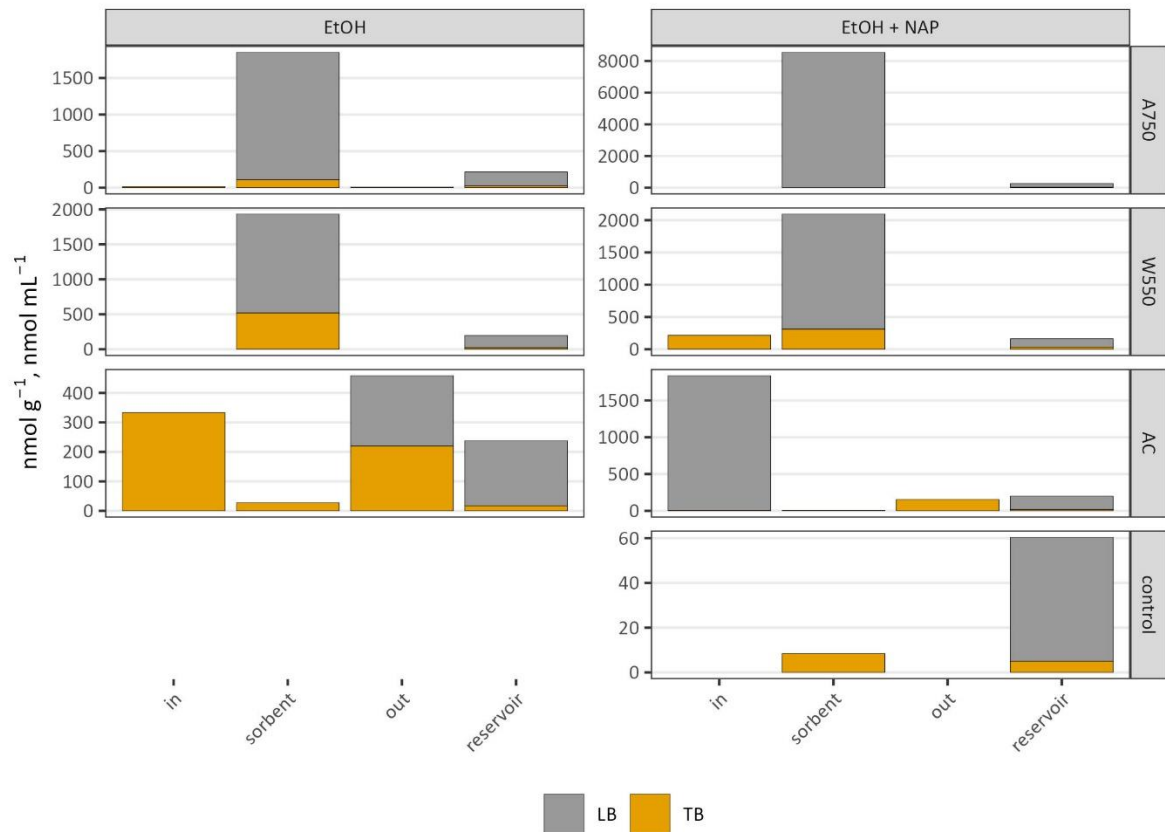


Abbildung 76: Gesamtkohlehydrate in der lose gebundenen EPS Fraktion (LB) und der stark gebundenen EPS Fraktion (TB) des Naphthalin Säulenversuchs an der Position **in** (Sand - NAP Zugabe), **sorbent** (AC, A750, W550, Sand) und **out** (Sand) sowie im **Reservoir**, welche mit einer Kultur von der Altlast W18 - Gaswerk Simmering inokuliert waren. Säulen haben im letzten Versuchsmonat entweder nur Ethanol (EtOH) oder Naphthalin in Ethanol (EtOH + NAP) gelöst erhalten.

Die Ergebnisse der Kohlehydratmessungen per Massen- und Volumeneinheit (g oder ml) in den NAP Säulenversuchen, zeigen die höchsten Konzentrationen in den Biokohlen, und vor allem in der lose gebundenen EPS Fraktion. Was sich auch in dem Verhältnis von LB/TB widerspiegelt, das für diese Proben meist zwischen bei ca. 10/1 liegt. Auf Grund der Aufkonzentration der Flüssigproben des Reservoirs in der Probenvorbereitung mittels Gefriertrocknung konnten auch dort Kohlehydrate quantifiziert werden. Die einzigen Proteinmessungen mit Messwert (über der Nachweisgrenze) fallen in diese Probenserie. Möglicherweise war auch die Effizienz der EPS-Extraktion in den gefriergetrockneten Flüssigproben am besten.

Für den Naphthalin-Säulenversuch wurde auch der Einbau von Naphthalin Kohlenstoff in die Gesamtkohlehydrate unter der Annahme berechnet, dass die Kohlenstoffaufnahme ähnlich ist wie in der PLFA-Fraktion. Der prozentuelle Einbau lag bei nur 1-2 % des hinzugegebenen Naphthalins. Der Anteil war also geringer als der Einbau in die mikrobielle Biomasse (3-22 %) (AP2.4). Bei Vergleich von Kohlenstoff in Lipiden (16:0 FA) zu Kohlehydraten (Mannose) ergibt sich ein mittleres Verhältnis von 1/1. Da Mikroorganismen ebenfalls Kohlehydrate in ihrer Zelle speichern, deutet dies darauf hin, dass neben den lebenden Mikroorganismen der Anteil des „toten“ Biofilms gering ist. Eine Unsicherheit bei dieser Schlussfolgerung ist die Vergleichbarkeit der Extraktionseffizienz der unterschiedlichen Methoden, sowie die Blindwertbestimmung.

Fazit

In den anaeroben PCE Versuchen bildeten sich äußerst geringe bis nicht nachweisbare Mengen an exopolymeren Substanzen (Lipide + Kohlehydrate). Auch wenn mikroskopisch sichtbar war, dass diese Biofilme flokkulieren und clustern, ist ein Clogging auch bei mehrere Monate dauernden Betrieb der biologisch-physikalischen Filter unwahrscheinlich. Der auf das mikrobielle Wachstum positive Effekt von Biokohle förderte die Schadstoffumsetzung ohne aber die Nachteile einer Verschlechterung der hydraulischen Leitfähigkeit auf Grund von einer starken Biofilmentwicklung zu induzieren. Biofilmentwicklung führte bei dem aeroben NAP Abbau im Säulenversuch AP2.3 zu einem Cloggingproblem beim Säuleneingang, welche aber nach der Installation eines Edelstahl-inlassfilters vermieden wurde. In den Säulen selbst kam es zu keiner Verringerung des Durchflusses. Sehr wohl aber etablierte sich in fast allen Proben eine nachweisbare Menge an EPS Kohlehydraten. In Kombination mit dem Anstieg der mikrobiellen Biomasse (AP 2.4) kann für einen aeroben Naphthalinabbau eine Biofilmmakkumulation in den Biokohlefiltern und somit das Risiko von Clogging in der Praxisanwendung auf Grund des jetzigen Wissensstandes nicht ausgeschlossen werden.

Schlussfolgerung

Das Projekt CHARBAK beschäftigte sich mit der Entwicklung von physikalisch-biologischen Biokohlefiltern für die Grundwassersanierung. Es zeigte sich, dass Biokohle aus den landwirtschaftlichen Nebenprodukten Holzschnitzel, Sonnenblumenkrenschalen und Marillenkernen als Filter geeignet ist, wobei bei der Pyrolyse eine Temperatur von 550°C bis max. 750°C optimal ist, um einerseits für die Retention der Schadstoffe eine entsprechende sorbierende Oberfläche zu erhalten und andererseits die Bildung von Polyzyklischen Kohlenwasserstoffen zu vermeiden. Die hydraulischen Eigenschaften waren in diesen Biokohlen ebenfalls sehr gut. Sobald für eine Anwendung größere Mengen Biokohle erzeugt werden müssen, könnte auch das Herstellungsverfahren abweichen (größere Pyrolyseöfen, unterschiedliche Betriebsweise). Somit empfehlen wir zumindest eine Charakterisierung nach den Erfordernissen der European Biochar Certificate (EBC) Richtlinie, um eine Bewertung im Vergleich zu den in diesem Projekt erfolgreichen Biokohlen vornehmen zu können.

Die Besiedelung der Biokohlen war problemlos und erfolgte bei Naphthalin sogar spontan (ohne Beimpfung). In einer Feldanwendung unter Heranziehen des kontaminierten Grundwassers wird diesbezüglich erwartet, dass eine Beimpfung bei einem aeroben Abbau von PAK voraussichtlich nicht notwendig ist. Eine Beimpfung in den anaeroben PCE abbauenden Biofiltern wird empfohlen. Dabei kann sowohl die kommerziell erhältlich kb1 Kultur als auch eine Kultur, die aus der zu sanierenden Altlast (z.B. im Rahmen einer Bohrung) gewonnen und im Labor angereichert wird, verwendet werden. Bezüglich mikrobieller Abbaueffizienz erwarten wir eine Limitation eher auf Grund suboptimaler Umweltbedingungen. Insbesondere das Einstellen der optimalen Redox-Bedingungen war unter Laborbedingungen einfach und könnte aber in der Praxis Schwierigkeiten bereiten. Der PCE Abbau findet nur unter reduzierenden Bedingungen statt. Eine Anwendung für die Sanierung von PCE Altlasten wird erleichtert, wenn ein niedriges Redoxpotential im Grundwasser vorhanden ist und ein natürlicher Abbau von PCE zu Ethen im Grundwasser schon nachgewiesen wurde. Es muss vermieden werden, dass das Grundwasser vor dem Durchströmen des Filters belüftet wird. Ein aerober Abbau von PAK benötigt die Zufuhr von Sauerstoff und kann in Folge auch hohe Abbauraten erreichen, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Clogging auf Grund von Biofilmbildung unter Realbedingungen möglich ist.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Isobarenplot Auswertung nach Pan et al. (2010) mit Ex = Excitation und Em = Emission.....	24
Tabelle 2. Übersicht hergestellter Biokohlen	31
Tabelle 3: Analyseverfahren für die Charakterisierung der Biokohlen.	33
Tabelle 4: Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalte der Input-Materialien vor der Pyrolyse	34
Tabelle 5. Ausgewählte Analysenergebnisse der produzierten Biokohlen. Bei Angabe von zwei Temperaturen (z.B. 750/100) je Biokohle wurde eine thermische Nachbehandlung zur potentiellen Reduktion der PAK-Gehalte durchgeführt.	35
Tabelle 6. Kenndaten Hydriffin A. Die genannten Daten basieren auf Untersuchungen der Aktivkohle im Anlieferungszustand und Analysemethoden gemäß ASTM (American Society for Testing and Materials). Zu Verfügung gestellt von Donau Carbon GmbH.	36
Tabelle 7. Adsorptionsparameter für Hydriffin 30N durchgeführt bei 20°C Wassertemperatur laut Hersteller Donau Carbon GmbH.	37
Tabelle 8: Ausgewählte Analysenergebnisse der produzierten Biokohlen und der Aktivkohle (Charakterisierung durch eurofins Austria).	38
Tabelle 9. Kohlenstoffisotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}$ in ‰ $\pm$ einfacher Standardabweichung (SD)) der Kohlen und mikrobiellen Kohlenstoffquellen	40
Tabelle 10. Übersicht Sorptionsequilibrium (t_{equi} in Stunden) und der Parameter der Sorptionskinetik nach Lagergren (K) sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2)	50
Tabelle 11. Übersicht der Sorptionsparameter lt. Freundlich für die Aktivkohle Hydriffin A, Marillenkern-Biokohle A750 und Holzschnitzel-Biokohle W550 für die Schadstoffe PCE, TCE, cDCE, VC, Ethen und NAP.	62
Tabelle 12. Ergebnisse der Toluolextraktion an Kohlen- und Sandproben am Ende des Säulenversuchs mit PCE-Zugabe.	109
Tabelle 13: Zuordnung der PLFAs zu den verschiedenen mikrobiellen Gruppen	134
Tabelle 14: Extraktionseffizienz der mikrobiellen Biomembranen bestimmt am Gehalt des internen 19:0 PLFA Standards gegen den internen 13:0 FAME Standard (Arithmetischer Mittelwert und einfache Standardabweichung). Verhältnis 13:0/19:0 in der Blindprobe (keine Kohle) wurde als 100% angenommen.....	135
Tabelle 15: Prozentueller Anteil von Kohlenstoffquellen Acetat und Laktat in den mikrobiellen PLFA (Arithmetischer Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Werte <100% Prozente verweisen auf die Verwendung alternativer Kohlenstoffquellen (z.B. Biokohle und Ethen) und auf alternative Biosynthesewege (z.B. Methanogenese – Methanoxidation).	142

Tabelle 16: Prozentueller Anteil des Naphthalin & Ethanol Kohlenstoffs in den mikrobiellen PLFA (gewichteter Mittelwerte und gewichtete Standardabweichungen). Werte >100 Prozent weisen auf den vorrangigen Einbau von Naphthalin hin. Werte <100 Prozent weisen auf den Einbau von einer alternativen Kohlenstoffquelle (z.B. Biochar) hin. Das Asterix * markiert Säulen, die auch im letzten Versuchsmonat Naphthalinzugaben (EtOH+NAP) erhalten haben.	146
Tabelle 17: Prozentueller Einbau von NAP in die mikrobielle Biomasse in Bezug zu der Gesamtmenge von NAP welches über den gesamten Versuchszeitraum in die Säulen injiziert wurde. 1. Wert: Annahme: NAP wird eingebaut, Bezugspunkt: Ethanol; 2. Wert: Annahme: NAP und Ethanol wird gleichwertig eingebaut, Bezugspunkt: Kohlen. Das Asterix * markiert Säulen, die auch im letzten Versuchsmonat Naphthalinzugaben erhalten haben.....	147
Tabelle 18: Prozentueller Anteil von Naphthalin im CO ₂ (mineralisiert) (des letzten Monats), in der mikrobiellen Biomasse (anabolisiert) und an dem Filter und im Reservoir sorbiert. Das Asterix * markiert Säulen, die auch im letzten Versuchsmonat Naphthalinzugaben erhalten haben. Die Mineralisierung konnte nur für das letzte Monat berechnet werden.	149
Tabelle 19: Gesamtlipidkonzentration im PCE Batchversuch, summiert wurden die mikrobiellen Fettsäuren zwischen der Kettenlänge C ₁₃ und C ₁₉ angegeben als nmol C ₁₉ g ⁻¹ auf den Kohlen (AC, A750, W550) (erste Zahl) oder im Flüssigmedium nmol C ₁₉ mL ⁻¹ (zweite Zahl) inokuliert mit der kommerziellen mikrobiellem Konsortium kb1 , den institutseigenen Kulturen 102121 und 10214 , sowie nicht inokuliert (no).	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Probennahme am Gate 8 „Kokerei Linz“ und Aktivkohle „Hydraffin 30N II neutral“ Foto: A. Watzinger	17
Abbildung 2: Digitalmikroskopische Aufnahme der Aktivkohle des Standortes O76.....	18
Abbildung 3: Probennahme Aktivkohlefilters 1 „Gaswerk Simmering“ und Aktivkohle „CC50P“ Foto: A. Watzinger	19
Abbildung 4: Digitalmikroskopische Aufnahme der Aktivkohle des Standortes W18	20
Abbildung 5: Dickenmessung mittels Digitalmikroskopie.....	21
Abbildung 6: Biofilm Spektrum des Prozesswassers vom Standort W18 (links) und Biofilm Spektrum der Aktivkohle vom Standort W18 (rechts).....	23
Abbildung 7: Schema der Labor-Pyrolyseanlage PYREKA mit den wichtigsten Komponenten (1: Feeder (Materialzuführung), 2: Reaktor, 3: Abgasbehandlung (Brennkammer), 4: Austrag (Kohletopf)). Quelle: PYREKA-Original-Betriebsanleitung R01 von Pyreg GmbH, 2021	27
Abbildung 8: Vorderansicht des PYREKA-Reaktors mit weiteren Details aus Abbildung 7 .	28
Abbildung 9: Umgebauter und gasdicht gemachter Probeneintrag (Komponente 1 aus Abbildung 7).	29
Abbildung 10: Eingang für Stickstoff als Spülgas.....	29
Abbildung 11: Für die Pyrolyse vorbereitete Holz-Hackschnitzel (rechts) und das nach Pyrolyse bei 550 °C erhaltene Karbonisierungsprodukt (links).....	30
Abbildung 12: Hydraulische Leitfähigkeiten der unterschiedlichen Biokohlen bestimmt über die Falling Head Methode; Probenbezeichnung (x-Achse): Der Buchstabe beschreibt die Biomasse, welche für die Herstellung der Biokohlen verwendet wurde (M = Miscanthus; A = Marillenkerne; S = Sonnenblumenkernschalen, W = Holzschnitzel) und die Zahl gibt die Herstellungstemperatur in °C an.....	42
Abbildung 13: Partikeldichte (Substanzdichte) der unterschiedlichen Kohlen bestimmt über Pyknometer. Probenbezeichnung (x-Achse): Der Buchstabe beschreibt die Biomasse, welche für die Herstellung der Biokohlen verwendet wurde (M = Miscanthus; A = Marillenkerne; S = Sonnenblumenkernschalen, W = Holzschnitzel) und die Zahl gibt die Herstellungstemperatur in °C an. AC steht für die Aktivkohle Hydraffin A.	43
Abbildung 14: Bestimmte Schüttdichte (oben) und berechnete Porosität (unten) der unterschiedlichen Kohlen. Der Buchstabe beschreibt die Biomasse, welche für die Herstellung der Biokohlen verwendet wurde (M = Miscanthus; A = Marillenkerne; S = Sonnenblumenkernschalen, W = Holzschnitzel) und die Zahl gibt die Herstellungstemperatur in °C an. AC steht für die Aktivkohle Hydraffin A.	44
Abbildung 15: Vorversuche zur Sorptionskinetik von PCE auf den Kohlen, durchgeführt mit allen bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellten Biokohlen.	47

Abbildung 16: Vorversuche zur Sorptionskapazität von PCE auf den Kohlen, durchgeführt mit allen bei unterschiedlichen Temperaturen hergestellten Biokohlen.	48
Abbildung 17: Stabilität der Kalibrationsstandards für PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen am Beispiel der Kalibrationsstandardlösungen während des PCE-Säulenversuchs (AP 2.3). Dargestellt sind die Rohmesswerte.....	54
Abbildung 18: Stabilität der Kohlenstoffisotopenverhältnisse (als $\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. VPDB) von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen in den Kalibrationsstandards am Beispiel der Kalibrationsstandardlösungen während des PCE-Säulenversuchs (AP 2.3). Dargestellt sind die Messrohwerte und die Sollwerte laut. EA-IRMS Analyse sind als punktierte Linie dargestellt.....	55
Abbildung 19: Stabilität des Kalibrationsstandards (Wiederfindung, Reproduzierbarkeit) für NAP am Beispiel der Kalibrationsstandardlösungen während des NAP-Säulenversuchs (AP 2.3). Dargestellt ist die Wiederfindung der Soll-Konzentration (punktierte Linie).	57
Abbildung 20: Isotopenverhältnisswerte des NAP Kalibrationsstandards für Kohlenstoff und Wasserstoff ($\delta^{13}\text{C}$ bzw. $\delta^2\text{H}$) während des NAP-Säulenversuchs	58
Abbildung 21: Wiederfindung und Reproduzierbarkeit der Sollwerte (punktierte Linie) von $\delta^{13}\text{C}$ in ‰ vs. VPDB und Gehalt (ppm lt. Analyse im Verhältnis zum Sollwert (CO_2 ppm _{rel})) des CO_2 -Kalibrationsgases mittels Gasbench/IRMS Analyse während des NAP-Säulenversuchs.	60
Abbildung 22: Sorptionsisothermen von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen für die Kohlen AC, A750 und W550	63
Abbildung 23: Sorptionsisothermen von NAP für die Kohlen AC, A750 und W550	64
Abbildung 24: Sorption von PCE, cDCE an Quarzsand (Stoffkonzentration in der wässrigen Phase).	66
Abbildung 25: Dechlorierung von PCE und seiner Metaboliten nach PCE-Zugabe in Batch aus KB-1, bioclear und institutseigenen (iH) Kulturen. Links: zeitlichen Konzentrationsverlauf von PCE, TCE, cDCE, VC und Ethen. Rechts: zeitliche Veränderung des stabilen Kohlenstoffisotopenverhältnisses ($\delta^{13}\text{C}$ vs VPDB in ‰).	71
Abbildung 26: Batchflaschen mit Inokulum der Kulturen von bioclear (links), KB-1 (Mitte) und einem institutseigenen Konsortium (rechts)	72
Abbildung 27: Ergebnisse der Batchversuche mit Titan(III)citrat aus Phase 2 mit der Angabe der Konzentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$) und dem Kohlenstoffisotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}$ ‰) je CKW (PCE, TCE, cDCE, VC) und Ethen für die Kombinationen von Inokulum (no $\triangleq$ kein Inokulum, iH (10214), kb1) und Kohle (no $\triangleq$ keine Kohle, AC, W550, A750) über einen Zeitraum von 68 Tagen. PCE-Zugabe als vertikale gepunktete Linien, Schwarze Linien zeigen den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert als Summe aller CKW und Ethen dar. Die horizontalen gestrichelten Linien zeigen für Inoc	

bzw. bei iH und kb1 von W550 und A750 die Summe der PCE-Zugaben an und die Sollwerte der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des zugegebenen PCE.....	74
Abbildung 28: Vergleich des Konzentrations- und Kohlenstoffisotopenverhältniss-Verlaufs von Naphthalin (mg L^{-1} , $\delta^{13}\text{C}$ in ‰) unter Verwendung der Mineralmedien lt. Bushnell und Uhlik inokuliert mit dem angereicherten mikrobiellen Konsortium. Vertikale Linien geben den Zeitpunkt der Naphthalin-Zugabe zu beiden Medien wieder.....	78
Abbildung 29: Anreicherungskulturen im Mineralmedium lt. Uhlik (jeweils links) und Bushnell (jeweils rechts) zu Beginn der Anreicherung (links) und nach 10 Wochen (rechts).	79
Abbildung 30: Ergebnisse NAP-Batchversuch mit/ohne Inokulum (Control, Inoculated) bzw. mit/ohne Biokohle (A750, W550, no). Dargestellt sind die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}$ ‰, d^2H ‰) sowie die Konzentration (mg L^{-1}) von Naphthalin während der Versuchslaufzeit (in Stunden) in der wässrigen Phase während des jeweiligen Versuchsabschnitte (Sorption, Sorption/Degradation, Desorption).	81
Abbildung 31: Design Säulenversuch PCE	85
Abbildung 32: Aufbau Säule (ohne Reservoir) für den Säulenversuch PCE	86
Abbildung 33: Durchführung Säulenversuch PCE	87
Abbildung 34: Aufbau Reservoirverschluss (Vici Safety-Cap) mit zwei Verbindungsschläuchen zum Säuleneingang und -ausgang, Überdruckventil, 3-Wege-Ventil für die Zugabe von z.B. Reduktionsmittel, Pufferlösung.....	88
Abbildung 35: Herstellungsprozedere Säulen PCE, Abbildung zeigt Sättigungsprozess der Säule mit anaerobem Medium (vor Zugabe des Reduktionsmittels Titan(III)Citrat) aus einem Vorratsbehälter, dessen Füllstand über den Sättigungszeitraum überwacht wurde.....	89
Abbildung 36: Aufbau des Säulenversuch für den aeroben Abbau von Naphthalin	91
Abbildung 37: Durchführung Säulenversuch NAP.....	92
Abbildung 38: Versuchsaufbau Säulenversuch NAP (ohne Säulenfüllung und Sättigung mit aerobem Medium). Rechts oben: nachträglich installierter Einlassfilter vom Reservoir am Ende der Versuchslaufzeit.	93
Abbildung 39: Normalisierte Tracerkonzentrationskurven (Calciumchlorid und Deuterium in L^{-1}) der Biokohlen A750 und W550 sowie der Aktivkohle (AC) bei unterschiedlich, farblich gegliederten Durchflussraten (ml min^{-1}) in Abhängigkeit des ausgetauschten Porenvolumens (x-Achse).....	97
Abbildung 40: zeitlicher Verlauf von pH-Wert und Redoxpotential (mV vs. H_2 -Elektrode) am Säulenausgang von zwei mit Biokohle teil-gefüllten Säulen (A750, W550), die mit dem in-house Inokulum beimpft wurden. Vertikale Linien zeigen eine Zugabe von PCE (violett) bzw. Reduktionsmittel (blau).....	100

Abbildung 41: Ergebnisse zum Monitoring der sieben Säulen, gefüllt mit Quarzsand (Kontrolle), sowie zusätzlich abschnittsweise mit Kohle (AC, W550, A750). Diese sechs Säulen erhielten zusätzlich ein Inokulum (iH oder kb1). Dargestellt ist die Massenkonzentration in der wässrigen Phase ($\mu\text{mol L}^{-1}$) und das diesbezügliche Kohlenstoffisotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}$ in ‰ von CKWs (PCE, TCE, cDCE, VC) sowie Ethen. Vertikale gestrichelte Linien zeigen den Zugabezeitpunkt von PCE bzw. von PCE, TCE, cDCE oder Ethen im Fall der Kontrollsäule. Die horizontale gestrichelte Linie zeigen den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des zugegebenen PCE. Die durchgehende schwarze Linie zeigt den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Summe an gemessenen CKW und Ethen.	103
Abbildung 42: Inokula der Säulenversuch, die in einem Batchversuch während des Säulenversuchs weitergeführt wurden und keine Kohle beinhalteten.	105
Abbildung 43: Vergrößerung der Ergebnisse der Kontrollsäule (nur Quarzsand, keine Kohle, kein mikrobielles Inokulum) aus Abbildung 41.	106
Abbildung 44: Desorbierte CKWs (PCE, TCE, cDCE, VC) in $\mu\text{mol g}^{-1} \pm 1$ Sigma der Messunsicherheit (n=4) von Kohlenproben (AC, W550, A750), gruppiert nach Inokulum (kb1, iH, Kontrolle), am Ende des Säulenversuchs für PCE mittels Toluol-Extraktion.	108
Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf von pH-Wert und Redoxpotential (mV vs. H_2 -Elektrode) im Säulenversuch NAP am Ausgang von zwei Säulen (je ein Säulenduplikat von A750 und W550). Vertikale Linien zeigen die Zugabe von NAP (violett) bzw. die Belüftung der Reservoirbehälter je Säule (blau).	112
Abbildung 46: NAP-Monitoring im Säulenversuch ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, mg L^{-1}) (y-Achse) mit einer farblichen Trennung der identen Säulenreplikate von AC, W550 und A750, sowie der einfachen Kontrolle ohne Kohle über den Versuchszeitraum von 102 Tagen (x-Achse)...	114
Abbildung 47: Zeitlicher Verlauf (Stunden) von $\text{mg}_{\text{NAP}} \text{L}^{-1}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{NAP}}$, $\text{CO}_2 \text{ Vol}\%$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, mV_H und pH-Wert nach Zugabe von NAP in EtOH-Stammlösung zu einem Säulenreplikat von A750 und W550 mit mikrobiellem Inokulum. Die horizontale strichlierte Linie zeigt die Sollwerte der NAP-Konzentration laut Zugabemenge bzw. des $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$, wenn NAP und EtOH vollständig mineralisiert werden.	116
Abbildung 48: Zeitlicher Verlauf (Stunden) der NAP-Konzentration in mg L^{-1} und des $\delta^{13}\text{C}_{\text{NAP}}$ Wertes in ‰ nach der letzten NAP-Zugabe für die Säulenreplikate von A750, W550, AC und der mit Quarzsand gefüllten Kontrolle, die NAP in einer EtOH-Stammlösung oder nur EtOH erhalten hatten.	117
Abbildung 49: Zeitlicher Verlauf (Stunden) der CO_2 Konzentration in $\text{Vol}\%$ und des $\delta^{13}\text{C}$ Wertes in ‰ nach der letzten NAP-Zugabe für jene Säulenreplikate von A750, W550, AC und der mit Quarzsand gefüllten Kontrolle, die NAP in einer EtOH-Stammlösung oder nur EtOH erhalten hatten. Die horizontal gepunktete graue Linie illustriert des $\delta^{13}\text{C}$ Wert von Ethanol bzw. NAP in Ethanol an.	118

Abbildung 50: Berechnete Anteile von EtOH und NAP im gebildeten CO₂ nach der letzten NAP Zugabe. Dargestellt sind der Anteil an gebildetem CO₂ in Verhältnis zur Kohlenstoffzugabe (EtOH+NAP, EtOH) (CO₂ ist/soll), der molare Anteil von NAP an der Gesamtzugabe aus EtOH und NAP (Anteil NAP) und der Anteil an abgebautem NAP relativ zur NAP-Zugabe (NAP – Abbau). Horizontale strichlierte Linien zeigen den Sollwert laut nominaler Zugabe und Punkte zeigen den berechneten Wert auf Grund der CO₂-Analysen.

..... 120

Abbildung 51: Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren (ϵ in ‰) berechnet aus der NAP-Konzentration in der wässrigen Phase im Säulen- und Batch Versuch (Fluid, Batch) und aus dem gebildeten CO₂ im Säulenversuch (Gas). Die Fraktionierungsfaktoren sind gruppiert nach den letzten beiden Zugaben (EtOH+NAP, EtOH), wobei zuvorgehend beide Gruppen EtOH+NAP erhielten. 121

Abbildung 52: Abbauraten (k in s⁻¹) berechnet aus der NAP-Konzentration in der wässrigen Phase im Säulen- und Batch-Versuch (Fluid, Batch) und aus dem gebildeten CO₂ im Säulenversuch (Gas). Die Abbauraten sind gruppiert nach den letzten beiden Zugaben (EtOH+NAP, EtOH), wobei zuvorgehend beide Gruppen EtOH+NAP erhielten. 123

Abbildung 53: Ergebnisse ($\mu\text{mol g}^{-1}$ und ml^{-1} , $\delta^{13}\text{C}$ ‰) der NAP-Desorption von Proben des Säulenversuchs (Sand in, Kohle, Sand out, Reservoir) entlang des Strömungsweges. Die Säulenduplikate von AC, W550 und A750 sowie die einzelne Kontrolle (Quarzsand) sind nach der Art der letzten zwei Zugaben von entweder NAP in Ethanol (EtOH+NAP) bzw. nur EtOH unterteilt. 125

Abbildung 54: Diversitätsindizes (Evenness J, Hills Number, Shannon Diversity, Species Richness) laut DNA-Analyse der Proben aus dem Batch- und Säulenversuchs (batch, column) gruppiert nach Behandlung (mit Kohle (A750, AC, W550), ohne Kohle (control), in den Anreicherungskulturen (enrichment) und Inokula (kein Inokulum (control), Instituts-eigene Kulturen (102121, 10214 (iH im Säulenversuch)) und der kommerziellen Kultur (kb1)). . 129

Abbildung 55: ANOVA Ergebnisse der PCoA Ergebnisse an Hand der auf Phylum-Ebene gruppierten DNA-Daten aus den Batch- und Säulenversuchen (batch, column). Signifikante Abhängigkeiten für die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften ergaben sich auf Grund des Inokulums (102121, 10214, control (kein Inokulum), kb1) und des Treatments (A750, AC, no charcoal (Kontrolle), W550). 130

Abbildung 56: ANOVA Ergebnisse der PCoA mit den OHRB (organo-Halid veratmenden Bakterien) Zuordnungen der DNA-Daten des Batch- und Säulenversuchs (batch, column) in signifikanter Abhängigkeit der Kohlen-Exposition (A750, AC, no charcoal (Kontrolle), W550). 132

Abbildung 57: Relative Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften laut DNA-Screening der Proben (in, charcoal, out, liquid) aus dem Säulenversuch (Kombination aus

Biokohle (A750, W550, AC) und mikrobiellem Inokulum (iH, kb1), gruppiert nach OHRB-Vertretern und den übrigen identifizierten Mikroorganismen (andere).....	133
Abbildung 58: Lebende mikrobielle Biomasse des PCE Batchversuches, unterteilt nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie den spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10Me16:0, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 7c auf den Kohlen (AC, A750, W550,), welche nicht (no), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder in-house Kulturen (102121 und 10214) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na ₂ S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert.....	136
Abbildung 59: Lebende mikrobielle Biomasse des PCE Batchversuches, unterteilt nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie den spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10Me16:0, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 7c in der Flüssigphase des PCE Batchversuches (AC, A750, W550), welche nicht (no), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder in-house Kulturen (102121 und 10214) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na ₂ S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert.	137
Abbildung 60: Lebende mikrobielle Biomasse im PCE Säulenversuch, summiert nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10Me16:0, 16:1 ω 6c, 16:1 ω 5c, 17:1 ω 7c an der Position in (Sand - PCE Zugabe), sorbent (AC, A750, W550) und out (Sand) sowie im aqueous (Flüssigmedium = Reservoir), welche nicht (0), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder einer in-house Kulturen (10214) inokuliert waren. Das Flüssigmedium wurde mit Titan(III)Citrat reduziert.	139
Abbildung 61: Isotopenwerte in Gram positiven Bakterien und Gram negativen Bakterien sowie der gesamten mikrobiellen Biomasse (total) des PCE Batchversuches, im Flüssigmedium (aqueous) und auf der Biokohle (sorbent) (AC, A750, W550), welche nicht (no), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder in-house Kulturen (102121 und 10214) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na ₂ S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert. Die Linien illustrieren die im Versuch vorhandenen Kohlenstoffquellen: $\delta^{13}\text{C}$ Acetat & Laktat -10.4 (punktierte Linie), AC -21.7, A750 -23.9, W550 -27.0 ‰ (durchgängige Linie).	140
Abbildung 62: Isotopenwerte in Gram positiven Bakterien und Gram negativen Bakterien sowie der gesamten mikrobiellen Biomasse (total) im Säulenversuch an der Position in (Sand - PCE Zugabe), sorbent (AC, A750, W550, Sand) und out (Sand) sowie im Reservoir (aqueous), welche mit kb1 oder einer in-house Kulturen (10214) inokuliert waren. Das Flüssigmedium wurde mit Titan(III)Citrat reduziert. Die Linien illustrieren die im Versuch vorhandenen Kohlenstoffquellen: $\delta^{13}\text{C}$ Acetat & Laktat -10.4 (punktierte Linie), AC -21.7, A750 -23.9, W550 -27.0 ‰ (durchgängige Linie).....	141

Abbildung 63: Lebende mikrobielle Biomasse (PLFAs) des NAP Säulenversuches, summiert nach Gram positiven Bakterien (gram+), Gram negativen Bakterien (gram-), ubiquitäre PLFAs sowie spezifischen PLFAs 18:1 ω 9c, 10&12Me18:0, 16:1 ω 5c an der Position in (Sand - NAP Zugabe), Sorbent (AC, A750, W550, Sand) und out (Sand) sowie im Reservoir , welche mit einer Kultur von der Altlast W18 - Gaswerk Simmering inokuliert waren. Säulen haben im letzten Versuchsmonat entweder nur Ethanol (EtOH) oder Naphthalin in Ethanol (EtOH + NAP) gelöst erhalten.....	144
Abbildung 64: Isotopenwerte in Gram positiven Bakterien (gram+) und Gram negativen Bakterien (gram-) sowie der gesamten mikrobiellen Biomasse (total) des NAP Säulenversuches an der Position in (Sand - NAP Zugabe), Sorbent (AC, A750, W550 und Sand) und out (Sand) sowie im Reservoir , welche mit einer Kultur von der Altlast W18 - Gaswerk Simmering inokuliert waren. Säulen haben im letzten Versuchsmonat entweder nur Ethanol (EtOH) oder Naphthalin in Ethanol (EtOH + NAP) gelöst erhalten. Die Linien illustrieren die im Versuch vorhandenen leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen ($\delta^{13}\text{C}$ Ethanol -13.7, Naphthalin in Ethanol -8.3 ‰).....	145
Abbildung 65: Filamentöse Struktur (Probe #51 - AC/kb1) an deren Oberfläche blau gefärbte Kolonien zu erkennen sind (links). Gesamtlänge des Filaments beträgt etwa 1000 μm (rechts).	152
Abbildung 66: Biofilmmaggregat und Kohlepartikel (Probe #53 - AC/kb1). Die Mikrobencuster können Aggregate von 50 μm bilden (links). Stärker kondensierte Aggregatkomplexe bilden Strukturen von 200 bis 300 μm und sind auf den Testoberflächen als Mikrobengeflecht verteilt (rechts).....	152
Abbildung 67: Probe # 55 - AC/102121: Freischwimmender Biofilm. Die Makrostrukturen sind gallertige Hüllen, in der Kohle und andere Partikel anhaften oder eingebettet sind (links). Freischwimmender Biofilm mit kutaner Struktur (rechts).	153
Abbildung 68: Querschnitt (Nord Süd)) Filmdicke gleichförmig zwischen 180 und 160 μm entlang eines Transektes der Probe #59 – AC/10214 auf einer Länge von über 5000 μm	153
Abbildung 69: Probe #61 – W550/kb1 filamentöse Struktur verzweigt mit aktiven Mikroben Kolonien (links). Einzelfilament Makrostruktur (rechts).	154
Abbildung 70: Filamentgeflecht an Bruchkante des Glasobjektträgers mit Partikeln und aktiven Mikrobencolonien (Probe #64 – W550/102121, links). Durchmesser der filamentösen Strukturen. Ausschnitt und Teilansicht des faserartigen organischen Geflechts (rechts).	154
Abbildung 71: Probe #65 – W550/102121: Filament mit freien und aktiven anhaftenden Mikrobencustern in der Größenordnung von 60 bis 100 μm	155

Abbildung 72: Probe #67 – W550/10214: Einzelne Filamente mit anhaftenden Mikrobenkolonien.	155
Abbildung 73: Probe #74 – A750/102121: Makrostruktur von aggregierten Mikrobenclustern mit hoher Mikrobe- und Partikeldichte (links) und aktive Mikroben an der Oberfläche des Trägerplättchens (rechts).	156
Abbildung 74: Probe #75 – A750/102121: Lebende Zellen im Zellverband, linear aneinandergereiht (grau) und divus verteilte Kohlepartikel (schwarz) (links) und Mikrobencluster mit hoher Partikel- und Mikrobendichte (rechts).	156
Abbildung 75: Gesamtkohlehydrate in der lose gebundenen EPS Fraktion (LB) und der stark gebundenen EPS Fraktion (TB) des PCE Batchversuches (AC, A750, W550), welche nicht (0), mit kb1 (kommerziell verfügbares Konsortium) oder 2 in-house Kulturen (102121 und 10214) inokuliert waren. Das Medium wurde entweder mit Na ₂ S (S) oder Titan(III)citrat (Ti) reduziert.	160
Abbildung 76: Gesamtkohlehydrate in der lose gebundenen EPS Fraktion (LB) und der stark gebundenen EPS Fraktion (TB) des Naphthalin Säulenversuchs an der Position in (Sand - NAP Zugabe), sorbent (AC, A750, W550, Sand) und out (Sand) sowie im Reservoir , welche mit einer Kultur von der Altlast W18 - Gaswerk Simmering inokuliert waren. Säulen haben im letzten Versuchsmonat entweder nur Ethanol (EtOH) oder Naphthalin in Ethanol (EtOH + NAP) gelöst erhalten.	161

Literaturverzeichnis

- Amos, B.K., Ritalahti, K.M., Cruz-Garcia, C., Padilla-Crespo, E., Löffler, F.E., 2008. Oxygen Effect on Dehalococcoides Viability and Biomarker Quantification. *Environmental Science & Technology* 42, 5718–5726. doi:10.1021/es703227g
- Atashgahi, S., Lu, Y., Smidt, H., 2016. Overview of Known Organohalide-Respiring Bacteria—Phylogenetic Diversity and Environmental Distribution, in: Adrian, L., Löffler, F.E. (Eds.), *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 63–105. doi:10.1007/978-3-662-49875-0_5
- Bowman, J.P., Skerratt, J.H., Nichols, P.D., Sly, L.I., 1991. Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 85, 15–22. doi:10.1111/j.1574-6968.1991.tb04693.x
- Bowman, J.P., Sly, L.I., Nichols, P.D., Hayward, A.C., 1993. Revised Taxonomy of the Methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., Emendation of *Methylococcus*, Validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* Species, and a Proposal that the Family Methylococcaceae Includes Only the Group I Methanotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 735–753.
- Bradley, A.S., Hayes, J.M., Summons, R.E., 2009. Extraordinary ¹³C enrichment of diether lipids at the Lost City Hydrothermal Field indicates a carbon-limited ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73, 102–118. doi:10.1016/j.gca.2008.10.005
- Chen, Z., Xing, B., McGill, W.B., 1999. A Unified Sorption Variable for Environmental Applications of the Freundlich Equation. *Journal of Environmental Quality* 28, 1422–1428. doi:10.2134/jeq1999.00472425002800050005x
- Claessen, D., Rozen, D.E., Kuipers, O.P., Søgaaard-Andersen, L., Van Wezel, G.P., 2014. Bacterial solutions to multicellularity: A tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews Microbiology* 12, 115–124. doi:10.1038/nrmicro3178
- Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., 1998. Chemical Description of Extracellular Polymers: Implication on Activated Sludge Floc Structure. *Water Science and Technology* 38, 45–53.
- Dowling, N.J.E., Nichols, P.D., White, D.C., 1988. Phospholipid fatty acid and infra-red spectroscopic analysis of a sulphate-reducing consortium. *FEMS Microbiology Letters* 53, 325–333. doi:10.1016/0378-1097(88)90498-3
- EBC, 2022. 'European Biochar Certificate --- Guidelines for a Sustainable Production of Biochar, Version 4.8 of 13th Dezember 2013. European Biochar Foundation (EBC), Arbaz, Switzerland.

- Erto, A., Andreozzi, R., Di Natale, F., Lancia, A., Musmarra, D., 2010. Experimental and statistical analysis of trichloroethylene adsorption onto activated carbon. *Chemical Engineering Journal* 156, 353–359. doi:10.1016/j.cej.2009.10.034
- Francesca Cotrufo, M., Soong, J., Vandegehuchte, M.L., Nguyen, T., Deneff, K., Ashley Shaw, E., Sylvain, Z.A., De Tomasel, C.M., Nielsen, U.N., Wall, D.H., 2014. Naphthalene addition to soil surfaces: A feasible method to reduce soil micro-arthropods with negligible direct effects on soil C dynamics. *Applied Soil Ecology* 74, 21–29. doi:10.1016/j.apsoil.2013.09.008
- Freundlich, H.M.F., 1906. Über die Adsorption in Lösungen. *J. Phys. Chem* 57, 1100–1107.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1621–1625. doi:10.1016/j.soilbio.2010.11.021
- Granzin, S., Valtl, M., 2018. Verdachtsflächenkataster und Altlastenatlas. Umweltbundesamt GmbH, Wien, Wien.
- Hunkeler, D., Meckenstock, R.U., Lollar, B.S., Schmidt, T.C., Wilson, J.T., Risk, N., Hunkeler, D., Meckenstock, R.U., Lollar, B.S., Schmidt, T.C., Wilson, J.T., 2008. A Guide for Assessing Biodegradation and Source Identification of Organic Ground Water Contaminants using Compound Specific Isotope Analysis (CSIA). USEPA Publication EPA 600/R-, 1–82. doi:EPA/600/R-08/148
- Javier, L., Farhat, N.M., Vrouwenvelder, J.S., 2021. Enhanced hydraulic cleanability of biofilms developed under a low phosphorus concentration in reverse osmosis membrane systems. *Water Research X* 10, 100085. doi:10.1016/j.wroa.2020.100085
- Jochmann, M.A., Blessing, M., Haderlein, S.B., Schmidt, T.C., 2006. A new approach to determine method detection limits for compound-specific isotope analysis of volatile organic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 3639–3648. doi:10.1002/rcm.2784
- Joergensen, R.G., Emmerling, C., 2006. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169, 295–309. doi:10.1002/jpln.200521941
- Jugder, B.E., Ertan, H., Bohl, S., Lee, M., Marquis, C.P., Manefield, M., 2016. Organohalide respiring bacteria and reductive dehalogenases: Key tools in organohalide bioremediation. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.00249
- Leitner, S., Berger, H., Gorfer, M., Reichenauer, T.G., Watzinger, A., 2017. Isotopic effects of PCE induced by organohalide-respiring bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 24803–24815. doi:10.1007/s11356-017-0075-2

- Leitner, S., Meeran, K., Watzinger, A., 2023a. Stable isotope analysis of atmospheric CO₂ using a Gasbench II-Cold Trap-IRMS setting. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 37. doi:10.1002/rcm.9647
- Leitner, S., Reichenauer, T.G., Watzinger, A., 2018. Impact of sorption processes on PCE concentrations in organohalide-respiring aquifer sediment samples. *Science of the Total Environment* 615, 1061–1069. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.225
- Leitner, S., Sobanski, F., Soja, G., Keiblinger, K., Stumpp, C., Watzinger, A., 2023b. Carbon isotope effects in the sorption of chlorinated ethenes on biochar and activated carbon. *Heliyon* 9, e20823. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e20823
- Löffler, F.E., Sanford, R.A., Ritalahti, K.M., 2005. Enrichment, cultivation, and detection of reductively dechlorinating bacteria. *Methods in Enzymology* 397, 77–111. doi:10.1016/S0076-6879(05)97005-5
- Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H., Spormann, A.M., 2013. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis nov.*, order *Dehalococcoidales ord. nov.* and famil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 625–635. doi:10.1099/ijs.0.034926-0
- Londry, K.L., Dawson, K.G., Grover, H.D., Summons, R.E., Bradley, A.S., 2008. Stable carbon isotope fractionation between substrates and products of *Methanosarcina barkeri*. *Organic Geochemistry* 39, 608–621. doi:10.1016/j.orggeochem.2008.03.002
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339, 69–72. doi:10.1016/j.ab.2004.12.001
- Mohapatra, B., Phale, P.S., 2021. Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, 1–28. doi:10.3389/fbioe.2021.602445
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., Meckenstock, R.U., 2002. Carbon and Hydrogen Stable Isotope Fractionation during Aerobic Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5191–5194. doi:10.1128/aem.68.10.5191-5194.2002
- Mundle, S.O.C., Johnson, T., Lacrampe-couloume, G., Pe, A., Duhamel, M., Edwards, E.A., McMaster, M.L., Cox, E., Re, K., Lollar, B.S., 2012. Monitoring Biodegradation of Ethene and Bioremediation of Chlorinated Ethenes at a Contaminated Site Using Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA).

- Munz, C., Roberts, P. V., 1986. Effects of solute concentration and cosolvents on the aqueous activity coefficient of halogenated hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* 20, 830–836. doi:10.1021/es00150a013
- Pan, X., Liu, J., Zhang, D., Chen, X., Li, L., Song, W., Yang, J., 2010. A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using threedimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA* 36. doi:10.4314/wsa.v36i1.50914
- Paul, D., Skrzypek, G., Fórizs, I., 2007. Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales – a review. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 3006–3014. doi:10.1002/rcm.3185
- Rossi, M.M., Silvani, L., Amanat, N., Petrangeli Papini, M., 2021. Biochar from Pine Wood, Rice Husks and Iron-Eupatorium Shrubs for Remediation Applications: Surface Characterization and Experimental Tests for Trichloroethylene Removal. *Materials* 14, 1776. doi:10.3390/ma14071776
- Schreiter, I.J., Schmidt, W., Schüth, C., 2018. Sorption mechanisms of chlorinated hydrocarbons on biochar produced from different feedstocks: Conclusions from single- and bi-solute experiments. *Chemosphere* 203, 34–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.03.173
- Singh, R., Babu, J.N., Kumar, R., Srivastava, P., Singh, P., Raghubanshi, A.S., 2015. Multifaceted application of crop residue biochar as a tool for sustainable agriculture: An ecological perspective. *Ecological Engineering*. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.01.011
- Walker, J.M., 1994. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 32, 5–8. doi:10.1385/0-89603-268-x:5
- Watzinger, A., 2015. Microbial phospholipid biomarkers and stable isotope methods help reveal soil functions. *Soil Biology and Biochemistry* 86, 98–107. doi:10.1016/j.soilbio.2015.03.019
- Watzinger, A., Stemmer, M., Pfeffer, M., Rasche, F., Reichenauer, T.G., 2008. Methanotrophic communities in a landfill cover soil as revealed by [13C] PLFAs and respiratory quinones: Impact of high methane addition and landfill leachate irrigation. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 751–762.
- Wawra, A., Friesl-Hanl, W., Jäger, A., Puschenreiter, M., Soja, G., Reichenauer, T., Watzinger, A., 2018a. Investigations of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons based on 13C-labeled phenanthrene in a soil co-contaminated with trace elements using a plant assisted approach. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 6364–6377. doi:10.1007/s11356-017-0941-y

- Wawra, A., Friesl-Hanl, W., Puschenreiter, M., Soja, G., Reichenauer, T., Roithner, C., Watzinger, A., 2018b. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a mixed contaminated soil supported by phytostabilisation, organic and inorganic soil additives. *Science of the Total Environment* 628–629, 1287–1295. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.156
- Wick, L.Y., Pelz, O., Bernasconi, S.M., Andersen, N., Harms, H., 2003. Influence of the growth substrate on ester-linked phospho- and glycolipid fatty acids of PAH-degrading *Mycobacterium* sp. LB501T. *Environmental Microbiology* 5, 672–680. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00455.x
- Yan, J., Rash, B.A., Rainey, F.A., Moe, W.M., 2009. Isolation of novel bacteria within the *Chloroflexi* capable of reductive dechlorination of 1,2,3-trichloropropane. *Environmental Microbiology* 11, 833–843. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01804.x
- Yang, G., Lin, J., Zeng, E.Y., Zhuang, L., 2019. Extraction and characterization of stratified extracellular polymeric substances in *Geobacter* biofilms. *Bioresource Technology* 276, 119–126. doi:10.1016/j.biortech.2018.12.100
- Zehnder, A.J.B., Wuhrmann, K., 1975. Titanium (III) Citrate as a Nontoxic Oxidation-Reduction Buffering System for the Culture of Obligate Anaerobes Vertebrate Central Nervous System : Same Neurons Mediate Both Electrical and Chemical Inhibitions. *Science* 194, 1165–1166.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111–129. doi:10.1007/s003740050533
- Zytner, R., Biswas, N., Bewtra, J.K., 1989. Adsorption and desorption of perchloroethylene in soils, peat moss, and granular activated carbon. *Canadian Journal of Civil Engineering* 16, 798–806. doi:10.1139/l89-123

Bundesministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie, Mobilität, Innovation und Technologie

Radetzkystraße 2, 1030 Wien

+43 1 711 62 65-0

email@bmk.gv.at

bmk.gv.at