



Mikrobieller Abbau

Massentransfer im System Schadstoff - Wasser - Sediment

Der mikrobiologische Abbau von Schadstoffen in der aquatischen Umwelt wird wesentlich von den vorherrschenden Redoxbedingungen und Stoffaustauschprozessen (Bioverfügbarkeit) beeinflusst. In einem neuen Vorhaben befasst sich das Technologiezentrum Wasser (TZW) mit den mikrobiellen Umsetzungsprozessen unter dynamischen Bedingungen, wie sie im Gebiet des Drei- Schluchten- Damms (Three Gorges Dam/ TGD) am Yangtze zu erwarten sind. Insbesondere molekularbiologische Methoden (PCR, Polymerase Chain Reaction, sowie DGGE, Denaturierende Gradienten Gel-Elektrophorese) werden für ein gezieltes Monitoring eingesetzt und weiterentwickelt. Der Fokus der Untersuchungen liegt zunächst auf dem Abbau der halogenierten Substanzen, die als Leitsubstanzen zum Verständnis der Stoffaustauschprozesse zwischen Sediment und Wasserkörper und der mikrobiellen Umsetzungsprozesse dienen. Ziel ist ein erweitertes Prozessverständnis und die Erfassung der Umsatzdynamik.

Konzeptionelles Modell

Der Yangtze im Bereich des Drei-Schluchten-Staudamms ist, wie weltweit viele Oberflächengewässer, durch den Eintrag von verschiedenartigen Schadstoffen mit hoher Umweltrelevanz sowie einem hohen Gehalt an sedimentierbaren Trübstoffen in den Zuflüssen gekennzeichnet [1]. Bei der Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit im Reservoir ist eine Sedimentation von Feststoffen in der Füllphase, und damit eine Verlagerung der Partikel von den aeroben Bereichen in die tieferen anaeroben Bereiche zu erwarten. Während der Abflussphase wird durch die erhöhte Turbulenz eine Resuspendierung der Partikel begünstigt. Daher können sich periodisch wechselnde Gehalte an Partikeln/Feststoffen und wechselnde Milieubedingungen im Wasserkörper und Sediment ergeben, die signifikante Auswirkungen auf den Schadstoffhaushalt und die mikrobiellen Abbauprozesse haben (Abb. 1).

Hydrophobe Schadstoffe wie chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW), z.B. Pentachlorphenol

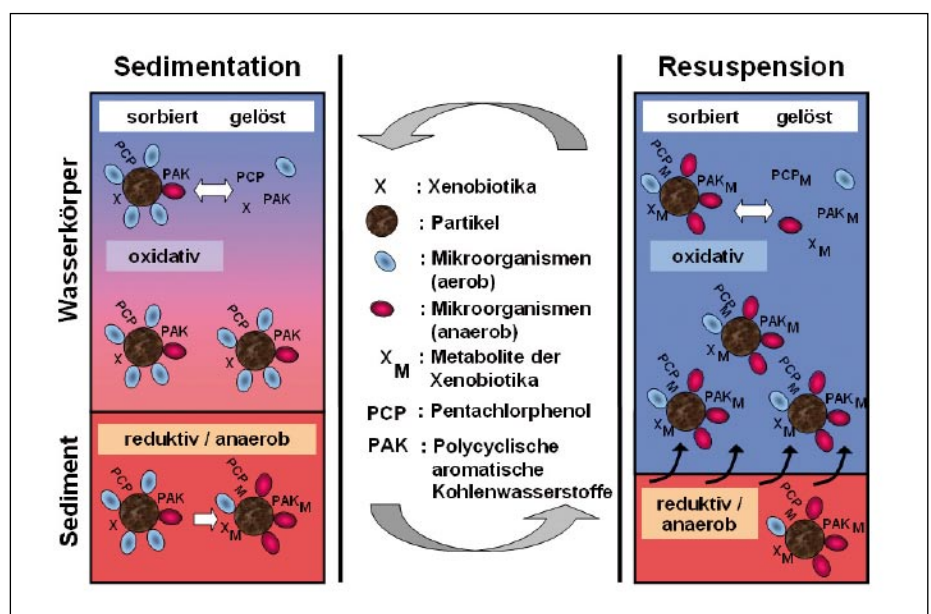


Abb. 1: Konzeptionelles Modell von Massentransfer und Abbauprozessen während der Sedimentation und Resuspension bei erhöhter Turbulenz



© Drei-Schluchten-Damm, Sandouping, Hubei Province, China. © Nowozin

(PCP) sorbieren stark am Sediment und werden deshalb mit diesem verfrachtet. Während hochchlorierte Verbindungen bevorzugt anaerob reaktiv abgebaut werden, werden die niedriger chlorierten Abbauprodukte oder Kohlenwasserstoffe besser unter aeroben Bedingungen verwertet [2]. Besonderes Interesse gilt dabei der Dynamik des Systems bei wechselnden Feststoffgehalten und Redoxbedingungen.

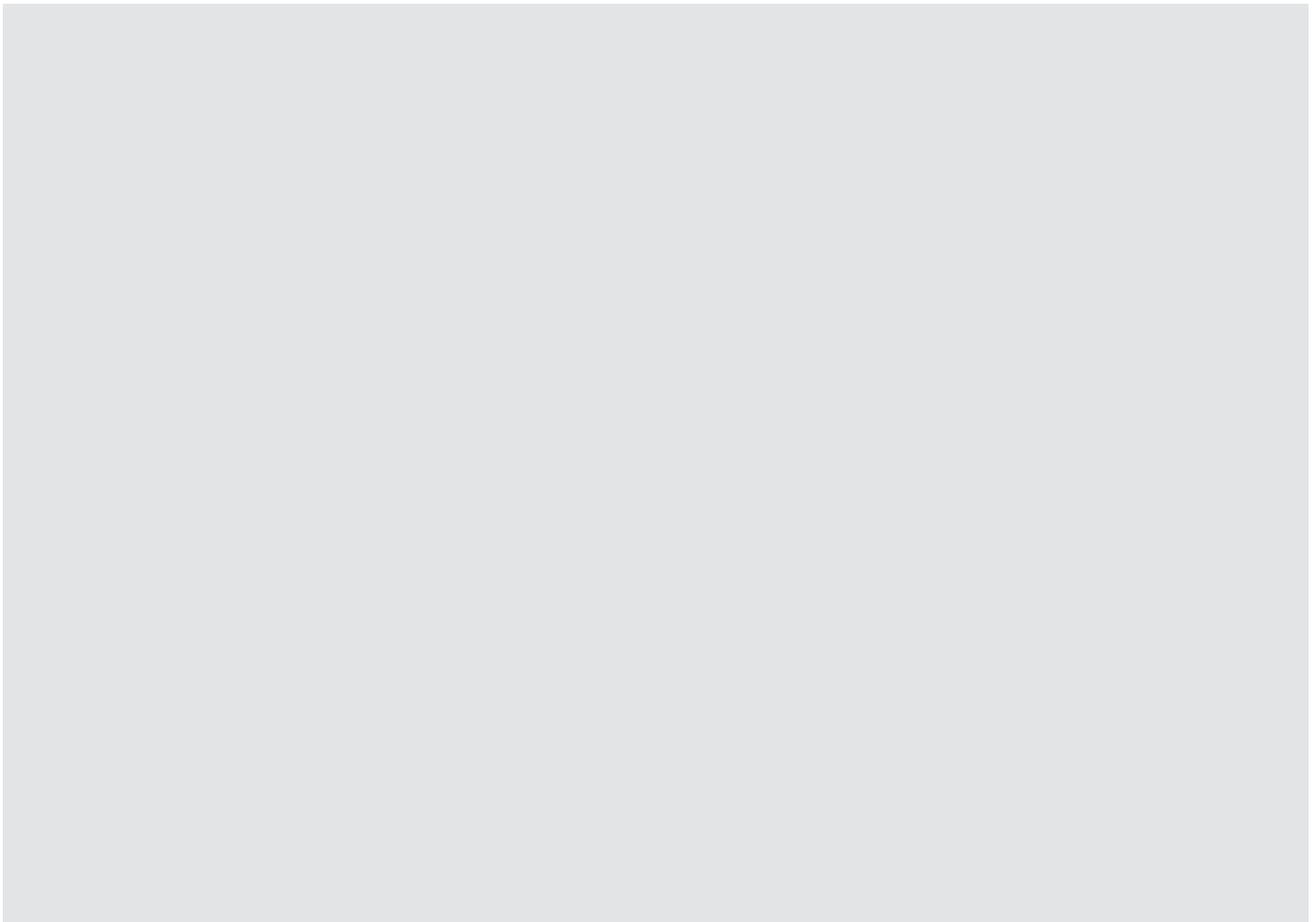
Aufgrund ihrer zum Teil toxischen und krebserregenden Eigenschaften und ihrer weiten Verbreitung sind halogenierte Kohlenwasserstoffe

(HKW) höchst relevante Umweltschadstoffe, die in den Untersuchungen als Leitsubstanzen verwendet werden.

Biologischer Abbau von HKW

Bei der reduktiven Dechlorierung via Halorespiration werden höher chlorierte Kohlenwasserstoffe wie Tetrachlorethen (PCE) und Trichlorethen (TCE) über die Zwischenprodukte cis-Dichlorethen (cDCE) und Vinylchlorid (VC) bis zum dehalogenierten Endprodukt Ethen abgebaut [3]. Je mehr Chlorato-

me das Molekül enthält, desto leichter verläuft eine reduktive Dechlorierung. Dabei erfolgt der initiale mikrobiologische Angriff in der Regel unter anaerob-reduktiven Bedingungen. Je weniger Chloratome an das Ethenmolekül gebunden sind, desto leichter ist eine oxidative Dechlorierung unter aeroben Bedingungen möglich. Dabei werden die Schadstoffe mineralisiert und als Endprodukte entstehen Kohlenstoffdioxid, Chlorid und Wasser. Beim anaeroben Abbau mittels Halorespiration oder Co-Metabolismus werden Wasserstoff oder Acetat als Elektronen-Donoren benötigt, die in der Regel aus



der Fermentation komplexer organischer Substrate hervorgehen [2]. Bei der Halorespiration ist es den abbauenden Bakterien möglich, Energie aus dem Schadstoffabbau zu gewinnen (Abb. 2).

Der Wechsel zwischen anaeroben und aeroben Bereichen kann somit einen vollständigen Abbau fördern [4]. Im dynamischen System ist allerdings auch eine hemmende Wirkung denkbar, wenn Sauerstoff toxisch auf die strikt anaeroben Mikroorganismen wirkt.

Am TZW liegen fundierte Erfahrungen über den mikrobiologischen Abbau von chlorierten Ethenen vor [2,5,6]. Die Mikroorganismen *Dehalobacter sp.*, *Desulfuromonas sp.*, *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfitobacterium sp.* und *Dehalococcoides sp.* sind bekannt dafür, chlorierte Ethene abzubauen. Allerdings kann nur *Dehalococcoides sp.* den ganzen Abbaupfad vom PCE zum Ethen durchführen [3]. Einige Stämme der *Dehalococcoides sp.* können chlorierte Benzole und chlorierte Phenole abbauen, z.B. *Dehalococcoides sp.* Stamm CBDB1 und *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 [7,8]. Werden die dechlorierenden Mikroorganismen an einem Standort nachgewiesen, ist dies ein Hinweis auf das Potential zur anaeroben Dechlorierung. Ein innovativer Ansatz in der Umwelttechnik ist die Anwendung von molekularbiologischen Methoden zum schnellen Nachweis schadstoffabbauender Mikroorganismen wie z.B. die oben genannten dechlorierenden Mikroorganismen und spezifischer Enzyme wie z.B. Tetrachlorethen Dehalogenase (*pceA*), Trichlorethen Dehalogenase (*tceA*) und Vinylchlorid Dehalogenase (*vcrA*, *bvcA*). Ein wesentlicher Vorteil molekularbiologischer Methoden liegt in der Konservierbarkeit von Proben, sowie dem geringen Zeitbedarf für Analysen und der dadurch möglichen hohen Probenzahl. Zu den molekularbiologi-

schen Methoden zählen PCR, real-time PCR, Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) (Abb. 3) und Fingerprinting mittels DGGE. Bei der PCR wird eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Nukleinsäuren der Mikroorganismen getroffen, mit Hilfe der real-time PCR ist zusätzlich eine quantitative Aussage möglich. Werden die abbauspezifischen Enzyme mittels RT-PCR ermittelt, lässt sich nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die Aktivität der Mikroorganismen nachweisen. Der spezifische Nachweis schadstoffabbauender Enzyme erfordert eine Charakterisierung der mRNA, für das jeweilige schadstoffabbauende Enzym. Dafür werden enzimspezifische Primer eingesetzt, die den gezielten Nachweis des jeweiligen Enzyms mittels PCR ermöglichen.

Bei einer RT-PCR wird mit Hilfe spezifischer Primer und der Reversen Transkriptase, der zur mRNA komplementäre DNA Strang synthetisiert. Der mRNA Strang wird durch das Enzym RNase zersetzt, der neu synthetisierte DNA-Doppelstrang bleibt erhalten (Abb. 3(B)). Zum Nachweis der spezifischen DNA-Sequenz wird eine PCR durchgeführt, bei der mit Hilfe spezifischer Oligonukleotid-Primerpaare, den Nukleotiden ATP, GTP, CTP, TTP und einer DNA Polymerase gezielt DNA-Abschnitte millionenfach kopiert werden (Abb. 3(A)). Die DNA-Kopien lassen sich als Banden auf einem Agarosegel sichtbar machen. Bei einer PCR mit einem enzym-spezifischen Primerpaar entsteht nur dann ein Amplifikationsprodukt definierter Länge, wenn DNA für das gesuchte Enzym in der Probe vorliegt.

Schwerpunkte der Untersuchungen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens werden die molekularbiologischen Methoden zum

Nachweis von spezifischen Mikroorganismen und funktionellen Genen zunächst weiterentwickelt und nachfolgend zur Untersuchung der mikrobiologischen Abbauprozesse eingesetzt.

Die Schwerpunkte dabei sind:

- Analytisches Screening mit einem Schwerpunkt auf chlorierten Verbindungen
- Weiterentwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden
- Nachweis und Quantifizierung von Bakterien mittels PCR
- Nachweis der Abbauprozesse anhand der mRNA
- Fingerprinting mit DGGE zur Populationsanalyse
- Experimentelle Untersuchungen zum anaeroben Abbau chlorierter Verbindungen (Modellsubstanzen Chlorethene und z.B. PCP)
- Erfassung der Dynamik der Abbauprozesse für chlorierte Verbindungen mit dem Schwerpunkt auf anaeroben Prozessen
- Vergleich der Dynamik aerober Prozesse anhand von z.B. Dioxygenasen
- Dynamik der mikrobiologischen Population (CKW-Verwerter, anaerobe / aerobe Mikroorganismen) bei wechselnden Milieubedingungen
- Massentransfer und Abbau von Schadstoffen als Funktion der Sedimentassoziation

Die Anwendung analytischer und innovativer molekularbiologischer Techniken ermöglicht vertiefte Erkenntnisse über die Dynamik der Stoffaustausch- und Abbauprozesse im Wasser/Sediment-System. Daraus abgeleitet können die Auswirkungen zukünftiger Eingriffe beurteilt und gegebenenfalls Maßnahmen zur gezielten Beeinflussung der Prozesse ergriffen werden.

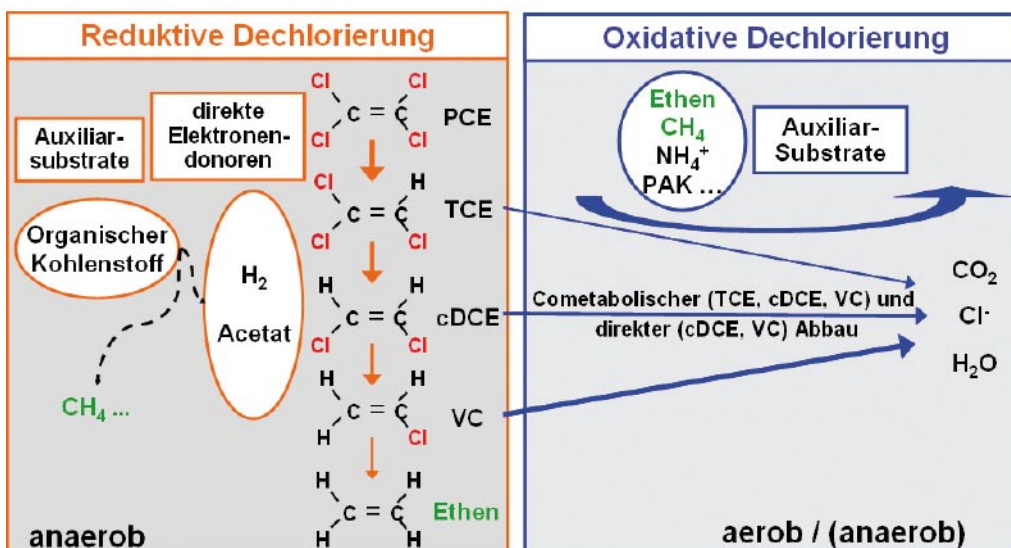


Abb. 2: Anaerobe und aerobe Prozesse beim Abbau halogenierter Schadstoffe am Beispiel der Chlorethene; Tetrachlorethen (PCE), Trichlorethen (TCE), cis-Dichlorethen (cDCE), Vinylchlorid (VC), Polyaromatische Kohlenstoffe (PAK)

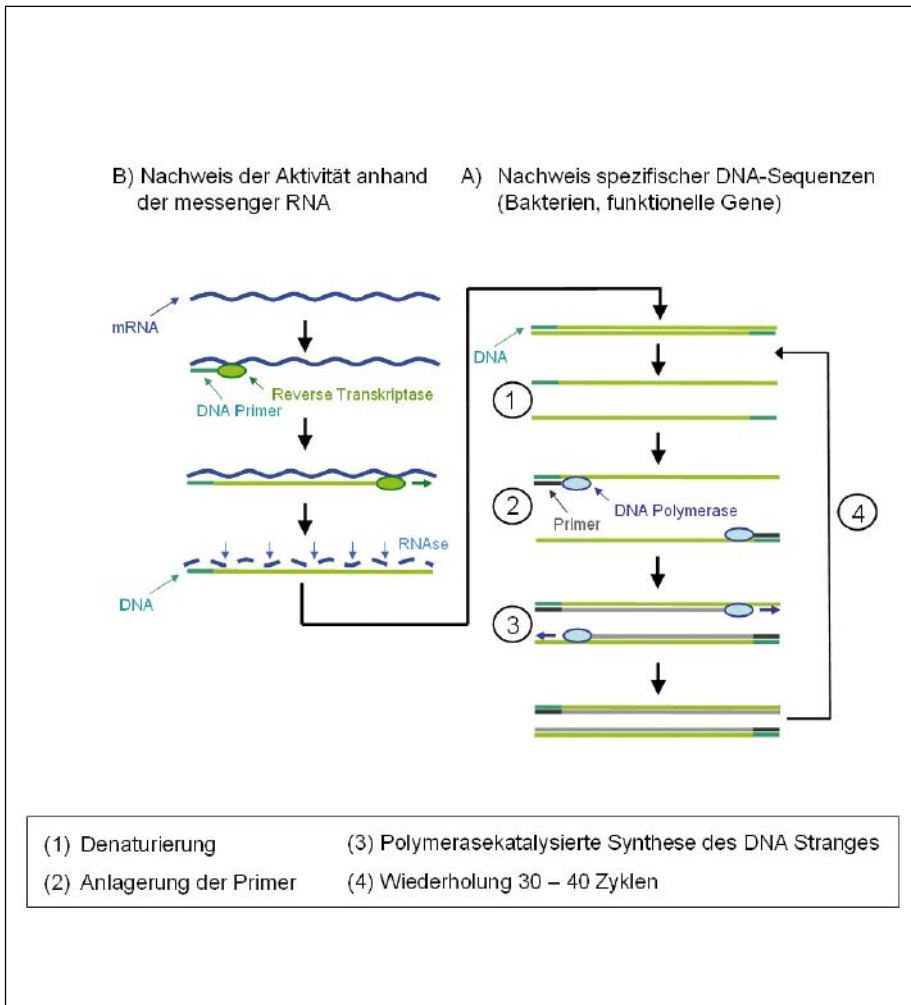


Abb. 3: Reaktionsschema einer DNA Synthese aus mRNA und der darauffolgenden PCR.

Danksagung

Die Autoren danken dem BMBF (Förderkennzeichen 02WT1130) für die finanzielle Förderung des Vorhabens.

Literatur

- [1] Wilken R.D. *et al.*: GIT Laborfachzeitschrift 55(6), 388–391 (2011)
- [2] Schmidt K.R. und Tiehm A.: Water Sci Techn. 58(5), 1137–1145 (2008)
- [3] Mattes T.E. *et al.*: FEMS Microbiol Rev 34, 445–475 (2010)
- [4] Tiehm A. und Schmidt K.R.: Current Opinion in Biotechnology 22(3), 415–421 (2011)
- [5] Schmidt K.R. *et al.*: Chemosphere 78(5), 527–32 (2010)
- [6] Zhao H.P. *et al.*: Water Research 44(7), 2276–2282 (2010)
- [7] Adrian L. *et al.*: Environ Sci Technol. 1;41(7), 2318–23. (2007)
- [8] Fennell D.E. *et al.*: Environ Sci Technol. 1;38(7), 2075–81 (2004)

Autoren

M. Sc. Irene Kranzioch, Dipl.-Ing (FH) Claudia Stoll, Dr. Andreas Tiehm

► KONTAKT

Dr. Andreas Tiehm
 Abteilung Umweltbiotechnologie & Altlasten
 Technologiezentrum Wasser (TZW)
 Karlsruhe
 andreas.tiehm@tzw.de