



LABORMACHBARKEITSSTUDIEN

VERTIEFENDE EINBLICKE IN
INNOVATIVE ANSÄTZE

Anja Wilken

AGENDA

- ▶ Labore und Untersuchungsmöglichkeiten
- ▶ Studie 1: Chrom VI - Reduktion und Immobilisation
 - Standort
 - Untersuchungskonzept
 - Ergebnisse
- ▶ Studie 2: Cyanide – Abbauverhalten und Next Generation Sequencing
 - Standort
 - NGS

UNTERSUCHUNGSMÖGLICHKEITEN

▶ Kiel

- Machbarkeitsstudien in Batch und Säulen
- Anaerobe Kultivierung: Sensabac-DHC
- ...

▶ Köln

- Machbarkeitsstudien Cyanide
- Aerobe Mikroorganismen Kultivierung



▶ Berlin

- Molekulargenetische Untersuchungen
- qPCR
- QuantArray Chlor, Petro
- NGS

MACHBARKEITSSTUDIEN – MOTIVATION

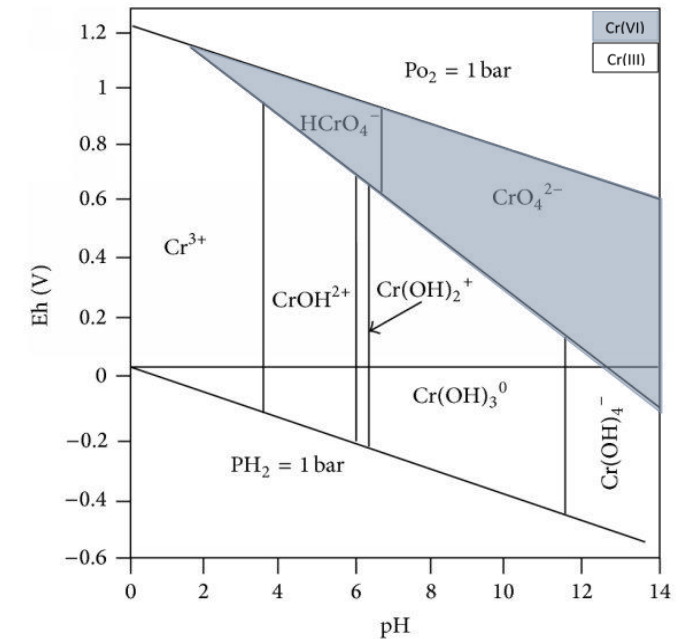
- ▶ Ziele von Labormachbarkeitsstudien?
 - Verbesserung der Wirtschaftlichkeit einer Sanierung
 - Ausarbeitung der „Best-fit“ Sanierungsstrategie → Standortspezifische Lösung
- ▶ Erkenntnisgewinn durch Machbarkeitsstudien:
 - besseres Prozessverständnis, der am Standort vorherrschenden Prozessen
 - Voruntersuchungen zur biologischen Aktivität
 - Betrachtung von Nebenreaktionen und Sekundärprozessen
 - Vergleich unterschiedlicher Sanierungsansätze → Biologisch/ chemisch?

STUDIE 1 - STANDORTINFORMATIONEN

- ▶ ehemaliger Industriestandort
- ▶ Metallveredelung, insbesondere Hartverchromung
- ▶ Schadstoffmix: LCKW, BTEX, Cr(VI)
- ▶ Teilsanierungen durchgeführt mittels Aushub
 - ABER: Restbelastung von Cr(VI)
- ▶ Möglichkeit der in situ Behandlung?
 - Reduktion
 - Adsorption
 - Variantenstudie

STUDIE 1: GRUNDLAGE DER CHROM (VI) REDUKTION

- ▶ Ziel: stabile Reduktion / Präzipitate / Adsorption
- ▶ Reduktion gefolgt von Copräzipitation
 - reduzierenden Bedingungen: Chrom(VI) → Chrom(III)
 - Chrom(III) → schwerlösliche Chrom(III)hydroxide
- ▶ Adsorption
 - Korrosion von Eisen im GW → Eisenhydroxide
 - Adsorption der Schwermetalle and Hydroxid Oberflächen



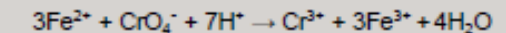
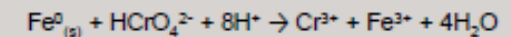
STUDIE 1: GRUNDLAGE DER CHROM (VI) REDUKTION

- ▶ Ziel: stabile Reduktion / Präzipitate / Adsorption
- ▶ Reduktion gefolgt von Copräzipitation
 - reduzierenden Bedingungen: Chrom(VI) → Chrom(III)
 - Chrom(III) → schwerlösliche Chrom(III)hydroxide
- ▶ Adsorption
 - Korrosion von Eisen im GW → Eisenhydroxide
 - Adsorption der Schwermetalle and Hydroxid Oberflächen

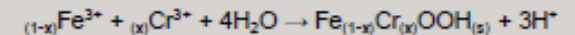
Reduktion & Co-Fällung

Entfernen von z.B. Cr(VI) als
Eisen-Chrom-Oxyhydroxid

Reduktion durch ZVI oder Fe(II)



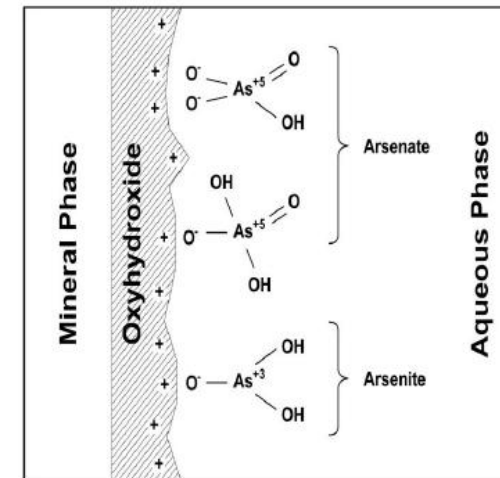
Co-Fällung



Quelle: Evonik

STUDIE 1: GRUNDLAGE DER CHROM (VI) REDUKTION

- ▶ Ziel: stabile Reduktion / Präzipitate / Adsorption
- ▶ Reduktion gefolgt von Copräzipitation
 - reduzierenden Bedingungen: Chrom(VI) → Chrom(III)
 - Chrom(III) → schwerlösliche Chrom(III)hydroxide
- ▶ Adsorption
 - Korrosion von Eisen im GW → Eisenhydroxide
 - Adsorption der Schwermetalle and Hydroxid Oberflächen



Quelle: Evonik

STUDIE 1: DESIGN DER LABORUNTERSUCHUNGEN

- ▶ Homogenisiertes Bodenmaterial vom Standort + GW
- ▶ Batchansatz
 - 3 Zuschlagstoffe (2x reduktiv, 1x adsorbtiv)
 - 3 Einsatzkonzentrationen
- ▶ Inkubationszeit: 10 Wochen
- ▶ 5 Analysezeitpunkte (Cr(VI) und Cr (ges.) in Überstand und Eluat des Bodens)

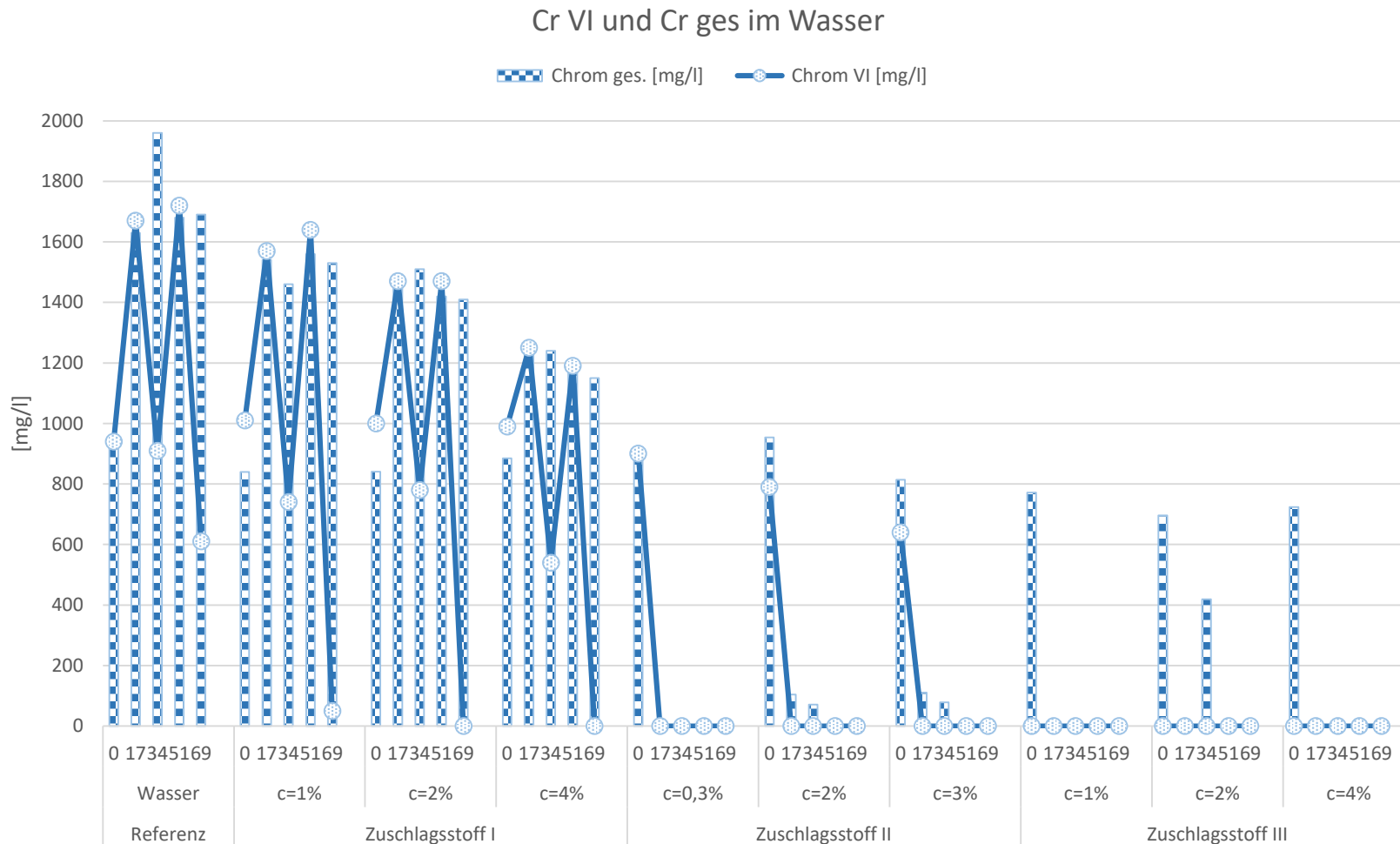
Ergebniserwartung

Wasser: Abnahme Cr(VI)
und Cr (ges.)

Boden: Abnahme Cr(VI)
Cr (ges.) konstant



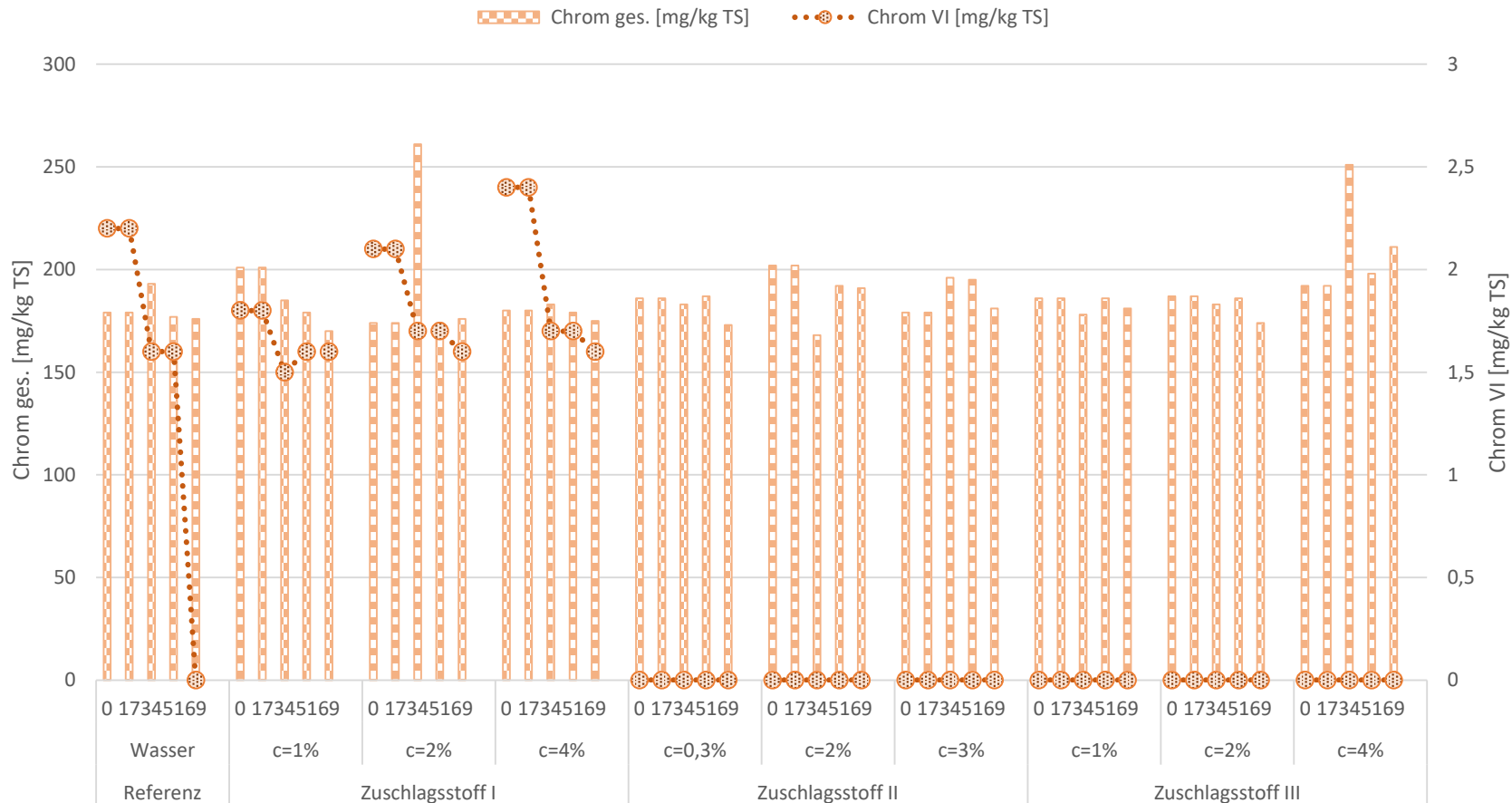
STUDIE 1: ERGEBNISSE WASSER



- ▶ Referenz: erhöhte Cr(VI) und Cr (ges.) Konzentrationen
- ▶ Zuschlagstoff I (adsorptiv): vgl. zur Referenz
- ▶ Zuschlagstoff II & III (reduktiv): deutliche Abnahme Cr(VI) und Cr(ges.)

STUDIE 1: ERGEBNISSE BODEN

Cr VI und Cr ges Boden



▶ Konstante Cr (ges.) Gehalte

▶ Referenz + Zuschlagstoff I (adsorptiv) → Cr (VI) erhöht

▶ Zuschlagstoff II und III (reduktiv) → keine Cr (VI)

STUDIE 1: FAZIT

- ▶ Ergebnisse der Laborstudie entsprechen der Erwartungshaltung
 - Abnahme Cr(VI) und Cr (ges.) im Wasser
 - Abnahme Cr(VI) im Boden
 - schnelle, wirksame Cr (VI) Reduktion nachweisbar
 - niedrige Einsatzkonzentration geeignet
 - ein geeigneter Zuschlagstoff identifiziert werden
- ▶ In Situ Sanierung mit Zuschlagstoff III wird in diesem Jahr begonnen

STUDIE 2: STANDORTINFORMATIONEN

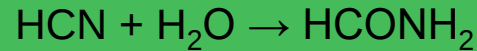
- ▶ ehemaliger Gaswerksstandort
- ▶ Altablagerungen von Produktionsresten
- ▶ Mischkontamination von PAK, Cyaniden
- ▶ Mehrere Schadensherde

- ▶ Möglichkeit der in situ Behandlung?
 - Mikrobiologischer Abbau
 - Sind cyanidabbauende Mikroorganismen vorhanden?
 - Wenn ja, läuft der Abbau hinreichend schnell ab?
 - Wenn nein, wie können diese stimuliert werden?

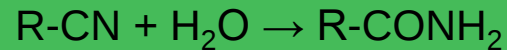
STUDIE 2: GRUNDLAGEN MIKROBIELLER ABBAU VON CYANIDEN - VIER GENERELLE ABBAUWEGE

Hydrolytische Reaktionen

Cyanid Hydratase



Nitrile Hydratase



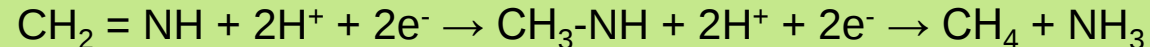
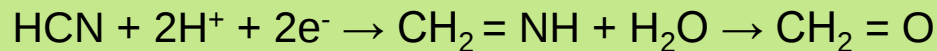
Cyanidase



Nitrilase

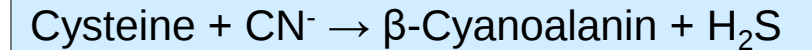


Reduktive Reaktionen

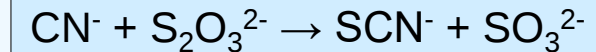


Substitution/Transfer-Reaktionen

Cyanoalanin Synthase

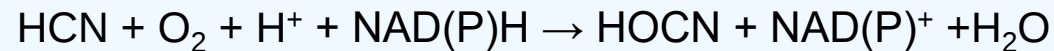


Thiosulfat: Cyanid Sulfurtransferase

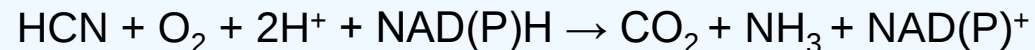


Oxidative Reaktionen

Cyanid Monooxygenase



Cyanid Dioxygenase



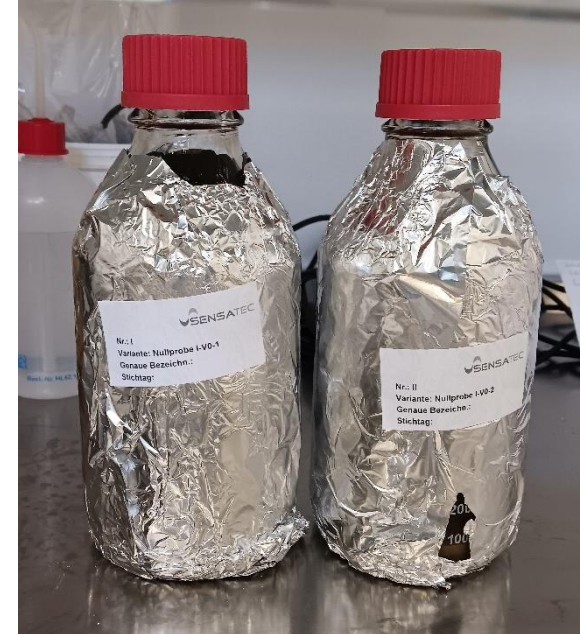
STUDIE 2: DESIGN DER LABORUNTERSUCHUNGEN

▶ Molekulargenetische Untersuchung

- Next Generation Sequencing (NGS)

▶ Labormachbarkeitsstudie

- homogenisiertes Bodenmaterial vom Standort + GW von drei Schadensherden
- Bestimmung des Nährstoffbedarfs
- Batchuntersuchung zum biol. Abbau von Cyaniden (4 Var.)
 - Unbehandelte Referenz
 - 3 stimulierte Varianten inkl. Bioaugmentation
- Inkubationszeit: 4 Wochen



MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN – WANN IST WELCHE ANALYTIK SINNVOLL?

2 Szenarien



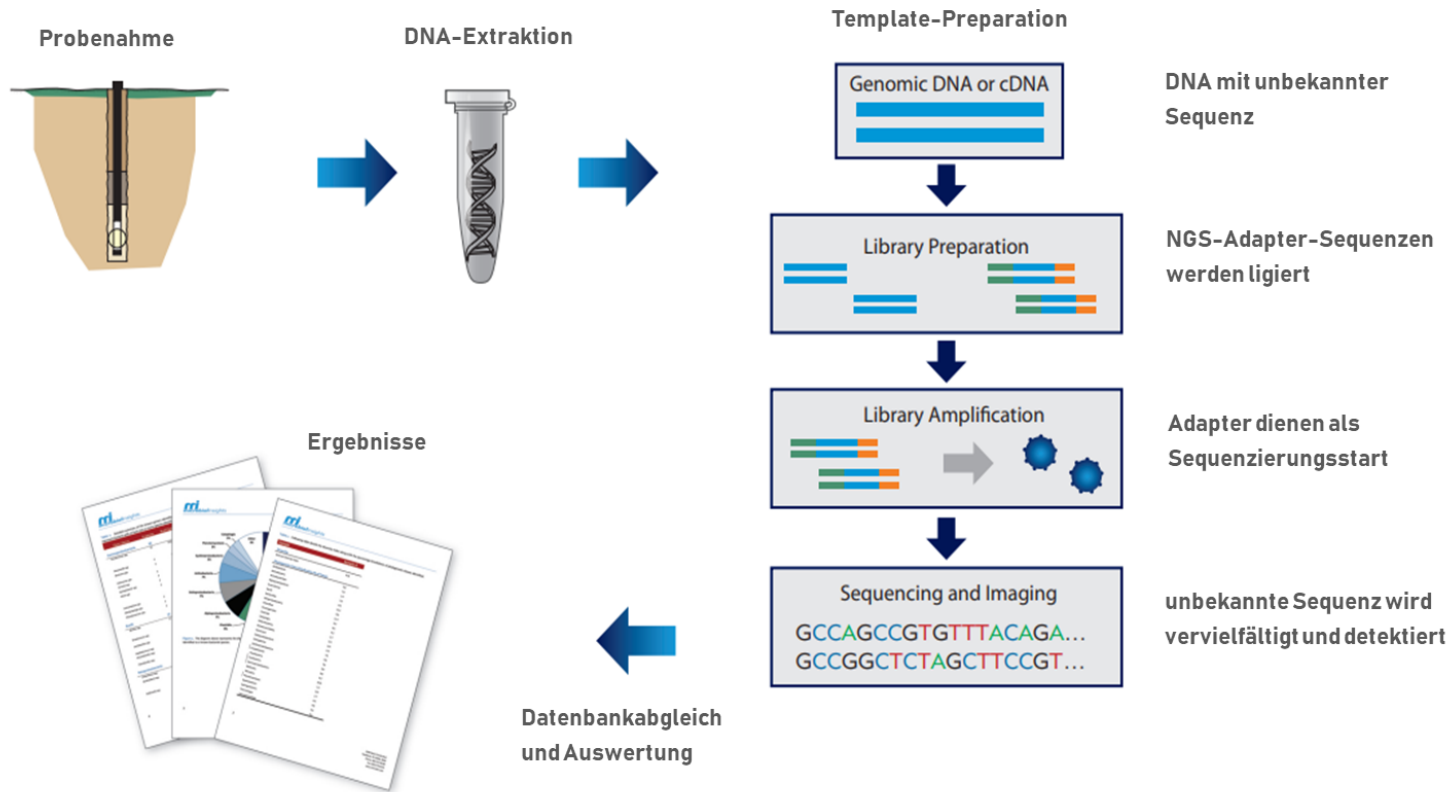
**Ich weiß,
welche Mikroorganismen / funktionalen
Gene für meine Fragestellung relevant und
zu detektieren sind:**

- ▶ **Census®:**
Sind einzelne Abbauer oder Gene vorhanden und wenn ja, in welcher Quantität (Potenzial)?
- ▶ **QuantArrays®:**
Parallele Quantifizierung unterschiedlicher Mikroorganismen und funktionaler Gene

**Ich weiß nicht,
welche Mikroorganismen / funktionalen Gene
für meine Fragestellung am Standort
vorhanden sind:**

- ▶ **Next Generation Sequencing (NGS):**
Identifizierung von Mikroorganismenstämmen und –familien und deren prozentualer Anteil im Milieu

WIE FUNKTIONIERT NGS ANALYTIK?



vereinfachte schematische Darstellung NGS-Analytik

WELCHE ERGEBNISSE LIEFERT NGS-ANALYTIK?

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	17,252,646	100.0%
Phylum	16,385,429	95.0%
Class	15,124,195	87.7%
Order	14,023,475	81.3%
Family	12,887,251	74.7%
Genus	11,753,291	68.1%
Species	8,878,494	51.5%

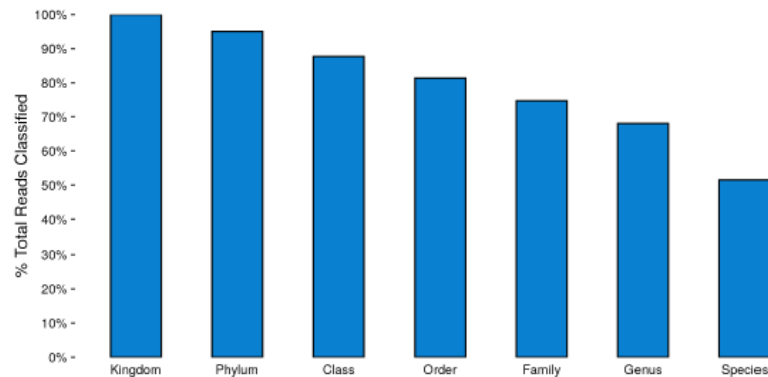
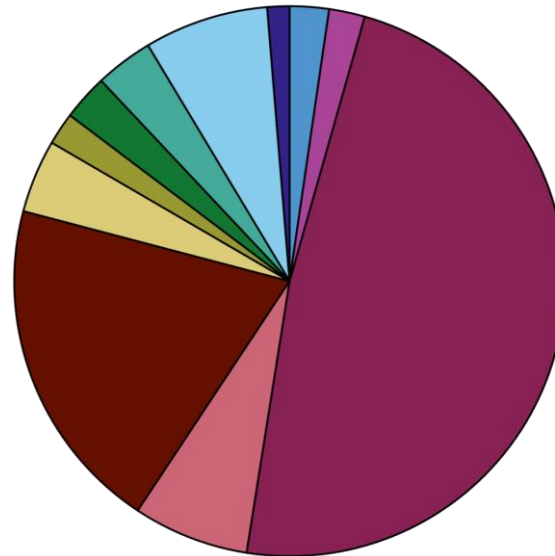
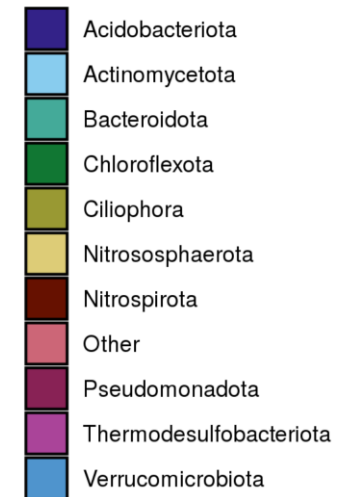


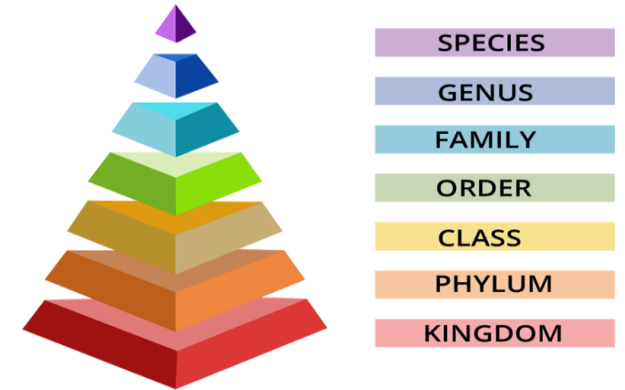
Figure 1: Classification Rate by Taxonomic Level for PN II



Top Phyla



Taxonomie



WONACH SUCHEN WIR? – BSP. MIKROBIELLER CYANIDABBAU

Reaktion	Funktionales Gen	Mikroorganismus (Bsp.)
Hydrolytische Reaktionen		
$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$	Cyanide Hydratase	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Bacillus Pumilus</i> , <i>Candida guilliermondii</i> aka <i>Plastodendron arztii</i> (Pilz)
$\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CONH}_2$	Nitrile Hydratase	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Pseudomonas Fluorescens</i> , <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Pseudomonas Putida</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.
$\text{HCN} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH}$	Cyanidase	<i>Bacillus Pumilus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas Fluorescens</i> , <i>Achromobacter Dentrificans</i> (aka <i>Alkaligenes Denitrificans</i>), <i>Klebsiella</i> sp.
$\text{R-CN} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-COOH}$	Nitrilase	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> *
Oxydative Reaktionen		
$\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{HOCN} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$	Cyanide Monooxygenase	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> strain NCINB11764**
$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADP}$	Cyanide Dioxygenase	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> strain NCINB11764**, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Escherichia coli</i>
Thiocyanat Abbau		
$\text{SCN}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$	Thiocyanate Hydrolase	<i>Mycobacterium Colombiense</i> CECT 3035, <i>Rhodococcus Equi</i> , <i>Thiobacillus thioparus</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Escherichia coli</i>
$\text{SCN}^- + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CNO}^- + \text{HS}^- \dots \text{SO}_4 + \text{H}_2 + \text{NH}_4 + \text{CO}_2$	Cyanase	<i>Sordaria Macrospora</i> (Pilz), <i>Pseudomonas Pseudoalkaligenes</i> subspec <i>Citrulli</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Escherichia coli</i>
Substitutionsreaktionen		
$\text{OAS} + \text{CN}^- \rightarrow \beta\text{-Cyanoalanin} + \text{CH}_3\text{COOH}$	Cyanoalanin Synthase	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>C. violaceum</i>
$\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$	Cyanide Sulfurtransferase	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas Denitrificans</i> ATCC13867
	Nitrogenase	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> (vermutlich)

► Mikroorganismen (bspw.):

- *Pseudomonas fluorescens*
- *Bacillus Pumilus*

► Funktionale Gene (bspw.):

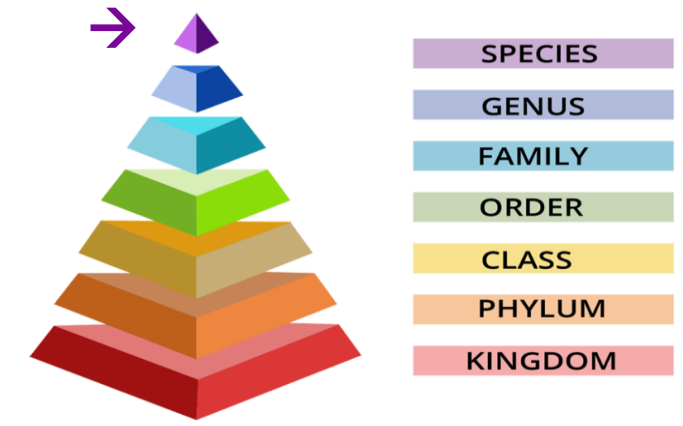
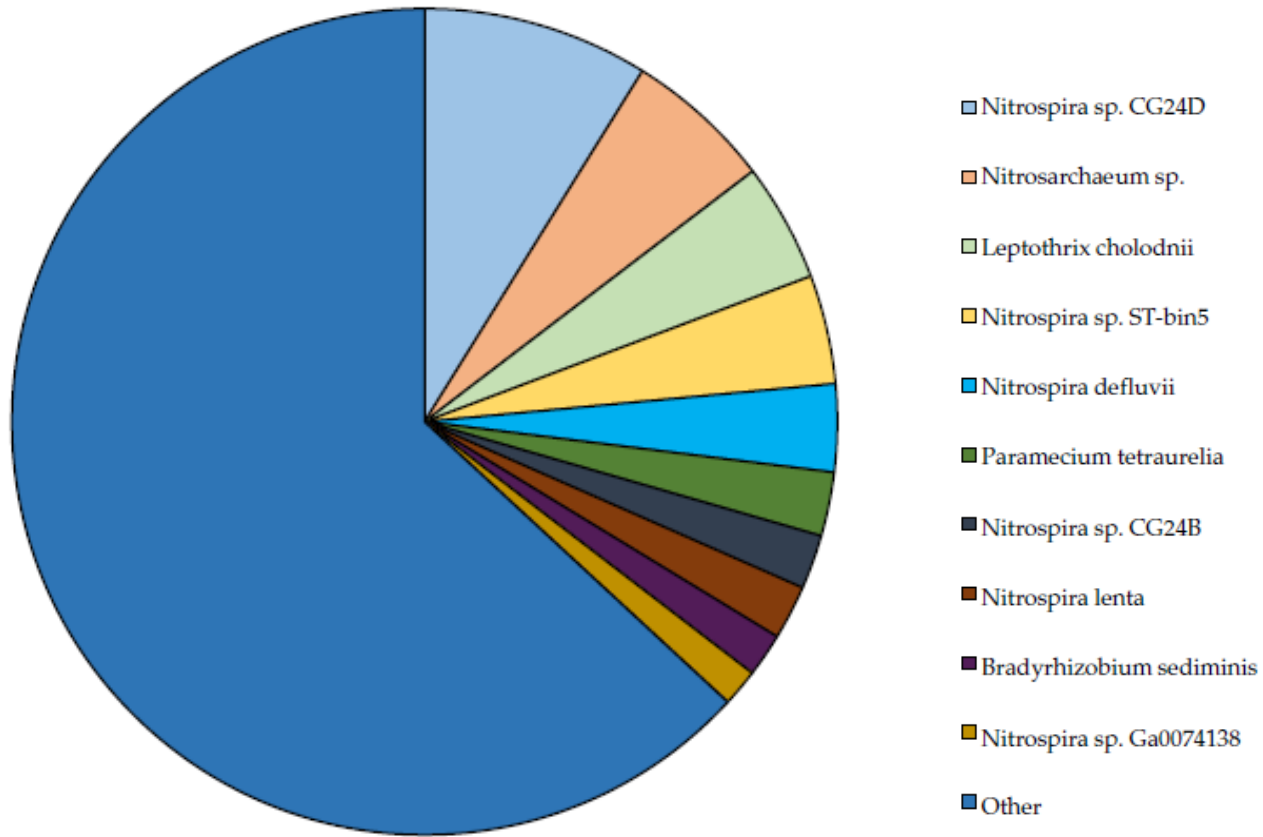
- Cyanid Hydratase
- Cyanidase

WONACH SUCHEN WIR? – BSP. MIKROBIELLER CYANIDABBBAU

Reaktion	Funktionales Gen	Mikroorganismus (Bsp.)
Hydrolytische Reaktionen		
$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCONH}_2$	Cyanide Hydratase	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Bacillus Pumilus</i> , <i>Candida guilliermondii</i> aka <i>Plastodendron arztii</i> (Pilz)
$\text{R-CN} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CONH}_2$	Nitrile Hydratase	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Pseudomonas Fluorescens</i> , <i>Brevibacterium</i> sp., <i>Pseudomonas Putida</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.
$\text{HCN} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCOOH}$	Cyanidase	<i>Bacillus Pumilus</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Pseudomonas Fluorescens</i> , <i>Achromobacter Dentrificans</i> (aka <i>Alkaligenes Denitrificans</i>), <i>Klebsiella</i> sp.
$\text{R-CN} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-COOH}$	Nitrilase	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> *
Oxydative Reaktionen		
$\text{HCN} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{HOCN} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$	Cyanide Monooxygenase	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> strain NCINB11764**
$\text{HCN} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3 + \text{NADP}$	Cyanide Dioxygenase	<i>Pseudomonas Fluorescens</i> strain NCINB11764**, <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Escherichia coli</i>
Thiocyanat Abbau		
$\text{SCN}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{COS} + \text{NH}_3 + \text{OH}^-$	Thiocyanate Hydrolase	<i>Mycobacterium Colombiense</i> CECT 3035, <i>Rhodococcus Equi</i> , <i>Thiobacillus thioparus</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Escherichia coli</i>
$\text{SCN}^- + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CNO}^- + \text{HS}^- \dots \text{SO}_4 + \text{H}_2 + \text{NH}_4 + \text{CO}_2$	Cyanase	<i>Sordaria Macrospora</i> (Pilz), <i>Pseudomonas Pseudoalkaligenes</i> subspec <i>Citrulli</i> , <i>Flavobacterium</i> sp., <i>Escherichia coli</i>
Substitutionsreaktionen		
$\text{OAS} + \text{CN}^- \rightarrow \beta\text{-Cyanoalanin} + \text{CH}_3\text{COOH}$	Cyanoalanin Synthase	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>C. violaceum</i>
$\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$	Cyanide Sulfurtransferase	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas Denitrificans</i> ATCC13867
	Nitrogenase	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i> (vermutlich)

$\text{CN}^- + \text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$
 Cyanide Sulfurtransferase
Pseudomonas Aeruginosa,
Pseudomonas Denitrificans ATCC13867

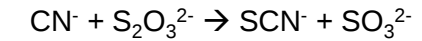
ERGEBNISSE AUF SPEZIES LEVEL



ERGEBNISTABELLE

Gene	Subsystem	Description
Sulfur oxidation protein SoxZ	Thiosulfate oxidation	Involved in the oxidation of thiosulfate to sulfate in thiosulfate oxidizing bacteria.
Sulfur redox associated protein DsrC	Dissimilatory sulfite reduction	Involved in the reduction of sulfite to hydrogen sulfide by sulfate and sulfite reducers.
Tellurite resistance protein (telA)	Tellurite resistance	Helps bacteria resist tellurium and its oxyanions which are highly toxic to bacteria due to their oxidative abilities.
Tellurite resistance protein TehB	Tellurite resistance	Helps bacteria resist tellurium and its oxyanions which are highly toxic to bacteria due to their oxidative abilities.
Tellurite resistance protein TerB	Tellurite resistance	Helps bacteria resist tellurium and its oxyanions which are highly toxic to bacteria due to their oxidative abilities.
Tellurium resistance protein TerA	Tellurite resistance	Helps bacteria resist tellurium and its oxyanions which are highly toxic to bacteria due to their oxidative abilities.
Tellurium resistance protein TerD	Tellurite resistance	Helps bacteria resist tellurium and its oxyanions which are highly toxic to bacteria due to their oxidative abilities.
Terpene utilization protein AtuA	Terpene utilization	Involved in the breakdown of acyclic terpenes.
Tetrathionate reductase sensory transduction histidine kinase	Tetrathionate reduction	Involved in the reduction of tetrathionate to thiosulfate.
Tetrathionate reductase subunit A	Tetrathionate reduction	Involved in the reduction of tetrathionate to thiosulfate.
Tetrathionate reductase subunit B	Tetrathionate reduction	Involved in the reduction of tetrathionate to thiosulfate.
Tetrathionate reductase subunit C	Tetrathionate reduction	Involved in the reduction of tetrathionate to thiosulfate.
Thiosulfate reductase cytochrome B subunit (membrane anchoring protein)	Thiosulfate reduction	Involved in the reduction of thiosulfate to sulfite and hydrogen sulfide.
Thiosulfate sulfurtransferase GlpE (EC 2.8.1.1)	Thiosulfate disproportionation	Involved in the transfer of sulfur from thiosulfate to hydrogen cyanide to form thiocyanate and sulfite.
Thiosulfate sulfurtransferase (EC:2.8.1.1)	Thiosulfate disproportionation	Involved in the transfer of sulfur from thiosulfate to hydrogen cyanide to form thiocyanate and sulfite.
Thiosulfate sulfurtransferase, rhodanase (EC 2.8.1.1)	Thiosulfate disproportionation	Involved in the transfer of sulfur from thiosulfate to hydrogen cyanide to form thiocyanate and sulfite.
Toluene-4-monooxygenase, subunit TmoA	BTEX biodegradation	Catalyzes the oxidation of BTEX compounds and chlorinated benzenes and can also be involved in the co-metabolism of TCE.

Beteiligt an der Übertragung von Schwefel von Thiosulfat zu Blausäure zu Thiocyanat und Sulfid



+ 24 weitere Seiten Übersicht

STUDIE 2 / NGS: FAZIT

- ▶ am Standort konnten Gene für den mikrobiellen Cyanidabbau gefunden werden
 - Stimulation in den Batchuntersuchungen erfolgreich

Fazit NGS

- ▶ NGS ist geeignet, die vollständige mikrobielle Gemeinschaft zu beschreiben und somit vorherrschende biogeochemische Prozesse zu charakterisieren
- ▶ NGS wird vor allem dann eingesetzt, wenn die biologischen Abbauwege für die vorhandenen Schadstoffe oder Schadstoffgemische (noch) nicht bekannt sind

Typische Fragestellungen NGS:

- ▶ Welche Mikroorganismen dominieren (bspw. aerob / anaerob)?
- ▶ Sind Spezialisten (z.B. Cyanidabbauer) vorhanden?
- ▶ Aufschluss über Unterschiede oder Veränderungen in den mikrobiellen Gemeinschaften durch Schadstoffe, im Zeitablauf oder als Reaktion auf Prozessvorgänge und Sanierungsmaßnahmen

FAZIT

- ▶ Labormachbarkeitsstudien / NGS bietet:
 - Kostengünstige Betrachtung vieler Varianten
 - Identifizierung ggf. nicht berücksichtigter Sanierungsmöglichkeiten
 - Mehr Klarheit im Hinblick auf unerwünschte Nebenreaktionen
 - Aufdeckung relevanter Sekundärprozesse
- ▶ Erkenntnisgewinn für eine effiziente und gezielte Sanierungsstrategie
 - Best-Fit für den Standort

VIELEN DANK FÜR IHRE
AUFMERKSAMKEIT.

Anja Wilken

TERMINANKÜNDIGUNG NÄCHSTES
WEBINAR FOLGT IN KÜRZE



KONTAKT

Sensatec GmbH
Sanierungs- und Sensoriktechnologien

Friedrichsorter Str. 32
D-24159 Kiel

a.wilken@sensatec.de

info@sensatec.de

www.sensatec.de