

Aufreinigungskaskade

Endbericht zum Forschungsprojekt Aug. 2019 - Okt. 2022





Impressum

Medieninhaber, Verleger und Herausgeber:

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

Projektleitung für die jeweilige Partnerorganisation: PD DI Dr. Maximilian Lackner, Prof. Dr. Andreas P. Loibner, DI Markus Plank, Dr. Karl Putz, Norbert Rüttinger

Projektkoordination: Norbert Rüttinger

Die Autor*innen der einzelnen Kapitel sind zu Beginn des jeweiligen Abschnitts genannt.
Wien, 2022. Stand: 31. Januar 2022

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 Bundeskanzleramtes und der Autorin/des Autors ausgeschlossen ist. Rechtsausführungen 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 maximilian.lackner@technikum-wien.at

Vorwort

Sehr geehrter Leser*innen,

Wir freuen uns, Ihnen mit diesem Werk einen Endbericht über unser Forschungsprojekt „Aufreinigungskaskade“ legen zu können.

Über einen Zeitraum von 2 Jahren hat sich ein interdisziplinäres Team im Rahmen des Projekts „Aufreinigungskaskade“ mit der Erforschung innovativer physikalischer und biochemischer Verfahren zur in-situ Sanierung von persistenten Kohlenwasserstoffschäden (Mineralölkohlenwasserstoffe, MKW, aber auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, PAK), befasst. Es wurden Anwendungsmöglichkeiten für einen kombinierten Einsatz von Sanierungsverfahren am konkreten Beispiel der Altlast N77 „Petroleumfabrik Drösing“ untersucht. Der Großteil der Arbeiten wurde in den Labors der wissenschaftlichen Partner mit kontaminiertem Material aus Drösing durchgeführt und diente der Entwicklung der neuartigen Verfahren, die in einem ersten Schritt die Hauptfracht an Schadstoffen durch Einsatz von Pflanzenöl-Emulsionen und Vliesen aus dem Untergrund bergen. In einem zweiten Schritt wurden im Untergrund verbliebene Kontaminanten mittels Enzymen metabolisiert. Dadurch wird ein in-situ Abbau von persistenten Kohlenwasserstoff-Gemischen wie sie an gealterten Schadensfällen bzw. Altlasten vorzufinden sind, ermöglicht und signifikant beschleunigt. Daraus resultiert eine erhebliche Verkürzung von Sanierungszeiten und eine Reduktion der damit verbundenen Gesamtkosten. Durch die Einbindung von wirtschaftlichen Partnern (3 KMU) wurde die Feldanwendung von Erkenntnissen bereits zu Beginn der Forschungsarbeiten mitgedacht und in weiterer Folge in der Verfahrensentwicklung berücksichtigt. Das Projekt „Aufreinigungskaskade“ baut auch auf einem abgeschlossenem Förderprojekt auf (ISPAK - Entwicklung eines Pflanzenöl-basierenden Verfahrens zur in-situ-Sanierung von PAK-kontaminierten Böden). Die Vorteile dieser Technologie sollten auf MKW-Kontaminationen umgelegt und in die neue Verfahrenskombination integriert werden. Das Projekt bestand aus 4 Arbeitspaketen. Arbeitspaket 1 umfasste klassisches Projektmanagement. Die eigentliche Forschungsarbeit erfolgte in Arbeitspaket 2 (Extraktion und Bindung von Kohlenwasserstoffen) und Arbeitspaket 3 (Enzymatischer Schadstoffabbau). Die federführenden Wissenschaftler im Projekt waren Prof. Dr. Andreas Loibner, PD DI Dr. Doris Ribitsch, PD DI Dr. Maximilian Lackner und Dr. Hermann J. Heipieper (Experte des UFZ-Leipzig, Deutschland).

Resultate des Projekts wurden über das 4. Arbeitspaket „Dissemination“ kommuniziert, u.a. mit einem Workshop vor Ort in Drösing am 31.05.2021 und einem weiteren in

Salzburg am 21.10.2021, unter Einbeziehung von Sachverständigen und Behörden. Mit heutigen Sanierungsverfahren ist die Wirtschaftlichkeit einer Sanierung von Altlasten wie der N77 häufig nicht gegeben, daraus generierte sich der Forschungsbedarf für die „Aufreinigungskaskade“. Die Entwicklung der untersuchten kosteneffizienten Technologiekombination bietet ein hohes Anwendungspotential, das weit über das Schadensszenario am Standort der N77 hinausgeht. Einerseits gibt es mit N77 vergleichbare Altlasten (u.a. N26 und N65), andererseits existieren zahlreiche weitere Altlasten und Verdachtsflächen, für die die hier entwickelte Verfahrenskombination der „Aufreinigungskaskade für gealterte Kohlenwasserstoffschäden“ eine kosteneffiziente und umweltschonende Sanierungsmöglichkeit darstellt (einige Beispiele an MKW- und PAK-Schäden sind: V3, K24, N64 und O59). Darüber hinaus konnten die Forschungspartner über 20 Studierende in Forschungsarbeiten einbinden und Erkenntnisse in die Lehrtätigkeit einfließen lassen. Genderaspekte wurden in die Ausarbeitung des Vorhabens einbezogen und werden in der Abwicklung des Projektes berücksichtigt.

Das Projektvolumen betrug € 870.656, davon erhielt das Konsortium eine Förderung von 80% (€ 696.525).

Dieser Endbericht fasst die Ergebnisse der Arbeitspakete 2 und 3 zusammen.

Das Konsortium hofft, dass die Ergebnisse aus dem Projekt „Aufreinigungskaskade“ bald den Weg in die Praxis finden, indem sie das Portfolio der in-situ Verfahren bereichern und helfen, Altlasten effizient und effektiv aufzuarbeiten.

Ihnen als Leser*innen wünschen wir viele Erkenntnisse aus dem Studium dieses Berichts!

Wien, am 31.01.2022

Norbert Rüttinger
Projektkoordination

Inhalt

Vorwort	3
Aufreinigungskaskade: Konzept des Projekts	7
Hintergrund: Die Altlast N77	7
Das Projekt „Aufreinigungskaskade“	10
Forschungsfragen	16
Meilensteine und Deliverables.....	17
Gender und Gleichbehandlung	18
Über die Partner	19
Bodenwäsche und Ölabtrennung: Arbeitspaket 2	24
Herstellung von Emulsionen.....	24
Auswaschen von MKW aus Bodenproben - Laborversuche	31
Auswaschen von MKW aus der ungesättigten Zone - Feldversuche	37
Auswaschen von MKW aus der gesättigten Zone - Feldversuche	39
Trennen von Öl/Wasser mittels Vliesen.....	40
Aufarbeiten von 500m ³ Grundwasser	42
Enzymatischer Schadstoffabbau: Arbeitspaket 3	45
Highlights.....	45
Lowlights.....	46
Allgemeine Darstellung des Arbeitsansatzes	46
Analyse von Feststoffproben.....	47
Auswahl funktioneller Enzyme (M3.1.)	51
Auswahl bekannter Enzyme.....	52
Auswahl von Enzymen durch genetische Analyse von Anreicherungskulturen	53
Enzym-Screening mit proteomischer Analyse	70
Nachweis der Funktionalität der Enzyme (M3.2.).....	75
Enzymatischer Abbau von Leitsubstanzen im physiologischen Testsystem.....	75
Enzymatischer Abbau von Leitsubstanzen in dynamischen Boden/Grundwasser Modellsystemen.....	85
Enzymatischer Abbau von Leitsubstanzen im Boden/Grundwasser Durchflusssystem.	96
Enzymatischer Abbau von MKW im dynamischen Boden/Grundwassermodellssystem 100	
Enzymatischer Abbau von MKW im Boden/Grundwasser Durchflusssystem	111
Anwendung der Enzyme im Feldversuch (M3.3.)	112
Immobilisierung von Enzymen an Vliesen	113
Erhöhung der Ladekapazität der Vliese durch Enzyme	115

Feldversuch	117
Engineering-Aspekte: Zum Transfer in die Praxis	127
Auslegung der Feldversuche	127
Durchführung der Feldversuche.....	137
Ergebnisse des Projekts: Diskussion, Zusammenfassung	141
Bewertung der Verfahrenskombinationen	141
Publikationstätigkeit.....	144
Überführung in die Lehre	145
Kaskade 2.0: Ausblick.....	147
Tabellenverzeichnis.....	148
Abbildungsverzeichnis.....	150
Literaturverzeichnis	157
Abkürzungen.....	158

Aufreinigungskaskade: Konzept des Projekts

Dieses Kapitel speist sich aus dem Projektantrag. Nach einer kurzen Einleitung zum Hintergrund der Altlast N77 wird der Projektansatz dargelegt.

Das Projekt „Aufreinigungskaskade“ wurde 2018/2019 konzipiert und im April 2019 zur Förderung eingereicht. Gemäß dem Förderungsvorschlag der Kommunalkredit Public Consulting GmbH wurde er von der Bundesministerin für Nachhaltigkeit und Tourismus am 11.06.2019 formell genehmigt (Projekt B820001).

Hintergrund: Die Altlast N77

Drösing ist eine Marktgemeinde mit knapp über 1100 Einwohner*innen im Bezirk Gänserndorf in Niederösterreich. Die Gemeinde ist in ein Naturschutzgebiet eingebettet und betreibt nachhaltige Projekte, beispielsweise eine Sterlet-Ansiedlung in der March. Drösing ist aber auch ein wichtiger Teil der Industriegeschichte Österreichs. So heißt es in dem Buch "ÖMV - OMV. Die Geschichte eines österreichischen Unternehmens" auf S.30: "Zu den Vorgängern der ÖMV-Raffinerie in Schwechat ist die Raffinerie in Drösing zu zählen. Sie wurde zur Verarbeitung galizischen Rohöles 1902 an der Nordbahn von der Schnodnica AG erbaut. (...) Am 1. Dezember 1927 wurde die Raffinerie an die rumänische Ceditul Minier verpachtet. (die Produktion war bis zu 240 Tagedestonnen, 3000 Monatstonnen Durchschnitt, ging aber stark zurück) Diese Raffinerie wurde 1937/38 zur Errichtung der Raffinerie Schwechat demontiert, verwendbare Anlagenteile wurden in Schwechat eingebaut." Dazu weiter: "Im Jahr 1936 erwarb die "Nova Öl- und Brennstoff AG" Grundstücke der Steinag-Ziegelfabrik in Schwechat und übertrug im folgenden Jahr ihre Raffineriekonzession von Drösing nach Schwechat."

Die folgende Abbildung 1, vom Gemeinderat und Anrainer Herrn Otto Kroenigsberger bereitgestellt, zeigt ein Foto der damaligen Zeit.

*Raffinerie Skizze zur Zeit Tscherne
östlicher Teil
Mod. O. Kroenigsberger*

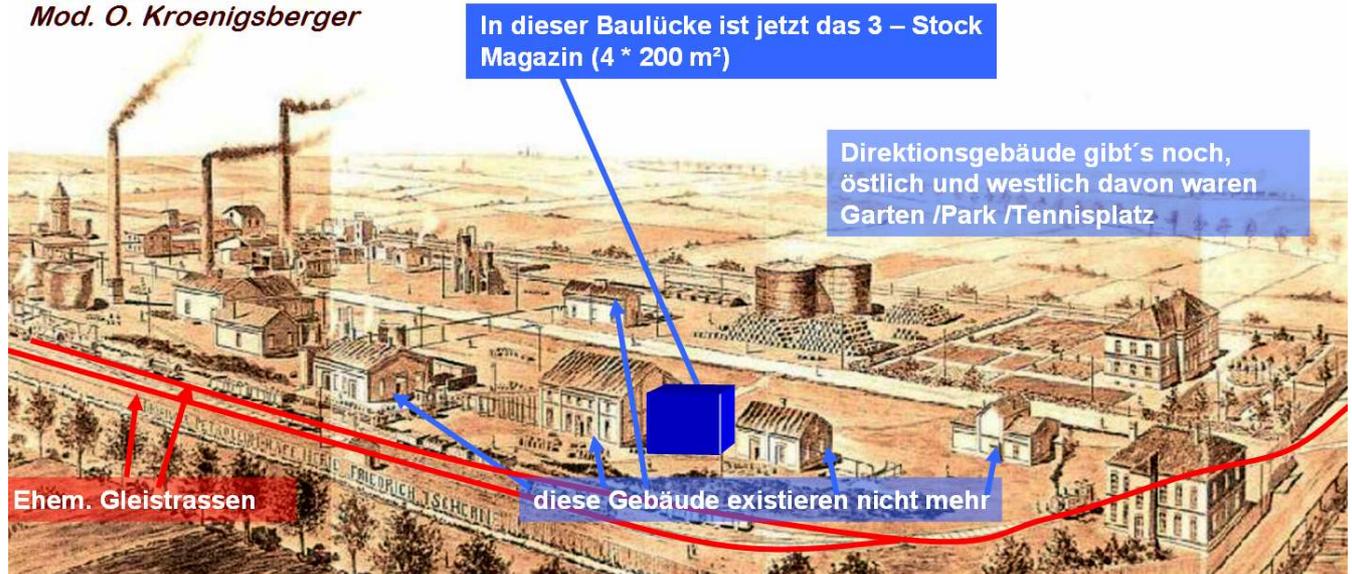


Abbildung 1: Historische Aufnahme der Petroleumfabrik Drösing, etwa 1935.

In Drösing wurde Galizisches Rohöl, welches mit der Bahn angeliefert wurde, raffiniert. Heute sieht der Standort „Petroleumfabrik Drösing“ anders aus. Die Fabrik existiert nicht mehr. Die Fläche nahe dem Bahnhof wird teilweise in Einfamilienhäusern bewohnt, ist mit 2 Lagerhallen bebaut und liegt größtenteils brach (verbuschte Fläche).

Zur Historie (aus dem Wasserrechtsakt entnommen):

1898/1899 Der Linzer Großkaufmann Friedrich Tscherne (manchmal auch Cerny) und Herr Kantorek geben den Bau einer Petroleumraffinerie in Auftrag.

1900 Anmeldung des Gewerbes. Es wird Rohöl aus Galizien, heute ein Teil von Polen, verarbeitet, die Fertigprodukte werden in Wien verkauft. Günstig ist dabei die Lage Drösings an der Bahnstrecke Wien – Galizien.

1905 Tscherne meldet den Betrieb der Raffinerie ab und verkauft diese an die polnische Schodnica AG, welche bereits eine Raffinerie in Zdieditz, Polen betreibt.

1906 Die Schodnica AG meldet den Betrieb wieder an. Die Drösinger Raffinerie beschäftigt bis zum Ende des Ersten Weltkrieges 80 Arbeiter.

1918 Nach Ende des Ersten Weltkrieges und Zerfall der Monarchie kommt es durch ein Ausfuhrverbot polnischer Rohstoffe zu betrieblichen Schwierigkeiten. Der Betrieb wird zuerst mit russischem, dann mit rumänischem Rohöl weitergeführt. Durch den zusätzlichen Transportweg Wien – Drösing trifft die Raffinerie gegenüber den Raffinerien an der Donau ins Hintertreffen.

1927 Die Fabrik wird von der Nova AG übernommen, welche die Anlage vom 1.1.1927 bis zum 31.12.1937 an die rumänische „Creditul Minier, Österr.-Rumänische Petroleum Vertriebs Gesellschaft“ verpachtet.

Die Raffinerie wird teilweise modernisiert, eine Paraffinerzeugung wird eingerichtet. Die Produktpalette umfasste Fliegerbenzin (Kerosin), Wundbenzin, Leicht-, Mittel-, und Schwerbenzin, Petroleum, Auto- und Maschinenöle, Nass- und Heißdampfzylinderöl, Bohröl, Vaselineöl, Vaseline, Tovotefett (Staufferfett), Lederfett, Wagenfett, Petrolpech und Petrolkoks. Aus der Paraffinverarbeitung Haushaltskerzen, Weihnachtskerzen und Fackeln. Weiters wurde Schuhcreme, Boden-, Ofen- und Möbelpasta und Siegellack unter dem Handelsnamen „Dobrol G.m.b.H.“ hergestellt. Bei Vollbetrieb waren 120 Personen beschäftigt.

1937 Creditul Minier hat kein Interesse die Anlage weiterzuführen, die Nova AG errichtet mit der Drösinger Konzession in Schwechat eine neue Mineralölr Raffinerie. Die Fabrik wird bis Jahresende ausgeräumt.

1937 – 1958 Die Nova AG verkauft die meisten Gebäude zum Ziegelabbruch. Nur die 3 Schloten, das ehemalige Magazin, ein Büro- und ein Wohngebäude bleiben erhalten.

1958 Anton Gaß und Dr. Hans Beinhofer kaufen das gesamte Gelände und errichten durch Erweiterung des ehemaligen Magazins eine Grünfüttertrocknungsanlage (Firma Floravit, Gaß, Beinhofer & Co).

1971 Herr Johann Hahn kauft einen Teil des ehemaligen Fabrikgeländes (nordwestlicher Teil mit Säureteich) von Dr. Hans Beinhofer

1979 Abbruch der Schloten

Grundstück 3305/20 wird von Dr. Beinhofer parzelliert, um es als Baugrund zu verkaufen.

- 1984 Seitens der Marktgemeinde Drösing wurde im Jahre 1984 der vereinfachte Flächenwidmungsplan im Bereich der ehem. Petroleumraffinerie abgeändert. Mit dieser Änderung wurde eine Teilfläche des als Bauland-Industriegebiet gewidmeten Geländes u. a. in Bauland-Wohngebiet umgewidmet.
- 1993 Verdachtsflächenmeldung
- 1996 Aufnahme in den Verdachtsflächenkataster
- 2001 wird bei dem Bodenaushub für ein Wohnhaus auf der Parzelle 3305/36 bitumenhaltiges Material gefunden. Daraufhin kommt es zur Erlassung einer unbefristeten Bausperre auf den betroffenen Grundstücken.

Zu Betriebszeiten der Petroleumfabrik wurde das per Kesselwagon angelieferte Rohöl mit Schwefelsäure behandelt, um reaktive Stoffe daraus zu entfernen. Der dabei entstehende Säureteer wurde vor Ort abgelagert. Dieser Säureteersee existiert heute noch. Bei Untersuchungen des Umweltbundesamts zeigte sich, dass ein Areal von über 5 ha, über das Gelände der ursprünglichen Petroleumraffinerie hinausgehend, massiv mit Kohlenwasserstoffen (MKW, PAK) verunreinigt ist. Man schätzt das Volumen des kontaminierten Erdreichs auf 100.000m³. Der Grundwasserstrom verfrachtet Kohlenwasserstoffe in das südöstlich gelegene Gebiet der Liegenschaft und darüber hinaus. Am 15.07.2016 schließlich wurde der Standort der ehemaligen Petroleumfabrik Drösing als Altlast N77 (Priorität 3) ausgewiesen.

Das Projekt „Aufreinigungskaskade“

Das Forschungsprojekt „Aufreinigungskaskade“ stellt eine innovative Verfahrenskombination zur in-situ und on-site Aufarbeitung gealterter Kohlenwasserstoff-Schäden unterschiedlicher Konzentration dar. Teilweise aus anderen Bereichen bekannte Technologien werden an die Altlastensanierung von MKW-, aber auch PAK-Schäden adaptiert und in weiterer Folge um neue Ansätze ergänzt.

Nachfolgend wird die Struktur des Projekts dargestellt. Tabelle 2 zeigt den Zeitplan und den Aufbau des Projekts (AP = Arbeitspaket, Q = Quartal).

Tabelle 1: Projektstruktur mit 4 Arbeitspaketen über 2 Jahre. Projektleitung durch die Firma BCA.

Nr.	Arbeitspaket	Dauer		Q1, Jahr 1	Q2, Jahr 1	Q3, Jahr 1	Q4, Jahr 1	Q1, Jahr 2	Q2, Jahr 2	Q3, Jahr 2	Q4, Jahr 2	Stufe
AP 1	Projektmanagement	24	Monate									-
AP 2	Extraktion und Bindung von Kohlenwasserstoffen	24	Monate									1
AP 3	In-situ enzymatische Degradation	24	Monate									2
AP 4	Dissemination	18	Monate									-

Das Projekt umfasst 4 Arbeitspakete und war für eine Dauer von 24 Monaten anberaumt. Der Start erfolgte mit 1. September 2019, der Abschluss wurde COVID19-bedingt kostenneutral vom 31. August 2021 auf den 31. Oktober 2021 verschoben. Es gab 5 Projektpartner (BCA, BOKU, FH Technikum Wien, ensowa, Spintec) und zwei ausländische Experten, Dr. Hermann J. Heipieper (Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ Department Umweltbiotechnologie) und Hr. Claus Fochler (Firma ICS). Die 5 Partner setzen sich aus 3 KMU, 1 FH und 1 Universität zusammen. Ein KMU (BCA) führt die Projektleitung durch.

Die folgende Abbildung 3 zeigt die Arbeitspakete 1 bis 4 und die 2 Stufen der Kaskade, um persistente Kohlenwasserstoffschäden (MKW=Mineralölkohlenwasserstoffe und auch PAK=polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) in absteigender Konzentration vor Ort zu sanieren. MKW gehören zu den häufigsten Altlasten-Schadstoffen. PAK sind

aufgrund ihrer Persistenz und geringen Verfügbarkeit gerade bei gealterten Schäden von großer Bedeutung.

Es wurden im vorliegenden Projekt neue in-situ Ansätze gemeinsam mit on-site Verfahren verfolgt, wobei der Schwerpunkt auf die Erforschung von innovativen und kombinierten in-situ Sanierungsmethoden gelegt wird. Es wird darauf hingewiesen, dass die einzelnen Verfahren bzw. Stufen der Kaskade nicht notwendigerweise in Kombination zur Anwendung kommen müssen, sondern standortspezifisch auch separat eingesetzt werden können.

Ansatz der Aufreinigungskaskade, Arbeitspakete

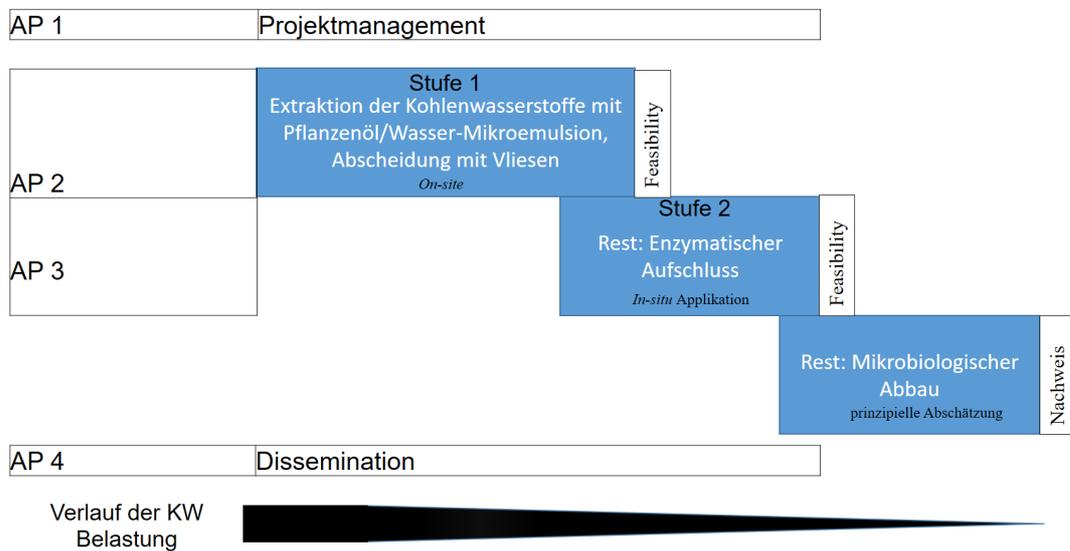


Abbildung 2: Konzept der Aufreinigungskaskade, Arbeitspakete.

Vom Anspruch des Technologiereifegrads (TRL) her soll in AP2 und AP3 eine Machbarkeit der Verfahren dargestellt werden. Die Betrachtung der Skalierbarkeit der entwickelten Techniken wird durch Einbindung von 3 KMU mit entsprechender Expertise sichergestellt, ein Engineering für eine tatsächliche Großanlage ist jedoch nicht Gegenstand dieses Forschungsvorhabens. Die enzymatische Behandlung soll persistente Schadstoffe wie MKW und PAK einem beschleunigten Abbau durch Mikroorganismen zugänglich machen. Ein vollständiger Abbau durch Enzyme ist in diesem zweijährigen Projekt nicht angedacht, da er einen erheblich größeren Forschungsbedarf generieren würde. Stattdessen kommen Schlüsselenzyme zum Einsatz, welche die geschwindigkeitsbestimmenden Abbauschritte katalysieren bzw. eine Entgiftung der Schadstoffe herbeiführen. Enzymatische Abbauprodukte sollen in einem weiteren Verfahrensschritt mikrobiologisch mineralisiert

werden. Im Rahmen des aktuellen Forschungsvorhabens wird die prinzipielle mikrobielle Abbaubarkeit enzymatisch aufgeschlossener Schadstoffe geprüft und die dadurch erzielte Erhöhung der Abbauraten ermittelt. Für einen zukünftigen Feldeinsatz soll das enzymatische Verfahren mit gängigen biologischen in-situ Sanierungstechniken wie sie z.B. in den Forschungsprojekten INTERLAND und NUTZRAUM entwickelt wurden, kombiniert zum Einsatz kommen.

Es sollten beide Arbeitspakete (AP 2 und AP 3) im Labor durchgeführt werden (TRL 3 und 4), aber Erkenntnisse daraus auch in einem Feldversuch (TRL 5) in Drösing zur Anwendung kommen. Der Feldversuch stellt eine prinzipielle Machbarkeitsanalyse dar.

Die MKW-Schäden in Drösing betreffen zwei unterschiedliche Kompartimente: Die ungesättigte Zone von der Geländeoberkannte bis in eine Tiefe von etwa 5m und die gesättigte Zone von etwa 5 bis 15m. Die Verfahrensentwicklung betrifft die Sanierung der gesättigten und der ungesättigten Zone. Die zwei einzelnen Behandlungsstufen der Kaskade (Stufe 1 in AP2 und Stufe 2 in AP3) beziehen sich auf diese beiden Kompartimente und ihre Spezifika, die Stufenabfolge betrifft jeweils ein Kompartiment. Eine Sanierung des Säureteersee (2000m³) ist nicht Gegenstand dieses Forschungsvorhabens, da diese Ausprägungsform einer Kontamination sehr speziell ist und in Österreich neben Drösing nur in zwei anderen Altlasten (N26 und N65) vorzufinden ist. Weitere vergleichbare Säureteer-Schadensmuster würden im Ausland vorliegen.

Stufe 1 der Aufreinigungskaskade – Kohlenwasserentfernung (Arbeitspaket 2)

Diese kommt sowohl in der ungesättigten als auch gesättigten Zone zum Einsatz. Eingerichtet werden einerseits Spülkreisläufe mit Wasser/Pflanzenöl-Mikroemulsionen, um Schadstoffe zu extrahieren und diese in weiterer Folge durch Bindung an Vliese aus der Spülflüssigkeit zu entfernen. Andererseits werden Vliese zur Schadstoffbindung über Brunnen direkt in den Aquifer eingebracht. Folgende Entwicklungsschritte sind für die jeweilige Zone vorgesehen:

Stufe 1.0 Vorarbeiten – Herstellung von Mikroemulsionen und Spülkreisläufen

Herstellung und Optimierung von Pflanzenöl/Wasser-Mikroemulsion sowohl für die Auswaschung als auch Flotation von Schadstoffen

Adaptierung und Optimierung von Spülkreisläufen und Flotationszyklen für den Einsatz von Mikroemulsionen

Stufe 1.1 Extraktion von Kohlenwasserstoffen in der gesättigten Zone

Entwicklung eines Pflanzenöl-Flotationsverfahrens mit Ölabtrennung

Entwicklung einer in-situ Anwendung von Vliesen zur Schadstoffabtrennung

Stufe 1.2 Extraktion von Kohlenwasserstoffen in der ungesättigten Zone

Einsatz von Pflanzenöl-Mikroemulsionen

Einsatz von Vliesen zur Schadstoffabtrennung

Stufe 2 der Aufreinigungskaskade - Enzymatischer Abbau von Kohlenwasserstoffen (Arbeitspaket 3)

Die in diesem Aufreinigungsschritt völlig neu zu entwickelnden Verfahren werden ebenfalls in der gesättigten als auch in der ungesättigten Zone eingesetzt. Dazu werden Enzyme selektiert, die bei Grundwasserbedingungen ein hohes Abbaupotential für persistente organische Schadstoffverbindungen aufweisen. Diese werden in weiterer Folge in Form von Suspensionen bzw. gebunden an Vliese zum Einsatz gebracht.

Stufe 2.0 Vorarbeiten - Gewinnung Schadstoff-abbauender Enzyme

Selektion von extremophilen Mikroorganismen mit Schadstoffabbaukapazität

Identifikation und Herstellung von Schadstoff-abbauenden Enzymen

Hydrophobisierung von Enzymen zur Anreicherung in Schadstoffherden

Immobilisierung von Schadstoff-abbauenden Enzymen auf Vliesen

Stufe 2.1 Einsatz von Schadstoff-abbauenden Enzymen in der gesättigten Zone

Einbringung und Verteilung von Enzymsuspensionen

Immobilisierung von Schadstoff-abbauenden Enzymen auf Vliese

Stufe 2.2. Einsatz von Schadstoff-abbauenden Enzymen in der ungesättigten Zone

Errichtung von Spülkreisläufen zur Verteilung von Enzymsuspensionen

Hydrophobisierung von Enzymen zur Anreicherung in Schadstoffherden

In Abb. 3 ist der Versuchsaufbau schematisch gezeigt (Feldversuch).

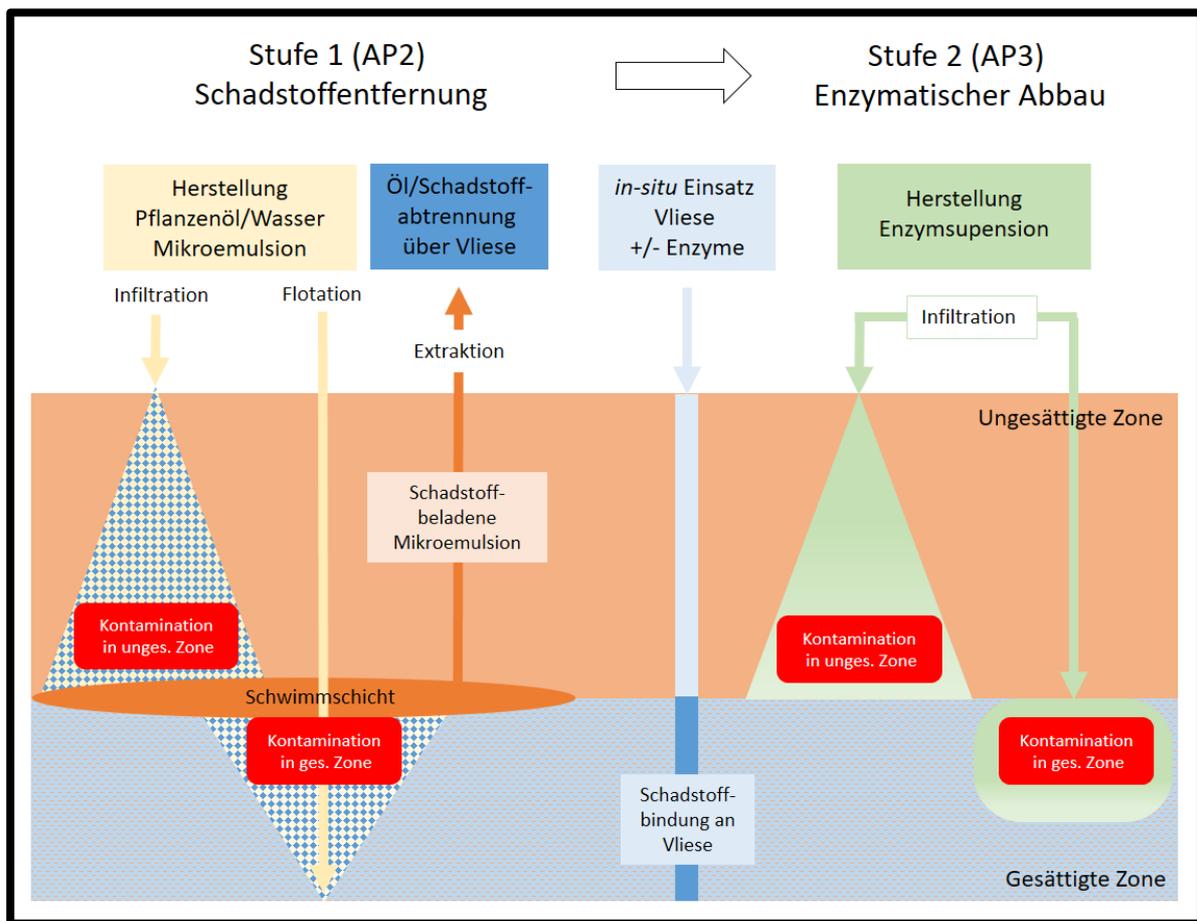


Abbildung 3: Schema der in-situ Aufreinigungskaskade. In Stufe 1 erfolgt die Extraktion von Kohlenwasserstoffen mit Pflanzenöl/Wasser-Mikroemulsionen, die in weiterer Folge über Vliese getrennt werden, so dass wiederum sauberes Wasser zur Verfügung steht. In Stufe 2 werden Enzyme in Form von Suspensionen in den Untergrund eingebracht, um nicht extrahierte Schadstoffe einem Abbau zuzuführen. Darüber hinaus erfolgt eine Immobilisierung von Enzymen an Vliesen, um deren Reinigungskapazität und damit Betriebszeit zu erhöhen.

Forschungsfragen

Die Forschungsfragen des Projekts „Aufreinigungskaskade“ umfassen:

Forschungsleitende Frage:

- Welche Verfahrenskombination für die Kompartimente ungesättigte und gesättigte Zone erlaubt eine rasche, nachhaltige und kostengünstige in-situ und on-site Sanierung von gealterten Kohlenwasserstoffschäden am Beispiel der Altlast N77?

Unterfragen:

- Wie können flüchtige Kohlenwasserstoffe aus wässriger Phase bzw. aus Mikroemulsionen effizient binden, im Aquifer und an der Oberfläche, mit geeigneter Regeneration?
- Wie können im Untergrund vorhandene Kohlenwasserstoffe aus der gesättigten und der ungesättigten Zone mithilfe von Pflanzenöl/Wasser Mikroemulsionen mobilisiert und extrahiert werden?
- Wie können gealterte MKW-Schäden durch enzymatischen Aufschluss einem natürlichen, in-situ ablaufenden mikrobiologischen Abbau zugänglich gemacht werden?
- Wie kann die Skalierbarkeit der Forschungsergebnisse der „Aufreinigungskaskade“ sichergestellt werden?
- Wie kann der Nutzen der neuen Verfahren(skombinationen) im Vergleich zu Verfahren nach dem heutigen Stand der Technik quantifiziert werden?
- Nach welchen Kriterien kann das Scale-up erfolgen?
- Wie gestaltet sich die Ökobilanz der Verfahren(skombinationen) der „Aufreinigungskaskade“?
- Wo liegen die Einsatzmöglichkeiten und Grenzen der neuen Verfahren(skombinationen) „Aufreinigungskaskade“?

Die Hypothese des Projekts „Aufreinigungskaskade“ ist, dass der stufenweise on-site und in-situ Abbau der MKW- und PAK-Belastung durch physikalische und biologische Schritte

technisch machbar und kosteneffizienter ist, als bisherige in der Literatur beschriebene bzw. bereits in der Praxis getestete oder angewandte Verfahren.

Meilensteine und Deliverables

Tabelle 2 fasst die Meilensteine und Tabelle 3 die Deliverables noch einmal übersichtlich zusammen.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Meilensteine.

Meilenstein	Arbeitspaket	Inhalt	Zeitpunkt
M2.1	AP2	Funktion der Schadstoff-Extraktion in der gesättigten und ungesättigten Zone über Pflanzenöl/Wasser-Mikroemulsionen im Labor nachgewiesen (Monat 12) sowie Abtrennleistung des ausgewählten Vlieses ermittelt	Monat 18
M2.2	AP2	500 m ³ Wasser über ein Vlies im Feldversuch aufgereinigt	Monat 24
M3.1	AP3	Funktionelle Enzyme (mindestens zwei) identifiziert	nach 6 Monaten
M3.2	AP3	Funktion der Enzyme hinsichtlich Abbau von persistenten MKW nachgewiesen	nach 12 Monaten
M3.3	AP3	Durchführung eines Feldversuchs mit einem in den Grundwasserstrom verbrachten Vlies, welches mit Enzymen beladen ist	nach 20 Monaten
M3.4	AP3	Nachweis des Co-Metabolismus enzymatischen Abbauprodukte persistenter Stoffe mit Pflanzenöl, Reisstärke oder PHB	nach 24 Monaten
M 4.1	AP4	Workshop in Salzburg mit mind. 20 ExpertInnen (TeilnehmerInnen) abgehalten.	~ Monat 18
M 4.2	AP4	Workshop in Drösing mit mind. 20 ExpertInnen (TeilnehmerInnen) abgehalten.	Monat 24

Nachfolgend sind die Deliverables aller Arbeitspakete zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Deliverables.

Deliverables	Arbeitspaket	Inhalt	Zeitpunkt
D1.1	AP1	Zwischenbericht 1 nach 6 Monaten	Ende Feb. 2020
D1.2	AP1	Zwischenbericht 2 nach 12 Monaten	Ende Aug. 2020
D1.3	AP1	Zwischenbericht 3 nach 18 Monaten	Ende Feb. 2021
D1.4	AP1	Endbericht nach 24 Monaten	Ende Aug. 2021
D2.1	AP2	Eine Publikation zum Inhalt des Arbeitspakets	nach 20 Monaten
D2.2	AP2	Ggf. ein Patent aus dem Arbeitspaket	nach 24 Monaten
D3.1	AP3	Zwei Publikationen	Nach 18 bzw. nach 24 Monaten
D3.2	AP3	Ggf. ein Patent	nach 24 Monaten
D 4.1	AP4	Tagungsband zum Workshop in Salzburg	Monat 20
D 4.2	AP4	Tagungsband zum Workshop in Drösing	Monat 24

Gender und Gleichbehandlung

Selbstverständlich wird in diesem Projekt sichergestellt, dass keine Benachteiligungen von ProjektmitarbeiterInnen und InteressensträgerInnen stattfinden. Hierauf werden alle 5 Partner achten. Das Stammpersonal des Konsortiums ist größtenteils männlich, es sind jedoch auch Frauen eingebunden, beispielsweise Frau Dr. Ribitsch.

Beim Verfassen von Berichten wird gendergerecht formuliert.

Bei der Vergabe von Bachelor- und Masterarbeiten werden Studierende nur aufgrund ihrer Leistungen ausgewählt und in das Projekt integriert.

Aus Sicht des Projektteams weisen die Inhalte des geplanten Projektes keine Genderrelevanz auf.

In Ergänzung zu dem bereits Geschriebenen kann noch angeführt werden: Das vorgeschlagene Projekt hat keine direkten geschlechtsspezifischen Aspekte, da Personen per se nicht erforscht werden, und die Ergebnisse werden den Alltag von Personen nicht direkt beeinflussen. Der eigentliche Zweck des Forschungsprojekts ist nicht personenorientiert; Es geht vielmehr darum, technische Lösungen zu entwickeln, und davon profitieren sowohl Frauen als auch Männer. Es gibt keine direkte Wechselwirkung zwischen Verbrauchern und dem Forschungsprojekt. Darüber hinaus sind die Vorteile neuer, kombinierter in-situ Verfahren für Männer und Frauen gleich. Genderaspekte werden jedoch in Bezug auf die Zusammensetzung des Projektteams berücksichtigt. Die Förderung der Chancengleichheit von Frauen und Männern ist dem Projektteam wichtig, und es wird angestrebt, ein ausgewogenes Verhältnis im Projektteam zu schaffen. In Bezug auf geschlechtsspezifische Aspekte wird ein integrativer Ansatz verfolgt.

Für Formulierungen wird eine gendergerechte Sprache gewählt.

Gleiche Chancen zwischen weiblichen und männlichen Mitarbeitern sind ein großes Anliegen des Konsortiums. Erfahrungsgemäß ist die Beschäftigung von Frauen in der technischen Wissenschaft eher gering, daher werden Frauen bei der Zusammenstellung des Projektteams bevorzugt. Die Leitlinie 2002/73 / EG des Europäischen Parlaments vom 29. Juli 2009, Grundsatz der Gleichbehandlung von Männern und Frauen hinsichtlich des Zugangs zur Beschäftigung, Berufsausbildung und -förderung sowie Arbeitsbedingungen wird berücksichtigt. Nichtdiskriminierung ist ein Grundsatz der Mitglieder des Konsortiums. Gleiche Gehälter für gleiche Positionen sind gewährleistet, ebenso die Möglichkeit, Mutterschaftsurlaub in Anspruch zu nehmen.

Über die Partner

Die Firma BCA ist Antragstellerin, und zusammen mit 4 Partnern und zwei internationalen Experten aus Deutschland wurde das Projekt bearbeitet.

- BCA GmbH (Antragstellerin)

Die BCA GmbH ist seit Ihrer Gründung im Jahr 1961 ein zuverlässiger Partner für die Entwicklung und Konfektion von qualitativen Vliesstoffen und deren individueller Veredelung. Die BCA ist Entwicklungspartner von verschiedenen führenden Vliesstoffherstellern.

Die BCA ist tätig für Kunden und Partner in den Bereichen Automobil, Filtertechnik, Bau, Garten- und Landschaftsbau, Abdichtung und Sanitär, Hygiene und Kosmetik, Industrie, Medizin, Verpackung und Entsorgung. Im Grunde genommen hat sich dadurch das umfassende Wissen über den vielfältigen Einsatz mit Vliesstoffen ergeben, häufig ist dabei die gemeinsame Rohstoffdefinition und deren anwendungsbezogene Auslegung die Basis für die Entwicklung von speziellen Vliesstofflösungen. Durch die mehr als 50jährige Erfahrung in der Verarbeitung und Modifikation unterschiedlicher Vliesstoffe haben sich im Laufe der Zeit auch verschiedenste eigene Patente und Gebrauchsmuster entwickelt, unter anderem zu Saugvliesen (AT514063 sowie EP2784201 „Saugvlies mit Mischfasern“). Zusammen mit seinem Konfektionspartner ICS verarbeitet die BCA jährlich rund 60 Millionen Quadratmeter Vlies bzw. konfektioniert mehr als 4.500 Tonnen Vlies pro Jahr. Die Technologien, die dabei in der Verarbeitung von textilen Kunststoffen zur Anwendung kommen, reichen vom einfachen Rollen und Wickeln über Stanzen, Bedrucken, Falten, Impulsschweißen, Nähen, Kleben, Kalandrieren, Thermobondieren bis hin zum Kaschieren von Mehrlagenprodukten. Verarbeitet werden Nadelvliese aus verschiedenen Rohstoffen, Spinnvliese aus Polypropylen, Polyester oder Polyethylen (PP-Vliese/ PES-Vliese/PE-Vliese) mit Prägestruktur oder Flat-Bonded (flachverfestigt), Wasserstrahlverfestigte Vliese aus Stapelfaser oder Endlosfasern, Meltblown-Vliese, Vliesfolien-Composites mit Folienvarianten geschlossen oder atmungsaktiv sowie Polyethylen. Die BCA ist in der Lage Vliesstoffe mit folgenden Eigenschaften zu versehen: Antistatisch, Atmungsaktiv, Absorbierend (Laugen & Öle), Haftend, Hitzebeständig, Hydrophil / Hydrophob, Klebend, Verrottbar / Unverrottbar, etc. Bezogen auf unser Projekt ist zu erwähnen, dass die BCA seit mehreren Jahren im industriellen Bereich mit Saugvliesen, u.a. für Öltassen in Werkstätten arbeitet.

- FH Technikum Wien (Projektpartner 1)

Die FH Technikum Wien ist Österreichs einzige rein technische Fachhochschule. Das Ausbildungsangebot umfasst 12 Bachelor- und 18 Master-Studiengänge, die in Vollzeit, berufsbegleitend und/oder als Fernstudium angeboten werden. Derzeit gibt es an der FHTW 4.000 Studierende und insgesamt hat die FH Technikum Wien bisher mehr als 9.000 AbsolventInnen hervorgebracht. Das Studienangebot ist wissenschaftlich fundiert und gleichzeitig praxisnah. Neben einer qualitativ hochwertigen technischen Ausbildung wird auch großer Wert auf wirtschaftliche und persönlichkeitsbildende Fächer gelegt. Sehr gute Kontakte zu und Kooperationen mit Wirtschaft und Industrie eröffnen den Studierenden bzw. AbsolventInnen beste Karrierechancen. Sowohl in der Lehre als auch in der Forschung steht die Verzahnung von Theorie und Praxis an oberster Stelle. Der

Bereich Forschung & Entwicklung an der FH Technikum Wien ist in den vergangenen Jahren stark gewachsen

- BOKU (Projektpartner 2)

Universität für Bodenkultur Wien, IFA-Tulln, Institute für Umweltbiotechnologie, Sektion Geobiotechnologie

Die Universität für Bodenkultur Wien (BOKU) umfasst 15 Departments und vier Servicezentren in Wien sowie eine Reihe von Experimentierzentren rund um Wien. Die Forschungsaktivitäten am Institut für Umweltbiotechnologie (UT) unter der Leitung von Prof. G. M. Guebitz konzentrieren sich auf die Nutzung des mikrobiellen Stoffwechsels zur Sicherung der Lebensqualität und zum Schutz der natürlichen Ressourcen. Gegenwärtig sind am Institut mehr als 100 Personen tätig. Ihnen stehen hervorragende Einrichtungen für Forschungsarbeiten zur Verfügung: Im Bereich der Enzymtechnik steht Infrastruktur für die Entwicklung neuer Enzyme, beginnend mit der Identifizierung neuer Gene und Nutzung von Expressionssystemen (*Escherichia coli* und *Pichia pastoris*) bis zur (bio) chemischen Analyse und Produktion der Enzyme in Bioreaktoren (2 L Labor- bis 6000 L Pilotmaßstab) zur Verfügung. Durch Entwicklung moderner und innovativer Ansätze wurden insbesondere die Interaktionen von Enzymen mit persistenten komplexen Substraten wie synthetischen Polymeren und phenolischen Makromolekülen entwickelt. Das Institut verfügt zudem über hervorragend ausgerüstete Labors mit einer state-of-the-art Infrastruktur für Mikrobiologie, Molekulare Biotechnologie und Bioprozesstechnik, die eine hohe Anzahl an Projekten mit der Industrie und in der Grundlagenforschung ermöglichen. Die bio(analytische) Ausrüstung des Instituts inkludiert LC-MS-Tof, GC-MS, GPC, SEM, CLSM und FTIR/Raman. Präparative Chromatographie (Büchi, Äkta) ist sowohl für kleine Moleküle wie auch Proteine verfügbar.

Im Bereich der Geobiotechnologie und Umweltchemie (Leitung Prof. A.P. Loibner) besteht umfangreiche Erfahrung in der Anwendung von mikrobiellen Verfahren zur Beurteilung und Dekontamination von Altlasten, die sich einerseits in der Durchführung von zahlreichen Forschungsprojekten z.B. gefördert durch EU: Bioremediation in the Rhizosphere, GeoEnvNet, LIBERATION, SARIB; KPC: Oxidativ-mikrobielle Sanierungsverfahren zum Abbau hochmolekularer PAK, ISPAK, INTERLAND, NUTZRAUM, INNOSAN, HetReMed; Land Wien: Optimierung und Erfolgskontrolle von in-situ Bodensanierungsmaßnahmen; Land Niederösterreich: PESTA, MACATA I, MACATA II und ISOMON widerspiegelt, andererseits aber auch durch zahlreiche Industriekooperationen

und Anwendungen von mikrobiellen Verfahren im Vollmaßstab bestätigt wird. Als Beispiel seien hier Sanierungen von MKW-Schäden einer Feuerwache im dritten Wiener Gemeindebezirk (Diesel-Kontamination) und im Bereich des Zentralbahnhofs Wien sowie die Entfrachtung der Altlast N16, Tuttendorfer Breite (weitgehend kontaminiert mit Mitteldestillaten) genannt.

Am Institut stehen der Geobiotechnologie ein eigenes Laborgebäude und umfassende analytische Methoden zur sensitiven Quantifizierung von Schadstoffen in Boden und Grundwasser zur Verfügung. Darüber hinaus werden im Schadstoffabbau involvierte und aktive Mikroorganismen mit DNA und RNA Sequenzdatenanalysen identifiziert und quantifiziert. Die Durchführung von Abbauversuchen ist im Maßstab von 1 Gramm bis zu 1 Tonne möglich wobei im größeren Maßstab sowohl die ungesättigte Zone als auch Aquiferbedingungen simuliert werden können. Es ist geplant, diese Einrichtungen für die Entwicklung und Anwendung von Enzymtechnologien zu adaptieren und sie zur Optimierung des Verfahrens im erweiterten Labormaßstab zum Abbau von persistenten MKW-Kontaminationen einzusetzen.

- ensowa – innovation und umweltconsulting gmbh (Projektpartner 3)

Die ensowa - innovation und umweltconsulting Gmbh beschäftigt sich seit etwa 12 Jahren mit technischen Sanierungsmethoden für MKW kontaminierte Standorte und hat sich auf in-situ Sanierungen spezialisiert. Die ensowa Gmbh ist ständig bemüht die Sanierungseffizienz zu erhöhen sowie die Sanierungszeiten und -kosten zu reduzieren. Gleichzeitig soll mit der Weiterentwicklung der Technik ein wesentlicher Beitrag für den Umweltschutz geleistet werden.

- Spintec (Projektpartner 4)

Langjährige Erfahrung und umfangreiche Tätigkeiten in verschiedenen Bereichen ermöglichen die Abwicklung von Kleinprojekten bis hin zur Komplettlösung von komplexen Aufgaben. Aufgrund modernster Softwareausstattung und hochqualifiziertem Personal kann die SPINTEC GmbH sämtliche Projektanforderungen erfüllen: Vorstudien, Projektierung, Planung, Simulation bis hin zur Detailzeichnung. Durch die jahrelange Erfahrung und den neuesten Wissensstand wird an nachhaltigen Lösungen in allen Bereichen der Umwelt- und Energietechnik gearbeitet. Beste Verbindungen zu Universitäten, Forschungseinrichtungen und Behörden fördern eine reibungslose Projektumsetzung. Auch die Bereiche Maschinenbau und Verfahrenstechnik werden bei

SPINTEc großgeschrieben. Durch das fachspezifische Personal können Projekte in den Bereichen der Planung, Konstruktion, Verfahrenstechnik und Prozesssimulation durchgeführt werden. Speziell für dieses Projekt weist die SPINTEc GmbH große Erfahrung in der Erstellung von Studien, detaillierten 3D-Modellen und der Umsetzung von Konstruktionskonzepten auf.

Bodenwäsche und Ölabtrennung:

Arbeitspaket 2

Die Forschungsarbeiten zu diesem Arbeitspaket wurden federführend von der FH Technikum Wien durchgeführt, mit Unterstützung der Projektpartner, speziell im Zuge der Ausführung des Feldversuches. Folgende Mitarbeiter*innen der FH waren in die schriftliche Darstellung dieses Berichtsteiles involviert: Thomas Hribernig und Maximilian Lackner. Von den Partnern waren Norbert Rüttinger, Claus Fochler, Dr. Karl Putz und DI Markus Plank eingebunden. Arbeitspaket 2 befasst sich mit der Bodenwäsche mithilfe von Pflanzenöl-in-Wasser-Emulsionen sowie der Trennung von Öl/Wasser-Gemischen mittels Vliesen.

Herstellung von Emulsionen

Die Arbeiten wurden mit Rapsöl in Wasser durchgeführt. 5-10% Rapsöl (nach Masse) sollten als Emulsion für mind. 50 Stunden stabil in Wasser verteilt werden. Die Stabilität der Emulsionen konnte von zu Beginn der Experimente mit 4h auf fast 50h gesteigert werden. Es erfolgte ein systematisches Screening mit Tensiden und Co-Tensiden. Abb. 4 zeigt ein paar Ansätze.



Abbildung 4: Ansätze für Emulsionen im Labor. Die Zahlen geben die Mengen an Rapsöl, Tensid und Cotensid an.

In Abb. 5 ist zu sehen, wie die Emulsionen in der Laborapparatur zum Versickern gebracht wurden. Es handelt sich dabei um 10 Plexiglassäulen, die auf einem Metallnetz gelagert waren und mit Bodenproben befüllt wurden.

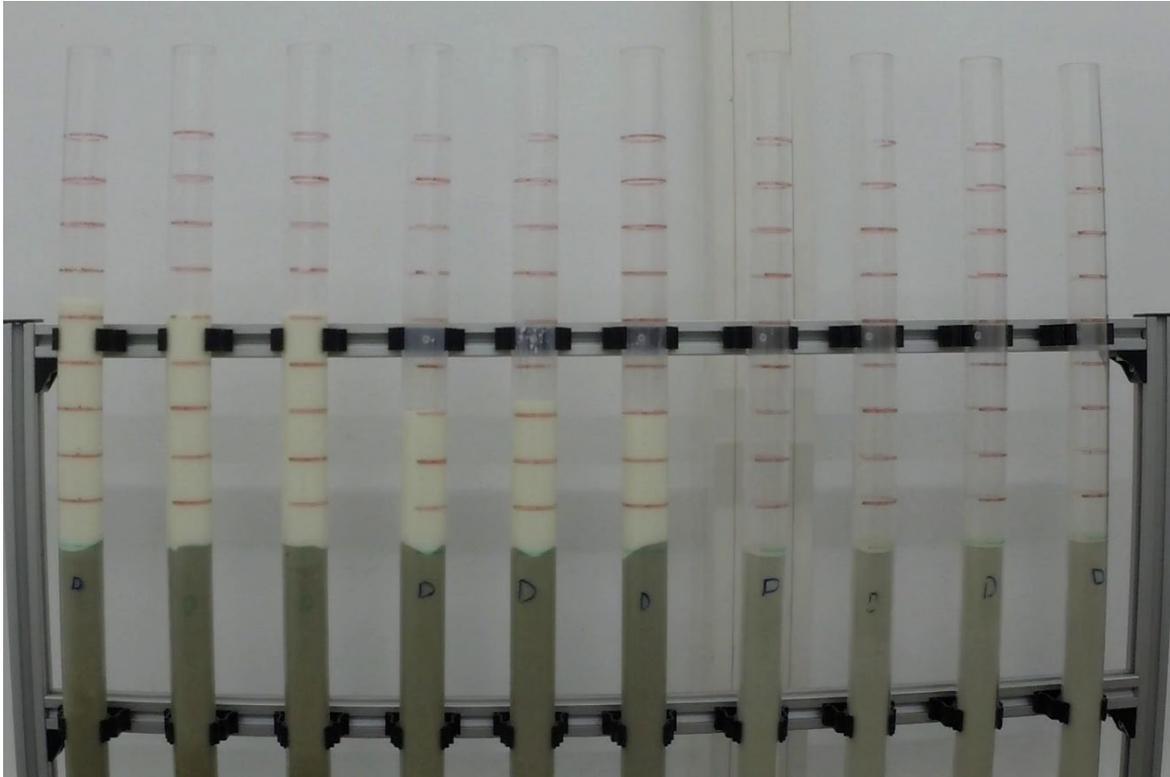


Abbildung 5: Versickerungsversuche mit Emulsionen im Labor. Die Striche in rot zeigen jeweils 5cm Abstand. Die 6 Säulen von links sind aktuell mit Emulsion befüllt.

Öl in Wasser entmischt sich. Damit eine Emulsion stabilisiert werden kann, werden Emulgatoren eingesetzt. Als erste Option wurden Lecithine in Betracht gezogen, da diese aus natürlichen Quellen wie Soja oder Eigelb stammen und eine gute Verträglichkeit mit dem menschlichen Körper aufweisen. Aus diesem Grund finden sie auch breiten Einsatz in diversen pharmazeutischen Produkten wie auch in Lebensmitteln. Als Alternative fiel die Wahl auf Emulgatoren aus Polysorbaten. Polysorbate sind ethoxylierte Sorbitanfettsäureester (Polyoxyethylensorbitanfettsäureester) in Form öliger Flüssigkeiten. Einige Polysorbate sind als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen und tragen eine E-Nummer. Polysorbate sind nicht-ionische synthetische Emulgatoren und werden vornehmlich für die Herstellung von Produkten im Kosmetik- und Lebensmittelbereich verwendet. Beispiele von Lebensmittel, in denen sie vorkommen sind etwa Kaugummi, Sportnahrung, Suppen und Saucen, Milch- und Rahmprodukte, Speiseeis sowie diverse Süßwaren. Hierbei werden sie unter anderem zur Emulgierung von Aromastoffen oder

Anpassung der Fettkristallstruktur verwendet und ermöglichen z.B. ein geringeres Spritzen beim Erhitzen von Margarine. Hergestellt werden sie durch die Veresterung von Ölsäuren mit Sorbit aus pflanzlichen Quellen wie Mais oder Früchten der Eberesche. Im Handel sind sie vor allem als Produkt des Herstellers SIGMA-ALDRICH GmbH unter dem Namen Tween™ bekannt und in verschiedenen Kettenlängen erhältlich. Eine Übersicht der Typen und ihren HLB-Werten (Hydrophilic-Lipophilic-Balance) liefert die nachfolgende Tabelle 4:

Tabelle 4: Verfügbare Emulgatoren der Tween™-Reihe. Es handelt sich dabei um Polysorbate. Sie wurden für die Stabilisierung der Emulsionen aus Rapsöl in Wasser getestet.

Emulgator-Typ	HLB-Wert
Tween 20	16,7
Tween 21	13,3
Tween 40	15,6
Tween 60	14,9
Tween 61	9,6
Tween 65	10,5
Tween 80	15
Tween 81	10
Tween 85	11

Für die Versuche wurden die Polysorbate 40, 60 und 85 als besonders geeignet erachtet. Neben Polysorbat 20 und 80 wurde zudem N-Propanol als Co-tensid ausgewählt. Ein Co-tensid ist ein 2. Tensid. Damit kann der die Emulsion stabilisiert werden (Steigerung Dispersionsgrad der Tröpfchen). Dem Hinweis, aus der Literatur, dass das Wasser vor dem Ansetzen einer Emulsion entgast werden sollte, wurde gefolgt, siehe Abb. 6.



Abbildung 6: Entgasungspumpe und Vakuumkammer zur Entgasung der Emulsion. Dies konnte die Stabilität deutlich steigern.

Beispielhaft sind hier einige Ergebnisse der Emulsionsherstellung in Abb. 7 wiedergegeben, anhand von Dreiecksdiagrammen:

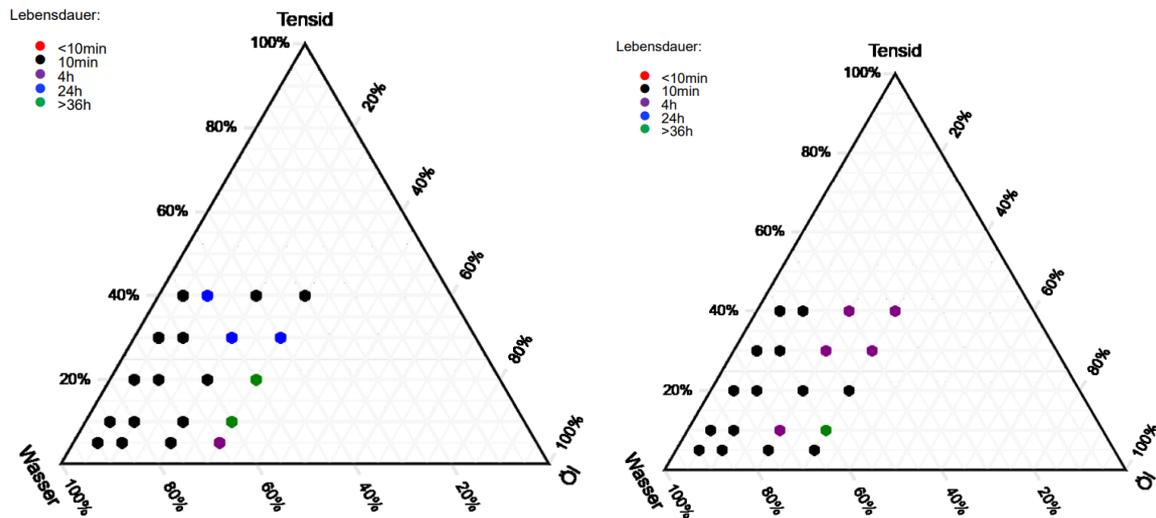


Abbildung 7: Beispiele der Stabilität von Wasser, Öl und Tensid-Mischungen. 3 Mischungen sind über 36h stabil.

Bei einem k_f -Wert von beispielsweise $5 \cdot 10^{-5}$ m/s und einer Penetrationslänge von 5m benötigen wir 27,8 Stunden, daher wurden 36-50 Stunden Stabilität der Emulsion angepeilt. Tabelle 5 fasst die stabilen Emulsionen aus den Laborversuchen zusammen.

Tabelle 5: Die besten bzw. besonders stabilen Emulsionen, Teil 1.

Probe Nr.	Rapsöl [%]	Destilliertes Wasser [%]	Polysorbat 20 [%]	Polysorbat 80 [%]	N-Propanol [%]	Emulgier-Methode	Viskosität	Stabil nach 10min	Stabil nach 4h	Stabil nach 24h	Stabil nach 36h
10	10	50	40	0	0	Homogenisator	3	Ja	Ja	Ja	Nein
14	20	50	30	0	0	Homogenisator	3	Ja	Ja	Ja	Nein
17	30	60	10	0	0	Homogenisator	2	Ja	Ja	Ja	Ja
18	30	50	20	0	0	Homogenisator	2	Ja	Ja	Ja	Ja
19	30	40	30	0	0	Homogenisator	3	Ja	Ja	Ja	Nein
23	5	75	10	0	10	Homogenisator	1	Ja	Ja	Ja	Nein
57	30	60	0	10	0	Homogenisator	2	Ja	Ja	Ja	Ja

In der obigen Tabelle finden sich nach 57 Versuchseinstellungen 3 Emulsionen, die nach 36h noch stabil waren. Die Viskosität ist von 1 =hoch bis 5 =gering qualitativ beurteilt. Im nächsten Schritt wurden die stabilen Mikroemulsionen für den Feldversuch im größeren Mischer angesetzt.

Es wurde eine Stabilität der Emulsionen von max. 50h erreicht, durch ein systematisches Screening mit Tensiden und Co-Tensiden. Der Ansatz, die Dichte der Emulsionen durch Salzzugabe zu steigern, funktionierte nicht, weil die Salze die Stabilität der Emulsionen stark herabsetzten. Im April 2021 konnte der Mischer für die Feldversuche (300l) in Betrieb genommen werden, in weiterer Folge wurde dieser in Drösing installiert. Laut Literatur spricht man bei einer Tröpfchengröße von $>1\mu\text{m}$ von sogenannten „Makroemulsion“ und nur im Bereich von 10 – 200nm von sogenannten „Mikroemulsion“. Im Gegensatz dazu bezeichnet Mikroplastik die vergleichsweise größeren Plastikpartikel unter 1mm, aber typischerweise deutlich über $1\mu\text{m}$. Die Bezeichnung „Mikroemulsion“ ist für die von uns hergestellten Emulsionen nicht korrekt, daher verwenden wir den Terminus „Emulsion“. Für die Stabilisierung einer Emulsion von Öl in Wasser (O/W Emulsion) ist besagtes Tensid/Emulgator notwendig. Dieser Zusatz verhindert die Koaleszenz (das Zusammenlaufen) der dispersen Phase (hier: Öl). Tenside haben einen hydrophilen + hydrophoben/lipophilen Anteil, eventuell ist auch ein Co-Tensid notwendig. Entscheidend ist der HLB-Wert. Er gibt das Masseverhältnis zw. polarem und unpolarem Teil an, auf einer Skala von 0-20:

0-8 → tendenziell lipophil → 3-6 ~ W/O-Emulsion

9-20 → tendenziell hydrophil → 8-18 ~ O/W-Emulsion

Diese Tenside haben wir getestet: Sodium laureth sulfate (SLS/SDS), N-Pentanol (Co-T.), N-Propanol (Co-T.), Tween-20 + Tween 80 (Polysorbate), diverse pflanzliche Lecithine, Polyethylen Glycol 400 (PEG-400 \triangleq PEG-8), Kantor (Agrar-Additiv), Sodium stearyl lactylate (SSL), Lutensol TO 5, Emulan A, Lysolecithin, Glycerinstearat, Sucrose stearat.

Ein höherer Ölanteil resultierte in den Versuchen in höherer Viskosität, die Versuche im Feld wurden daher mit 5% Ölanteil durchgeführt. Es kam nur Rapsöl zum Einsatz. Als wässrige Phase haben wir destilliertes Wasser, Leitungswasser (entgast/nicht entgast) und im Feld Grundwasser verwendet. Vollmilch, Kondensmilch, Kokosmilch wurden als leicht verfügbare, fertige Emulsionen vorgeschlagen, die Versickerungsversuche zeigten aber schlechte Versickerungsraten. Zur Stabilitätsprüfung wurden auch weniger biokompatible Tenside getestet. Das sind die stabilsten Emulsionen (Tabelle 6), Teil 2:

Tabelle 6: Stabile Emulsionen, Teil 2.

Rapsöl [g]	destilliertes Wasser [g]	Tensid [g]		Cotensid [g]		Stabilität			
						10min	4h	24h	50h
25 (5%)	465	SSL	10 (2%)	-	-	ja	ja	ja	ja
25 (5%)	450	SSL	25 (5%)	-	-	ja	ja	ja	ja
17,5 (5%)	297,5	Lutensol TO 5	35 (10%)	-	-	ja	ja	ja	ja
17,5 (5%)	262,5	Emulan A	35 (10%)	Lutensol	35 (10%)	ja	ja	ja	ja
25 (5%)	465	SSL	5 (1%)	Sucrose Stearat	5 (1%)	ja	ja	ja	ja
25 (5%)	455	Sucrose Stearat	15 (3%)	Glycerinstearat	5 (1%)	Ja	ja	ja	ja

Für die Feldversuche wurde auf Lecithin gesetzt, vgl. Tabelle 7:

Tabelle 7: Emulsionen für den Feldversuch in Drösing.

Rapsöl [g]	destilliertes Wasser [g]	Tensid [g]		Cotensid [g]		Stabilität		
						10min	4h	24h
25 (5%)	472,5	Lecithin	2,5 (0,5%)	-	-	ja	ja	ja
25 (5%)	470	Lecithin	5 (1%)	-	-	ja	ja	ja
25 (5%)	467,5	Lecithin	7,5 (1,5%)	-	-	ja	ja	ja
25 (5%)	465	Lecithin	10 (2%)	-	-	ja	ja	ja
25 (5%)	460	Lecithin	15 (3%)	-	-	ja	ja	ja
25 (5%)	455	Lecithin	20 (4%)	-	-	ja	ja	ja
25 (5%)	450	Lecithin	25 (5%)	-	-	ja	ja	ja

Vorteile von Lecithinen sind gute Verfügbarkeit, biologische Unbedenklichkeit und leichtere Trennung, da sie nicht dauerstabil sind. Im Feldversuch wurde v.a. dieses Material verwendet: Giralec HE-60. Es handelt sich dabei um ein hydrolysiertes Sonnenblumenlecithin. Dabei ist der Masseanteil der apolaren Anteile verringert, was zu verbesserter Wasserlöslichkeit bei geringerer Energieeinbringung führt. Der Aufbau im Feld ist in Abb. 8 zu sehen.



Abbildung 8: Die Feldversuche. Die rote Farbe ist zur besseren Sichtbarkeit. Links: 300l Mischer. Rechts: Detail des Mischvorgangs.

Auswaschen von MKW aus Bodenproben - Laborversuche

Im Labor der FH Technikum Wien wurde eine „Versickerungssäulen-Batterie“ errichtet. Es kamen 3D-gedruckte Teile zum Einsatz. Weiters wurde eine Kamera installiert, um auch längere Versickerungsversuche aufzeichnen zu können, vgl. Abb. 9.

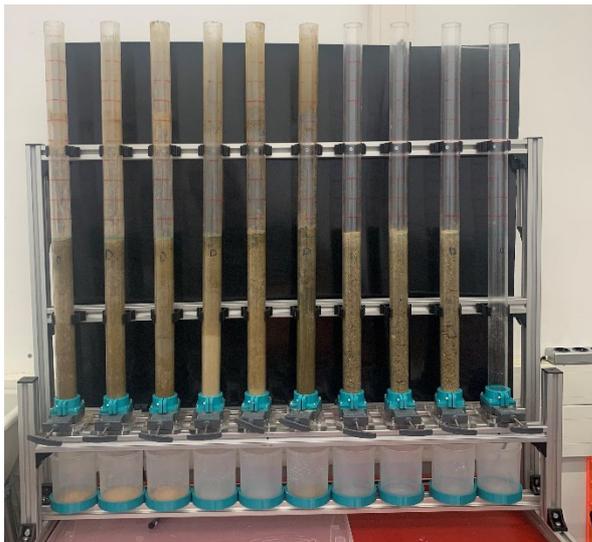


Abbildung 9: Die Laborapparatur für Versickerungsversuche. Typischerweise wurden 400mm Bodensäule verwendet.

Zunächst wurden Versickerungsversuche an Feinputzsand und Estrichsand durchgeführt, als Modellsubstanzen für die gesättigte Zone. Versickerung in größerem Kies lieferte keine auswertbaren Daten, da durch die großen Zwischenräume, keine merklichen Unterschiede zwischen unterschiedlichen Flüssigkeiten festgestellt werden konnten. Eine Emulsion aus Wasser, 5% Rapsöl und 1% Soja-Lecithin (Pulver) erwies sich als über mehrere Tage hinweg stabil (optisch, durch Zugabe von hydrophilen und lipophilen Farbstoffen; bei Raumtemperatur) und weist gute Bioverträglichkeit auf. Ergebnisse von im Labor durchgeführten Versickerungsversuchen sind in Abb. 10 und Abb. 11 gezeigt.

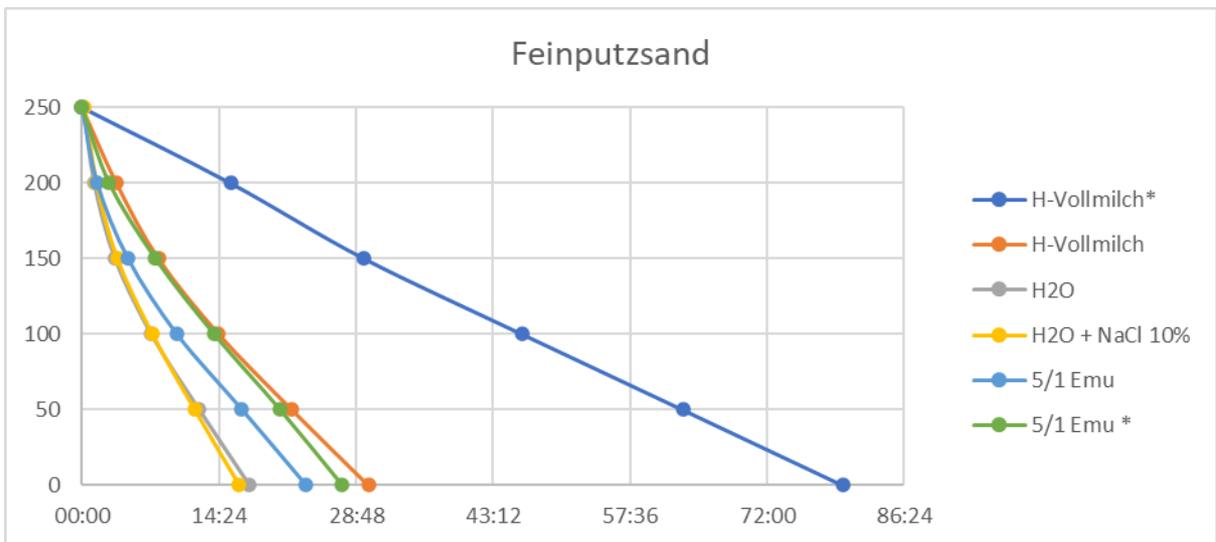


Abbildung 10: Versickerungsversuche in Feinputzsand. * = Bodenprobe mit Wasser gesättigt. 5/1 Emu = Emulsion: 5% Rapsöl, 1% Sojalecithin.

Man sieht aus Abb. 10, dass der mit Wasser gesättigte Boden geringere kf-Werte zeigt. Kf steht für Durchlässigkeitsbeiwert und wird in m/s angegeben. Der kf-Wert für die H-Vollmilch liegt bei $5,3 \cdot 10^{-5}$ m/s im wassergesättigten Boden, jener für Wasser bei $2,8 \cdot 10^{-4}$. Wasser mit Salzzusatz hat den höchsten kf-Wert. Vergleiche dazu Estrichsand, der etwas grobkörniger ist, in Abb. 11:

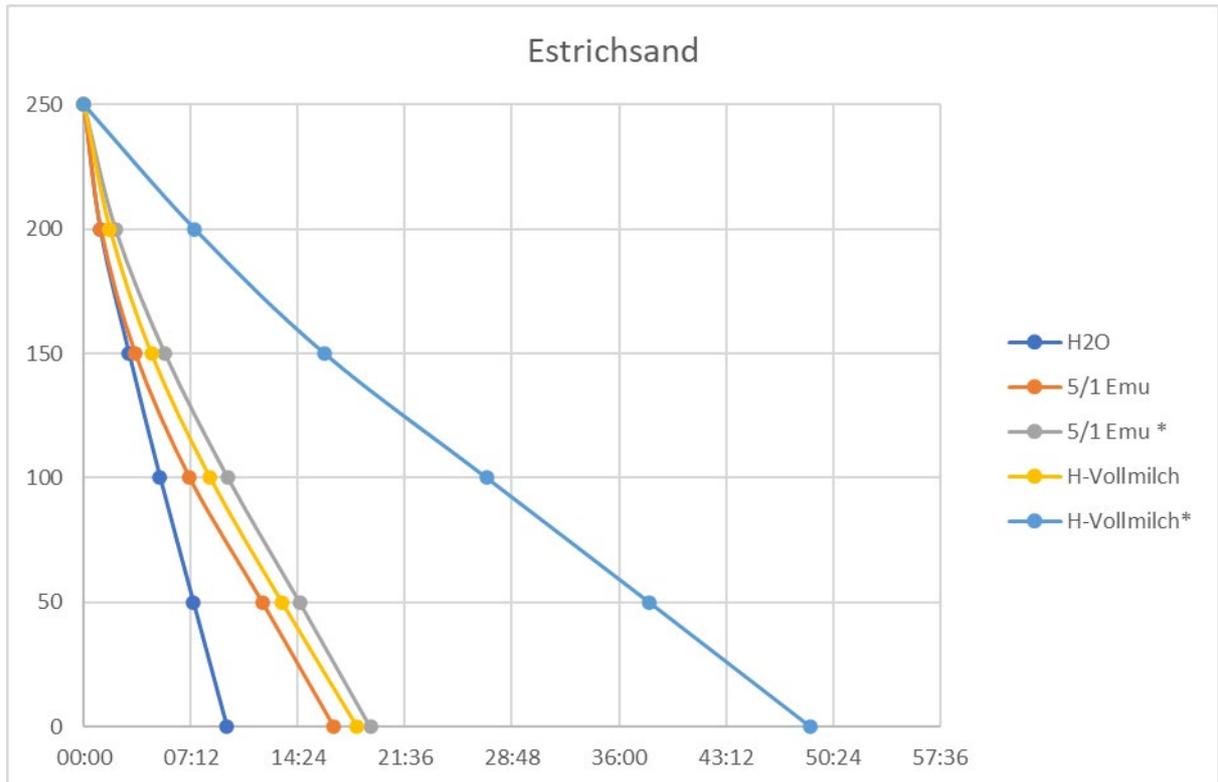


Abbildung 11: Weitere Versickerungsversuche im Labor, mit Estrichsand. Siehe Text für Details.

Die k_f -Werte liegen bei $5,2 \cdot 10^{-4}$ für Wasser bis $8,3 \cdot 10^{-5}$ für H-Vollmilch. Der Estrichsand ist damit leichter durchlässig als der Feinputzsand.

Daten zum verwendeten Estrichsand:

- Körnung: 0,06 - 4 mm
- Korn: Rundkorn
- Schüttgewicht: 1700 kg/m^3

Daten zum Verwendeten Feinputzsand:

- Körnung: 0,06 - 1 mm
- Korn: Brechkorn
- Schüttgewicht: 1300 kg/m^3

Milch wurde als mögliche Emulsion verworfen, da die Versickerung, besonders im gesättigtem/ feuchtem Boden sehr langsam erfolgte. In den Versickerungsversuchen und Bodenproben aus Drösing wurden nur mehr Wasser und 5/1 Emulsion getestet, vgl. Abb. 12 (5% Rapsöl, 1% Lecithin).

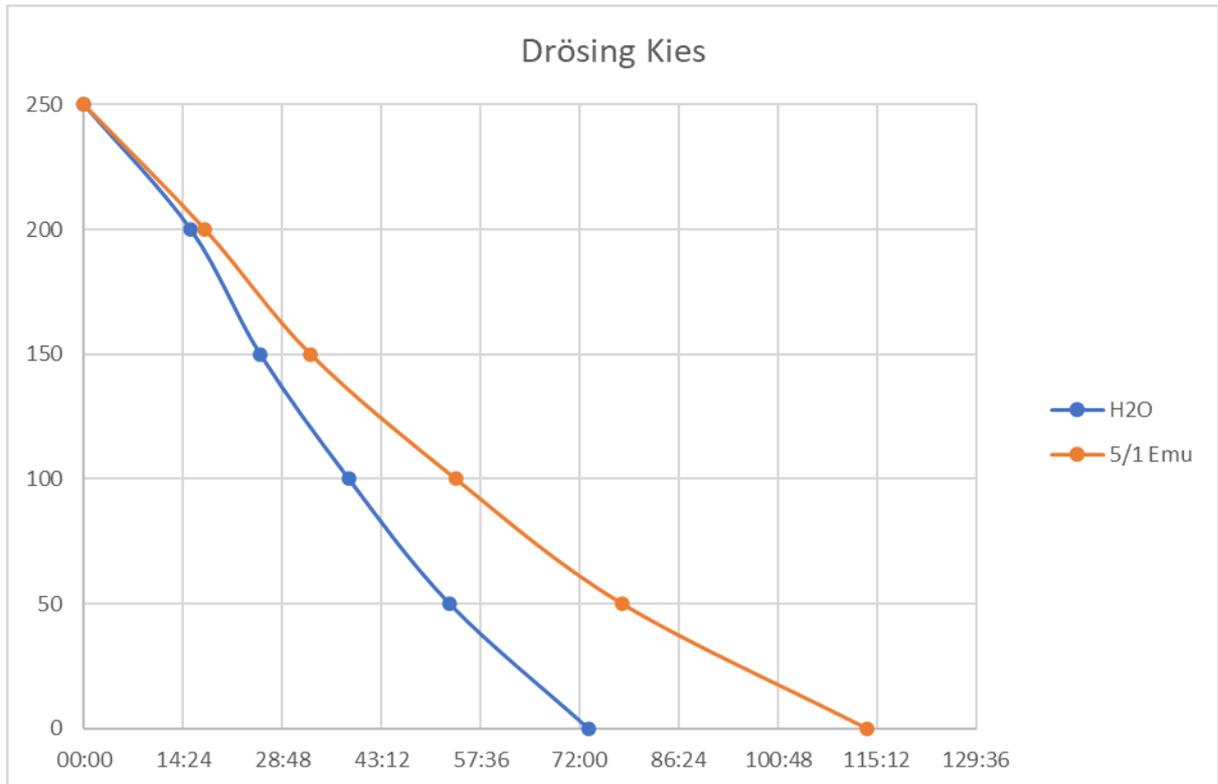


Abbildung 12: Versickerungsversuche in Original-Bodenmaterial aus Drösing (gesättigte Zone).

In Abb. 12 liegen die k_f -Werte für Wasser und Emulsion bei $5,8 \cdot 10^{-5}$ bzw. $3,6 \cdot 10^{-5}$ m/s. In Drösing-Lehm (ungesättigte Zone) war keine Versickerung möglich. Die Extraktionseffizienz wurde im nächsten Schritt für unterschiedliche Materialien quantifiziert (Tabellen 8 und 9).

Tabelle 8: Auswaschen von Kies aus Drösing mit unterschiedlichen Medien. Der Kies stammt aus der Schicht 7-8m in Drösing.

Bezeichnung: **KIES 1 - unbehandelt**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	96,9
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	1020

Bezeichnung: **KIES 2 – Extraktion mit Milch 3,6 % Fett**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	92,3
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	1050

Bezeichnung: **KIES 3 – Extraktion mit Emulsion (Rapsöl:Wasser = 1:1)**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	87,9
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	468

Bezeichnung: **KIES 4 – reines Rapsöl**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	98,2
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	1820

Bezeichnung: **KIES 5 - Kokosnussmilch**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	89,9
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	704

Anmerkung: Die Analysenwerte der Feststoffparameter beziehen sich auf die Trockensubstanz. Der Parameter Trockensubstanz bezieht sich auf die Originalsubstanz.

Man erkennt, dass die Emulsion (50% Rapsöl in Wasser) deutlich besser extrahiert als reines Rapsöl, Kokosnussmilch und Milch. Die Schwankungen der Werte sind auf die Inhomogenität der Probe zurückzuführen. Die Original-Probe hatte 1020ppm an MKW-Kontamination. Mit Rapsöl in Wasser konnten in einem Durchgang 552ppm (55%) ausgewaschen werden.

Tabelle 9: Auswaschen von Lehm aus Drösing mit unterschiedlichen Medien. Der Lehm stammt aus der Schicht 4-6m in Drösing.

Bezeichnung: **Lehm 1 - unbehandelt**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	97,7
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	12100

Bezeichnung: **Lehm 2 – Extraktion mit Milch 3,6 % Fett**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	82,4
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	10800

Bezeichnung: **Lehm 3 – Extraktion mit Emulsion (Rapsöl:Wasser = 1:1)**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	88,1
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	2090

Bezeichnung: **Lehm 4 – reines Rapsöl**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	97,8
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	7820

Bezeichnung: **Lehm 5 - Kokosnussmilch**

Parameter	Methode	Einheit	Messwert
Trockensubstanz	EN 14346:2006	%	69,4
Kohlenwasserstoff-Index C10 – C40	EN 14039:2004	mg/kg	4860

Anmerkung: Die Analysenwerte der Feststoffparameter beziehen sich auf die Trockensubstanz. Der Parameter Trockensubstanz bezieht sich auf die Originalsubstanz.

Der Lehm enthielt viel mehr MKW als der Kies, 12100 ppm. Auch hier zeigte sich, dass mit Öl in Wasser die besten Extraktionswerte zu erzielen sind.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie viel Pflanzenöl im Boden zurückbleibt, siehe Tabelle 10.

Tabelle 10: Wie viel Pflanzenöl verbleibt im Boden?

Medium	Gemenge [g]	Rückgewinnung [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 1 [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 2 [%]
Kieselsteine	Wasser/Öl 900/100	84	91,37	97,64
Kieselsteine	Wasser/Öl 900/100	90,85	99,35	99,71
Medium	Gemenge [g]	Rückgewinnung [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 1 [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 2 [%]
Grobsand	Wasser/Öl 900/100	63,15	71,67	78,75
Grobsand	Wasser/Öl 900/100	57,77	71,21	76,77
Medium	Gemenge [g]	Rückgewinnung [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 1 [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 2 [%]
Lehm	Wasser/Öl 900/100	56,11	73,26	79,83
Lehm	Wasser/Öl 900/100	53,9	67,82	74,67
Medium feucht	Flüssigkeit	Rückgewinnung nach vermischen [%]	Rückgewinnung nach Waschgang 1 [%]	Gesamtrückgewinnung [%]
Lehm	Öl	81,5	86,37	89,7
Lehm	Öl	80,89	87,56	89,61

Man sieht, dass je nach Bodenart zwischen 77 und 99% des Öls (nach 3 Waschgängen) zurückgewonnen werden können. Die Kieselsteine hatten eine Körnung von 3-8mm, der Grobsand von 1-5mm. Der Lehm stammte aus Drösing, Schicht 4-6m.

Auswaschen von MKW aus der ungesättigten Zone - Feldversuche

Um die prinzipielle Machbarkeit des neuen Verfahrens zu demonstrieren, wurden Feldversuche durchgeführt. Die wesentlichen Versuche für die ungesättigte Zone sind hier zusammengefasst (Tabelle 11):

Tabelle 11: Versickerungs- und Pumpversuche in der ungesättigten Zone

	Emulsion [L]	enthaltene PÖL [L]	Emulgator	Einheit Emulgator	Emulgator	Abgepumpte Ölmenge (geschätzt*) [L]	Enthalte nes MÖL [%]	Liter PÖL	% Rückgewinn ung	Liter MÖL
27.05.2021	190	10	5 kg		Sojalecithin, Pulver	9	65	3,15	63%	5,85
08.06.2021	190	10	5 kg		Sojalecithin, Pulver	8	60	3,2	64%	4,8
09.06.2021	190	10	6 L		Giralec HE	8,5	60	3,4	57%	5,1
17.06.2021	190	10	6 L		Giralec HE	8	55	3,6	60%	4,4
18.06.2021	190	10	6 L		Giralec HE	7	50	3,5	58%	3,5
29.06.2021	190	10	6 L		Giralec HE	7,5	50	3,75	63%	3,75
30.06.2021	190	10	6 L		Giralec HE	8	45	4,4	73%	3,6
	Gesamt:	70				56		25		31

* Ölmenge geschätzt durch Messung der Schichthöhe in IBC
Ölphase abgepumpt nach max. 36h

Es wurden 7 Versuche gemacht, mit insgesamt 7*190 Liter = 1330 Liter Emulsion, die 70 Liter Rapsöl enthielten. Es konnten insgesamt 56l, bestehend aus 25l Pflanzenöl und 31 Liter Mineralöl, ausgewaschen werden. Das Abpumpen startete 5 Stunden nach Versuchsbeginn und wurde nach max. 36h beendet. Abb. 13 zeigt einen IBC in Drösing mit 2 Phasen: Grundwasser und darüber abgesetztes Gemisch aus Mineral- und Pflanzenöl, aus dem Feldversuch in der ungesättigten Zone in Drösing.

Abbildung 13: Aus dem Boden in Drösing gewonnenes Material, bereits teilweise entmischt. Die Menge der öligen Schicht (schwarz), welche aus einer Mischung aus Pflanzenöl und Mineralöl besteht, beträgt hier etwa 56 Liter, vgl. Tabelle 11. Dieses

Material wurde aus der ungesättigten Zone abgezogen. Damit lässt sich folgende Zusammenfassung für die ungesättigte Zone geben:

- Bodenwäsche: Etwa 50-85% der MKW aus dem Boden lassen sich in 1 Durchgang mit 5% PÖL (Pflanzenöl) in Wasser auswaschen
- Das Verfahren ist für durchlässige Boden (Kies) geeignet, nicht für Lehm
- Max. 15-50% des PÖLs verbleiben im Boden, durch Nachwaschen mit Wasser nur max. 10-30%, teilweise <5%.

Auswaschen von MKW aus der gesättigten Zone - Feldversuche

Die grundlegende Idee des Verfahrens für den Grundwasserschwankungsbereich und die gesättigte Zone ist, dass Pflanzenöl in tiefere Lagen eingepresst wird und zum Grundwasserhorizont aufsteigt. Während der Perkolation werden Kohlenwasserstoffe (PAK, MKW) aus dem Boden absorbiert, und das derart beladene Pflanzenöl kann anschließend vom Grundwasserspiegel abgezogen wird. Pflanzenöl wurde mit bis zu 5 bar Druck eingebracht und max. 1 Stunde später wieder abgepumpt, vom Grundwasserhorizont. Die wesentlichen Versuche für die gesättigte Zone sind hier zusammengefasst (Tabelle 12):

Tabelle 12: Infiltrierungs- und Pumpversuche in der gesättigten Zone

	PÖL [L]	Abgepumpte Ölmenge (geschätzt*) [L]	Enthalten es MÖL %	Liter PÖL	% Rückgewinnun g	Liter MÖL
14.07.2021	30	28	8	25,76	92%	2,24
15.07.2021	30	29	8	26,68	92%	2,32
22.07.2021	30	27	6	25,38	94%	1,62
23.07.2021	30	28	5	26,6	95%	1,4
	120	112		104,42		7,58

* Ölmenge geschätzt durch Messung der Schichthöhe in IBC
Ölphase abgepumpt nach max. 1h

In die gesättigte Zone wurde an 4 Versuchstagen reines Pflanzenöl unter den Grundwasserhorizont eingebracht, in Summe 120 Liter. Zurückgewonnen werden konnten 112 Liter Öl, bestehend auf 104,42 Liter PÖL und 7,58 Liter MÖL. Damit haben wir folgende Zusammenfassung für die gesättigte Zone:

- 87% des Pflanzenöls konnten zurückgewonnen werden, durch Abpumpen vom Grundwasserhorizont.
- Das PÖL hat sich zu 6,8% mit MÖL angereichert, auf seiner Passage zum Grundwasserhorizont.

Trennen von Öl/Wasser mittels Vliesen

Vliese aus Polyolefinen und Polyestern, welche Öle binden können, kamen zum Einsatz, mit einem Flächengewicht von 220 bis 400 g/m² und einer Ölbindekapazität des 5-15fachen Flächengewichts. Es zeigte sich, dass sie durch Auspressen regenerierbar (neu zu beladen) sind. Die Vliese nehmen selektiv Öl auf (sowohl Mineralöl als auch Pflanzenöl), jedoch kein Wasser. Die Laborversuche wurden mit Motoröl begonnen (SAE W40, SAE W30). Nach dem Bau mehrerer Modelle, die kontinuierlich und diskontinuierlich arbeiteten, wurde ein finaler Prototyp entwickelt, bei dem das Vlies durch ein Öl/Wasser-Gemisch gezogen wird und dabei das Öl herausholt, siehe Abb. 14.



Abbildung 14: Versuche zur Ölabtrennung mit Vliesen. Restölgehalt im Wasser 0,5 bis 1,5mg/l, Wassergehalt im Öl max. 2%.

Für den Feldversuch wurde das Vlies zu einem Endlosband vernäht und in einer eigens gebauten Anlage eingesetzt. Wie im Abb. 14 zu sehen ist, wird das Vlies im Prototypen nur einmal eingesetzt. Im finalen Setup kann das Vlies durch wiederholtes Auspressen und Neu-Beladenwerden im Kreis geführt werden. Eine Nachspannvorrichtung sorgt dafür,

dass leichte Dehnungen ausgeglichen werden. Der finale Schrägbettfilter (SBF) für Drösing wurde folgendermaßen gebaut (Abb. 15):



Abbildung 15: Aufbau des Schrägbettfilters (SBF) auf Ergebnissen des Scale-up. BCA, FH Technikum Wien und Spintec haben hier eng zusammengearbeitet.

Die Firma ICS/Claus Fochler hat mit der Auswahl der geeigneten Vliese unterstützt. Bei den Versuchen mit Vliesen zur Abtrennung von PÖL/MKW aus Wasser zeigte sich ein Restölgehalt im Wasser von 0,5 bis 1,5mg/l. Der Wassergehalt im Öl lag bei max. 2%.

Bei Abzug von Grundwasser im Feldversuch ergaben sich beim Einsatz dieses SBF folgende Ergebnisse:

Restölgehalte nach den Verfahren

MÖA: 0,8 mg/l

MÖA + SBF: 0,3 mg/l

SBF: 0,4 mg/l (SBF = Schrägbettfilter, MÖA = Mineralölabscheider)

Damit liefert der SBF bessere Werte als ein klassischer Mineralölabscheider (MÖA). Die Kombination aus MÖA und SBF ergab sogar noch geringere Werte an Restölgehalt, lediglich 0,3 mg/l.

Beim Einsatz des SBF zum Trennen von PÖL/MÖL in Wasser Emulsion zeigten sich diese Leistungsdaten:

Restölgehalte (Gesamt) nach den Verfahren

MÖA: 0,8 mg/l

MÖA + SBF: 0,7 mg/l

SBF: 0,6 mg/l (SBF = Schrägbettfilter, MÖA = Mineralölabscheider)

Nach Laborversuchen nahm die Beladepazität des Vlieses nach 20 Zyklen um weniger als 5% ab. Dies wurde in den Feldversuchen ebenfalls bestätigt. Damit sind die Werte für im Wasser verbleibendes Öl etwas höher als bei Grundwasser.

Der SBF konnte mit 3,5l/s (entsprechend 12,6 m³/h) betrieben werden. Im Leistungsbereich von 0,5 bis 12,6 m³/h zeigte sich kein Unterschied in der Qualität des Ablaufs. Als besonders vorteilhaft stellte sich heraus, dass mitgeförderter Sand kein Problem darstellte.

Aufarbeiten von 500m³ Grundwasser

Ein wesentliches Ziel des Projekts ist Meilenstein 2.2, die Aufreinigung von 500m³ Grundwasser am Ort der N77. Die folgende Tabelle 13 zeigt, wie er erreicht wurde:

Tabelle 13: Insgesamt haben wir 511 m³ Grundwasser in Drösing abgepumpt und aufgereinigt.

Datum	Uhrzeit	Gepumpt und versickert	Reinigung über MÖA	Reinigung über SBF
21.09.2021	10.35-16.40	41.610	x	-
21.09.2021	11.00-16.40	38.760	-	X
22.09.2021	09.15-16.00	46.170	x	-
22.09.2021	09.15-16.00	46.170	-	X
23.09.2021	10.20-16.15	40.470	x	-
23.09.2021	10.20-16.15	40.470	-	X
28.09.2021	09.35-16.00	37.050	x	-
28.09.2021	10.00-16.00	41.040	-	X
29.09.2021	12.15-17.10	33.630	x	-
29.09.2021	12.30-17.10	31.920	-	X
30.09.2021	09.30-18.20	60.420	x	-
30.09.2021	10.30-18.20	53.580	-	X
Gesamt [l]		511.290	259.350	251.940

Die 1,9l/l (Leistung der Pumpe) konnten problemlos vom Schrägbettfilter bewerkstelligt werden. Teilweise wurde beim abgepumpten Grundwasser Öl in Phase vorgefunden, besonders bei Abzug in der Nähe des Grundwasserhorizonts. 2,7m³ an Mineralöl konnten

abgetrennt werden, das entspricht 0,53% der geförderten Menge. Der Schrägbettfilter wurde in dieser Zeit zweimal mit einer neuen Vliesbahn bespannt.



Abbildung 16: Bei den Feldversuchen. Zu erkennen sind 2 IBC mit Pflanzenöl/Mineralöl, die mittels Schrägbettfilter abgetrennt werden konnten aus den geförderten 500m³ Grundwasser.

Dieser Versuch zeigte eindrucksvoll die prinzipielle Machbarkeit des Verfahrens.

Enzymatischer Schadstoffabbau:

Arbeitspaket 3

Die Forschungsarbeiten zu diesem Arbeitspaket wurden federführend von der Universität für Bodenkultur Wien, Dept. IFA-Tulln durchgeführt, mit Unterstützung der Projektpartner, speziell im Zuge der Ausführung des Feldversuches. Folgende Mitarbeiter*innen der Universität waren in die schriftliche Darstellung dieses Berichtsteiles involviert, neben einem externen wissenschaftlichen Experten:

Marion Sumetzberger-Hasinger, Elisabeth Edlinger, Julia Otte, Thore Diefenbach, Verena Braunschmid, Hermann Heipieper, Doris Ribitsch und Andreas P. Loibner

Nachfolgend finden sich die Ergebnisse zu den einzelnen Arbeitsteilen sowie die daraus gewonnenen Erkenntnisse.

Highlights

- Das im Haus produzierte Enzym PL, sowie die Laccase MtL und die Peroxygenase UPO sind in der Lage, Kontaminanten der Altlast N77 bei neutralem pH-Wert und Grundwassertemperatur zu metabolisieren.
- Enzyme beschleunigten den Schadstoffabbau im Laborversuch um 200-400%.
- Das Enzym MtL reduziert mikrobiologisch nicht abbaubare MKW (Residualkontamination in Boden N77) innerhalb einer Woche um 88% (von 1464 auf 182 mg/kg).
- Für die Laccase MtL konnte nach einwöchigem Feldeinsatz ein in situ MKW-Abbau nachgewiesen werden.
- Bei erfolgreichem MKW-Abbau konnte keine Anreicherung von Metaboliten nachgewiesen werden (LC-MSTOF), weder im Feldversuch noch bei Laborabbautests mit N77 Boden.

Lowlights

- Immobilisierung von Enzymen an Vliesen nicht quantitativ, jedoch positive Wirkung von Vliesen auf enzymatischen Schadstoffabbau im Feldeinsatz beobachtbar
- Begrenzte Langzeitstabilität der Enzyme (< 7 d)
- Geringere Abbauraten im Aquifermodell und im Feldeinsatz
- Große Mengen an erfolgversprechenden Enzymen derzeit nicht verfügbar

Allgemeine Darstellung des Arbeitsansatzes

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von Enzymen in kontaminierten Böden wurden Versuche im dynamischen Boden/Grundwassersystem sowie im Durchflusssystem ausgeführt. Dabei standen Eckdaten für die Durchführung des Feldversuches sowie die Enzymwirkung auf verschiedene Schadstoffgruppen inklusive höchst persistenter chemischer Strukturen im Vordergrund. Durch in silico screening von molekularbiologischen Daten einer Anreicherungskultur der Altlast N77 wurden drei Laccase-Sequenzen identifiziert. Zur Herstellung dieser Enzyme wurden die gefundenen Sequenzen in *E. coli* exprimiert. Alle so gewonnenen Enzyme wurden mit Leitsubstraten einem vergleichenden Abbautest unterzogen. Als vielversprechendstes Enzym stellte sich die Laccase PL heraus. Dieses sowie weitere eigene bzw. kommerziell verfügbare Enzyme wurde mit Leitschadstoffen und mit kontaminiertem Boden des Altstandortes Drösing hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Schadstoffdegradation unter realitätsnahen Bedingungen getestet.

Um die Möglichkeit des Schadstoffabbaus unter extremen Bedingungen zu untersuchen, wurden mikrobielle Kulturen der Altlast Drösing mit den höchstpersistenten Schadstoffen Diamantan und Adamantan versetzt und unter erhöhtem Schadstoffdruck bei 10°C inkubiert.

Basierend auf den Erkenntnissen der Versuchsserien im Labor und den Bedingungen am Altstandort N77, wurde ein vergleichender Feldversuch konzipiert. Dieser wurde mit dem Enzym MtL im August und September 2021 unter Einhaltung der behördlichen Auflagen durchgeführt.

Analyse von Feststoffproben

Der Fokus dieses Arbeitspaketes lag auf der Erforschung des enzymatischen Abbaus von persistenten Mineralölkohlenwasserstoffen in Boden- bzw. Grundwasserumgebung. Bei historischen Schadensfällen geht man davon aus, dass es im Zuge der Alterung zu einer Abreicherung von gering persistenten Kontaminanten gekommen ist, die verbleibenden hochpersistenten Schadstoffe stellen somit ein bestens geeignetes Substrat für enzymatische Abbauversuche im Rahmen des Forschungsprojektes dar. Zur Überprüfung des Verwitterungsgrades wurden Bodenproben im Versuchsareal der Altlast N77 entnommen, hinsichtlich der Schadstoffzusammensetzung untersucht und entsprechend für Abbauversuche herangezogen. Die Analyse der Bodenproben und der Mineralöl-Phase zeigte, dass im Feld bereits eine umfangreiche Alterung des Kohlenwasserstoff-Gemisches bedingt durch mikrobiologische als auch physikalisch-chemische Prozesse stattgefunden hat, wobei die Verwitterung in der am Grundwasser aufschwimmenden Ölphase am weitesten fortgeschritten war, gefolgt von Proben aus tieferen und damit Grundwasser-nahen Schichten. Es wird davon ausgegangen, dass in tieferen Bodenlagen die Versorgung mit Feuchtigkeit dauerhaft gewährleistet, davon kann in den darüber liegenden Schichten nicht ausgegangen werden. Zudem ergab die Nährstoffanalyse der tiefsten beprobten Bodenschicht (7-8m), dass weder Phosphat noch Nitrat detektierbar waren. Es ist naheliegend, dass diese Mineralstoffe für mikrobielles Wachstum im Zuge der biogenen Alterung der Schadstoffmischung konsumiert wurden. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt die in Form von Chromatogrammen ermittelten Schadstoffprofile aus allen untersuchten Bodenschichten. In nicht-degradierten MKW-Profilen ist das n-Alkan Signal jeweils größer als das iso-Alkan Signal. Eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten des iso-Alkans deutet auf einen mikrobiellen Abbau hin, da die Abbauraten für komplexe chemische Strukturen in der Regel geringer sind als bei linearem Aufbau. Dadurch wird untermauert, dass die Veränderung des Schadstoffspektrums nicht nur durch physikalische Effekte wie Auswaschung bedingt, sondern bevorzugt durch mikrobielle Aktivität erfolgt ist. In den Chromatogrammen, die für Bodenproben und Ölphase aufgezeichnet wurden, ist diese Verschiebung deutlich zu erkennen (rote Markierungen in Abbildung 17). Die Verschiebung der beiden Peakdupletten n-C17/Pristan (Tetramethylpentadecan) und n-C18/Phytan (Tetramethylhexadecan) zugunsten der iso-Alkane ist für die Ölphase stärker ausgeprägt, n-Alkane konnten hier nicht mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 14 zeigt einen Überblick der identifizierten Substanzen. Eine Auswahl der identifizierten Schadstoffe wurde für ein detailliertes Monitoring der Abbauxperimenten herangezogen (Abb. 19).

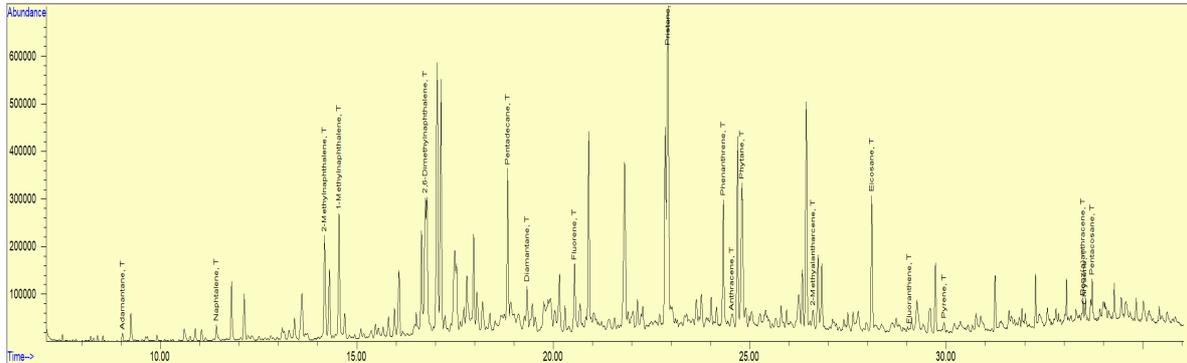


Abbildung 19: GC-MS Spektrum eines Bodenextraktes im selected ion mode, mit ausgewählten Schadstoffen.

PAK der US-EPA Prioritätenliste mit niedrigem und mittlerem Molekulargewicht konnten eindeutig identifiziert werden. Folgende Vertreter wurden in Proben des Standorts N77 nachgewiesen: Naphthalin, Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren und Chrysen. Höhere PAK konnten zwar noch qualitativ nachgewiesen werden, eine quantitative Bestimmung war auf Grund der geringen Konzentration allerdings nicht mehr möglich. Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol (BTEX) konnten nicht identifiziert werden, methylierte Benzole wurden jedoch nachgewiesen. Weiters wurden verschiedene alkylierte Cyclohexane identifiziert. Es konnten sowohl iso-Alkane (Farnesan, Pristan, Phytan) als auch n-Alkane (von C11 bis C25) nachgewiesen werden. Quantitativ liegt die Konzentration der Alkane um einen Faktor von 3 bis 10 über jener der PAK.

Tabelle 14: Substanzen, die mittels GC-MS in Ölphase detektiert wurden (exklusive n-Alkane).

Retentionszeit [min]	Substanz	Qualifier
6.833	2-Methylpropylcyclohexan	68
7.772	1,2,3-Trimethylbenzol	94
8.568	Methylundecan	89
8.651	1,2,3-Trimethylbenzol	83
10.814	1,2,4,5-Tetramethylbenzol	91
11.309	Hexylcyclohexan	87
11.87	1,3-Cyclopentadien	95
13.343	2,6,10-Trimethyldodecan (Farnesan)	83
13.798	Heptylcyclohexan	83
14.314	Naphthalin	72
15.211	1,2,3,4-Tetrahydro-5-methylnaphthalin	92
16.153	Octylcyclohexan	87
16.331	4-Cyclohexyliden-3,3-diethyl-2-pentanon	91
16.815	2-Methylnaphthalin	94
17.35	Decahydro-4,4,8,9,10-pentamethylnaphthalin	90
17.452	1-Methylnaphthalin	94
18.004	Fluoren	95
18.369	Nonylcyclohexan	93
19.106	1,7-Dimethylnaphthalin	96
19.167	2,6-Dimethylnaphthalin	96
19.598	2,7-Dimethylnaphthalin	96
19.721	1,5-Dimethylnaphthalin	96
20.077	2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan)	99

21.681	2,3,6-Trimethylnaphthalin	97
21.765	1,4,6-Trimethylnaphthalin	97
22.03	2,6,10,14-Tetramethylhexadecan (Phytan)	97
22.218	1,6,7-Trimethylnaphthalin	97
22.636	Trimethylnaphthalin	97
22.759	Trimethylnaphthalin	96
23.87	Fluoren	95
26.083	1-Methyl-9H-Fluoren	95
28.267	Phenanthren	95
28.460	Anthracen	95
29.937	2-Methylphenanthren	95
30.121	1-Methylanthracen	96
30.621	Methylphenanthren	95
30.739	Methylanthracen	96
33.195	Fluoranthren	96
34.125	Pyren	96
37.605	Benz(a)anthracen	95
37.667	Chrysen	96
38.563	(17 alpha H, 21 beta H) hopan	83

Auswahl funktioneller Enzyme (M3.1.)

Persistente Schadstoffe verfügen über hoch komplexe und stabile chemische Strukturen, die einen mikrobiologischen Abbau erschweren bzw. nahezu verunmöglichen. Es gibt jedoch spezielle Exo-Enzyme wie Oxidoreduktasen, die solche chemischen Strukturen angreifen können. Die Klasse der Oxidoreduktasen umfasst Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren. Sie kommen in allen lebenden Zellen und deren Stoffwechselwegen vor. Im Zuge der Oxidation übertragen diese Enzyme ein- oder mehrere Sauerstoffatome auf ihr Substrat, wobei oft auch Ringöffnungen am aromatischen Molekül stattfinden. Im Fokus

dieses Projekts standen Laccasen, kupferhaltige Oxidoreduktasen, die in vielen Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vorkommen und in der Natur die gekoppelte Oxidation phenolischer Substrate bei gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff katalysieren. Dabei wird die Phenolgruppe zu einem Radikal oxidiert, während Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Es ist jedoch auch bekannt, dass Laccasen in Gegenwart von Mediatoren auch nicht-phenolische Substrate oxidieren. In beiden Fällen würde die enzymatische Oxidation von solch stabilen Schadstoffverbindungen zu Produkten führen, die weniger persistent sind und somit leichter von Mikroorganismen abgebaut werden können.

In Zusammenarbeit mit Dr. Hermann Heipieper wurden Versuche zur Anreicherung von Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum Abbau persistenter Kohlenwasserstoffe konzipiert und durchgeführt. Zur Identifizierung von Enzymen mit Aktivität für persistente Schadstoffe wurden in diesem Projekt zwei Strategien verfolgt:

- Im ersten Ansatz wurden bekannte und kommerziell erhältliche Laccasen und weitere Oxidoreduktasen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Schadstoffabbau getestet. Dies bietet den Vorteil, dass diese Enzyme bereits in größerer Menge verfügbar sind und so z.B. für den Feldversuch herangezogen werden können.
- Im zweiten Ansatz wurde darauf abgezielt, Laccasen direkt aus N77 Boden zu isolieren. Dieser Strategie liegt die Tatsache zu Grunde, dass Mikroorganismen bereits an Umweltbedingungen wie sie am Standort N77 vorherrschen, adaptiert sind und ihre Enzyme sehr spezifisch an vorliegende Schadstoffe inklusive persistente Strukturen angepasst sind. Wir hypothetisieren deshalb, dass direkt aus N77 Boden isolierte Laccasen über ein ausreichend breites Substratspektrum mit gezielter Aktivität auf komplexe Strukturen verfügen.

Auswahl bekannter Enzyme

Um das Potenzial des enzymatischen Abbaus persistenter MKW-Strukturen zu überprüfen, wurden sechs bereits in der Literatur beschriebenen Oxidoreduktasen auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften und ausreichenden Verfügbarkeit ausgewählt (Tabelle 15).

Tabelle 15: Auswahl bekannter Oxidoreduktasen

Name	Enzymklasse	Mikrobielle Herkunft	Bezug
CotA	Laccase	Bacillus subtilis	Im Projekt rekombinant exprimiert
MaL1	Laccase	Melanocarpus albomyces	Im Projekt rekombinant exprimiert
SiLA	Laccase	Streptomyces rochei	Im Projekt rekombinant exprimiert
AbT	Tyrosinase	Agaricus bisporus	Kommerziell erworben
AbL	Laccase	Agaricus bisporus	Kommerziell erworben
MtL	Laccase	Myceliophthora thermophila	Kommerziell erworben
ThL	Laccase	Trametes hirsuta	Im Projekt rekombinant exprimiert
UPO	Peroxygenase	Agrocybe aegerita	Im Projekt rekombinant exprimiert

Unter den ausgewählten Enzymen befindet sich die Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (UPO), die in der Vergangenheit erfolgreich zum Abbau von Schadstoffen angewandt wurde, sowie eine Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Sechs weitere Enzyme gehören zur Gruppe der Laccasen, die eine sehr vielfältige und vielversprechende Enzymgruppe hinsichtlich der Zielsetzung des gegenständlichen Projektes darstellen, da sie ein breites Spektrum an komplexen Substraten transformieren können, wie in der Literatur bereits dargestellt. In Abbauprobversuchen an ausgewählten Leitsubstraten haben die Laccase aus *Myceliophthora thermophila* (MtL) und die UPO die höchsten Aktivitäten gezeigt. Da das Enzym MtL zudem kommerziell erhältlich und daher in großen Mengen verfügbar ist, wurde diese Laccase in weiteren Abbauprobversuchen genauer untersucht.

Auswahl von Enzymen durch genetische Analyse von Anreicherungskulturen

In einer weiteren Strategie zur Identifizierung von N77-spezifischen Laccasen wurden Anreicherungskulturen mit N77 Bodenproben durchgeführt (Abb. 20). Diese

Kultivierungen hatten die Vermehrung von endogenen Mikroorganismen zum Ziel, die in der Lage sind, komplexe Schadstoffverbindungen unter realitätsnahen Bedingungen abzubauen. Dazu wurden zwei kontaminierte Bodenproben ausgewählt, die auf Grund ihres gealterten Kontaminationsprofils das Vorhandensein von Schadstoff-abbauenden Mikroorganismen nahelegten.



Abbildung 20: Anreicherungskulturen zweier Bodenproben bei pH 5 und 7.

Einerseits wurde eine Probe aus der tiefsten untersuchten Zone (7-8m) herangezogen, diese zeigte im Vergleich zu darüberliegenden Schichten den höchsten Degradationsgrad, der in diesem Zusammenhang der biogenen Alterung des Kohlenwasserstoffgemisches entspricht. Andererseits wurde auf eine Bodenprobe eines Rohölschadens zurückgegriffen, die ebenso ein hoch komplexes, degradiertes Schadstoffgemisch aufwies. Die Versuche wurden aerob bei zwei unterschiedlichen pH-Werten und Raumtemperatur durchgeführt. Aktivitäten der Exo-Enzyme (Laccasen) konnten in den Kulturüberständen nachgewiesen werden (Tabelle im 2. Teilbericht zum Projekt), folglich wurde dieses Konsortium zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

Abb. 21 zeigt das mikrobielle Konsortium, das sich nach 297 Tagen Abbaueversuch im N77 Boden etabliert hat. Es zeichnet sich durch eine sehr hohe Diversität aus, die auf die durch die lange Laufzeit des Versuches bedingte steigende Komplexität des Schadstoffgemisches zurückzuführen sein dürfte. Der Abbau eines reichhaltigen Gemisches an hochkomplexen Strukturen erfordert i.d.R. eine höhere Diversifizierung an metabolischer Funktionalität bis hin zur Interaktion taxonomisch unterschiedlicher Bakteriengruppen.

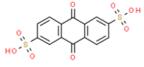
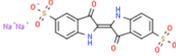
Hauptvertreter sind Burkholderia, Sphingomonas, Pseudomonas und Xanthobacter. Besonders deutlich ist die Erhöhung der Abundanz von Sphingopyxis von 0,7% bei Raumtemperatur auf 38% bei 10°C. Dieser Stamm wurde laut Literatur zum Beispiel aus einem mit Schweröl kontaminierten Boden isoliert (De-Chao, et al., 2010).

Anreicherungskulturen mit höchstpersistenten Schadstoffen

In Zusammenarbeit mit Dr. Hermann Heipieper wurden zusätzliche Versuchsreihen zur Anreicherung von Mikroorganismen mit der Fähigkeit zum Abbau von Adamantan und Diamantan konzipiert. Diese Versuche wurden in gasdichten Kulturflaschen durchgeführt, um ein falsch positives Ergebnis durch eine Verflüchtigung der Schadstoffe zu vermeiden. Die Behandlungsverfahren mit Adamantan (ADA), Diamantan (DIA) sowie Phenanthren (PHE) wurden in Dreifachbestimmung mit einer Konzentration von 1 g/L erstellt. Phenanthren besitzt eine stabile aromatische Struktur aus drei kondensierten Benzolringen, wird aber dennoch von vielen Mikroorganismen umgesetzt und diente so als Positivkontrolle.

Weiters wurden Redox-Mediatoren zur potenziellen Beschleunigung der Abbaureaktion eingesetzt. Dazu wurden zwei Mediatoren, i.e. AQDS und Indigokarmin ausgewählt (Tab. 16). Von diesen Substanzen ist bekannt, dass sie als Elektronenshuttle fungieren und gewöhnlich ihre Anwendung in anaeroben mikrobiellen Abbauprozessen finden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass diese Mediatoren die Schadstoffumsetzung auch unter den vorliegenden Bedingungen beschleunigen und somit zu einer verstärkten Anreicherung von Abbau-kompetenten Mikroorganismen führen. Da Indigokarmin im Wachstumsmonitoring (Messung der optischen Dichte bei 600 nm) verstärkte Interferenzen hervorrief, liegt der Fokus der Darstellung in weiterer Folge auf Versuchsergebnissen, die mit AQDS erzielt wurden.

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Redox-Mediatoren

substance	molecular formular	structure	average mass
AQDS 2,6-Anthracenedisulfonic acid, 9,10-dihydro-9,10-dioxo-	C ₁₄ H ₈ O ₈ S ₂		368.339 Da
Indigo carmine (2E)-3-Oxo-2-(3-oxo-5-sulfonato-1,3-dihydro-2H-indol-2-ylidène)-5-indolinesulfonate de disodium	C ₁₆ H ₈ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₂		466.353 Da

Eine Anreicherung von Biomasse konnte weder visuell beobachtet werden noch ließ sich ein signifikanter Anstieg der optischen Dichte bei 600 nm feststellen (Abb. 23). Somit konnte in diesem Ansatz kein mikrobielles Wachstum und damit kein Abbau des Schadstoffes nachgewiesen werden.

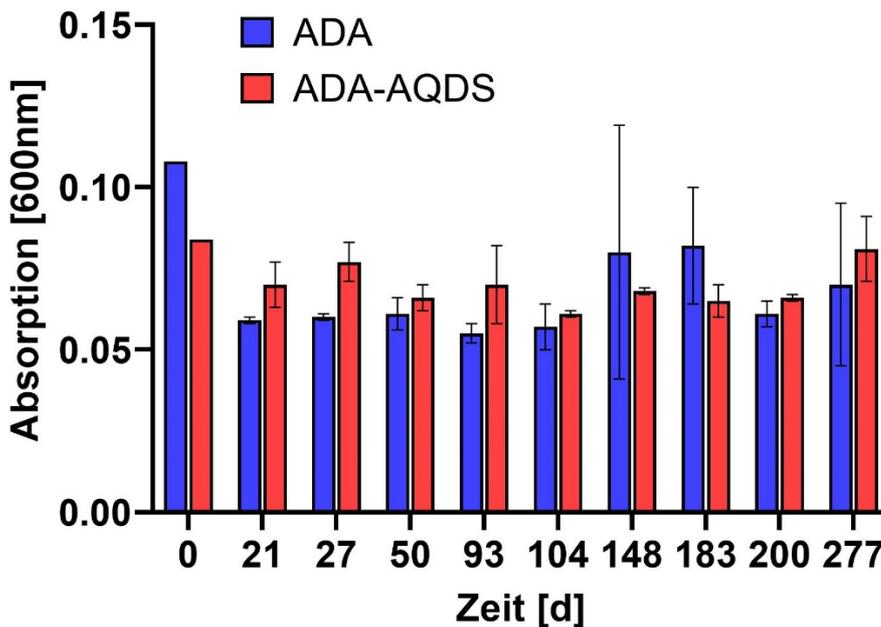


Abbildung 23: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600nm}) der Anreicherungskulturen mit Adamantan mit und ohne AQDS. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Ein ähnliches Bild zeigt auch der Verlauf der optischen Dichte der Anreicherungskulturen mit Diamantan (Abb. 24), wobei hier die letzte Messung für Diamantan-AQDS statistisch

signifikant höher als ist als die vorangegangenen Werte. Diese Erhöhung der optischen Dichte um ca. 50% im Vergleich zum Startwert könnte auf einsetzendes Zellwachstum und damit einen Abbau von Diamantan in Gegenwart des Mediators AQDS hinweisen.

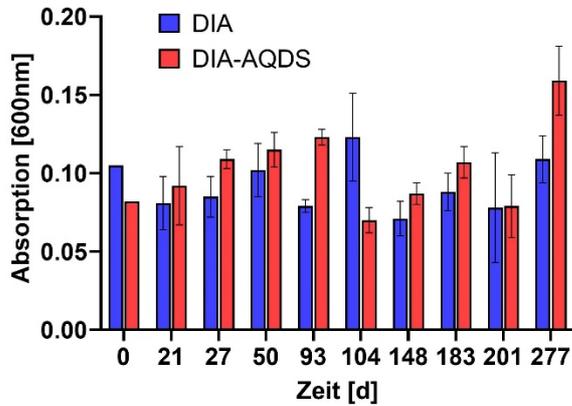


Abbildung 24: Verlauf der optischen Dichte (OD600nm) der Anreicherungskulturen mit Diamantan mit und ohne AQDS. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Die Anreicherungskulturen mit Phenanthren zeigten schon innerhalb von 157 Tagen eine Verdreifachung der optischen Dichte (Abb. 25 und Abb. 26), wodurch vergleichsweise rasches mikrobielles Wachstum mit dem organischen Schadstoff als singuläres Substrat bestätigt wird.



Abbildung 25: Vergleich der Anreicherungskulturen mit Phenanthren, Tag 0 (oben) und Tag 157 (unten).

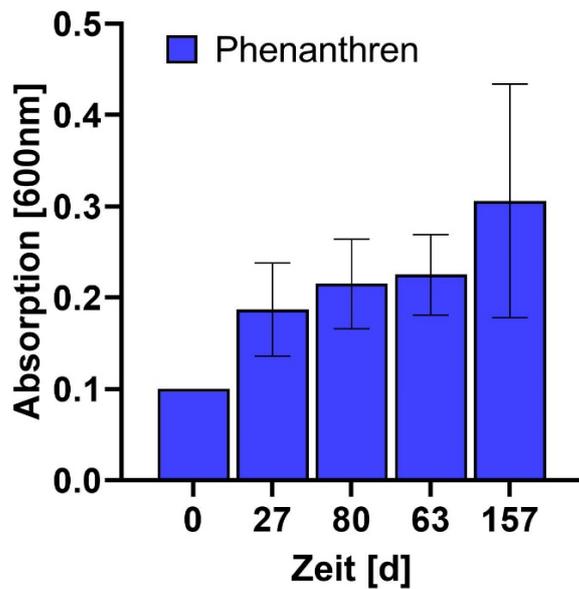


Abbildung 26: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600nm}) der Anreicherungskulturen mit Phenanthren. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Um das Verhalten des mikrobiellen Konsortiums im N77 Boden unter extremophilen Bedingungen zu testen, wie sie i.d.R. auch an kontaminierten Altstandorten vorliegen, wurde eine Versuchsserie mit erhöhtem Schadstoffdruck durchgeführt. Dazu wurden neue Ansätze bei Zugabe eines chemischen Stressors (Cyclohexan) in steigender Konzentration erstellt und mit der bestätigt aktiven Phenanthrenkultur inokuliert.

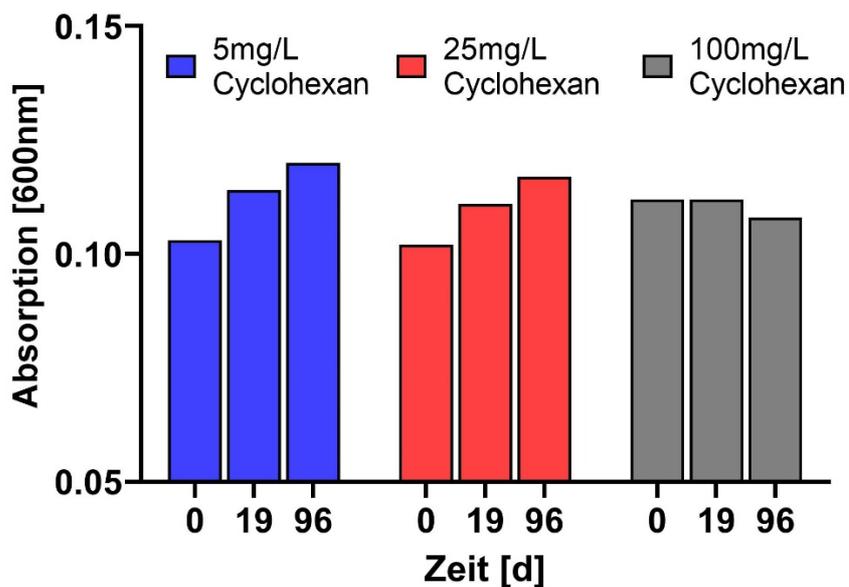


Abbildung 27: Verlauf der optischen Dichte (OD_{600nm}) der Anreicherungskulturen in Gegenwart des Stressors Cyclohexan.

Bei Cyclohexan-Konzentrationen von 5 und 25 mg/L konnte innerhalb eines Zeitraums von 96 Tagen mikrobielles Wachstum nachgewiesen werden, nicht so bei einer Konzentration von 100 mg/L an Cyclohexan (Abb. 27). Diese hohe Menge an Stressor, der ein organisches Lösemittel ist, führte auf Grund unzureichender Adaptierung des mikrobiellen Konsortiums zu Hemmeffekten. Jedoch zeigt sich auch, dass die mikrobiellen Kulturen vom Standort N77 Schadstoffe mit Lösemittelcharakter tolerieren bzw. abbauen können, sofern die Konzentrationen im moderaten Bereich liegen.

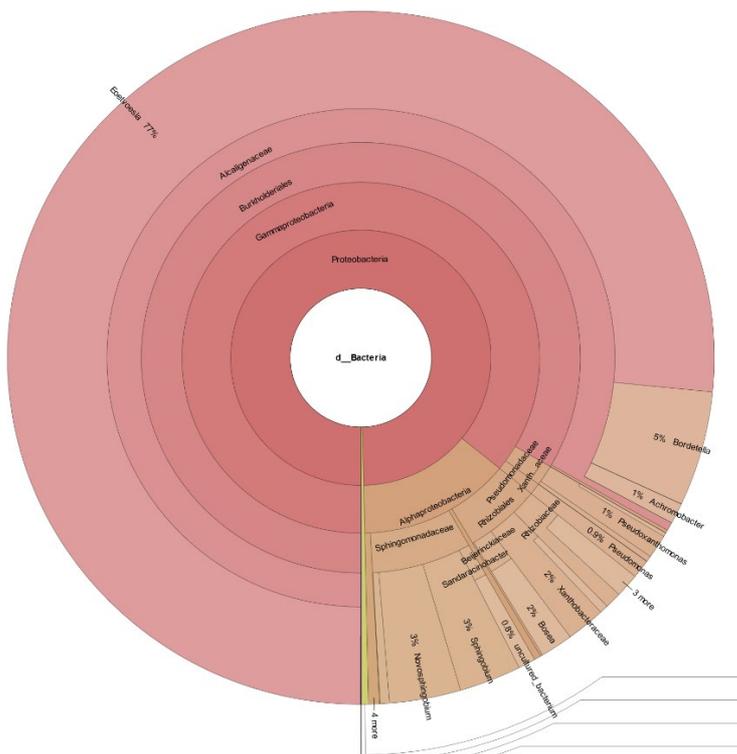
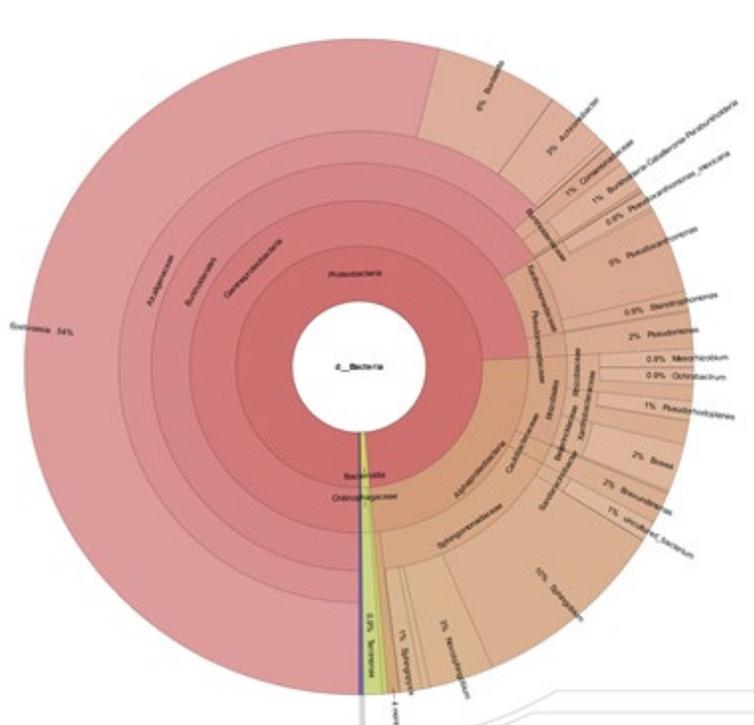


Abbildung 28: Krona-Plot des mikrobiellen Konsortiums der Anreicherungskultur mit AQDS zu Beginn (oben) und nach 97 Tagen (unten) in Gegenwart des Stressors Cyclohexan.

Es wurden insgesamt acht Bakterienstämme identifiziert, die sich innerhalb der 178 Tage in der Kultur verstärkt angereichert hatten. In einem nächsten Schritt wurden verfügbare Sequenzdatenbanken der angereicherten und identifizierten Mikroorganismen in einem in-silico Screening nach Sequenzen untersucht, die für Multi-Kupfer Oxidasen wie Laccasen codieren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Sequenzen mit Homologie zur Laccase MTL gelegt. Insgesamt wurden fünf vielversprechende Stämme und deren Multi-Kupfer Oxidasen identifiziert (Tabelle 17). Da die Aufnahme von Schadstoffen in die Zelle von Mikroorganismen eine zusätzliche Limitierung darstellen kann, wurden nur Laccasen ausgewählt, die über strukturellen Voraussetzungen für eine Sekretion aus der Zelle verfügen und dadurch einen Schadstoffabbau außerhalb der Zelle ermöglichen. Drei vielversprechende Enzyme, die potenziellen Laccasen aus *Brevundimonas alba* (BA), *Pseudoxanthomonas mexicana* (PM) und *Parvibaculum lavamentivorans* (PL), verfügen über derartige Voraussetzungen in Form von Signalpeptiden und wurden daher heterolog in *Escherichia coli* exprimiert.

Tabelle 17: Identifizierte Enzymsequenzen mit Homologie zu MtL

Strain	Enzyme	Signal-IP	Accession Nr.	MtL Homolog	MtL Identity
Brevundimonas alba	copper resistance system multicopper oxidase	yes	WP_168048018	28%	16%
Mycobacterium monacense	-	-	-	-	-
Pseudoxanthomonas mexicana	copper resistance system multicopper oxidase	yes	WP_187572678.1	29%	16%
Aquisphaera giovannonii	multicopper oxidase domain-containing protein	no	WP_168222263.1	15%	8%
Parvibaculum lavamentivorans	copper resistance system multicopper oxidase	yes	WP_011995260.1	34%	23%
Luteimonas granuli	copper resistance system multicopper oxidase	no	WP_144889486.1	36%	22%

Enzymexpression

Die Laccase aus *Pseudoxanthomonas mexicana* (PM) wurde nur mit sehr geringer Ausbeute in *E. coli* produziert und zeigte zudem keine Aktivität auf dem Standardsubstrat. Die Laccasen aus *Parvibaculum lavamentivorans* (PL) und *Brevundimonas alba* (BA) wurden erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Beide Laccasen zeigten Aktivität auf dem Laccase-Standardsubstrat 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure – ABTS). Da die Laccase PL jedoch eine höhere Aktivität als BA aufwies, wurde sie für die genauere biochemische Charakterisierung ausgewählt.

Charakterisierung der Laccase PL

In einem Substratscreening zeigte die Laccase PL Aktivität für alle ausgewählten Standardsubstrate mit Ausnahme der schwer oxidierbaren Vanillinsäure und Ferulsäure (Abb. 30).

	Neg Ctrl	PL	
Catechol			+
Syringaladizne			+
2,6-Dimethoxyphenol			+
Guaiacol			+
Sinapic acid			+
Ferulic acid			~
Vanilic acid			-
Gallic acid			+

Abbildung 30: Aktivitätstest des Enzyms PL für eine Auswahl an Standardsubstraten.

Die Charakterisierung der Laccase PL hat ein pH-Optimum im weitgehend neutralen Bereich ergeben. Die höchste Aktivität für die Oxidation des Modellsubstrates ABTS wurde bei pH 6 erzielt, für den Abbau von 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) lag sie bei pH 8 (Abb. 31). Da die meisten bekannten Laccasen über ein Aktivitätsoptimum im stark sauren pH Bereich (< pH 5) verfügen, stellt hingegen das pH Optimum der Laccase PL rund um pH7 eine sehr gute Voraussetzung für die Anwendung im Feld dar.

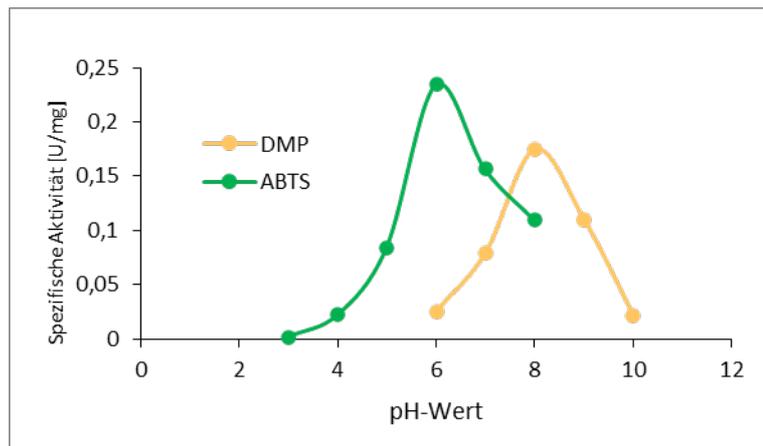


Abbildung 31: PL pH-Optimum: Spezifische Aktivität für die Substrate ABTS (grün) und DMP (orange) in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Eine Aktivitätsbestimmung der Laccase PL bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte, dass das Maximum an Umsetzung nach Inkubation bei 10°C erzielt wurde (Abb. 32), womit die Eignung des Enzyms für die in situ Anwendung unterstrichen wird.

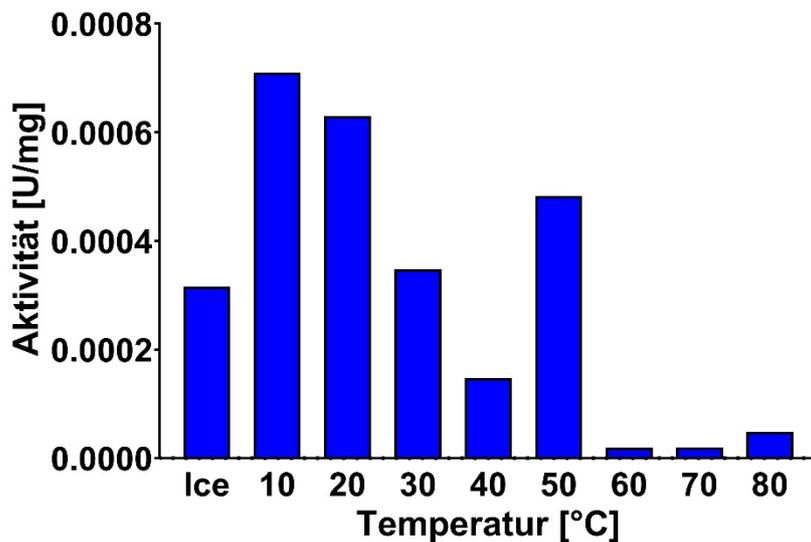


Abbildung 32: Aktivität des Enzyms PL bestimmt mit ABTS nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen.

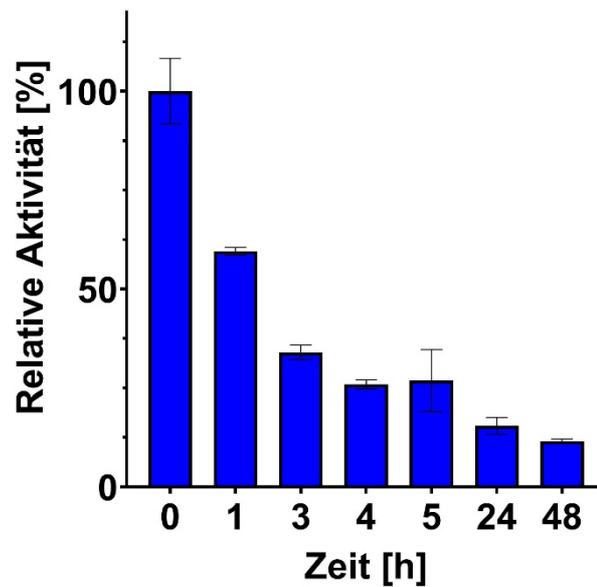


Abbildung 33: Stabilität des Enzyms PL bei Raumtemperatur, bestimmt mit ABTS. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Bei Raumtemperatur ist die Stabilität der aufgereinigten Laccase PL gering (Abb. 33). Auch die Lagerstabilität bei niedrigen Temperaturen erwies sich als gering (Abb. 34). Die Stabilität des Enzyms in nicht aufgereinigter Form (als Zelllysate) war jedoch deutlich höher, folglich wurde für den Abbau von Schadstoffen in Bodenproben Zelllysate eingesetzt. Die Charakterisierung des Enzyms erfolgte jedoch mit dem aufgereinigten Enzympräparat.

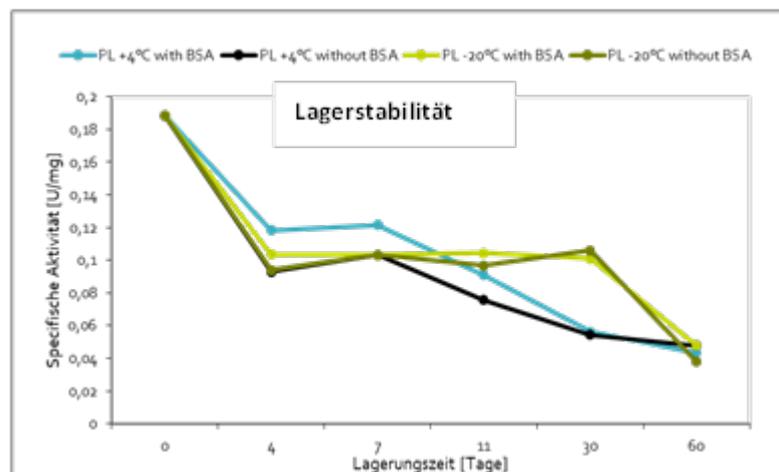


Abbildung 34: Lagerstabilität des Enzyms PL bei 4°C und -20°C mit/ohne Stabilisator Rinderserum Albumin (BSA) getestet auf ABTS

Die Bestimmung der kinetischen Parameter nach Michaelis-Menten ergab, dass die Laccase PL eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) von 0,47 U/mg für ABTS und eine Michaelis-Konstante K_m von 1,22 mM besitzt, siehe Abb. 35. Im Vergleich zu anderen bekannten und optimierten bakteriellen Laccasen (siehe BRENDA EC 1.10.3.2), zeigen diese kinetischen Parameter, dass PL gegenüber ABTS eine etwas niedrigere Affinität und katalytische Effizienz besitzt.

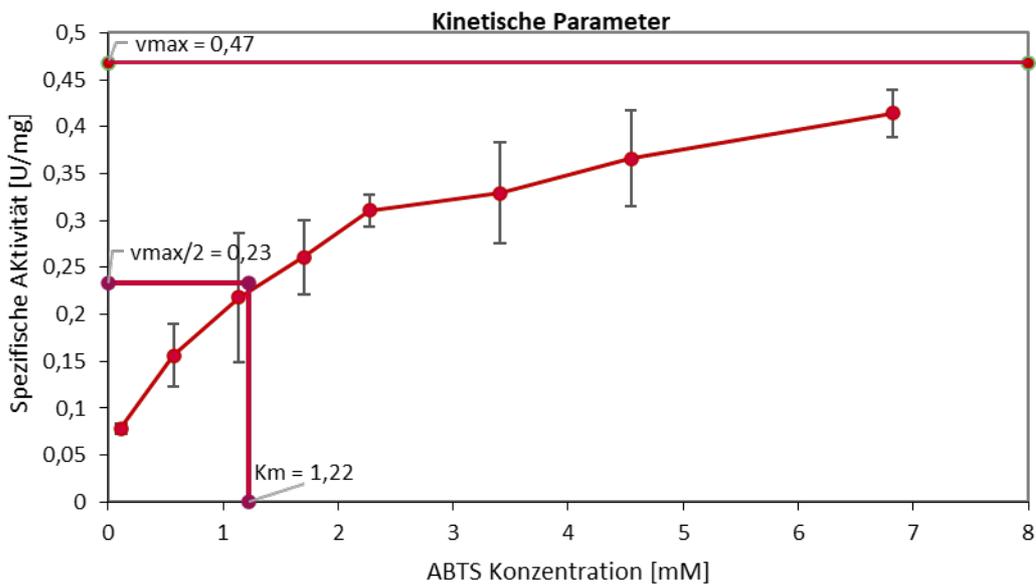


Abbildung 35: Michaelis-Menten Kinetik von PL auf ABTS, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, $n=3$

Der Abbau von PAK durch Laccasen erfolgt in mehreren Schritten (siehe Abbildung 36) und wurde kürzlich am Beispiel von Benzo(a)anthracen mechanistisch untersucht (Pengfei, et al., 2020). Basierend auf identifizierten Intermediaten kommt es durch die Laccase-katalysierte Oxidation zunächst zu einer Hydroxylierung des Ringsystems, gefolgt von der Ringöffnung und Abspaltung der Seitenkette. Durch Schritte wie Oxidation und Ringspaltung werden PAK zu einfacheren und weniger stabilen chemischen Strukturen abgebaut, die leichter von Mikroorganismen aufgenommen und metabolisiert werden können. Im Zuge der in diesem Projekt durchgeführten Forschungsarbeiten konnte eine

Anreicherung von Metaboliten weder im Labor noch im Feld analytisch nachgewiesen werden, was einen raschen mikrobiellen Abbau der Metabolite in Testsystemen, die neben einer Flüssigphase auch Boden enthalten, nahelegt.

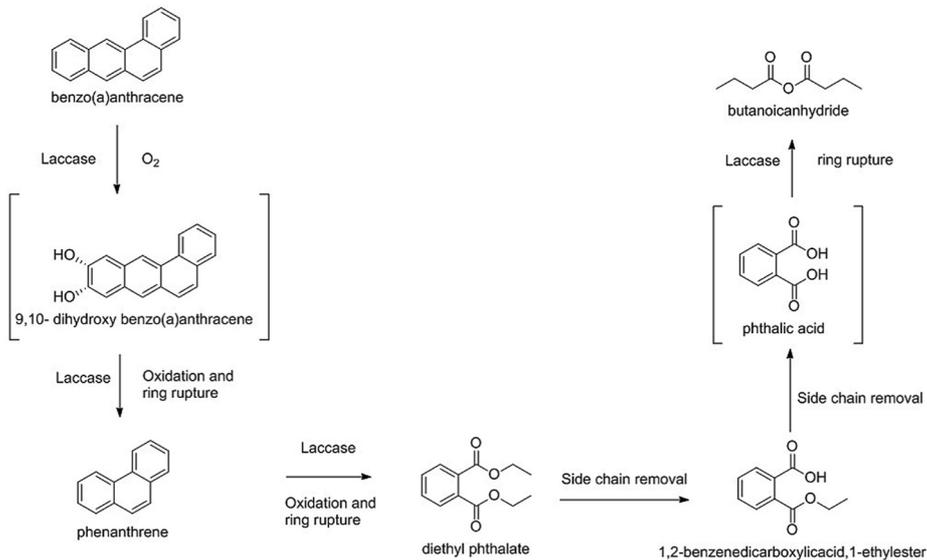


Abbildung 36: Reaktionsmechanismus des Laccase-katalysierten PAK-Abbaus am Beispiel Benz(a)anthracen

Enzym-Screening mit proteomischer Analyse

Die im gegenständlichen Forschungsvorhaben untersuchten Exo-Enzyme sind funktionelle Eiweiße, die von Zellen in das umgebende Milieu sekretiert werden. Um kompetente Enzyme in kontaminierten Bodenproben nachweisen zu können, ist jedoch vorab eine Separation der Proteine von Komponenten der Bodenmatrix erforderlich.

Um eine möglichst vollständige Extraktion aller Proteine aus dem Boden der Altlast Drösing (N77) zu gewährleisten, war die Entwicklung einer robusten Methode erforderlich. Dazu wurden im Vergleich Proteine aus 6 verschiedenen Böden mit 5 unterschiedlichen Extraktionsmitteln und 2 verschiedenen Verfahren extrahiert (Rotationsagitation und Ultraschallextraktion, jeweils bei Raumtemperatur, siehe Abb. 37 und Abb. 38).

Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Extrakte wurde mittels BCA Proteinassay (Pierce™ Rapid Gold Pierce™ Rapid Gold) bestimmt. SDS/Phenol zeigte im Proteintest hohe Blindwerte, sodass eine Auswertung nicht sinnvoll war. Eine Darstellung dieser Daten entfällt an dieser Stelle.

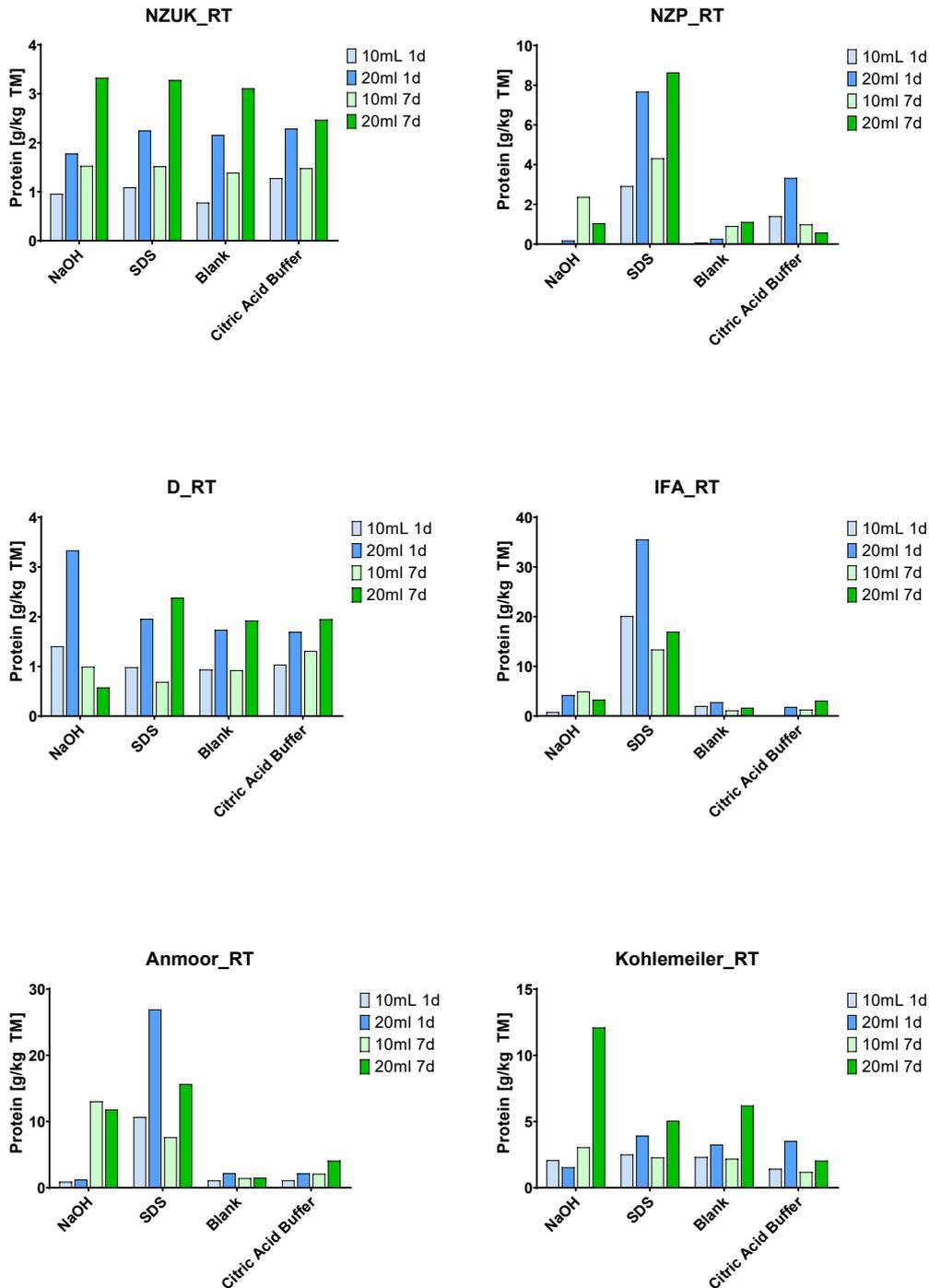


Abbildung 37: Proteinausbeuten der untersuchten Bodenproben mittels Rotationsagitation.

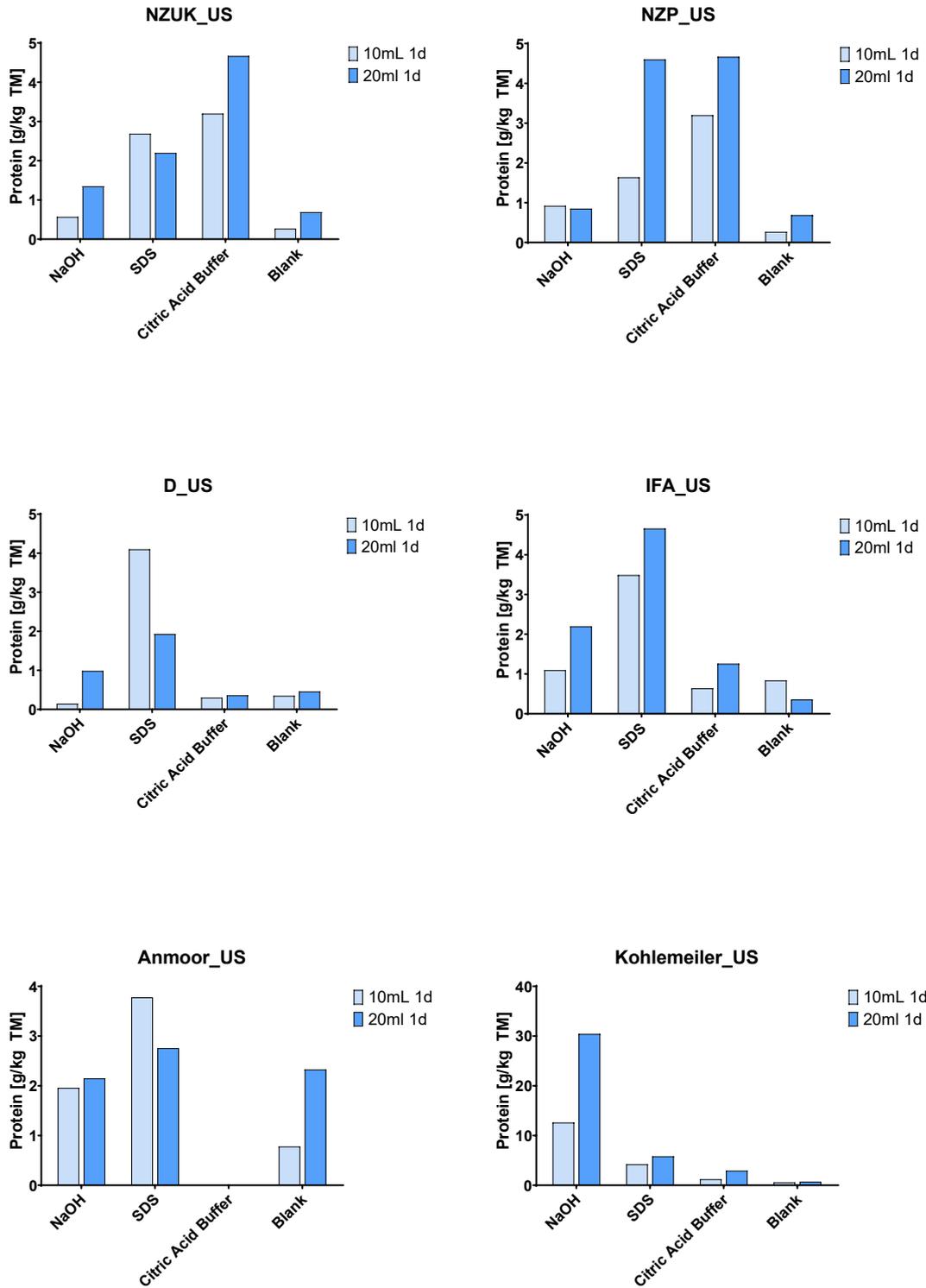


Abbildung 38: Proteinausbeuten der untersuchten Bodenproben mittels Ultraschallextraktion

Ergebnisse Orbitrap Methodenentwicklung

Die Proteinausbeute schwankt erwartungsgemäß in Abhängigkeit von der jeweiligen Bodenzusammensetzung. Generell ergaben eine verlängerte Extraktionszeit gepaart mit größeren Volumina an Extraktionsmittel höhere Ausbeuten. Die Analyse mittels Orbitrap-nanoLC zeigte ein deutlich größeres Spektrum an unterschiedlichen Proteinen in den Ansätzen mit Puffer (Abb. 41), obwohl die quantitative Ausbeute geringer war als in den Ansätzen mit SDS (Abb. 40). Um eine möglichst große Bandbreite an unterschiedlichen Proteinen zu erfassen, wurden die Anreicherungskulturen mit Boden der Altlast N77 mit Puffer extrahiert (Abb. 42). In weiterer Folge wurde ein Datenbankabgleich mittels UniProt und eine gezielte Suche nach Laccasen durchgeführt. Dabei konnte das Vorhandensein der Laccase des Organismus *Amylostereum areolatum* nachgewiesen werden (Abbildung 39) und somit die gesuchte enzymatische Aktivität im N77 Boden bestätigt werden.

UniProtKB - A0A873P8Q8 (A0A873P8Q8_9AGAM)

Display [Help video](#) [BLAST](#) [Align](#) [Format](#) [Add to basket](#) [History](#)

Entry Submitted name: **Laccase 1**

Gene N/A

Organism *Amylostereum areolatum*

Status Unreviewed - Annotation score: ●○○○○ - Experimental evidence at transcript level¹

Function¹

Keywords¹

Molecular function **Oxidoreductase** Imported

Names & Taxonomy¹

Protein names¹ Submitted name: **Laccase 1** Imported (EC:1.10.3.2 Imported)

Organism¹ *Amylostereum areolatum* Imported

Taxonomic identifier¹ 103385 [NCBI]

Taxonomic lineage¹ Eukaryota > Fungi > Dikarya > Basidiomycota > Agaricomycotina > Agaricomycetes > Russulales > Stereaceae > *Amylostereum* ⓘ

Structure¹

No structure information available for A0A873P8Q8

Sequence¹

Abbildung 39: Datenbankabgleich via UniProt Website

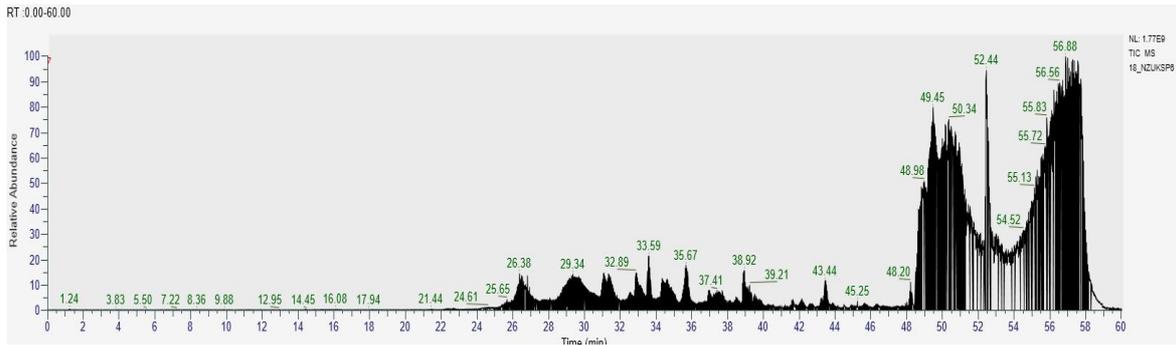


Abbildung 40: Chromatographische Analyse (Orbitrap-nanoLC) der mit SDS aus Boden extrahierten Proteine; hohe Signalstärke bei reduzierter Auflösung, geringe Anzahl an distinkten Peaks.

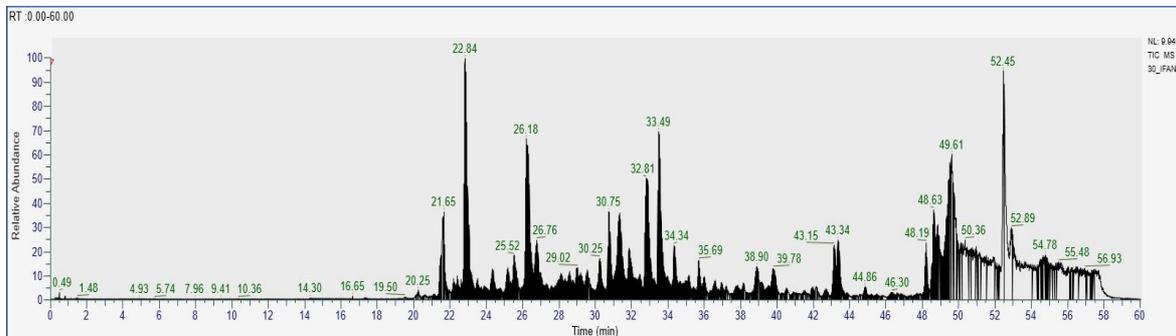


Abbildung 41: Chromatographische Analyse (Orbitrap-nanoLC) der mit Puffer aus Boden extrahierten Proteine; es zeigen sich sehr scharfe, gut getrennte Peaks.

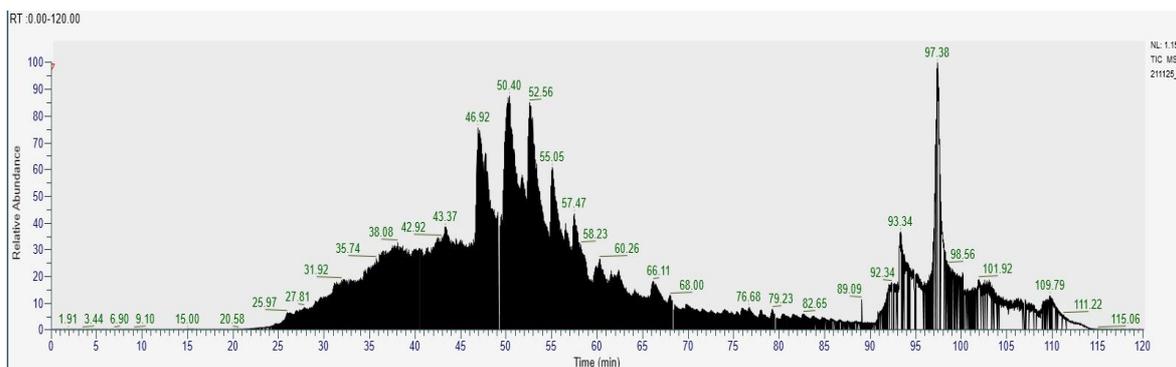


Abbildung 42: Chromatographische Analyse (Orbitrap-nanoLC) der mit Puffer aus N77 Boden nach Anreicherung kompetenter Mikroorganismen extrahierten Proteine.

Nachweis der Funktionalität der Enzyme (M3.2.)

Enzymatischer Abbau von Leitsubstanzen im physiologischen Testsystem

Zur Überprüfung der enzymatischen Abbauwirkung wurden Funktionstests mit Modell-schadstoffen (sogenannten Leitsubstanzen, siehe 18) in einem gepufferten Testansatz ohne Boden durchgeführt. Die Auswahl der Substanzen erfolgte einerseits anhand der Analyseergebnisse der Proben der Altlast N77 (mittels GC-MS identifizierte PAK und methylierte PAK sowie ausgewählte n- und iso-Alkane). Andererseits wurden zusätzlich zwei komplex strukturierte Schadstoffe (Adamantan und Diamantan) hinsichtlich ihrer enzymatischen Abbaubarkeit getestet. Diese beiden Substanzen finden sich in Rohöl und weisen eine extrem hohe Persistenz auf. Da speziell für Diamantan ein biologischer Abbau noch nicht hinlänglich bewiesen ist, würde ein positives Ergebnis das Potential des jeweiligen Enzyms für gealterter Schadensfälle nicht nur untermauern, sondern auch völlig neue Perspektiven zur nachhaltigen Sanierung eines breiten Spektrums an komplexen Altlastenschadstoffen eröffnen.

Tabelle 18: Leitsubstanzen selektiert für enzymatische Abbauuntersuchungen im physiologischen Testsystem.

Name	Abkürzung	Wasserlöslichkeit (mg/L) basierend auf log KOW
Pristan	PRI	2,00E-05
Phytan	PHY	1,68E-05
Cylopentadecan	Cyc15	0,003662
Pentadecan	C15	0,002866
Pentacosan	C25	2,05E-08
Phenanthren	PHE	0,677
2,6-Dimethylnaphthalin	DMN	14,85
Methylantracen	MAN	0,247
Dibenzothiophen	DBT	8,83E-01

Adamantan	ADA	6,033
Diamantan	DIA	0,81

Ziel dieser Versuchsreihe war die Überprüfung aller in Tabelle 19 angeführten Enzyme hinsichtlich ihrer prinzipiellen Eignung für den Abbau der 11 selektierten Leitsubstanzen (Tabelle 18). Basierend auf den Ergebnissen sollten die besten Enzyme ausgewählt werden und in weiterführenden Tests auf ihre Funktionsfähigkeit bei simulierten Untergrundbedingungen in Bodensuspension bzw. im Grundwassermodellsystem untersucht werden.

Dem gepufferten Enzymtestsystem ohne Boden wurde je nach Erfordernis Co-Faktor zugesetzt. Zur Bestätigung des Vorhandenseins von enzymatischer Aktivität im Abbauansatz bzw. der erfolgreichen Enzyminaktivierung im Kontrollansatz wurde die Aktivität sowohl vor als auch nach der Durchführung der Tests in allen Ansätzen bestimmt. Die Ergebnisse sind den Abbildungen 43-48 jeweils relativ zum inaktivierten Enzym dargestellt. Die Signifikanz der beobachteten Effekte wurden mittels 2way ANOVA und Bonferroni Posttest (GraphPad Prism 9) untersucht (Tabellen 20-25).

Tabelle 19: Liste der getesteten am Institut produzierten bzw. zugekauften Enzyme*

Name	Klasse	Mikroorganismus
UPO*	Peroxygenase	Agrocybe Aegerita
MtL*	Laccase	Myceliophthora thermophila
MaL1	Laccase	Melanocytrpus albomyces
CotA	Laccase	Bacillus subtilis
SiLA	Laccase	Streptomyces rochei
TvL	Laccase	Trametes versicolora

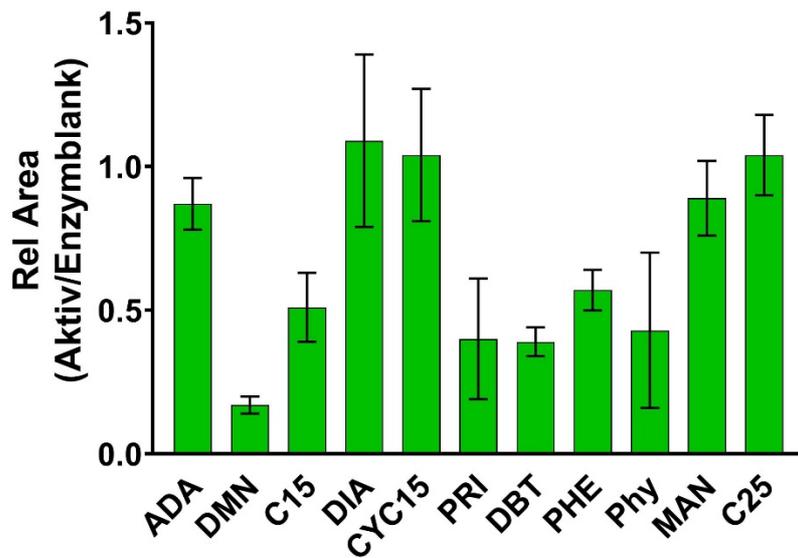


Abbildung 43: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym UPO, Messung mit ITEX. Aktiv/Inaktiv - aktiver Ansatz berechnet relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Die Peroxidase UPO zeigte auch im wiederholten Versuch einen statistisch signifikanten Abbau von allen getesteten Substanzklassen, außer für die höchst komplexen zyklischen Alkane und Methylantracen. Der Abbaugrad lag zwischen 49% und 83%, wie aus Tab. 20 ersichtlich. Allerdings sank die Aktivität des Enzyms UPO im Testansatz innerhalb von 48 Stunden um >99%. Im hitzebehandelten und vergifteten Kontrollansatz wurde UPO erfolgreich inaktiviert.

Tabelle 20: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym UPO. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.

Row Factor	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
DMN	17	3	P<0.0001	****
C15	51	12	P < 0.05	*
PRI	40	21	P<0.01	**
DBT	39	5	P<0.01	**
Phy	43	27	P<0.01	**

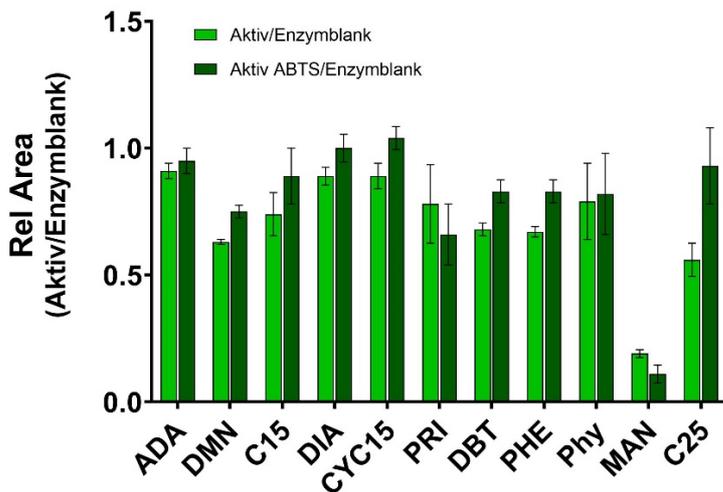


Abbildung 44: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym MtL, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Auch MtL zeigte Abbauaktivität für aromatische und auch aliphatische Strukturen. Im Vergleich zur UPO ist der Abbau von Methylantracen mit 89% Reduktion stärker

ausgeprägt, siehe Abb. 44 und Tabelle 21. Die Aktivität der Laccase MtL konnte im Versuchsansatz über den gesamten Testzeitraum von 48 Stunden erhalten werden (+3%). Im hitzebehandelten und vergifteten Kontrollansatz wurde MtL erfolgreich inaktiviert.

Tabelle 21: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MtL. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.

Aktiv/EB	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
DMN	63	2	P < 0.05	*
PHE	67	4	P < 0.05	*
MAN	19	3	P<0.001	***
C25	56	13	P<0.01	**
Aktiv ABTS/EB	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
PRI	79	15	P < 0.05	*
MAN	11	7	P<0.001	***

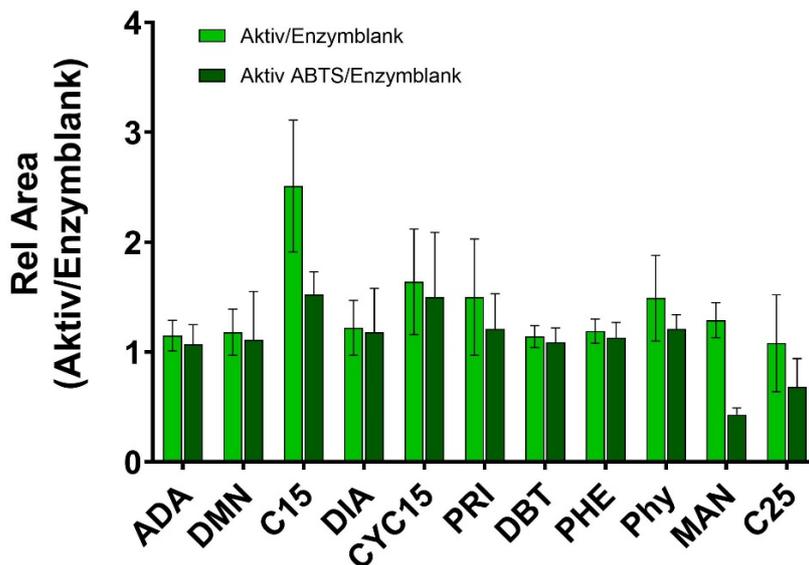


Abbildung 45: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym MaL1, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-

Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Die Laccase MaL1 verlor innerhalb von 48 Stunden 99% an Aktivität. Die hitzebehandelte und vergiftete MaL1 Probe wurde erfolgreich inaktiviert. Das Enzym zeigte nur für Methylantracen eine statistisch signifikante Abnahme von 32%, siehe Abb. 45, respektive Tabelle 22.

Tabelle 22: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MaL1. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.

Aktiv ABTS/EB	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
MAN	68	26	P<0.001	**

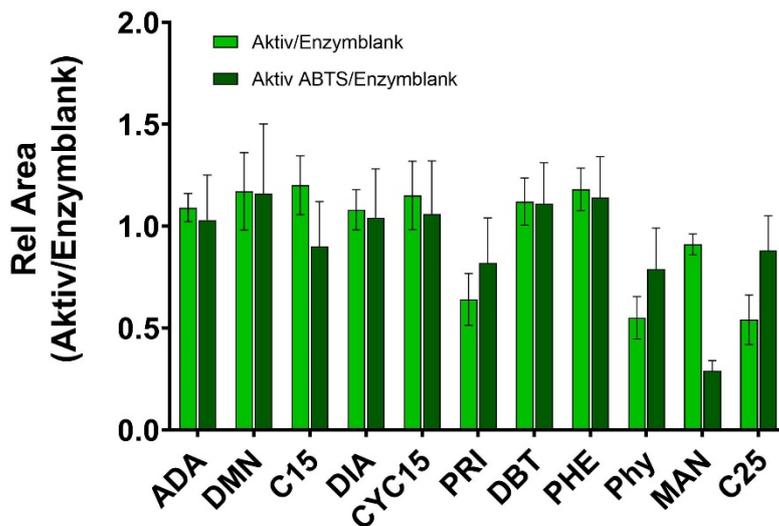


Abbildung 46: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym CotA, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3..

CotA war aktiv, die hitzebehandelte und vergiftete CotA Probe konnte allerdings nicht vollständig inaktiviert werden. Die aktive CotA Probe verlor innerhalb von 48 Stunden 30% ihrer Aktivität. Auch CotA konnte nur bei Methylantracen eine signifikante Abnahme in der Höhe von 71% bewirken, wie in Abb. 46 und Tabelle 23 ersichtlich ist.

Tabelle 23: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym CotA. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.

Aktiv ABTS/EB	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
MAN	29	5	P<0.001	***

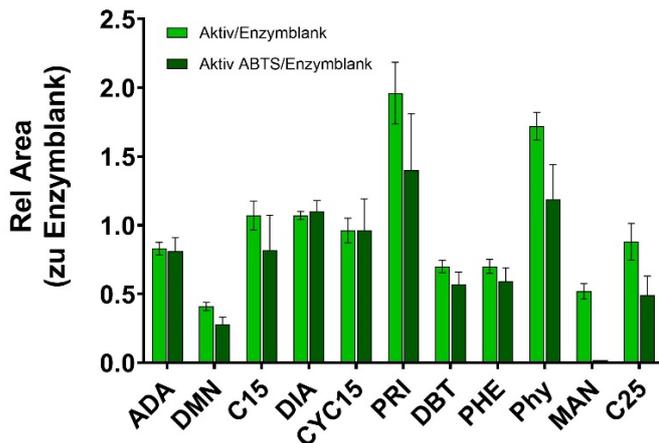


Abbildung 47: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym SiLA, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

SiLA war aktiv, im Kontrollansatz führte Hitzebehandlung und Hemmung zu einer erfolgreichen Inaktivierung des Enzyms. Im aktiven Ansatz verlor SiLA allerdings innerhalb von 48 Stunden die gesamte Aktivität. Trotzdem zeigte das Enzym Wirkung vor allem auf die Gruppe der PAK mit einer Reduktion von 47% bis 98%, zu entnehmen der Abb. 47 und der Tabelle 24. Damit gehört SiLA zu den drei aktivsten Enzymen.

Tabelle 24: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym SiLA. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.

Aktiv/EB	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
DMN	41	6	P<0.001	***
MAN	52	11	P < 0.05	*
ABTS/EB	Restmenge	SD	P value	Summary

	[%]	[%]		
DMN	28	5	P<0.001	***
DBT	57	9	P < 0.05	*
MAN	2	0.5	P<0.001	***
C25	49	14	P<0.01	**

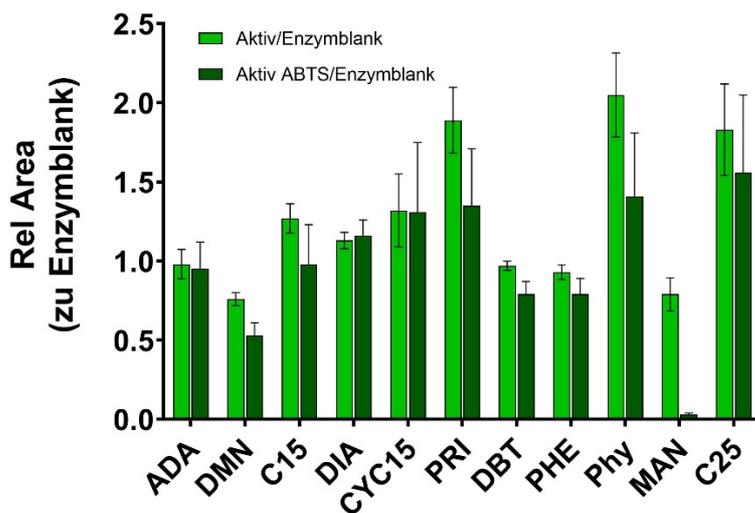


Abbildung 48: Abbau von Modellschadstoffen (Standardsubstrate) mit dem Enzym TvL, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. . ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

TvL war aktiv, im Kontrollansatz führte Hitzebehandlung und Hemmung zu einer erfolgreichen Inaktivierung des Enzyms. Im aktiven Ansatz verlor TvL allerdings innerhalb von 48 Stunden 99% an Aktivität. Mit TvL wurde mit 97% eine sehr hohe Reduktion von Methylantracen erzielt, siehe Abb. 48 und Tabelle 25.

Tabelle 25: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym TvL. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.

ABTS/EB	Restmenge [%]	SD [%]	P value	Summary
MAN	3	1	P<0.001	***

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Enzyme eine sehr unterschiedliche Wirkung auf die getesteten Substanzklassen zeigten. Die aktivsten Enzyme in Bezug auf Schadstoffabbau waren UPO, MtL und SiLA. Nicht zuletzt auf Grund der höheren Stabilität sowie der Verfügbarkeit in größerer Menge wurde MtL als Enzym für den Feldversuch ausgewählt.

Keines der getesteten Enzyme zeigte in diesem Testsystem jedoch Aktivität auf die bekannt höchst persistenten chemischen Strukturen Adamantan und Diamantan.

Enzymatischer Abbau von Leitsubstanzen in dynamischen Boden/Grundwasser Modellsystemen

Parallel zum Modellsystem ohne Boden, wurden die Enzyme im dynamischen Boden/Grundwasser Modellsystem einem Funktionstest mit den ausgewählten Leitsubstanzen unterzogen. Einerseits befinden sich die vorliegenden Bedingungen in diesem Modellsystem näher an der Realität des Feldes wobei auch eine Kombination des enzymatischen mit einem mikrobiellen Abbau ermöglicht wird, andererseits wird die Enzymwirkung in Gegenwart eines komplexen Schadstoffprofils untersucht, wobei Adamantan und Diamantan dem Boden vor Versuchsbeginn zugesetzt wurden. Das eingesetzte Mineralmedium dient als optimiertes Grundwassersurrogat, der Boden repräsentiert die reale Matrix, ist Schadstoffquelle und definiert die Reaktionsbedingungen. Das erweiterte Schadstoffspektrum der Extrakte wurden mittels GC-MS analysiert. Nachfolgend sind die Ergebnisse für folgende Enzyme dargestellt: MtL, UPO und PL, die im Metagenom des Standortes identifizierte Laccase.

Der für diese Versuche herangezogene Boden der Altlast N77 kam nach einer Vortrocknung und Siebung <2mm zum Einsatz. Der Zusatz der höchstpersistenten Schadstoffe Adamantan und Diamantan erfolgte gelöst in n-Heptan. Die Versuche wurden in verschlossenen Flaschen durchgeführt, um der hohen Fugazität einzelner Kontaminanten gerecht zu werden. Nach Zusatz des optimierten Grundwassersurrogats wurden die Versuchsansätze bei Raumtemperatur sowie selektiv bei 12°C (Untergrundbedingungen) inkubiert. Die Enzymaktivität wurde jeweils vor Beginn des Versuches zu Kontrollzwecken gemessen.

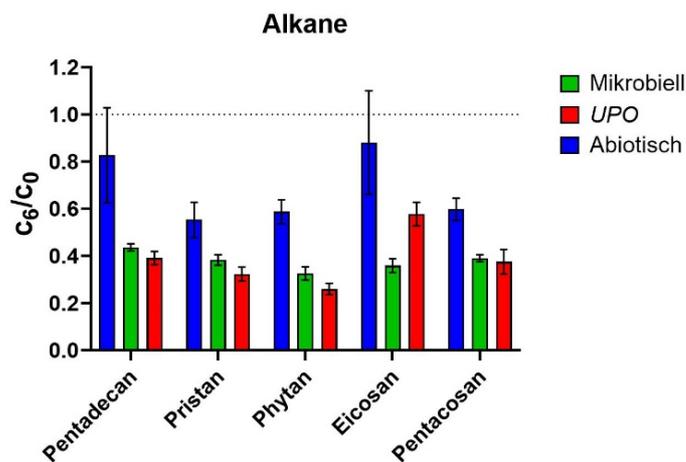
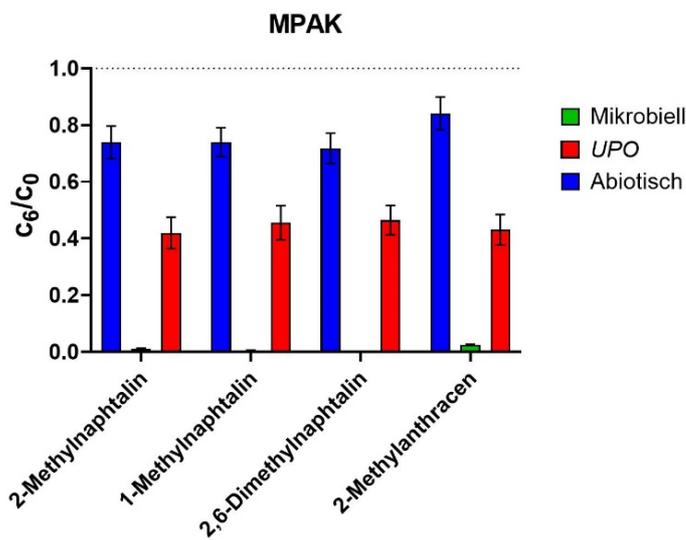
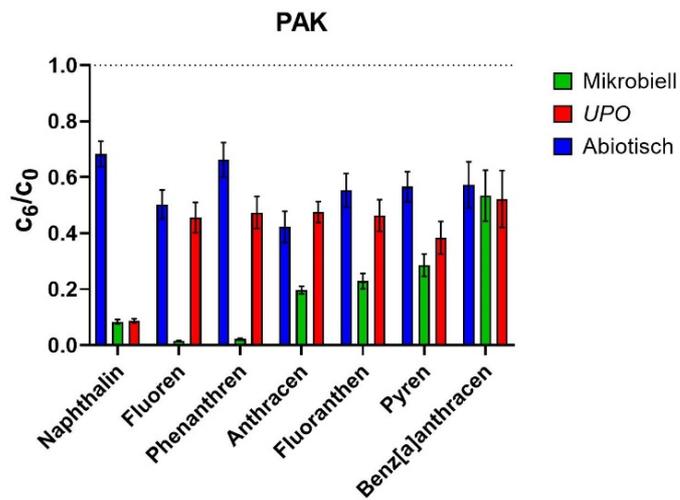


Abbildung 49: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym UPO bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Das bereits in den vorhergehenden Versuchen im physiologischen Testsystem aktivste Enzym UPO zeigte auch im dynamischen Grundwassermodellsystem bei 20°C eine ausgeprägte Abbauwirkung für alle Substanzklassen (PAK 90%-48%, MPAK 48%-44%, Alkane 78%-43%), diese konnte den mikrobiellen Abbau allerdings nicht signifikant übertreffen. Dies weist auf ein extrem gut an die Kontamination adaptiertes mikrobielles Konsortium im Boden des Standortes N77 hin. Da das Enzym nur begrenzt aktiv ist, sind die Werte von Tag 8 als Kombination von enzymatischem Primärschritt und nachfolgendem mikrobiellem Abbau zu sehen, siehe Abb. 49.

Die Laccase MtL zeigte im Abbauversuch bei 20°C (ersichtlich in Abb. 50) für alle PAK eine statistisch signifikante Abnahme im Vergleich zur abiotischen Kontrolle. Der enzymatische Ansatz weist nur für Benz(a)anthracen eine größere Abnahme auf als der mikrobielle Ansatz. Generell sind für einen Zeitraum von 8 Tagen sehr hohe Abbaugrade zwischen 98% und 67% zu beobachten, wodurch wiederum das hohe Abbaupotential des Bodens bestätigt wird. Auch für die methylierten PAK war eine deutliche Abnahme von 99% bis 97% sowohl im mikrobiellen Ansatz als auch im enzymatischen Ansatz nachweisbar, wobei zu berücksichtigen ist, dass auch in der abiotischen Kontrolle eine Reduktion von maximal 28% zu beobachten war. Unterschiede zwischen mikrobiellem und enzymatischem Abbau wurden für Alkane beobachtet. Hier war der enzymatische Ansatz für Pentadecan signifikant besser (Reduktion von 88%). Bei Pristan und Phytan zeigt sich zwar eine stärkere Abnahme mit Enzymzusatz (71% bzw. 80% Abnahme), die aber nicht signifikant unterschiedlich zum mikrobiellen Ansatz ist.

Um die Versuchsbedingungen an den Untergrund anzunähern, wurde die Abbaueffizienz der Enzyme im dynamischen Modellsystem nicht nur bei 20°C, sondern auch bei 12°C getestet. Dazu wurde einerseits das Enzym MtL herangezogen (siehe Abb. 51), da es für den Einsatz im Feldversuch vorgesehen war. Andererseits wurde das durch genetische Analyse der aus den Anreicherungskulturen identifizierte und am IFA-Tulln exprimierte Enzym PL ebenfalls bei 12°C getestet (siehe Abb. 52).

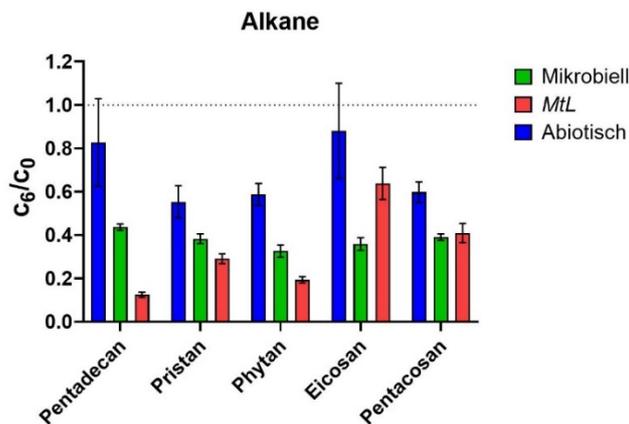
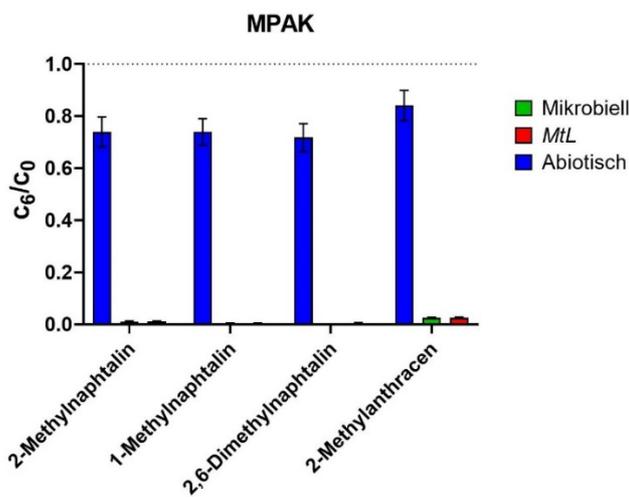
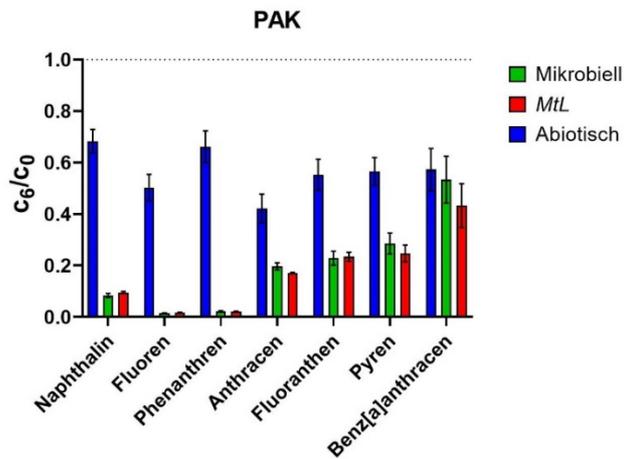


Abbildung 50: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MtL bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

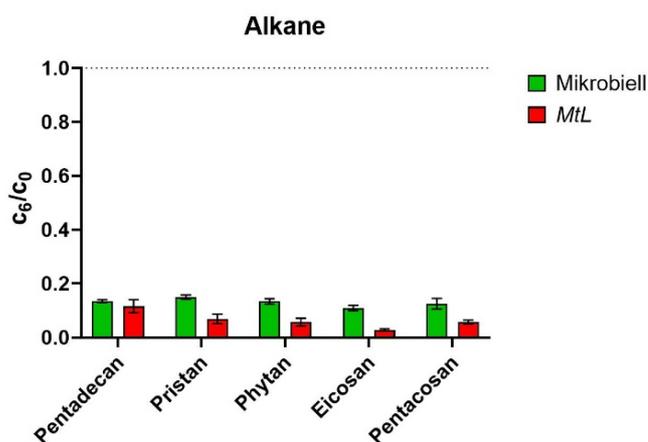
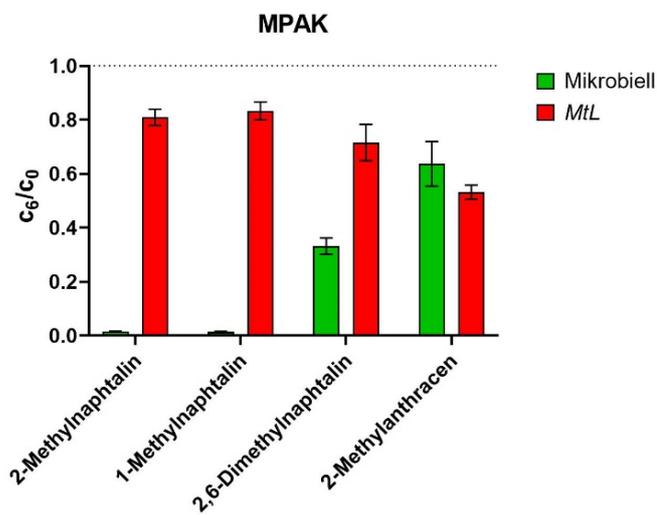
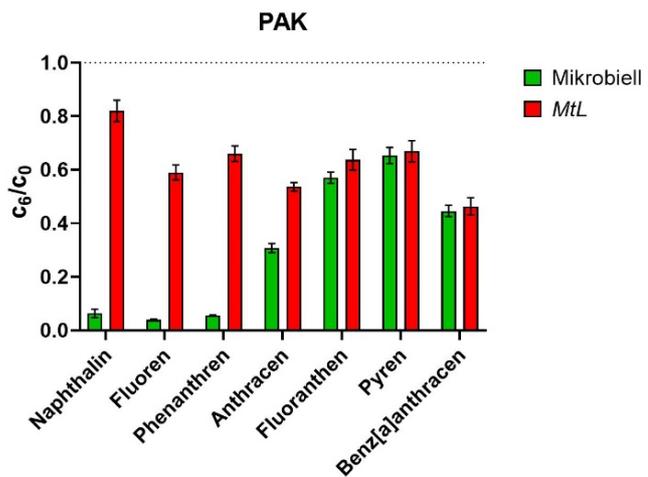


Abbildung 51: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MtL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Für PAK und methylierte PAK zeigte MtL bei 12°C eine Konzentrationsabnahme von 54% bis 18% bzw. 46% bis 17%. Die Schadstoffreduktion durch das Enzym ist mit dem mikrobiellen Abbau weitgehend vergleichbar, außer für niedermolekulare Substanzen, die einen geringeren enzymatischen Abbau aufweisen. Wie erwartet waren die Abbauraten für PAK bei 12°C geringer als bei 20°C. Ein anderes Bild zeigt sich jedoch für Alkane: die enzymatische Schadstoffreduktion ist bei 12°C mit 97% bis 88% höher als bei 20°C (88% bis 30%) und auch signifikant besser als der mikrobielle Abbau bei 12°C ohne Enzymzusatz.

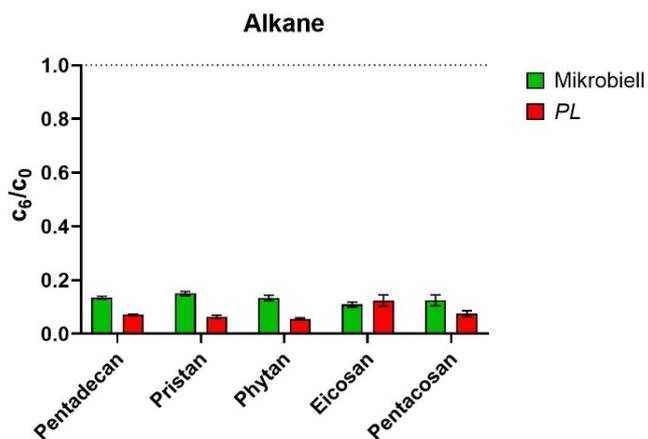
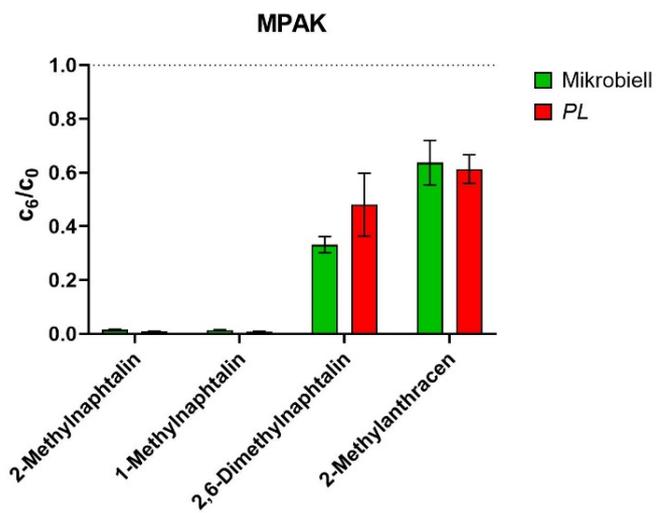
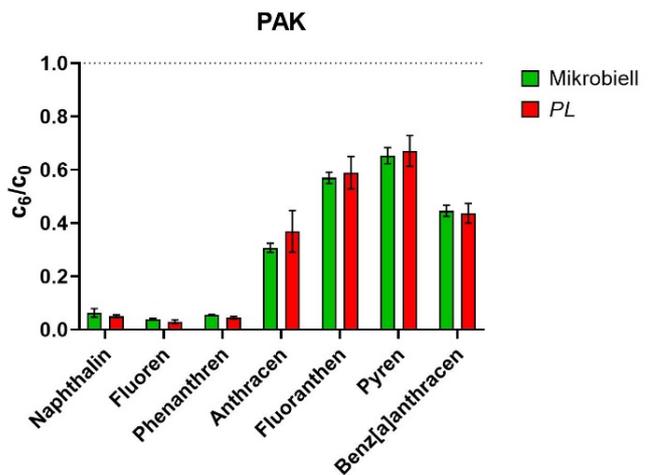


Abbildung 52: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym PL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit der am IFA-Tulln produzierten Laccase PL erzielt. Die Reduktion von PAK (Abnahme um 97% bis 33%) und methylierten PAK (Abnahme um 99%-39%) unterscheidet sich statistisch nicht vom mikrobiellen Ansatz. Auch hier ist der Enzymansatz für Alkane (Reduktion um 94% bis 88%) signifikant besser als der mikrobielle Ansatz (Reduktion um 89% bis 85%), außer für Eicosan (kein signifikanter Unterschied beider Ansätze).

Betrachtet man das Abbaupotential der ausgewählten Laccasen für die beiden höchstresistenten Substanzen Adamantan und Diamantan, so zeigt sich, dass für physiologischen Testansatz ohne Boden kein signifikanter enzymatischer Abbau zu verzeichnen ist. Ein anderes Bild geben die Versuche im dynamischen Boden/Grundwassermodellssystem, in dem zur Absicherung der Ergebnisse auch eine zusätzliche Negativkontrolle zum Einsatz kam.

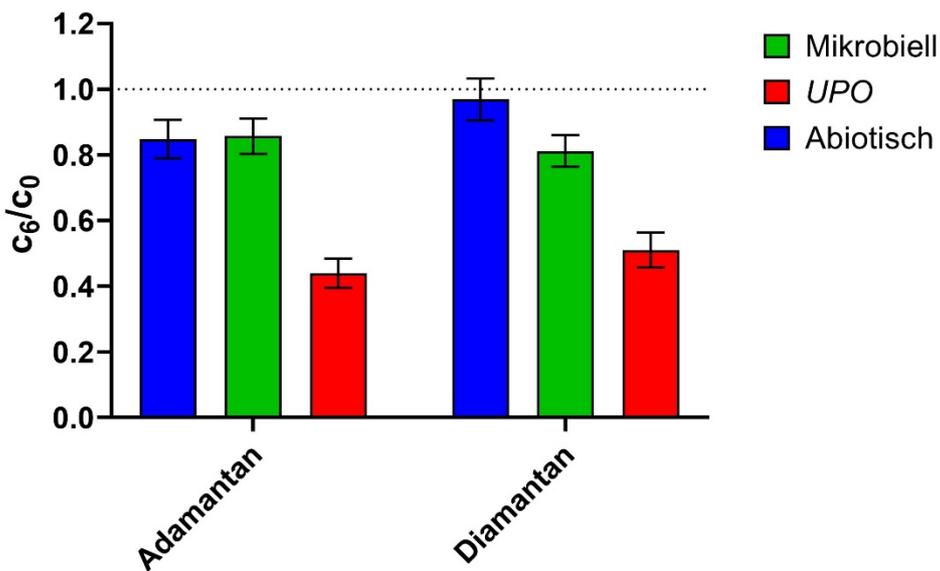


Abbildung 53: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym UPO bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellssystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

UPO zeigte bei 20°C binnen 8 Tagen einen mittleren bis hohen Abbau der beiden höchstpersistenten Substanzen Adamantan (Abnahme um 56%) und Diamantan (Abnahme um 49%), wie in Abb. 53 ersichtlich.

Im gleichen Zeitraum wurde auch ein signifikanter mikrobieller Abbau für Diamantan im Vergleich zur Negativkontrolle verzeichnet, der immerhin auch bei beachtlichen 19% lag.

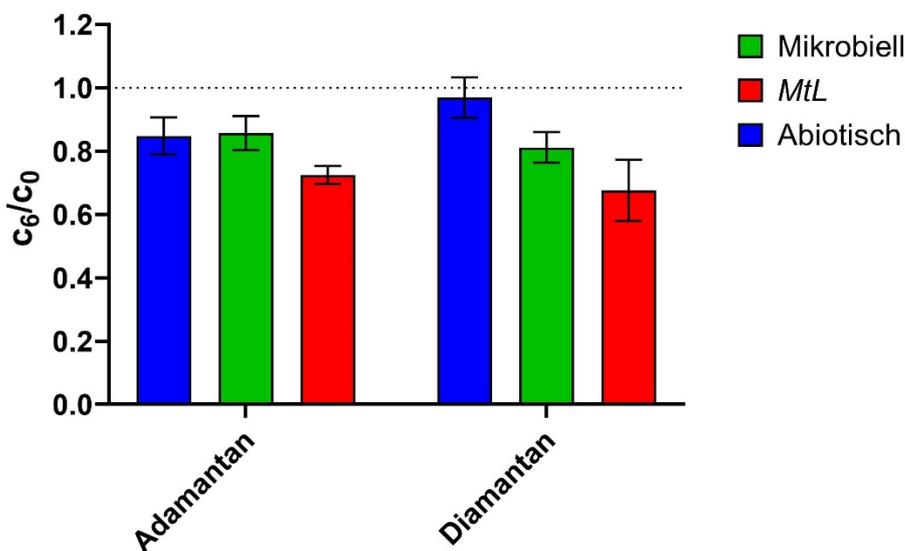


Abbildung 54: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym MtL bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

MtL erwies sich bei 20°C hinsichtlich des Abbaus beider Schadstoffe weniger effektiv als UPO (Abb. 54). Im Vergleich zur Negativkontrolle wurde Adamantan um 28%, Diamantan um 32% signifikant reduziert. Eine höhere Reduktion von Adamantan (30%) und Diamantan (50%) wurde mit MtL im Versuch bei 12°C erzielt (Abb. 55). Doch auch der mikrobielle Ansatz zeigte bei dieser Temperatur ähnliche Ergebnisse. Dies dürfte auf ein über einen langen Zeitraum bestens an das Substratangebot (i.e. die Mischung an persistenten Schadstoffen) adaptiertes mikrobielles Konsortium im Untergrund der Altlast N77 zurückzuführen sein.

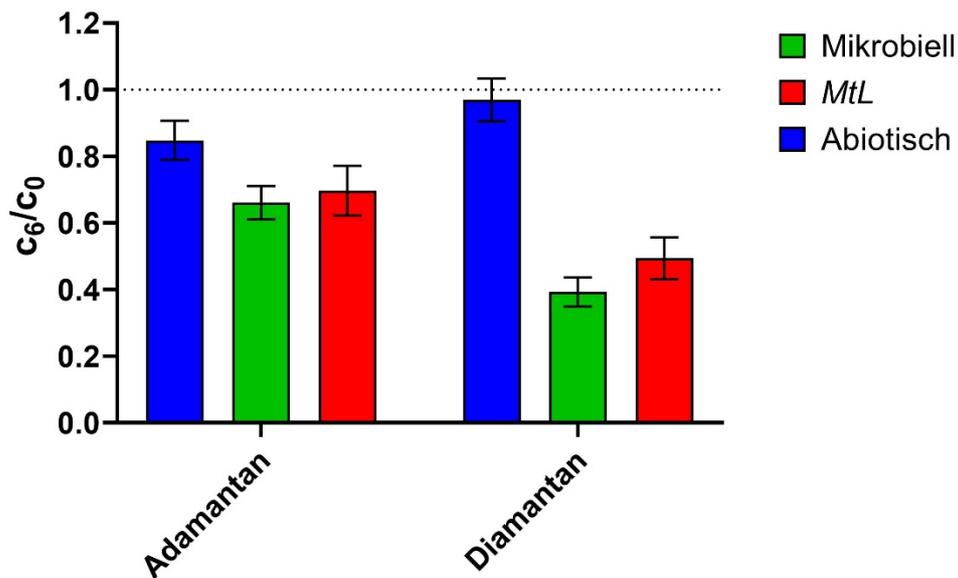


Abbildung 55: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym MtL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

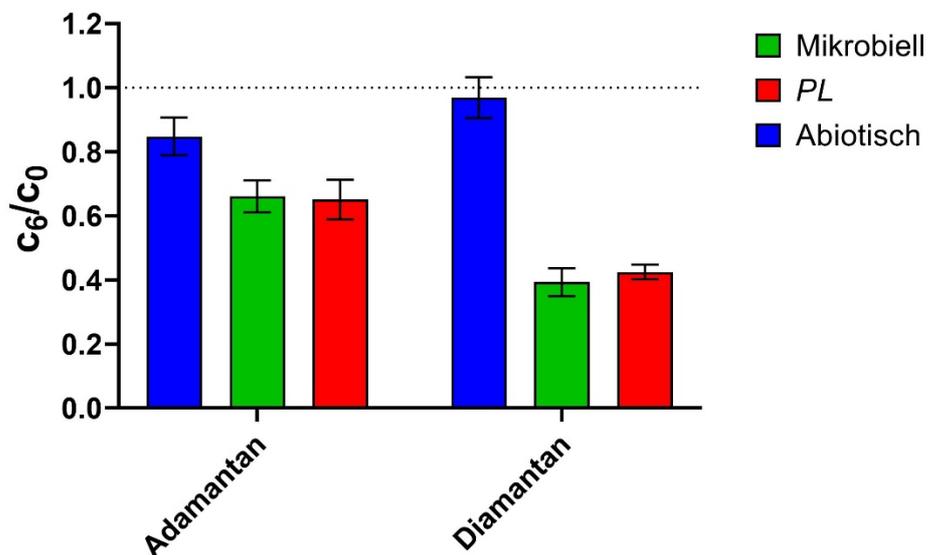


Abbildung 56: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym PL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Das am Institut produzierte Enzym PL zeigt bei 12°C die im Vergleich höchste Reduktion beider Schadstoffe: 35% für Adamantan und 60% für Diamantan. Eine vergleichbar hohe Abnahme ist auch für den mikrobiellen Ansatz zu beobachten (Abb. 56). Dies lässt sich damit erklären, dass dieses Enzym durch in silico screening des mikrobiellen Konsortiums der Altlast N77 identifiziert wurde. D.h., die Mikroorganismen am Standort haben die genetische Information zur Expression dieses Enzyms und es liegt nahe, dass mangels leichter verwertbarer Substrate, Enzyme wie die PL von den Mikroorganismen vor Ort produziert werden um sich persistente Schadstoffe als Energie- und Kohlenstoffquelle zugänglich zu machen.

Proben dieser Versuche wurden mittels LC-MSTOF auf enzymatische Abbauprodukte untersucht. Eine Anreicherung von Metaboliten wurde nicht beobachtet. Einzelne Signale wurden zwar detektiert, die Substanzen konnten aber auf Grund der geringen Signalhöhe nicht identifiziert werden. Selbst nach Abgleich mit Standardsubstanzen konnten weder Adamantol noch Adamantancarboxylsäure, beides Metaboliten von Adamantan, nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass der initiale Oxidationsschritt der originären chemischen Struktur des Schadstoffsubstrates der geschwindigkeitsbestimmende Prozess in der Metabolisierung dieser molekular komplexen Schadstoffe ist.

Enzymatischer Abbau von Leitsubstanzen im Boden/Grundwasser Durchflusssystem



Abbildung 57: Setup Durchflussreaktoren

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Möglichkeit des enzymatischen MKW-Abbaus im simulierten Grundwasserfluss untersucht. Dazu wurde N77 Boden in zylindrische Reaktoren verdichtet eingebaut und beidseitig mit jeweils einer Kiesfilterstrecke gekapselt. Der Boden entstammte dem Aquifer der Altlast N77 und wurde aus einer Teufe von 7-8m entnommen. Die Reaktoren wurden mit 3-Wege-Ventilen zur Enzymdosierung sowie zur Probenahme ausgestattet. Grundwasser der Altlast N77 wurde in einem Reservoir durch Rotationsagitation mit Luftsauerstoff gesättigt (Abb. 57) und im Kreislauf durch die Reaktoren geführt bei einer Flussrate von 1 mL/min. Getestet wurden ein biologischer Ansatz ohne Zusätze und zwei enzymatische Ansätze mit unterschiedlicher Enzymmenge (Boden:Enzym = 2:1 und 4:1), jeweils in dreifacher Bestimmung mit einer Laufzeit von 5 Tagen. In regelmäßigen Intervallen wurden pH-Wert, DOC, Sauerstoffgehalt vor und nach Passage des Reaktorraumes, sowie die Enzymaktivität gemessen. Im mikrobiellen Ansatz wurde im Reservoir eine Sauerstoffsättigung von 8 mg/L erzielt. Während der Passage durch den Reaktionsbereich des simulierten Aquifers fiel der Sauerstoffgehalt auf 6 bis 2 mg/L. In der Versuchsreihe mit Enzymzusatz zeigte sich ein erhöhter Sauerstoffkonsum bereits im Reservoir, in dem für den 4:1 Enzymansatz Sauerstoffkonzentrationen von 7 bis 5 mg/L detektiert wurden. Die eingesetzten Enzyme nutzen Sauerstoff als Co-Substrat und die beobachtete Sauerstoffzehrung bestätigt bereits einsetzende Abbautätigkeit. Nach Durchlauf des Reaktorraumes wurden Sauerstoffgehalte

von 4 bis 1 mg/L festgestellt. In Summe ergibt sich eine erhöhte Sauerstoffzehrung in den Durchflussreaktoren mit Enzymzusatz im Vergleich zur mikrobiologischen Kontrolle.

Der pH-Wert lag im mikrobiellen Ansatz bei 8,1 und in den enzymatischen Versuchsreihen zwischen 7,4 und 8,0. Somit befand er sich in einem für den biologischen Abbau förderlichen Bereich.

Der DOC-Gehalt der mikrobiellen Ansätze zeigte zu Beginn einen Anstieg im Reservoir. Diese Erhöhung auf maximal 26 mg/L spiegelt die Verfrachtung wasserlöslicher Anteile des Schadstoffgemisches sowie der organischen Bodensubstanz wider. In den Ansätzen mit Enzym wurden erhöhte DOC Werte mit 10.990 mg/L (Boden:Enzym 4:1) bzw. 15.540 mg/L (Boden:Enzym 2:1) detektiert, die im Versuchsverlauf weitgehend konstant blieben bzw. leicht abnahmen. Diese Erhöhung ist auf den Kohlenstoffgehalt des Proteins zurückzuführen. Die Enzymaktivitäten im System blieben bis zu 4 Tage weitgehend gleich und nahmen danach deutlich ab. Nach 5 Tagen wurde der Boden entnommen, die Proben entsprechend aufbereitet und mittels GC-MS analysiert.

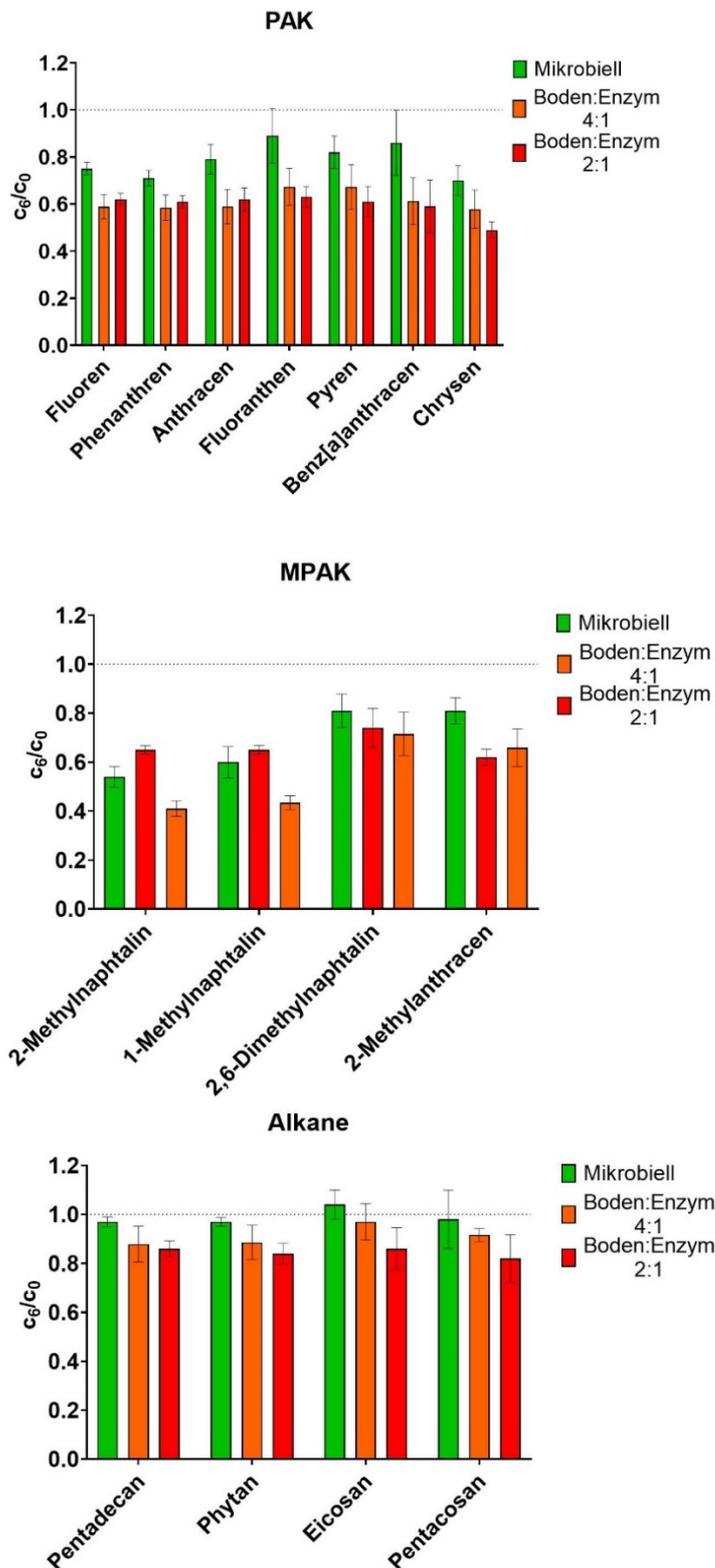


Abbildung 58: Abnahme von PAK, methylierten PAK und Alkanen im Boden/Grundwasser Durchflusssystem bei Raumtemperatur, Messung mittels GC-MS und Flüssinjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=9.

Im Boden/Grundwasser Durchflusssystem ist ein reduzierter Schadstoffabbau gegenüber den vollaufmischten dynamischen Systemen zu beobachten, was nicht zuletzt auf eine geringere Massentransferrate zurückzuführen sein dürfte. Die Abnahme an PAK war für alle Leitsubstanzen statistisch signifikant höher als im mikrobiellen Vergleichsansatz, außer für Phenanthren im 2:1 Ansatz (Abb. 58). Für alle methylierten PAK erwies sich die Abnahme im Ansatz 4:1 statistisch signifikant höher im Vergleich zum mikrobiologischen Ansatz, während dies im Ansatz 2:1 nur für Methylantracen der Fall war. Generell können die Abnahmen mit bis zu 51% für PAK und bis zu 59% für methylierte PAK bei einer Laufzeit von nur 5 Tagen als deutlich ausgeprägt bezeichnet werden. Für Alkane waren im Enzymansatz 2:1 mit max. 18% die geringsten Abnahmen zu beobachten. Der Grund dafür dürfte in der deutlich geringeren Wasserlöslichkeit dieser Substanzklasse liegen was zu einer weiteren Einschränkung des Massentransfers führt. Generell konnte auch in dieser Versuchsserie der raschere Abbau von Leitschadstoffen bei Enzymzusatz bestätigt werden.

Enzymatischer Abbau von MKW im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem

In dieser Versuchsserie wurden die prinzipielle Abbaubarkeit von MKW durch Oxidoreduktasen untersucht, sowie potenziell abbaufördernde Effekte von Redox-Mediatoren überprüft. Die Versuche wurden mit kontaminierten Bodenproben, entnommen an der Altlast N77, durchgeführt (Abb. 59). Die Enzyme wurden sowohl bei 20°C als auch bei 12°C als Annäherung an Feldbedingungen geprüft. Der enzymatische Abbau, erzielt mit der Peroxidase UPO bzw. der Laccase MtL, wurde jeweils mit einer abiotischen Kontrolle und einem mikrobiellen Ansatz verglichen.

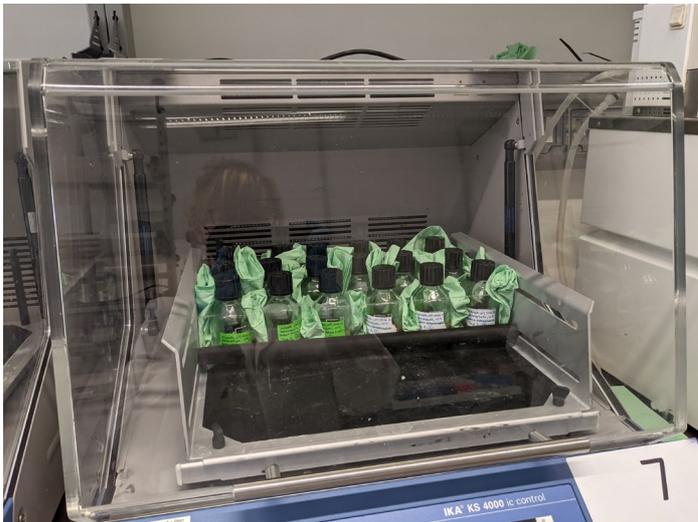


Abbildung 59: Enzymatischer Abbau von MKW im dynamischen Boden/Wasser System

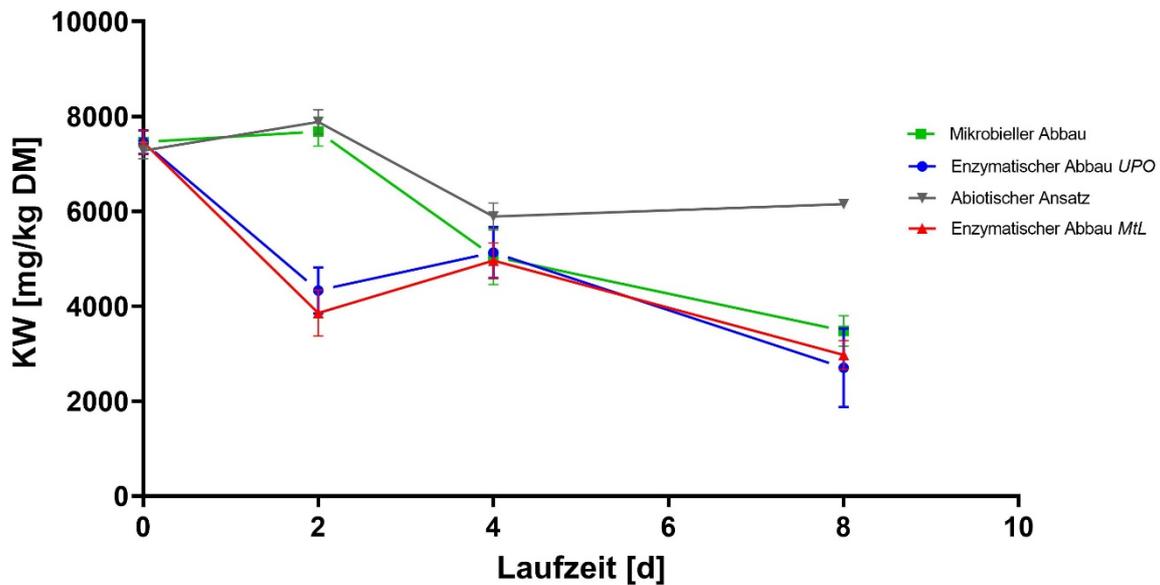


Abbildung 60: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaueversuches: mikrobielle und enzymatische Behandlungsverfahren bei 20°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3

Die beiden enzymatischen Ansätze zeigen eine rasche Abnahme an MKW ab Versuchsstart, während für den mikrobiellen Ansatz erst ab Tag 2 eine Konzentrationsabnahme zu verzeichnen ist (Abbildung 60). Die abiotische Kontrolle weist über die gesamte Laufzeit von 8 Tagen eine Reduktion von 15% auf, während UPO und MtL den MKW-Gehalt im gleichen Zeitraum um 64% bzw. 60% reduzierten. Der mikrobielle Ansatz weist mit 53% eine geringere Abnahme auf, der Unterschied zu den Enzymansätzen ist statistisch jedoch nicht signifikant. Mit UPO wurde in den ersten 2 Tagen eine Abbaurrate von 1600 mg/kg·d erzielt, für MtL betrug sie 1800 mg/kg·d, während die höchste Rate des mikrobiellen Abbaus bei etwa 1300 mg/kg·d lag. Jedoch nimmt die Aktivität der Enzyme innerhalb von 2 Tagen stark ab und nach einer kurzen Adaptionsphase zwischen Tag 2 und 4 erfolgt in den Enzymansätzen ein weiterer Schadstoffabbau durch das mikrobielle Konsortium. Dies demonstriert die Möglichkeit einer erfolgreichen Kombination beider Verfahren. Abgesehen von dem beobachteten Booster-Effekt durch das Enzym unmittelbar nach Versuchsstart, übertrafen die Abbauraten der beiden Enzymansätze auch in der zweiten Versuchsphase (mikrobiologischer Abbau) jene des mikrobiellen Ansatzes um das Zweifache (500 bis 600 mg/kg·d gegenüber 300 mg/kg·d). Generell ist eine Schadstoffabnahme von 4000 mg/kg bis 4800 mg/kg innerhalb eines Zeitraumes von nur 8 Tagen auch für optimierte

Laborbedingungen als sehr hoch zu erachten. Dies weist auf das hohe Abbaupotential des Konsortiums im Boden N77 hin, in dem für komplexe MKW Gemische höchst kompetente Mikroorganismen im Verlauf von mehreren Jahrzehnten durch natürliche Selektionsmechanismen angereichert wurden.

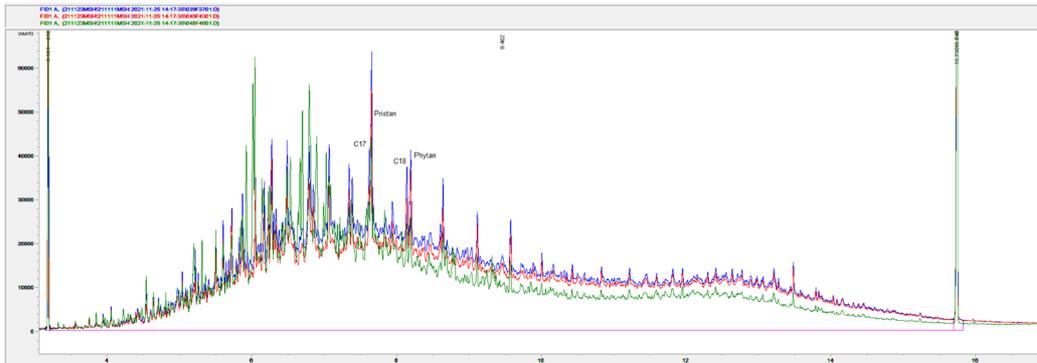


Abbildung 61: Gaschromatographische Analyse nach Ende des Abbauersuches (Tag 8), blau: mikrobiell, rot: UPO und grün: MtL

Bei Betrachtung der Schadstoffprofile nach erfolgtem Abbau (Abb. 61), wird deutlich, dass vor allem die Laccase MtL im hinteren, größtenteils unaufgelösten Bereich des Chromatogramms die beiden anderen Varianten übertrifft. Die quantitative Auswertung der Sektoren von C10 bis C17 und größer >C17 bis C40 ergibt für MtL einen signifikant besseren Schadstoffabbau im höheren Bereich sowohl gegenüber dem Enzym UPO als auch dem mikrobiellen Ansatz (Abb. 62).

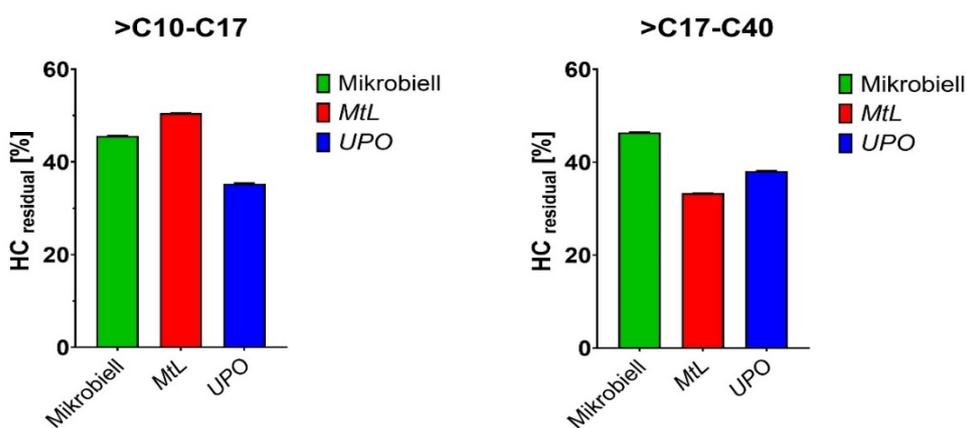


Abbildung 62: Restmenge an Kohlenwasserstoffen nach enzymatischem (MtL und UPO) bzw. mikrobiellem Abbau dargestellt für die Sektoren >C10 bis C17 und >C17 bis C40 nach 8 Tagen Inkubation bei 20°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Im vorderen Sektor des Chromatogramms weist der Ansatz mit dem Enzym UPO eine signifikant stärkere Reduktion der Schadstoffe auf. In weiterer Folge wurde das Enzym UPO auch bei 12°C getestet. Im Vergleich zum Ansatz bei 20°C liegt die Schadstoffreduktion bei dieser Temperatur mit 34% auf einem geringeren Niveau. Hervorzuheben ist jedoch, dass der enzymatische Abbau bei Grundwassertemperatur den mikrobiellen Abbau um einen Faktor von 3 übertrifft (Abb. 63)

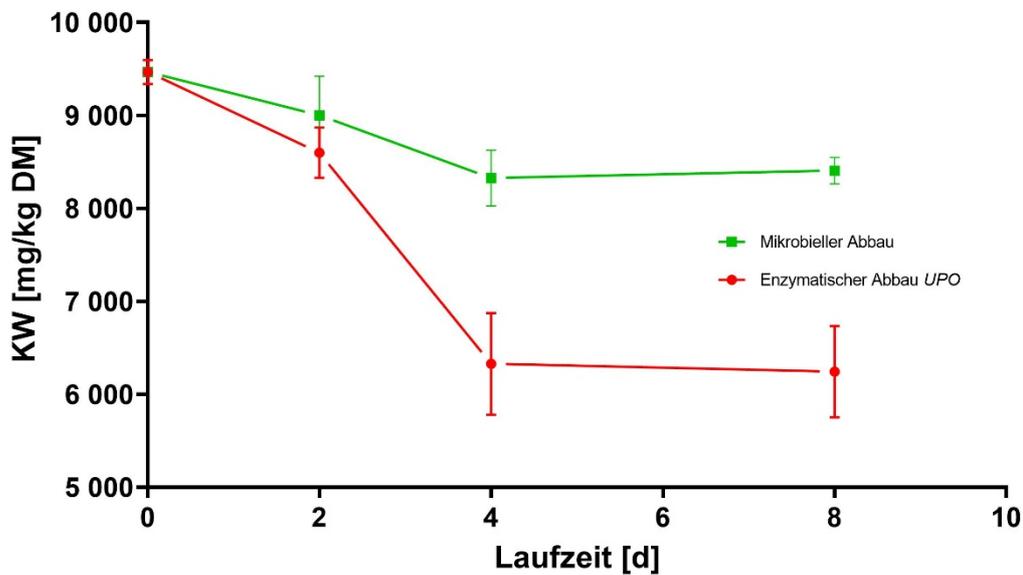


Abbildung 63: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaueversuches: mikrobieller und enzymatischer Abbau bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Das Zielsubstrat von Laccasen sind phenolische Verbindungen. Sollte im Substrat keine phenolische Gruppe enthalten sein, so kann das Enzym dieses dennoch mit Hilfe eines Redox-Mediators oxidieren. Im Falle von MtL kann diese Funktion zum Beispiel von ABTS (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz) übernommen werden, dessen Struktur in Abb. 64 ersichtlich ist.

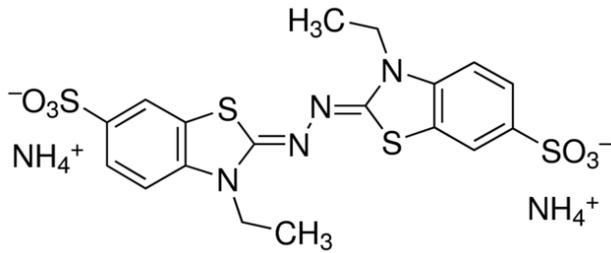


Abbildung 64: Struktur von ABTS

Auch bodenbürtige Substanzen, die Teil der organischen Bodenfraktion sind, können eine Mediatorfunktion einnehmen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Mediatorzugabe im Feldversuch eingespart werden kann. Dies wurde vorab durch eine Versuchsreihe bei 12°C mit und ohne Mediator im Vergleich zu einem mikrobiellen Ansatz geprüft (Abb. 65).

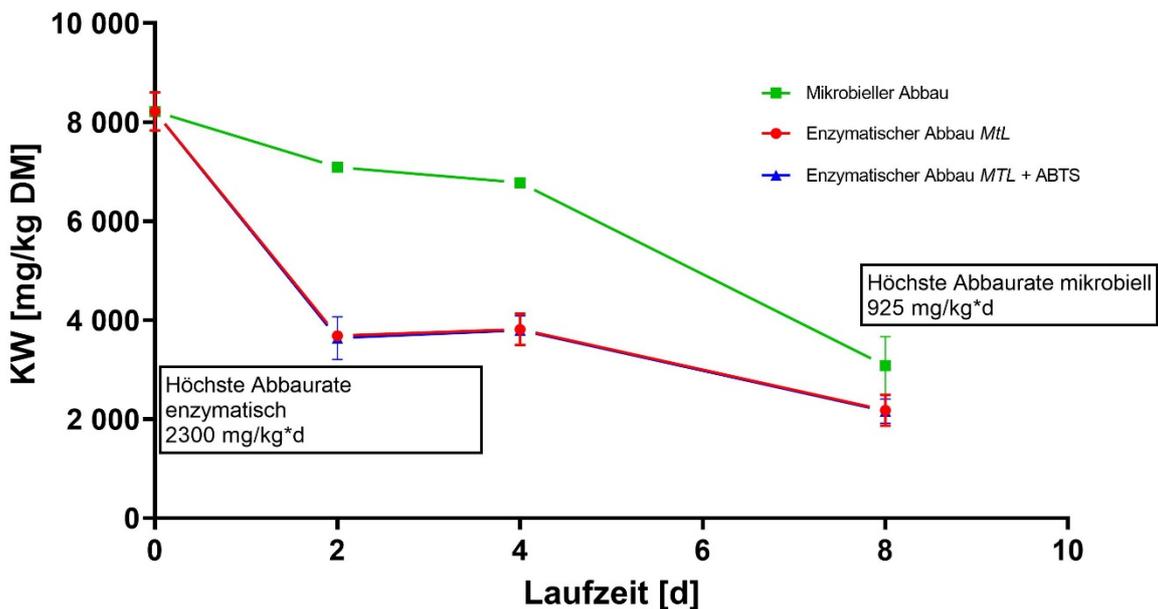


Abbildung 65: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaubversuches: mikrobieller und enzymatischer Ansatz mit *MtL* mit und ohne Mediatorzugabe bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Die in Abb. 65 dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass im Bodenmaterial der Altlast N77 Substanzen vorhanden sind, die eine Mediatorfunktion für das Enzym MtL ausüben können. Die Kurven mit und ohne Mediator weisen einen identen Verlauf auf, die einzelnen Werte unterscheiden sich zu keinem Probenahmezeitpunkt. Bei einer Temperatur von 12°C benötigt der mikrobielle Ansatz in diesem Versuch eine längere Adaptionszeit, eine beschleunigte MKW-Abnahme zeigt sich ab Tag 4, während Schadstoffe in den beiden enzymatischen Versuchsansätzen wie schon in den vorangegangenen Versuchsreihen bereits ab dem Start abgebaut werden. Die höchste Abbaurrate der enzymatischen Ansätze wurde somit zwischen Tag 0 und 2 beobachtet. Sie liegt um den Faktor 2,5 über der höchsten Abbaurrate des mikrobiellen Ansatzes, die zwischen Tag 4 und 8 erzielt wurde. Diese Versuchsserie zeigte, dass das Enzym MtL auch unter Feldbedingungen funktionsfähig und der Zusatz eines Redox-Mediators nicht zwingend erforderlich ist.

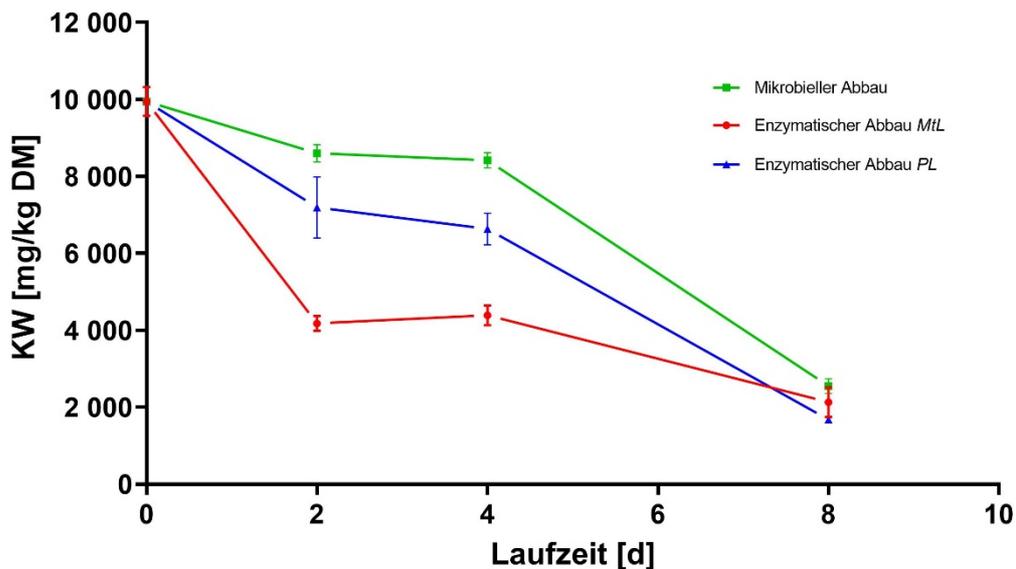


Abbildung 66: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaubversuches: mikrobieller und enzymatischer (PL) Abbau bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

In weiterer Folge wurde auch das am IFA exprimierte Enzym PL einem vergleichenden Funktionstest bei 12°C unterzogen. Abb. 66 zeigt für das Enzym MtL wiederum die bereits beobachtete rasche Abnahme der MKW-Konzentration in den ersten 2 Tagen. Die im Boden durch in silico screening identifizierte Laccase PL ähnelt in ihrer Abbaudynamik

eher dem mikrobiellen Ansatz, zeigt aber für alle Messpunkte einen höheren MKW-Abbau.

Zu Versuchsende wurde nur mit PL ein signifikant höherer Abbaugrad erzielt im Vergleich zur mikrobiellen Testreihe. Generell sind die beobachteten Residualbelastungen aller Ansätze dieser Versuchsreihen bei 12°C als gering zu erachten, speziell wenn die kurze Laufzeit berücksichtigt wird. Der mikrobielle Ansatz weist noch 26% der Ursprungskontamination auf, für PL und MtL liegt dieser Wert bei 17% bzw. 21%. Dies bestätigt wiederum die gute Adaptierung der autochthonen Mikroorganismenflora an die im Feld vorherrschenden Bedingungen.

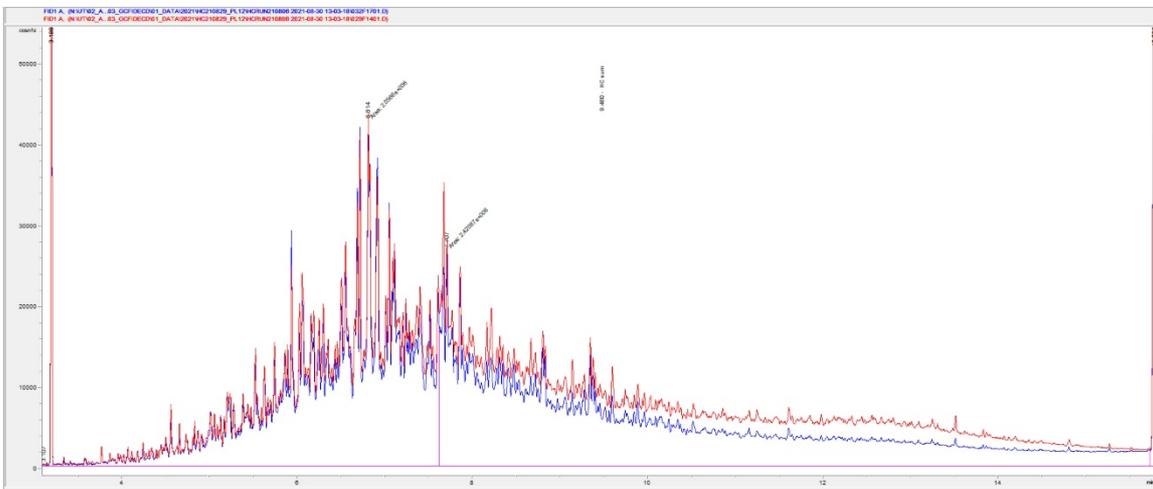


Abbildung 67: Gaschromatographische Analyse nach Ende des Abbaues (Tag 8), Vergleich mikrobieller Abbau (rot) und enzymatischer Abbau mit PL (blau).

Wie in Abb. 67 ersichtlich, zeigt sich auch bei der Laccase PL ein höherer MKW-Abbau vor allem bei längeren Retentionszeiten, bei denen größere und i.d.R. persistenter Substanzen eluieren. Mit PL-Zusatz nimmt der Schadstoffgehalt in beiden Sektoren des Chromatogramms (Separator C17) vergleichbar ab, während der höher siedende Bereich (Sektor <C17-C40) im mikrobiellen Ansatz um den Faktor 1,4 weniger abnimmt. Folglich verbleibt eine relative Residualmenge von 43% im Sektor <C17-C40 gegenüber 30% im Sektor >C10-C17 (Abb. 68).

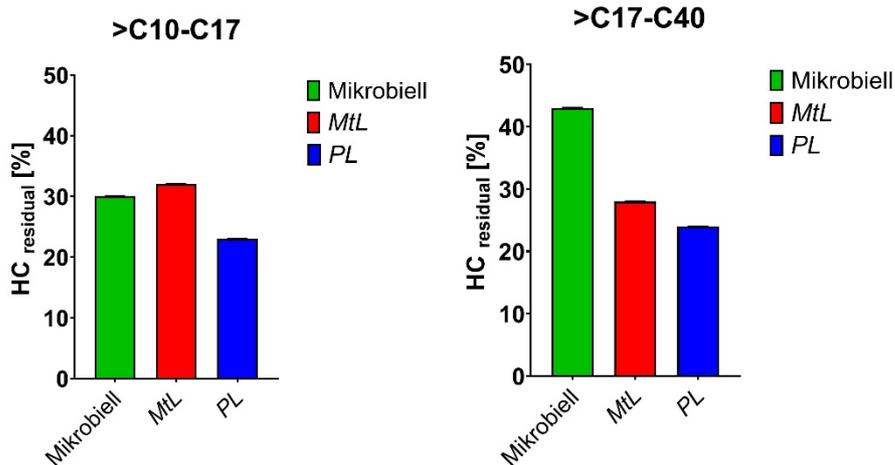


Abbildung 68: Restmenge an Kohlenwasserstoffen nach enzymatischem (MtL und PL) bzw. mikrobiellem Abbau dargestellt für die Sektoren >C10 bis C17 und >C17 bis C40 nach 8 Tagen bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Die beobachtete bessere Abnahme im unaufgelösten höher siedenden Bereich des Chromatogramms legt den Schluss nahe, dass die untersuchten Enzyme für bereits stark gealterte Schadensfälle einsetzbar sind, in denen exakt dieser Teil des Schadstoffspektrums einer relativen Anreicherung unterliegt, da einfache chemische Strukturen im Laufe der Zeit durch intrinsische mikrobiologische Aktivitäten abgebaut wurden. Um diese Abbaufähigkeit von Laccasen für höhersiedende und komplexe MKW zu verifizieren, wurden langfristige mikrobielle Abbaubersuche mit N77 Boden angesetzt. Nach 312 Tagen hatte der mikrobiologische Abbau mit einer residualen MKW-Konzentration von 1464 mg/kg ein Plateau erreicht (Abb. 69). Diesem degradierten Boden wurde in weitere Folge das Enzym MtL zugesetzt. Die dadurch erzielte zusätzliche Abnahme der Schadstoffkonzentration ist in Abb. 69 und Abb. 70 ersichtlich.

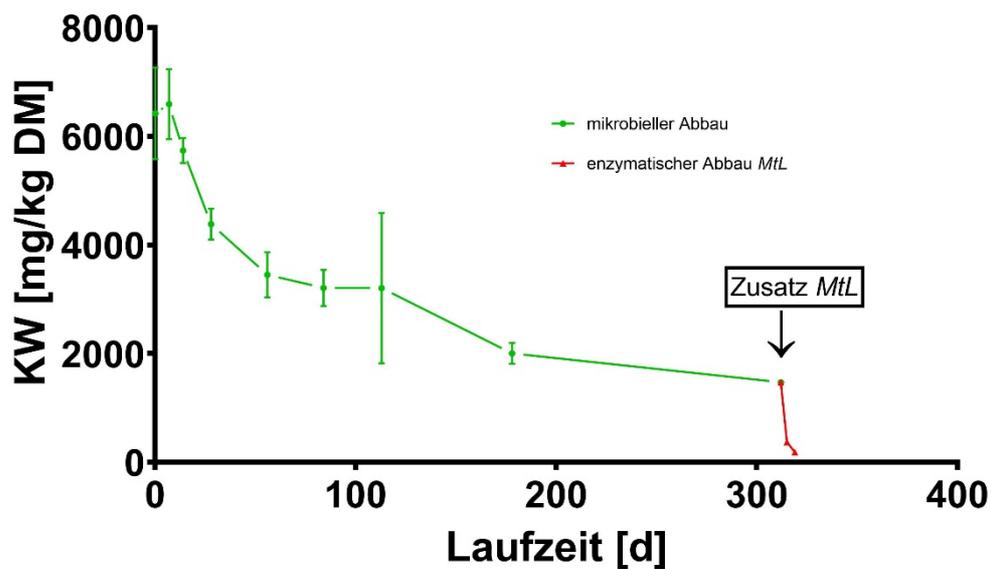


Abbildung 69: Mikrobiologischer Schadstoffabbau (grün) gefolgt von enzymatischer Behandlung (rot) im dynamischen Modellsystem bei 20°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3

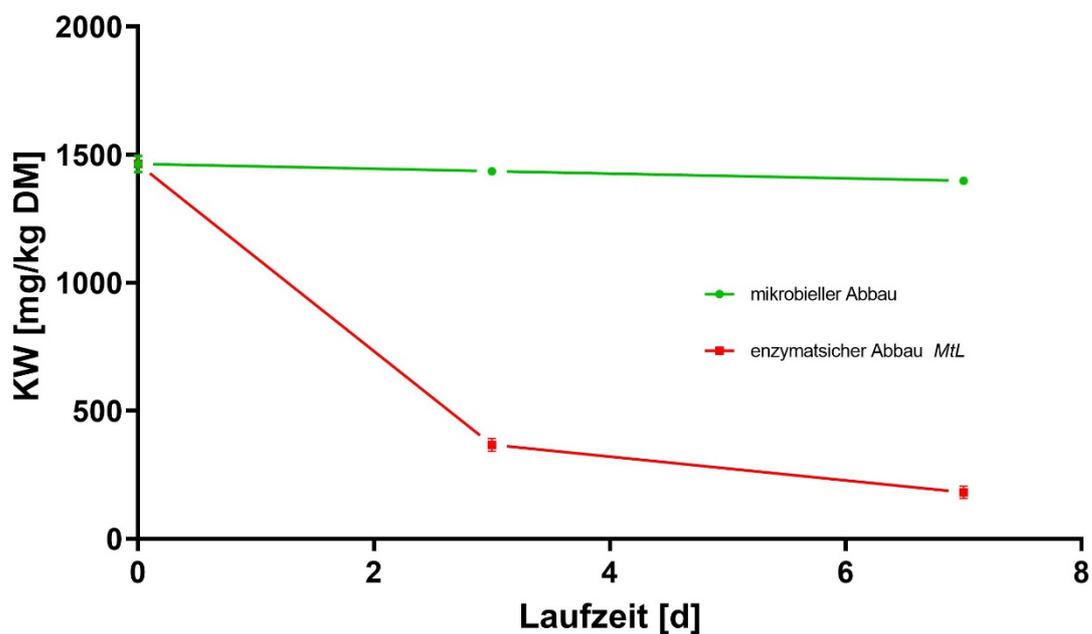


Abbildung 70: Enzym-induzierte Abnahme der Schadstoffkonzentration nach Stagnation des mikrobiologischen Abbaus, Ausschnitt aus Abbildung 69 mit extrapoliertem mikrobiellem Abbau. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Bereits nach 3 Tagen war eine besonders starke Abnahme der MKW-Konzentration im enzymatischen Ansatz zu verzeichnen. Es ist besonders hervorzuheben, dass die Konzentration an mikrobiologisch nicht abgebauten persistenten MKW durch Laccasezugabe innerhalb von nur 7 Tagen von 1464 auf 182 mg/kg abgesenkt werden konnte.

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit dem am IFA selektierten und exprimierten Enzym PL im Vergleich zu MtL durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde der kontaminierte Boden über 258 Tage einer mikrobiellen Degradation unterzogen. Die verbleibenden mikrobiologisch nicht abgebauten Schadstoffe fanden sich in der chromatographisch nicht getrennten komplexen Matrix bei mittleren und längeren Retentionszeiten (Abb. 71), ein Bereich der i.d.R. persistente Schadstofffraktionen umfasst. In Folge wurde ein Teil der Proben einem weiteren mikrobiellen Abbau unterzogen, während der andere Teil enzymatisch mit PL bzw. MtL degradiert wurde. Die Inkubation erfolgte für beide Ansätze bei 20°C. Dabei ist anzumerken, dass MtL in aufgereinigter Form eingesetzt wurde, die Laccase PL jedoch als nicht aufgereinigtes Zelllysats zum Einsatz kam. Folglich war die volumetrische Aktivität der Laccase PL mit 0,93 U/mL deutlich geringer als jene von MtL (1779 U/mL).

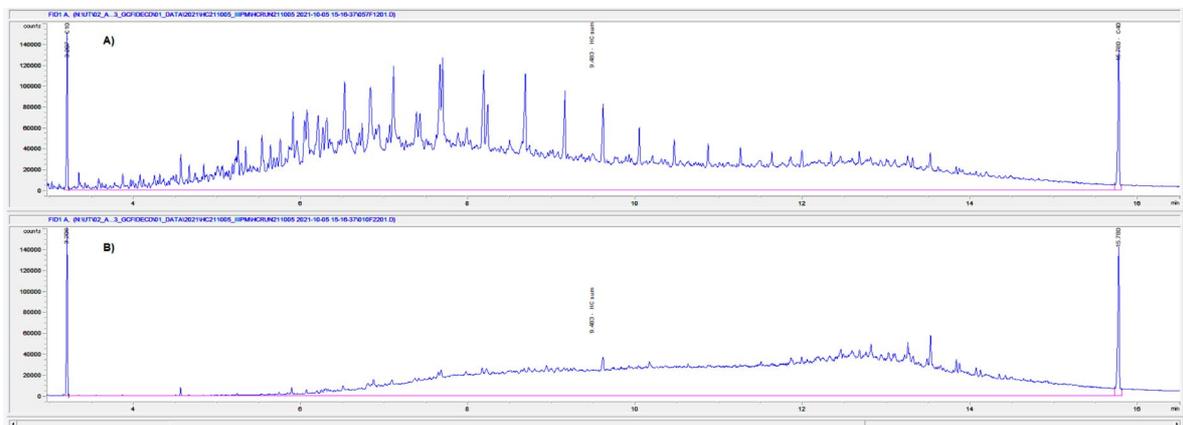


Abbildung 71: Chromatogramme von Boden der Altlast N77 originär (A) und nach 258 Tagen mikrobieller Prädegradation (B)

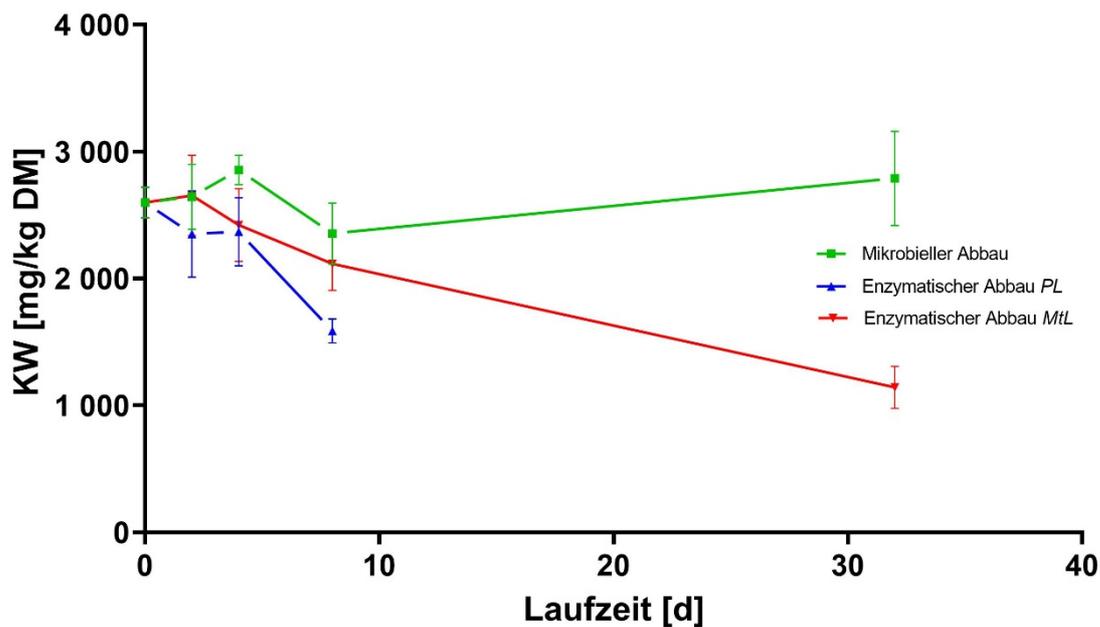


Abbildung 72: Verlauf der Schadstoffkonzentration nach Enzymzusatz (PL, Mtl) zu prädegradierten N77 Boden. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

- Voraussetzung für die Enzymzugabe war eine weitgehend konstante Residualkonzentration (MKW) nach Prädegradation. Die gaschromatographische Analyse von Proben, die im Abstand von 7 Tagen entnommene wurden, ergab vergleichbare MKW-Konzentrationen in der Höhe von etwa 2500 mg/kg. Damit wurde das Erreichen der Stagnationsphase des mikrobiellen Abbaus bestätigt und somit die Persistenz der noch im N77 Boden vorhandenen Schadstoffe. Auch diesmal zeigte sich nach Enzymzusatz eine starke Abnahme des Schadstoffgehaltes, während die MKW-Konzentration im mikrobiellen Abbauansatz konstant blieb (Abb. 72). Besonders aktiv war die Laccase PL mit einer Schadstoffreduktion von 39% binnen 8 Tagen, während mit Mtl die Abnahme zu diesem Zeitpunkt bei 19% lag. Das ist insofern bemerkenswert, da die volumetrische Aktivität von Mtl im Vergleich zu PL um den Faktor 1913 höher liegt, womit die besonders gute Eignung des Enzyms PL für Kohlenwasserstoffartige Substrate untermauert wird. Da PL aus MKW kontaminiertem Boden stammt, könnte ABTS aber auch ein nicht optimales Testsubstrat sein, wodurch die Aktivität dieses Enzyms auf Kohlenwasserstoffe im Zuge seiner Charakterisierung unterschätzt werden würde. Die Inkubationszeit belief sich für den mikrobiellen und den Mtl-Ansatz auf 32 Tage. Der Versuch mit PL musste auf Grund der

limitiert verfügbaren Enzymmenge mit 8 Tagen begrenzt werden. Der mikrobielle Ansatz zeigte keine statistisch signifikante Veränderung über die gesamte Laufzeit von 32 Tagen. Diese Versuchsreihe belegt eindeutig, dass der Zusatz von geeigneten Enzymen eine rasche Reduktion von persistenten Schadstoffanteilen herbeiführt und legt damit den Schluss nahe, dass solche Enzyme eine vielversprechende Möglichkeit zur Sanierung gealterte Schadensfälle darstellen.

Enzymatischer Abbau von MKW im Boden/Grundwasser Durchflusssystem

Die Proben aus dem Durchflusssystem wurden nicht nur hinsichtlich des Abbaus von Leitsubstanzen analysiert, sondern mittels GC-FID wurde auch der MKW-Gehalt nach DIN ISO 16703 bestimmt.

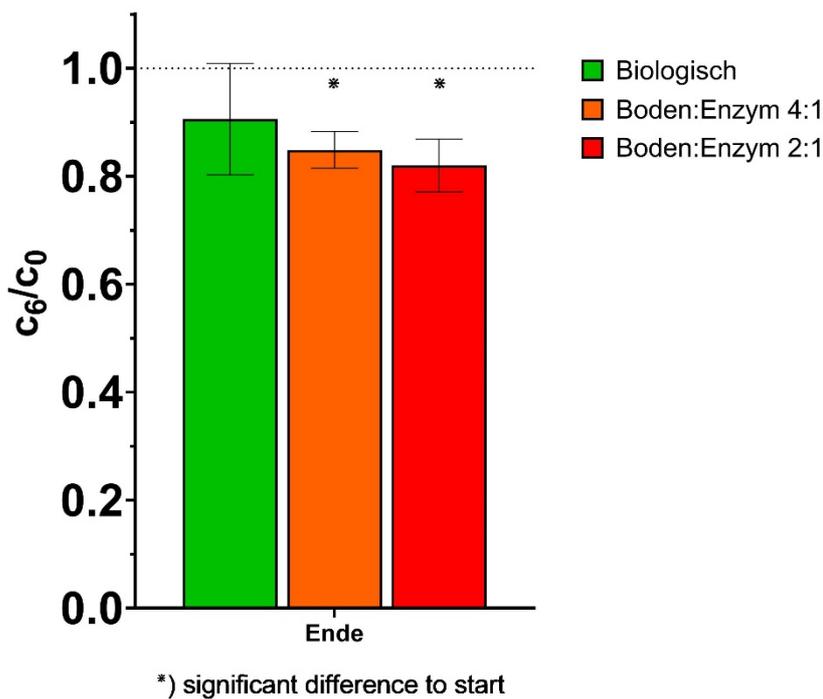


Abbildung 73: MKW-Konzentration nach 5 Tagen enzymatischer Abbau (MtL) im Boden/Grundwasser Durchflusssystem. Unterschied zum mikrobiellen Ansatz: * schwach

signifikant, ** signifikant. Verhältnis Boden zu eingesetzter Enzymmenge 4:1 bzw. 2:1. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=9.

Wie in Abb. 73 ersichtlich, konnte auch im Durchflusssystem eine signifikant bessere Abnahme für die enzymatischen Ansätze beobachtet werden. Im Vergleich zum dynamischen Modellsystem war die Abnahme mit 18% (2:1) und 15% (4:1) deutlich geringer was einerseits auf Einschränkungen in der homogenen Verteilung des Enzyms, andererseits aber auch auf Massentransferlimitierungen zurückzuführen sein dürfte.

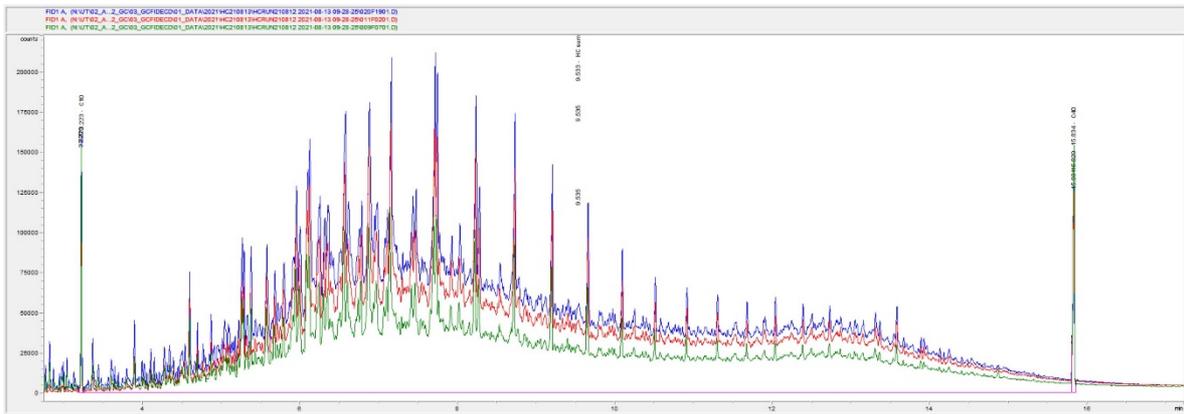


Abbildung 74: MKW-Profile vor (blau) und nach Abbau (rot – mikrobiell, grün – Enzym MtL 2:1).

Auch in dieser Versuchsserie zeigte die Enzymbehandlung einen verbesserten MKW-Abbau im komplexen und höher siedenden Bereich des Chromatogramms (Abb. 74).

Anwendung der Enzyme im Feldversuch (M3.3.)

- Am Standort N77 wurde das Enzym MtL hinsichtlich seiner Wirkungsweise im Vergleich zum mikrobiologischen Abbau unter in situ Bedingungen getestet. Das Enzym wurde dazu einerseits als vorgereinigter Form, andererseits gebunden am Vlies in den Grundwasserleiter eingebracht und auf seine Wirkungsweise bezüglich der Fähigkeit zum Schadstoffabbau geprüft.

Immobilisierung von Enzymen an Vliesen

In Abstimmung mit dem Hersteller wurde Vlies F für die Immobilisierungsversuche von Enzymen herangezogen. Das Vlies wurde mit 90% Ethanol und destilliertem Wasser gereinigt, die Enzymlösung in 3 unterschiedlichen Konzentrationsstufen aufgebracht und über 3 Tage zur Bindung inkubiert. Im Laufe des Versuches wurde die Veränderung der Enzymaktivität im Überstand mit ABTS gemessen (Abb. 75). Die Ergebnisse zeigen eine generell hohe Varianz, eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität konnte nicht festgestellt werden.

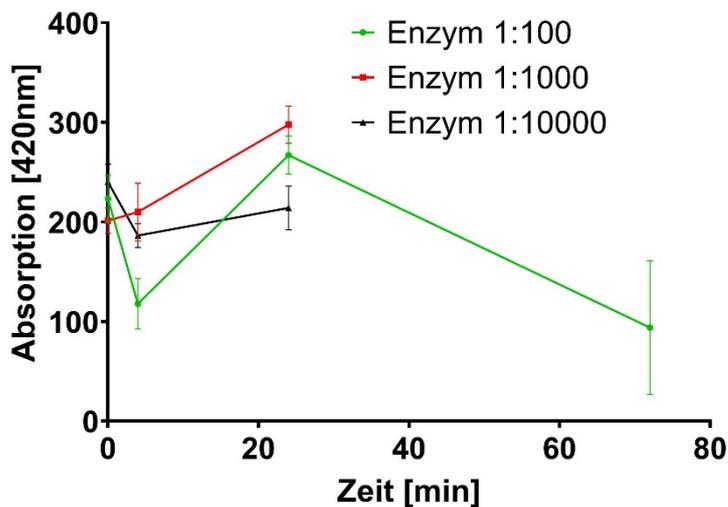


Abbildung 75: Zeitlicher Verlauf der Enzymaktivität während der Beladung des Vlieses. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Nach Ablauf der 3 Tage wurde das Vlies entnommen und mit Natriumphosphatpuffer gereinigt. Die Spüllösung wurde gesammelt und die Enzymaktivität mit ABTS bestimmt (Abb. 76).

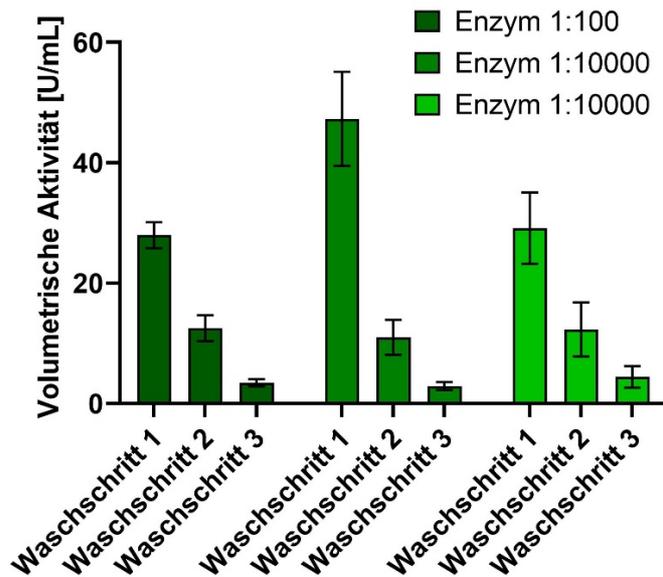


Abbildung 76: Enzymaktivitäten in der Spüllösung, jeweils bestimmt für unterschiedliche Enzymkonzentrationen nach aufeinanderfolgenden Waschsritten. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Die gesammelten Spüllösungen wiesen im zeitlichen Verlauf eine abnehmende Menge an Enzym auf, was auf eine Bindung von Enzym am Vlies hinweist.

In einem weiteren Versuchsschritt wurden die gereinigten Vliese mit Natriumphosphatpuffer und ABTS versetzt und die Enzymaktivität bestimmt, siehe Abb. 77.

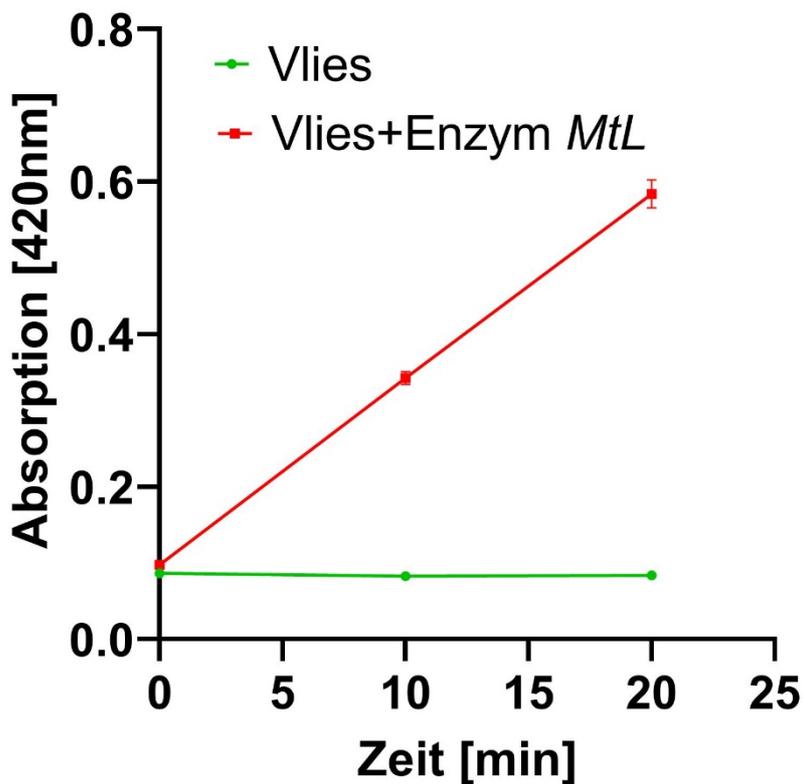


Abbildung 77: Enzymaktivität der nach Beladung getesteten Vliese. Ordinate: Enzymaktivität, Abszisse: Inkubationszeit mit Puffer, rot: Vlies beladen mit Enzym, blau: Kontrollansatz (unbeladenes Vlies). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Erhöhung der Ladekapazität der Vliese durch Enzyme

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob mit MKW kontaminierte Vliese unter Zuhilfenahme von Laccasen regeneriert werden können. Dazu wurden Vliese mit freier Ölphase, vom Altstandort in Drösing stammend, kontaminiert und in weiterer Folge in Grundwasser entnommen am Standort mit und ohne Enzymzusatz über einen Zeitraum von 3 Tagen inkubiert.

Die Vliese wurden vor Einbringung getrocknet und gewogen. Pro Testansatz wurden 500 mg Vlies und ca. 1000 mg Ölphase eingesetzt. Um eventuelle Interferenzen durch

Prozesse wie mikrobiellem Abbau, Auswaschung oder Verflüchtigung und Proteinadsorption abzubilden, wurden ein multipler Versuchsansatz gewählt (siehe

Abbildung 78):

- mit Ölphase kontaminiertes Vlies in Grundwasser
- nicht kontaminiertes Vlies in Enzymlösung (1:2 verdünnt)
- kontaminiertes Vlies in Enzymlösung (1:2 verdünnt)
- nicht kontaminiertes Vlies in Enzymlösung (1:4 verdünnt)
- kontaminiertes Vlies in Enzymlösung (1:4 verdünnt)



Abbildung 78: Vliese in Grundwasser mit und ohne Enzymzusatz (Mtl)

Nach Ablauf von 3 Tagen wurden die Vliese entnommen, getrocknet und erneut gewogen (Abb. 79).

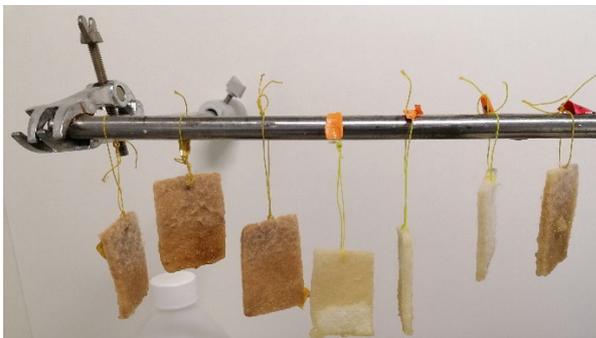


Abbildung 79: Vliese nach 3 Tagen Inkubation

•

- Eine erfolgreiche enzymatische Regeneration der kontaminierten Vliese sollte einen Gewichtsverlust relativ zum Kontrollansatz bewirken. Die Ergebnisse des Versuches waren jedoch nicht eindeutig. Eine ausreichend hohe Reduktion der Ölphase am Vlies konnte in dieser Versuchsreihe nicht statistisch abgesichert werden.

Feldversuch

Im Zuge dieses Versuches am Standort N77 in Drösing sollte die Eignung des ausgewählten Enzyms (MtL) zum in situ Abbau von MKW bei Feldbedingungen untersucht werden. Der Fokus wurde dabei auf den MKW-Abbau in der wassergesättigten Zone gelegt. Zur Überprüfung des Schadstoffabbaus in der Festphase wurden Bodenproben, die der Altlast N77 entstammten, in das Grundwasser eingehängt. Dazu wurden die bereits vorhandene Infrastruktur in Form von Injektions- und Kontrollpegeln sowie die Belüftungsanlage der Ensowa genutzt. Neben der Einbringung des Enzyms war auch ein Kontrollansatz ohne Zugabe von Laccase vorgesehen, der den intrinsischen mikrobiellen Abbau im Aquifer abbilden sollte. Abb. 80 zeigt die Lage der Pegel am Standort. Zur Herstellung geeigneter Abbaubedingungen erfolgte in F-SB1 und F-DB über einen Zeitraum von einem Monat eine Belüftung des Grundwassers und der darüberliegenden ungesättigten Zone. Damit sollte eine ausreichende Sauerstoffversorgung hergestellt werden, da sowohl der angestrebte mikrobielle als auch enzymatische Schadstoffabbau an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden ist. Während der Durchführung des enzymatischen Abbaueversuchs sowie des mikrobiellen Kontrollansatzes (Dauer jeweils eine Woche) wurde zur Vermeidung von Ölphasentransfer lediglich über F-DB im geringen Volumenstrom (1,8 m³/h) belüftet.

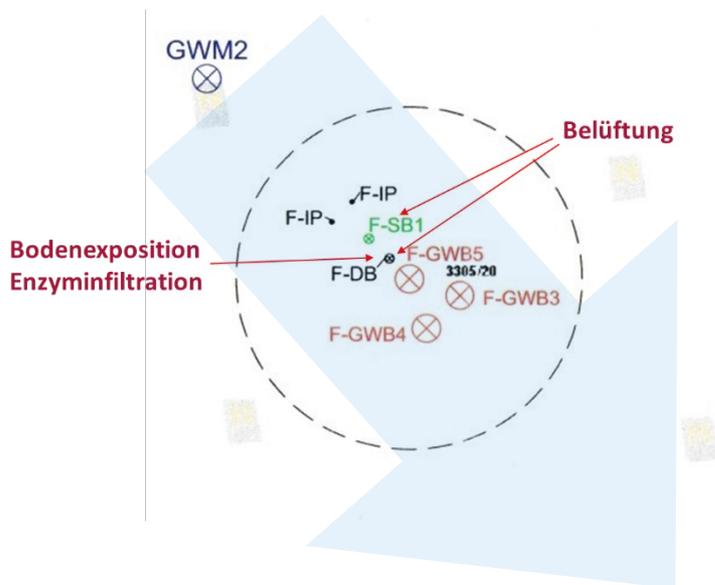


Abbildung 80: Lage der Brunnen in der KASKADE Versuchszone des Altstandortes N77. Die Belüftung erfolgte über F-SB1 und F-DB. Bodenproben wurden in F-DB eingehängt, über diesen Brunnen wurde auch das Enzym eingebracht. Zur Beweissicherung diente F-GWB3.

Zu Beginn des jeweiligen Versuchsansatzes wurden die Bodenproben in Metallkörben (Abb. 81) mit und ohne Vlies über den F-DB in den Grundwasserleiter eingebracht. Diese Vorgangsweise bietet den Vorteil, dass exakt dieselbe Bodenprobe nach Inkubation im Grundwasser wieder für die Analyse entnommen werden kann und somit die hohe Varianz der Feststoffprobenahme bedingt durch Heterogenitäten des Untergrundes reduziert wird.



Abbildung 81: Bodenprobe in Metallkorb mit Stahlmesh, bereit für den Feldeinsatz.

Abbildung 82 zeigt die Anordnung der Metallkörbe wie sie im Pegel abgesenkt wurde. Die Sauerstoffversorgung während der Inkubation erfolgte durch Belüftung über das abgebildete Polymertubing (blau) und die terminal fixierte Keramikfritte.



Abbildung 82: Bodenprobe in Metallkörben mit Mesh- bzw. Vlieseinsatz, bereit für die Absenkung in F-DB.

Die jeweiligen Abbauversuche wurden durch Zusatz von 25 L Wasser (mikrobieller Ansatz) bzw. 25 L der vorgereinigten Laccase (enzymatischer Ansatz) gestartet. Die weitere Dosierung des Enzyms erfolgte automatisiert über einen Zeitraum von 6 Tagen durch wiederholte Einspeisung von jeweils 1,5 L der Enzymlösung in dreistündigen Intervallen. An den Tagen 0, 1, 3 und 6 wurde in jeder Versuchsserie vor Ort die Sauerstoffsättigung des Grundwassers gemessen und es wurden Wasserproben für weiterführende Analysen entnommen. Grundwasserproben wurden zusätzlich zum Duobrunnen auch aus dem Beweissicherungsbrunnen (GWB5) in regelmäßigen Abständen entnommen. Auffällig war das Vorhandensein einer stärker ausgebildeten Ölphase in F-GWB5 im Vergleich zum Duobrunnen (Abbildung 83). Die mächtigste Ölphase wurde jedoch im Sanierungsbrunnen

festgestellt (F-SB1). Um eine Beeinflussung der Abbauprobe durch Phasenmobilisierung aus diesem Brunnen hintanzuhalten, wurde die Sauerstoffversorgung über F-SB1 während des aktiven Versuchszeitraums eingestellt.



Abbildung 83: Wasserproben aus F-GWB5, Duobrunnen und Sanierungsbrunnen vor Versuchsbeginn (von links nach rechts, aufschwimmende Ölphase deutlich erkennbar).

Vor Beginn der Belüftung lag der Sauerstoffgehalt im Duobrunnen (F-DB) bei etwa 0,3 mg/L, vor Beginn der Abbauprobe waren Sauerstoffkonzentrationen zwischen 3 und 4 mg/L messbar. Tabelle 26 gibt einen Überblick über weitere Messparameter, die während des Feldversuches bestimmt wurden. MKW-Konzentrationen wurden für Tag 0 und Tag 6 der jeweiligen Serien gemessen.

Der Sauerstoffgehalt lag im Duobrunnen nach 4 Wochen Belüftung bei etwa 3 mg/L, der pH-Wert zwischen 7 und 8. Im grundwasserabströmigen Beweissicherungsbrunnen 5 fanden sich lediglich Sauerstoffgehalte um 0,5 mg/L, während der pH-Wert ebenfalls zwischen 7 und 8 lag. Auch die Leitfähigkeit befand sich in beiden Brunnen bei etwa 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Deutlich höhere MKW-Gehalte wurde im Beweissicherungsbrunnen für die erste Probenahme am 4.8.2021 festgestellt, wobei die aufschwimmende Schadstoffphase Ursache für eine Interferenz sein könnte. Der gelöste Kohlenstoff lag vor Versuchsbeginn in beiden Brunnen im selben Größenbereich, mit tendenziell leicht höheren Werten im Duobrunnen. Im Verlauf des mikrobiellen in situ Versuchs nahm der MKW-Gehalt im Duobrunnen tendenziell ab während pH-Wert, DOC und Leitfähigkeit nahezu unverändert blieben. Im Beweissicherungsbrunnen wurde ein geringer Anstieg des Sauerstoffgehaltes verzeichnet. Berücksichtigt man jedoch die Schwankungsbreite der Messwerte, so kann generell nicht von einer substantiellen Veränderung der in Tabelle 13 aufgelisteten Parameter ausgegangen werden, abgesehen von einem erhöhten DOC-Gehalt zu Beginn

des mikrobiellen Abbauversuches. Dieser könnte artifizieller Natur sein, bedingt durch die in diesem Pegel sehr stark ausgebildete freie Ölphase. Nachteilige Effekte wie z.B. die Mobilisierung von Schadstoffen, eine potenzielle Auswirkung der Belüftungstätigkeit in der Sanierungszone, konnten in Grundwasserproben des Beweissicherungsbrunnens nicht festgestellt werden.

Tabelle 26: Chemische Analyse von Grundwasserproben (N77) im Laufe des Feldversuches

		F-DB					F-GWB 5				
		O2	pH	Lf	MKW	DOC	O2	pH	Lf	MKW	DOC
	Vorunter- suchungen	mg/L		µS/cm	mg/L	mg/L	mg/L		µS/cm	mg/L	mg/L
	4.8.21	0,3	7,6	1015	0,98	30,1	0,5	7,6	937	10,6	13,8
	26.8.21	0,3				50,8	0,6	7,4	1085		27,9
Mikrobieller Ansatz											
Tag 0	8.9.21	3,0	7,2	1035	0,47	10,0	0,5	7,4	1016	0,57	77,9
Tag 1	9.9.21	3,9	7,2	1001		10,5	0,5	7,3	1070		18,7
Tag 3	11.9.21	3,0	7,5	947		10,2	1,0	7,4	1082		18,5
Tag 6	14.9.21	3,7	7,8	991	0,16	9,7	1,8	8,0	1050	0,44	20,7
Enzymatischer Ansatz											
Tag 0	15.9.21	3,9	8,2	955	0,21	8,5	0,4	8,4	1012	-	21,9
Tag 1	16.9.21	3,6	8,5	1157		4717	0,9	7,4	1074		22,8
Tag 3	18.9.21	-	5,4	1514		8522	-	-	-		-
Tag 5	20.9.21	3,2	6,0	1602		8207	0,8	7,9	1059		21,3
Tag 6	21.9.21	1,5	8,0	1528	0,38	3384	1,3	7,8	1053	1,42	16,7

Im enzymatischen in situ Versuch bewirkte die Zugabe der Laccase MtL erwartungsgemäß eine Erhöhung des gelösten Kohlenstoffes, der auf den Kohlenstoffgehalt des Proteins zurückzuführen ist. Im Beweissicherungsbrunnen 5 wurde zu keinem Zeitpunkt eine

Erhöhung des Gelöstkohlenstoffs detektiert, womit eine Verfrachtung des Enzyms in diesen Pegel auszuschließen ist. Die DOC-Werte bewegen sich in dem schon vor Enzymzugabe gemessenen Schwankungsbereich. Eine gesicherte Interpretation des Anstiegs des MKW-Gehaltes in der Grundwasserprobe vom 21.9.2021 ist auf Grund der mächtigen Ölphase in diesem Pegel nicht möglich, v.a. auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der DOC-Gehalt derselben Probe im Vergleich zu vorangegangenen Messungen gesunken ist. Jedenfalls lag der MKW-Wert nach Beendigung des Feldversuches mit 1,42 mg/L um eine Größenordnung unter jenem vor Beginn dieser Versuchsreihe am Standort N77 (10,6 mg/L, gemessen am 4.8.2021).

Die Grundwasserproben wurden mittels LC-MSTOF auf eine potenzielle Gegenwart von wasserlöslichen Metaboliten untersucht. Jedoch konnte wie auch schon in den Proben der Laborversuche trotz hochempfindlicher Analytik keine Anreicherung von Metaboliten nachgewiesen werden. Dies ist durch einen raschen mikrobiellen Abbau der enzymatisch generierten Produkte erklärbar, womit auch die Funktionalität der kaskadenförmigen Aufreinigung untermauert wird.

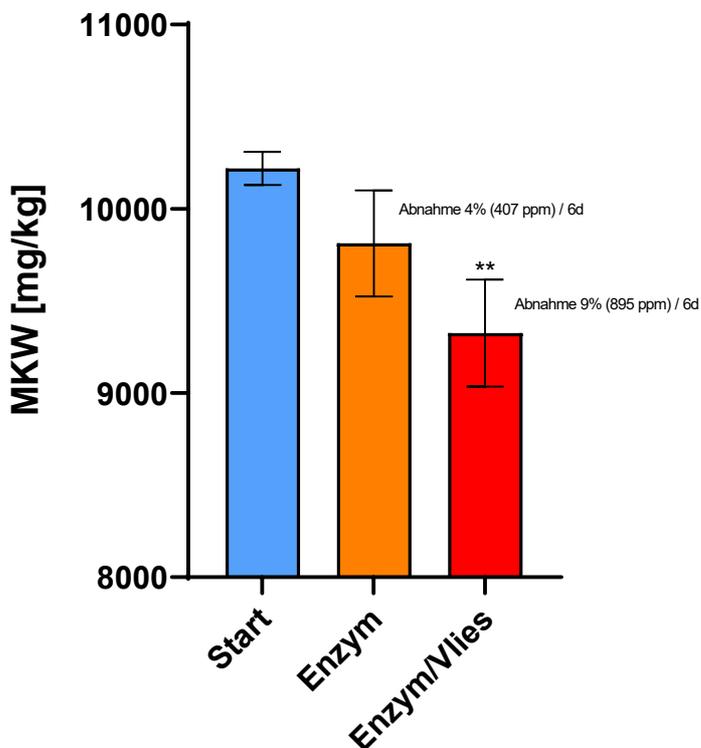


Abbildung 84: MKW-Gehalt der Bodenproben vor und nach 6-tägigem enzymatischen in situ Abbau. Die statistische Signifikanz der Differenz zum Startwert ist durch zwei Asteriske indiziert (P=0,007). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Nach Ablauf der vorgesehenen Versuchsdauer für den mikrobiellen sowie enzymatischen Ansatz wurden die Bodenproben gehoben und jeweils nach DIN ISO 16703 hinsichtlich des MKW-Gehalts analysiert. Der Effekt der Enzymzugabe mit bzw. ohne Vlies ist in Abb. 84 dargestellt. Es zeigt sich eine Abnahme der Schadstoffkonzentration nach Enzymdosierung. Der abbaubeschleunigende Effekt des Enzymzusatzes zeigt sich im Feld geringer als bei Laborbedingungen. Dies dürfte nicht zuletzt auf die höhere Komplexität des offenen Systems eines Aquifers und die dadurch bedingte größere Beeinflussung der Ergebnisse durch die Dynamik des umgebenden Grundwasserkörpers mit teilweise aufschwimmender Ölphase zurückzuführen sein. Die generell höheren Schwankungsbreiten von Felddaten nehmen gleichfalls Einfluss auf die Möglichkeit, Ergebnisse mit statistischer Signifikanz abzusichern.

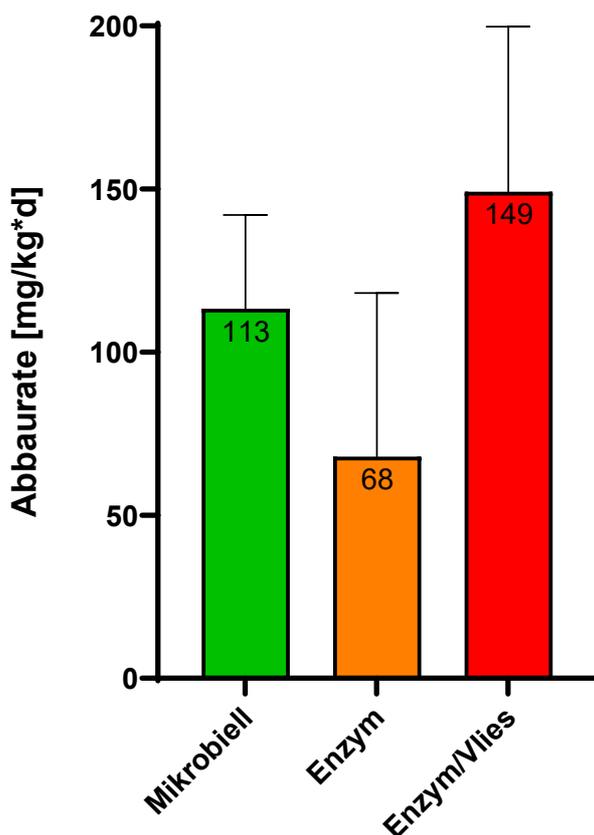


Abbildung 85: Abbauraten der Feldversuchsansätze im Vergleich. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.

Berücksichtigt man jedoch den kurzen Versuchszeitraum von 6 Tagen, so ist die erzielte Schadstoffreduktion von nahezu 10% für Feldbedingungen als durchaus beachtlich anzusehen. Hervorzuheben ist der positive Effekt, den das Vlies auf den enzymatischen MKW-Abbau ausübt, der in diesem Fall auch mit einer hochsignifikanten MKW-Abnahme in der Höhe von 900 mg/kg im Vergleich zum Startwert statistisch abgesichert werden konnte. Diese Verstärkung des enzymatischen MKW-Abbaus im gewählten Versuchssystem wird auf die Rückhaltung und Stabilisierung der Laccase am Vlies zurückgeführt. Aus dem höchsten Abbaugrad wie er für den Versuchsansatz Enzym/Vlies mit 900 mg/kg beobachtet wurde, ergibt sich die im Vergleich höchste durchschnittliche MKW-Abbaurrate von 149 mg/kg·d (Abb. 85). Auch wenn sich dieser Wert auf Grund der Varianzbreite von Felddaten statistisch nicht von den Vergleichsansätzen unterscheidet, so stellt eine tägliche Abnahme der MKW-Konzentration im Feld in der Höhe von 150 mg/kg einen vielversprechenden Wert dar.

Betrachtet man das Schadstoffprofil in chromatographischer Auflösung (Abb. 86), so ist wie bereits für enzymatische Versuchsserien im Labormaßstab beobachtet, eine im Vergleich zum alleinigen mikrobiellen Abbau erhöhte Abnahme von MKW im höhersiedenden Bereich feststellbar, der vermehrt komplexe und persistente Kohlenwasserstoffe umfasst.

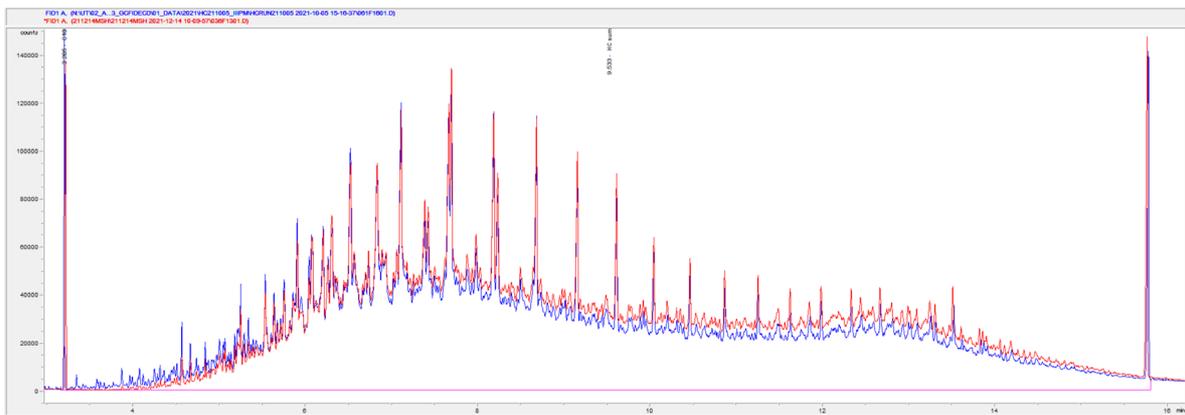


Abbildung 86: Chromatogramm der Bodenproben aus den eingesetzten Körben, rot: mikrobieller Ansatz, blau: enzymatischer Ansatz mit Vlies.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die ausgewählte Laccase MtL im Feldeinsatz bestanden hat. Vor allem in Kombination mit dem Vlies zeigt sie die im

Vergleich höchste Abbaurrate bei einer Schadstoffreduktion von nahezu 10% in nur 6 Tagen. Enzymatische Metabolite wurden trotz hochsensitiver Analytik nicht nachgewiesen, womit sich die Möglichkeit der subsequenten Applikation von enzymatischen und mikrobiellen Behandlungsschritten in Kaskadenform bestätigt.

Engineering-Aspekte: Zum Transfer in die Praxis

In diesem Kapitel sind die Aspekte der 2 Engineering-Firmen Spintec und ensowa wiedergegeben, die sichergestellt haben, dass die Forschungsarbeiten der akademischen Partner FH Technikum Wien (Fokus AP2) und BOKU (Fokus AP3) auch praxisrelevant und in das Feld umsetzbar sind.

Auslegung der Feldversuche

Es wurde ein vollständiges Aufbereitungskonzept für das Sanierungsverfahren entwickelt, dessen Schema die folgende Abbildung 87 zeigt:

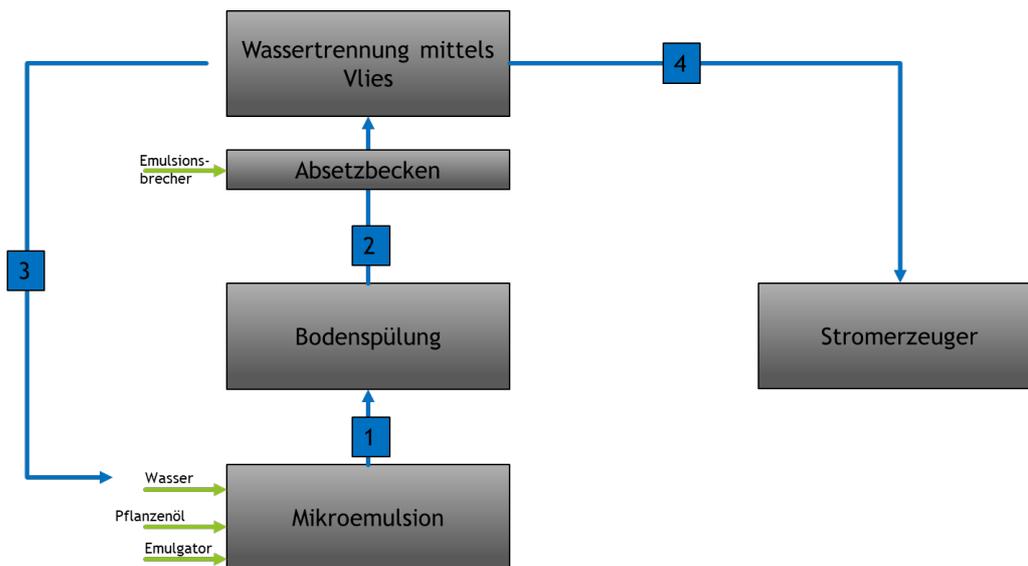


Abbildung 87: Aufbereitungskonzept

Nach der Infiltration der Emulsion in den Boden (1) und der Spülung des Untergrundes wird die Emulsion mit den Schadstoffen (2) mittels Vlieses in eine Ölphase (4) und Wasserphase (3) gespalten. Bei Bedarf kann noch ein Absetzbecken installiert werden, um die festen Bestandteile aus dem Kreislauf zu entfernen. Die Wasserphase (3) wird somit

dem Prozess wieder zugeführt. Die Ölphase (4), die aus den Hauptteilen Pflanzenöl, Emulgator und den Schadstoffen besteht, wird mittels Aggregats vor Ort für die Stromgewinnung genutzt.

- Herstellung der Emulsion:

Durch die Anwendung von Emulsionen soll die erforderliche Menge an Pflanzenöl reduziert und damit die Nachhaltigkeit und Wirtschaftlichkeit des Verfahrens erhöht werden. Für die Herstellung der Emulsionen ist der Rührkessel der am häufigsten verwendete Rührapparat. Zur Innenausstattung gehören ggf. Stromstörer, Rohrschlangen, Messfühler (z.B. Thermometerrohre, Standanzeiger, etc.) sowie Einlauf- und Ablaufrohre. Alle diese Einbauten können die Rührwirkung beeinflussen. Folgende Abbildung 88 zeigt den Rührbehälter:



Abbildung 88: Rührbehälter

Um eine möglichst homogene Emulsion herstellen zu können, können sogenannte Strombrecher eingebaut werden. Für die Herstellung der Emulsion wurde ein 3-Flügel-Mischprobeller (Abbildung 89 – Nummer 1) mit einem Durchmesser von 125mm gewählt. Es wurde eine stufenlose Drehzahlregelung (Drehzahl: 0-1690 UPM) installiert, vgl. Abb. 89.

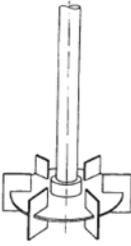
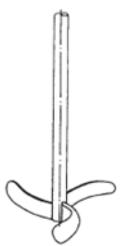
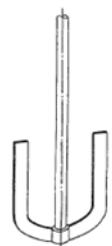
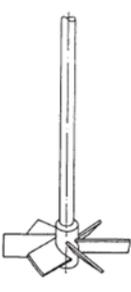
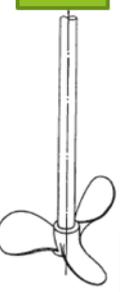
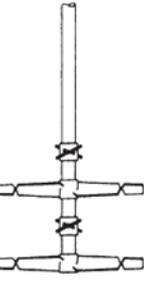
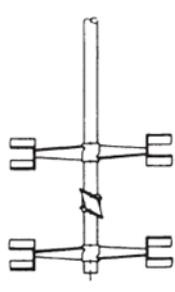
		Viskosität der Flüssigkeit [mPas]					
		< 500		500 – 5 000		$5 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^4$	
Hauptsächlich bewirkte Flüssigkeitsströmung	tangential bis radial						
	Scheiben-R. Impeller-R. (PFAUDLER) Kreuzbalken Gitter-R. Blatt-R. Anker-R.						
	axial						
	Schrägblatt-R. Propeller-R. MIG - R. (EKATO) INTERMIG-R. (EKATO) Wendel-R.						

Abbildung 89: Rührertypen. Der Propeller-Rührer wurde ausgewählt.

Erste Versuche zeigten, dass dieser Aufbau für die Herstellung von Emulsionen geeignet ist. Allerdings zeigte sich dabei auch, dass die Pflanzenöl/Wasser - Emulsion unmittelbar nach dem Emulgieren bricht und sich nach wenigen Minuten eine Entmischung einstellt. Die Emulsion muss aus diesem Grund stabilisiert werden. Hierfür kommen geeigneten Stabilisatoren zum Einsatz. Im konkreten Fall wurde Lecithin verwendet.

- Einbringung in den Boden inkl. Monitoring- und Sicherungskonzept

Es wurde mit dem Projektpartner Ensowa ein Monitoring- Sicherungskonzept erstellt, dies wird ein den folgenden Abbildung 90 gezeigt.

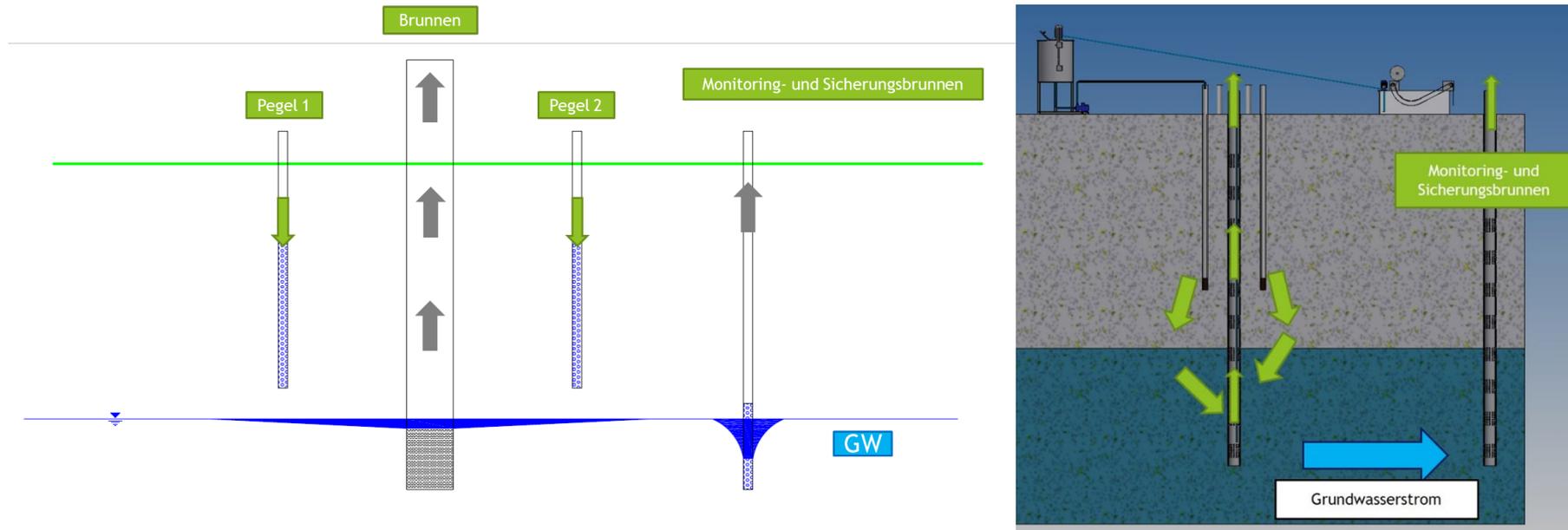


Abbildung 90: Monitoring- Sicherungskonzept

Es wurde für die Behördeneinreichung der Lageplan mit den Brunnen und Pegel erstellt (Abb. 91):

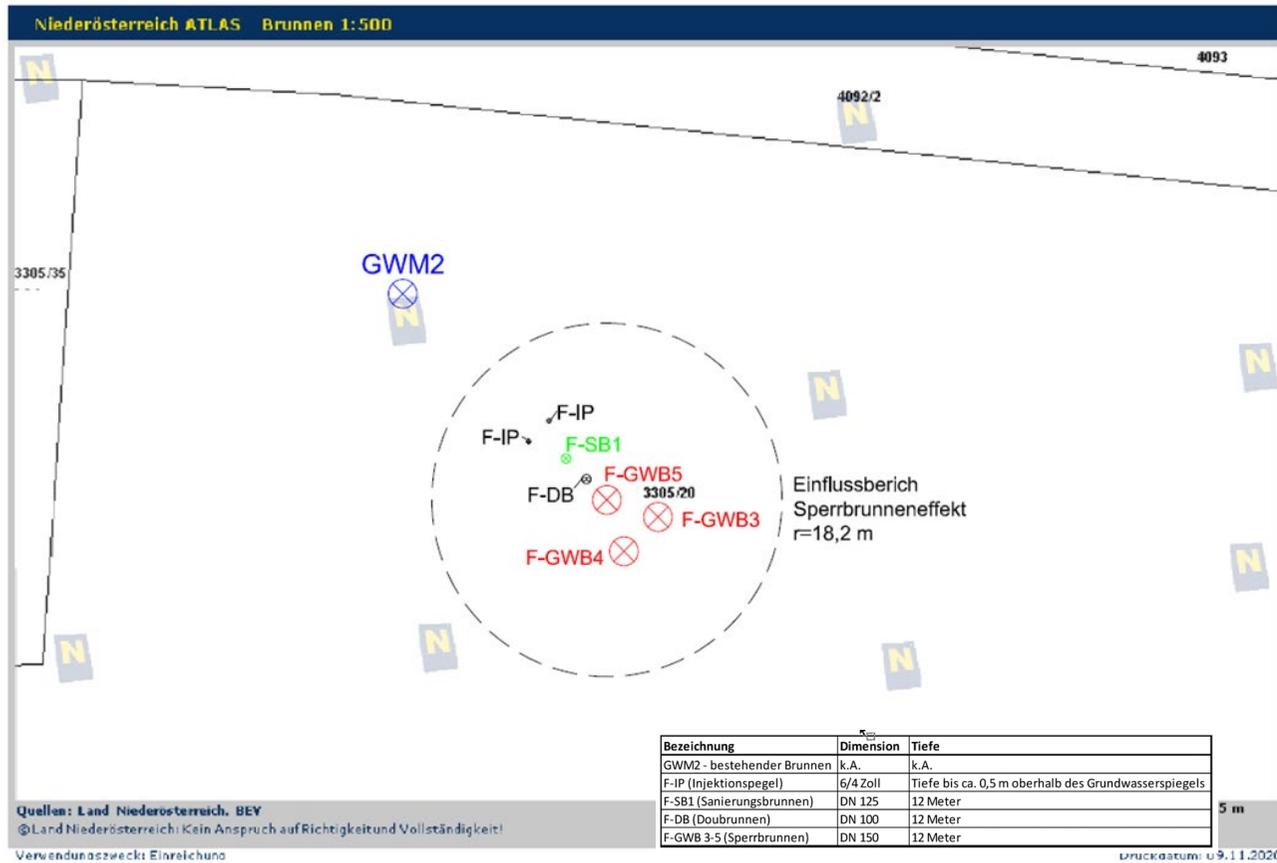


Abbildung 91: Einreichplan

- Konzept Schrägbettfilter für die Trennung Wasser und Öl (Pflanzen- und Mineralöl)

Im hier vorliegenden Punkt wurden Lösungen für den Meilenstein 2.2 (M2.2: 500 m³ Wasser über ein Vlies im Feldversuch aufgereinigt) erarbeitet. Es müssen 500 m³ kontaminiertes Grundwasser entnommen und über den Schrägbettfilter behandelt und größtenteils wieder zur Versickerung gebracht werden. Die durch das Vlies zurückgehaltene Kontamination wird entsorgt. Folgende Abbildung 92 zeigt das Konzept.

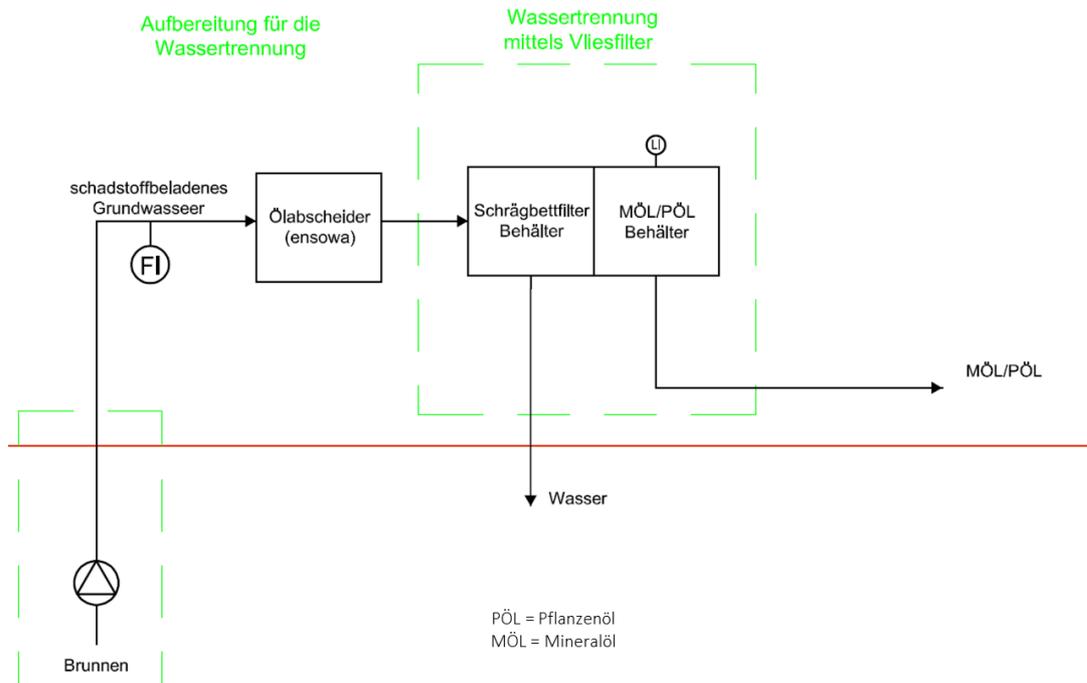


Abbildung 92: Schema Feldversuch

- Konzept Schrägbettfilter

Der Schrägbettfilter ist ein vollautomatisch, hydrostatisch arbeitender Vlies-Bandfilter, der zur Trennung von Flüssigkeiten eingesetzt wird. Mit dem Schrägbettfilter können sowohl filtriebare als auch flotierende Stoffe abgetrennt werden. Im ersten Teil des Filters wird das Vlies mit dem kontaminierten Grundwasser in Kontakt gebracht. Durch die Umlenkungen wird die Kontaktzeit erhöht. Im zweiten Teil wird das Vlies ausgepresst und die Schadstoffe in einem Behälter gesammelt und bei Bedarf entsorgt, siehe Abb. 93 und 94.

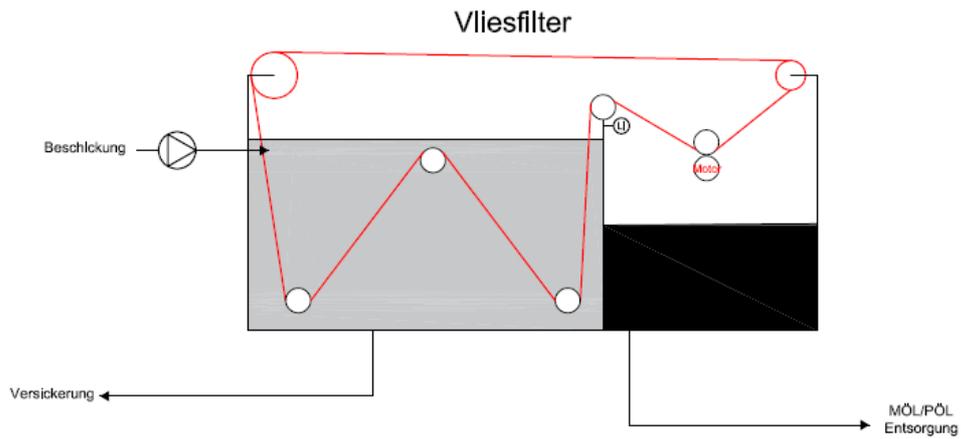


Abbildung 93: Konzept Schrägbettfilter

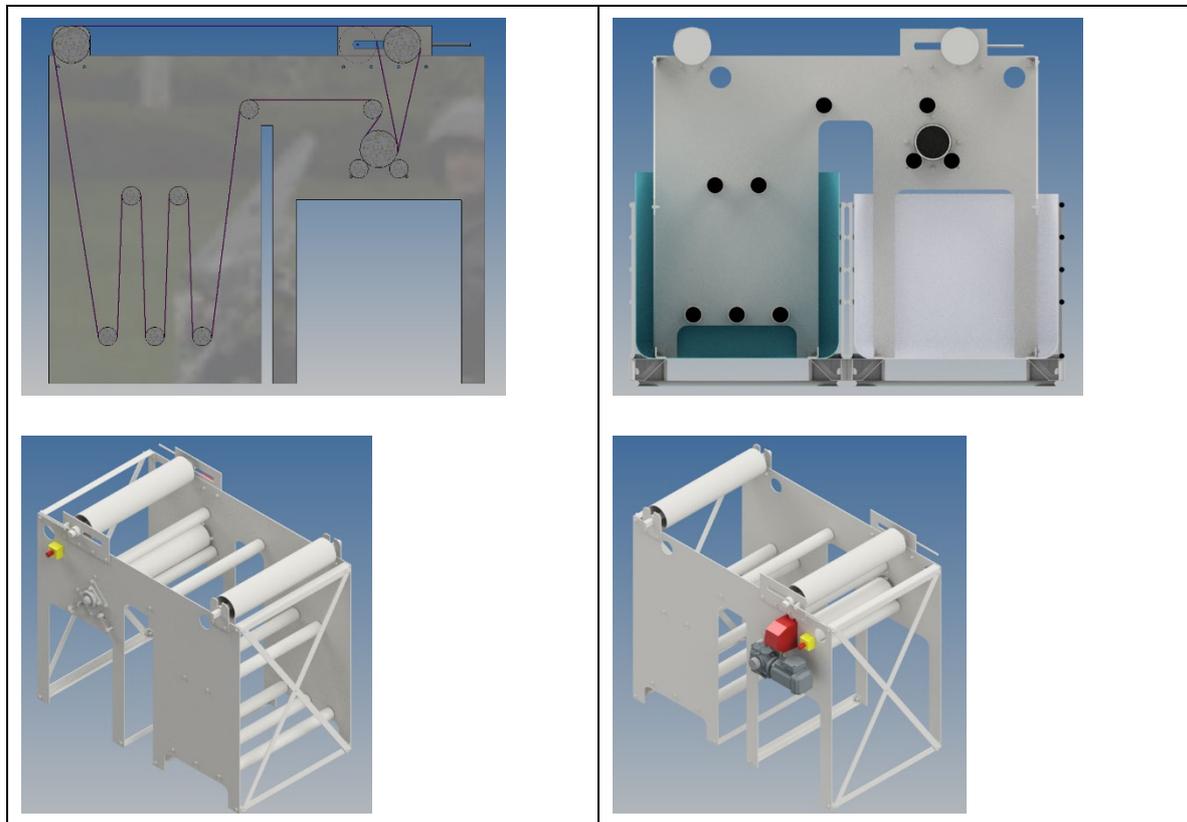


Abbildung 94: Details Schrägbettfilter

In Abb. 95 ist ein 3D-Modell zu sehen.

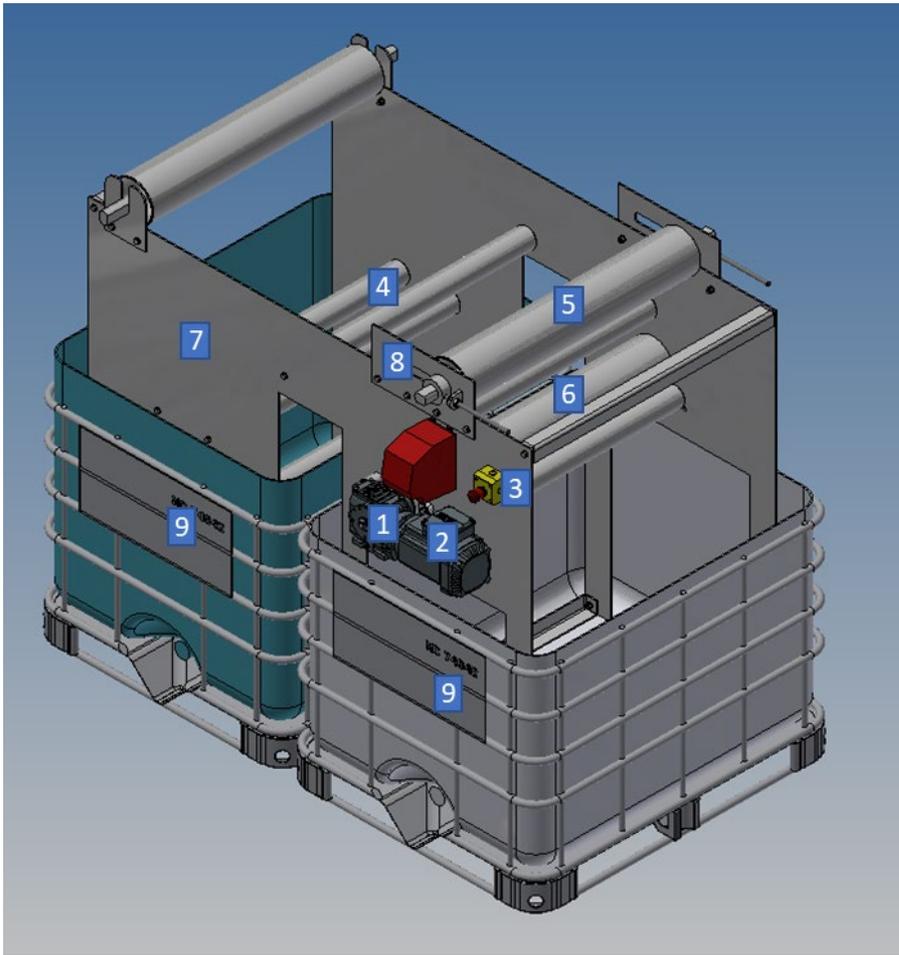


Abbildung 95: Schrägbettfilter im 3D-Modell.

Tabelle 27 zeigt die Teile des Filters:

Tabelle 27: Teile Schrägbettfilter

Nummer	Hersteller	Bezeichnung	Artikelnummer
1	SEW	Schneckengetriebemotor	SH47/T DRN80M4/TH
2	SEW	Frequenzumformer	18251412
3	EATON	Not-Aus	216524
4	Spohr GmbH	Tragrollen	Typ 15207 Unterbandrollen RL950 IG M10
5	Spohr GmbH	Zentrierrollen	INBI Bandbreite 800
6	Mayrhofer Maschinenbau	Antriebsrolle	-
7	Mayrhofer Maschinenbau	Metalleile	-
8	Maedler	Lagerbock DM40	62614000
9	Auer Packaging	IBC Container	IBC 1000 K 150.50-UN

Die folgenden Abbildungen 96 und 97 zeigen die Details zum Schrägbettfilter.

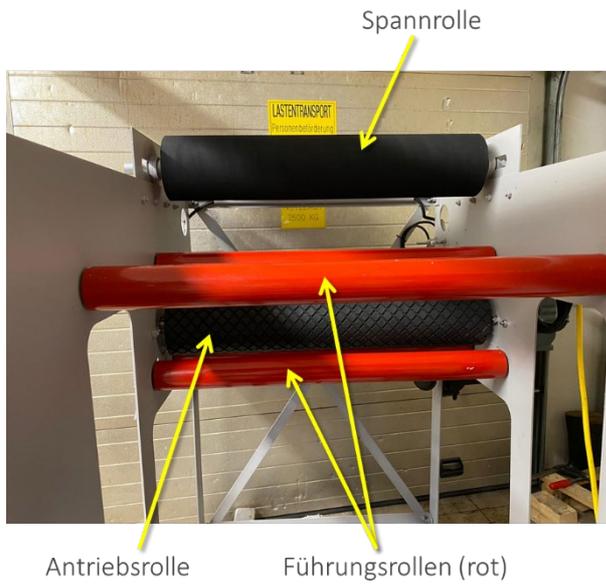


Abbildung 96: Details Schrägbettfilter

Not-Aus Schalter Spannvorrichtung (Vliesspannung) Zentrierrolle



Abbildung 97: Details Schrägbettfilter

- Gesamtsystem Container

Das besondere Augenmerk von Spintec liegt auf der Nutzung bisher nicht (optimal) ausgeschöpfter Potentiale beziehungsweise Ressourcen. Für die Stromversorgung vor Ort könnte ein Multifuel-Generator sorgen. Dieser könnte mit dem Mineralöl - Pflanzenöl – Gemisch betreiben werden. So wäre auch eine Energieversorgung vor Ort ohne Netzanschluss möglich. Dieser Versuch wurde durch Budgetgründen nicht durchgeführt, siehe Abb. 98.

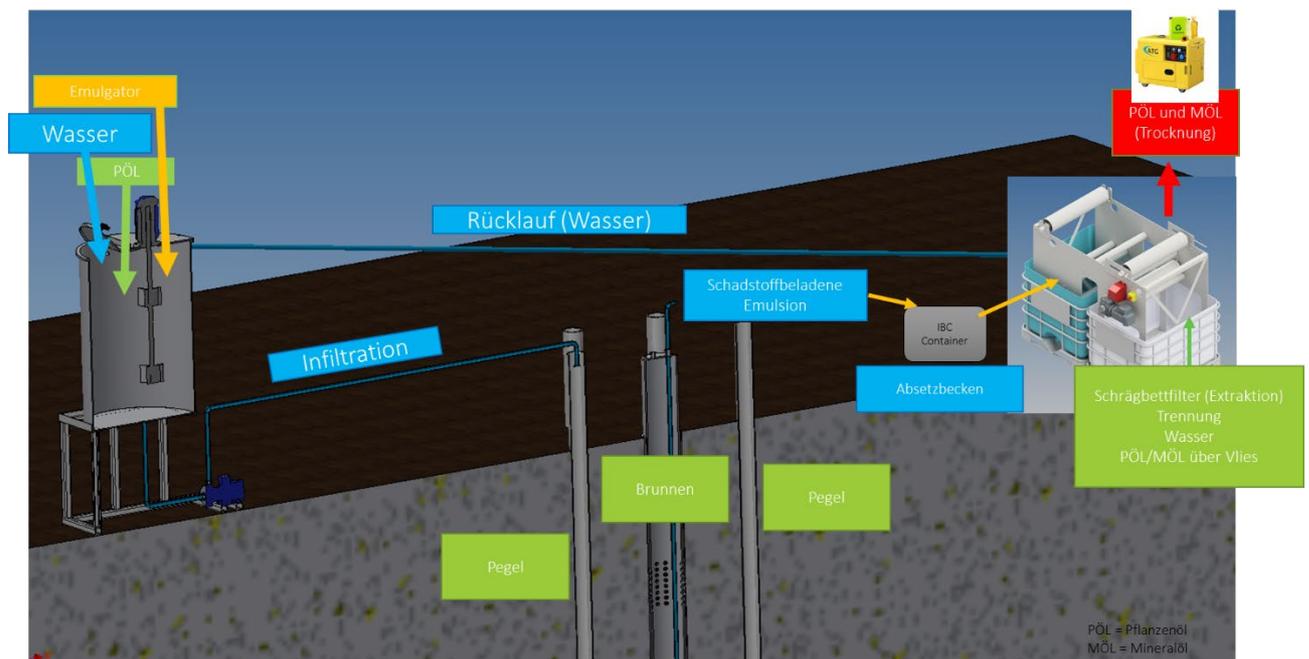


Abbildung 98: Gesamtsystem

Durchführung der Feldversuche

Die Firma ensowa hat sich als operativer Forschungspartner und Umweltsanierungsunternehmen nach dem Behördenverfahren im oben erwähnten Zeitraum hauptsächlich mit den angeführten Feldversuchen in Drösing beschäftigt. Daneben wurde das von der Behörde vorgeschriebene Monitoringprogramm mit dem beauftragten Unternehmen „Gruppe Wasser“ seitens ensowa koordiniert.

Etwa von März 2021 bis Mai 2021 wurden die Feldversuche (Infiltration von Pflanzenöl in die ungesättigte und gesättigte Bodenzone inklusive Wiedergewinnung von Pflanzenölgemischen) nach den ersten Labortests auch für den Feldversuch vorbereitet und dementsprechend kalibriert. Die eigentlichen Feldversuche wurden von Mai bis Oktober 2021 umgesetzt. Dafür wurden zahlreiche Gerätschaften für die Umsetzung der einzelnen Pilotprojekte von der ensowa angefertigt und für das Forschungsareal -der Altlast Drösing- adaptiert.

Vor den operativen Tätigkeiten am Feld wurden nach dem wasserrechtlichen Bewilligungsverfahren nochmals mehrere Pumpversuche erfolgreich durchgeführt, um den Sperrbrunneneffekt zwecks Hintanhaltung von möglichen Mobilisierungen von Schadstoffen im Grundwasser vor der Umsetzung der Forschungsaktivitäten bestätigen zu können.

Schritt 1: Infiltration von Pflanzenölgemisch in die ungesättigte Bodenzone

Abbildung 99: Mischer im Feld. Zu sehen ist das Stromaggregat.

-im eigens von Firma Spintec hergestellten Rührwerk wurden die Pflanzenöl-Lecithin-Gemische hergestellt

-in den von ensowa entwickelten Infiltrationslanzen (grundwasseranstromig positioniert) wurde Pflanzenölgemisch großteils mit Schwerkraft versickert

-Bereitstellung eines leistungsstarken Stromaggregates für den Pumpbetrieb (Herstellung eines Absenktrichters um eine abstromige Verdriftung zu verhindern)

Schritt 2: Wiedergewinnung von PÖL (Pflanzenöl) und MÖL (Mineralöl)



Abbildung 100: Der Ölskimmer

-Einsatz eines Ölskimmers für die Wiedergewinnung von PÖL + MÖL (rechte Abbildung)

-Sammlung von PÖL + MÖL + Wasser in Container (linke Abbildung)

Schritt 3: Einsatz des Schrägbettfilters – Aufreinigung des Abwassers über Vlies

Die Feldversuche betreffend Aufreinigung des belasteten Grundwassers über den Schrägbettfilter werden verfahrenstechnisch im 4. Zwischenbericht der Spintec ausführlich beschrieben. Ebenso werden dort die Ergebnisse aufgezeigt.

Schritt 4: Belüftung bzw. Sauerstoffeintrag in den Grundwasserkörper



Abbildung 101: Die Belüftung

Vor Durchführung des Ezymversuches seitens Boku war eine aufwendige Zufuhr von Luftsauerstoff in den Grundwasserkörper notwendig. Die laufenden Messungen der erfolgreichen Sauerstoffanreicherung im Grundwasser wurden seitens Boku dokumentiert.

Ein dafür geeigneter Sparger und dafür konzipierte Adaptierung des Zubehörs wurde seitens ensowa gmbh zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Infiltrationsversuche inklusive der Wiedergewinnung von Öl-Pflanzengemischen sowie die Aufreinigung über den Schrägbetfilter erfolgten grundsätzlich erfolgreich.

Ergebnisse des Projekts: Diskussion, Zusammenfassung

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Ergebnisse des Projekts, aus den Arbeitspaketen 2 und 3, kritisch diskutiert.

Das Projekt wurde im Zeit- und Kostenrahmen abgeschlossen, und die Technologiereife konnte von TRL 3 auf TRL 5 (Feldversuche) angehoben werden.

Bewertung der Verfahrenskombinationen

BODENWÄSCHE:

Die Infiltrationsversuche wurden mit Drücken bis zu 5 bar durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich das Verfahren für ausreichend durchlässige Boden (Kies) eignet. In die ungesättigte Zone wurden insgesamt 70 L Pflanzenöl (PÖL) in Form einer Emulsion infiltriert womit eine Entfrachtung von 31 L Mineralöl (MÖL) erzielt werden konnte bei einer Wiedergewinnung von 25 L PÖL. In die gesättigte Zone wurden 120 L PÖL eingebracht. Damit wurden 7,6 L MÖL entfernt bei einer Wiedergewinnung von 104 L PÖL. Die wesentlichen Ergebnisse für die ungesättigte Zone fassen sich wie folgt zusammen:

- 50-85% an MKW im Boden lassen sich in einem Durchgang mit 10% PÖL in Wasser extrahieren
- Das Verfahren ist für durchlässige Boden geeignet: Bodendurchlässigkeitsbeiwert $k_f > 10^{-4} \text{ m sec}^{-1}$
- Max. 15-50% des PÖLs verbleiben im Boden, bei Nachwaschen mit Wasser nur max. 5-30%
- Der Wirkungsbereich beträgt etwa 1-5 m² in der ungesättigten und 5-10 m² in der gesättigten Zone. Grundsätzlich hängt dieser vom jeweiligen Kf-Wert ab, d.h. vom Absenktrichter, der durch den Pumpbetrieb (am besten intermittierender Modus) entsteht.

Für gering bis schwer durchlässige Böden könnte das Verfahren auch on-site als Bodenwäsche eingesetzt werden. In diesem Fall sind kombinierte Behandlungsschritte denkbar, speziell der Zusatz von Schadstoff-abbauenden Enzymen scheint vielversprechend zu sein.

Das hier entwickelte Verfahren erlaubt eine rasche und einfache Schadstoffreduktion von durchlässigen Böden sowohl in der gesättigten als auch ungesättigten Zone. Es eignet sich auch als Vorbehandlungsschritt für mikrobielle Techniken wodurch eine signifikante Reduktion der Sanierungszeit ermöglicht wird.

VLIESFILTER:

Gerade in Kombination mit einem vorgeschalteten Mineralölabscheider bietet ein Schrägbettfilter mit ölabsorbierendem Vlies, welches als Endlosbahn geführt und regelmäßig ausgedrückt wird, Vorteile, indem der Restölgehalt im Ablauf um 0,1 bis 0,2 mg/l geringer ist als bei einem Ölabscheider im alleinigen Betrieb. Das Verfahren ist robust gegen Verunreinigung durch Sand und kann in Zukunft helfen, die Öl/Wasser-Trennung im Feld zu vereinfachen und effizient zu gestalten.

ENZYMATISCHER ABBAU von gealterten MKW-Schäden:

Im Zuge dieses Arbeitspaketes wurde die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus von Altlastenschadstoffen bei Laborbedingungen sowie im Feldeinsatz am Altlastenstandort N77 in Drösing, NÖ, untersucht. Der Fokus wurde auf schwer degradierbare und weitgehend persistente Kohlenwasserstoffe wie aromatische Substanzen mit erhöhter Ringanzahl in zum Teil alkylierter Form und komplexe aliphatische Strukturen inklusive Diamantan und Adamantan gelegt. Für den Abbau wurden einerseits eigene sowie kommerziell verfügbare Oxidoreduktasen eingesetzt, die in ausreichender Menge verfügbar waren (CotA, SiLA und MaL1 bzw. MtL und UPO). Andererseits wurde in Anreicherungskulturen mit kontaminiertem Feststoff, der dem Altstandort N77 entstammte, auch gezielt nach Enzymen gesucht, die ein erhöhtes Potenzial zum MKW-Abbau aufweisen könnten.

Für die Peroxygenase UPO sowie die Laccase MtL konnte ein erfolgreicher Abbau eines breiten Spektrums persistenter Leitsubstanzen nachgewiesen werden. In weiterer Folge wurden das Abbaupotential dieser ausgewählten Enzyme mit N77 Boden sowohl im dynamischen als auch im Durchflusssystem geprüft. Die eingesetzten Enzyme erhöhten

den Schadstoffabbau im dynamischen Testsystem um einen maximalen Faktor von 3,8 bei 20°C bzw. 4,3 bei 12°C. Im Durchflusssystem lag die maximale Erhöhung des Abbaugrades bei einem Faktor von 1,5.

Von den Enzymen, die im Metagenom des N77 Bodens identifiziert wurden, wurde die Laccase PL als sehr vielversprechend erachtet und am Institut in Testchargen produziert, charakterisiert sowie ihr Potential zum Abbau von Kohlenwasserstoffen geprüft. Dieses Enzym weist ein pH-Optimum im neutralen Bereich auf und zeigt bei Grundwassertemperatur die höchste Aktivität. Im dynamischen Versuchssystem war die Laccase PL in der Lage, den Schadstoffabbau bei 12°C innerhalb von 4 Tagen um den Faktor 2,2 zu beschleunigen, bei deutlich geringerer Menge an Enzym im Testansatz im Vergleich zu UPO und MtL.

Hervorzuheben ist auch, dass der Einsatz der selektierten Enzyme durchwegs zu einem verstärkten Abbau von höhersiedenden komplexen MKW führte im Vergleich zu einem singulären mikrobiellen Behandlungsschritt. Darüber hinaus waren die getesteten Enzyme (PL, UPO und MtL) in der Lage, die höchstpersistenten Kohlenwasserstoffe Diamantan und Adamantan abzubauen, womit das degradative Potenzial dieser Enzyme für den Altlasteneinsatz deutlich unterstrichen wird.

Eine Anreicherung von enzymatischen Metaboliten konnte weder im Modellsystem Boden/Grundwasser noch im Feldversuch festgestellt werden. Es wird davon ausgegangen, dass diese Reaktionsprodukte rasch einer weiterführenden mikrobiellen Metabolisierung unterzogen werden.

Die Aktivität der ausgewählten Enzyme ist auf weniger als eine Woche begrenzt. Das stellt einerseits einen erhöhten Aufwand in der Sanierungsanwendung dieser Enzyme dar, da eine mehrmalige Enzymdosierung in wöchentlichen Intervallen zur Entfernung großer Schadstofffrachten erforderlich ist. Andererseits ist die Feldanwendung damit aber gut kontrollierbar, da keine über diesen Zeitraum hinausgehende Bildung von enzymatischen Abbauprodukten zu erwarten ist und somit eine langfristige Aufrechterhaltung mikrobieller Wachstumsbedingungen nach in situ Enzymapplikation entfallen kann.

Die Anwendung des ausgewählten Enzyms MtL im kontaminierten Aquifer des Standortes Drösing zeigte, dass diese Laccase auch unter in situ Bedingungen den MKW-Abbau beschleunigen kann, wenngleich auch bei geringeren Raten (<150 mg/kg·d). Vor allem der kombinierte Einsatz von MtL mit einem Polymer-Vlies führte zu einer signifikanten

Schadstoffreduktion im Feststoff in der Höhe von 900 mg/kg innerhalb eines Zeitraumes von nur 6 Tagen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Einsatz von Oxidoreduktasen eine vielversprechende Möglichkeit zur Dekontamination von Altstandorten, die mit persistenten organischen Chemikalien verunreinigt sind, darstellt. Die Kombination mit existierenden Sanierungsverfahren wie dem mikrobiologischem in situ Abbau ist nicht nur möglich, sie stellt bei erhöhter Effizienz auch ein nachhaltiges Sanierungskonzept dar.

Der kaskadische Verfahrensansatz kann zumindest in zwei Wegen beschrrieben: (i) Mehrmalige Enzymdosierung zu Beginn der Sanierungsmaßnahmen zur partiellen Oxidation stabiler molekularer Schadstoffstrukturen, die sich z.B. einem mikrobiellen Angriff oder einer tensidgestützten Auswaschung widersetzen, gefolgt von einem konventionellen mikrobiologischen Verfahrensschritt zur terminalen Oxidation von enzymatischen Abbauprodukten. Eine weitere Verfahrenskaskade (ii) umfasst den einmalig vorgesehenen Enzymeinsatz nach erfolgter mikrobieller Sanierung. Während Variante (i) hohes Potential zur Verkürzung der Behandlungsdauer aufweist, ermöglicht Variante (ii) eine finale Erreichung des Sanierungszielwertes durch Reduktion der Residualkontamination nach erfolgter mikrobiologischer Sanierung, bei gleichzeitiger Verringerung der erforderlichen Enzymmenge. Eine Erhöhung der Enzymstabilität, eine Erweiterung der Abbaueffizienz sowie die Produktion schadstoffabbauender Enzyme im erweiterten Maßstab wird als förderlich zur Umsetzung dieser Technologie erachtet.

Publikationstätigkeit

Auswahl an Veröffentlichungen aus dem Projekt:

- Maximilian Lackner, Verena Braunschmid, Marion Sumetzberger-Hasinger, Karin Müllern, Karl Putz, Markus Plank, Norbert Rüttinger, Doris Ribitsch, Andreas P. Loibner, „KASKADE - Vegetable oil extraction of hydrocarbons from soil and subsequent separation via non-woven fabrics“, Recy & DepoTech2020 (Vortrag).
- Maximilian Lackner, Karl Putz, Markus Plank und Andreas P. Loibner, In-situ Bodenwäsche mit Pflanzenöl/Wasser-Emulsionen zur Kohlenwasserstoff-Entfrachtung, Recy & DepoTech2022 (Poster wurde 12/2021 angenommen).

- Maximilian Lackner, Karl Putz, Markus Plank und Andreas P. Loibner, Ölbindende Vliese zur Entfernung von Mineral- und Pflanzenöl aus Wasser, Recy & DepoTech2022 (Poster wurde 12/2021 angenommen).

Publikationen der Universität für Bodenkultur Wien

Zum enzymatischen Abbau von MKW in kontaminierten Böden wurde im Rahmen des Projekts eine Masterarbeit durchgeführt. Weiters wurde eine Bachelorarbeit zum Thema „Bioabbau von Umweltschadstoffen aus Erdöl in kontaminierten Böden“ verfasst. Ergebnisse zum Arbeitspaket wurden 2020 in Leoben auf der Konferenz „RecyDepoTech“ mit einem Poster, betitelt „KASKADE - Enzymatischer Abbau persistenter Mineralölkohlenwasserstoffe“, vorgestellt. Das vielversprechendste Enzym des in silico screenings, die Laccase PL wurde 2021 auf der Konferenz „Designer Biology“, veranstaltet von der European Federation of Biotechnology, als Poster präsentiert. Zusätzlich wurde eine Masterarbeit mit dem Titel „Investigation of novel laccases for hydrocarbon degradation“ verfasst, die sich mit den Eigenschaften und der Wirkung der am IFA exprimierten PL beschäftigt.

Auf dem Workshop in Drösing am 31.5.2021 wurden Resultate zum enzymatischen Cracken von gealterten Kohlenwasserstoffen in Form eines Vortrages von Priv.Doz. Dr. Doris Ribitsch einem interessierten Fachpublikum präsentiert. Am abschließenden Workshop in Salzburg wurden die Ergebnisse des Arbeitspaketes zur enzymatischen Behandlung von gealterten MKW Kontaminationen am Beispiel der Altlast N77 zusammenfassend von Prof. Dr. Andreas P. Loibner vorgestellt.

Überführung in die Lehre

An der BOKU wurden im Rahmen des Projekts Bachelor- und Masterarbeiten durchgeführt, wie oben bereits angemerkt. Weiters wurden Projekterkenntnisse direkt Dissertanten-, Master- und Bachelorseminare sowie in nachfolgend dargestellte Vorlesungen eingebracht:

- Environmental bioprocess engineering (790306)
- Microbial adaptation to extreme environmental conditions (970015)
- Environmental and biotechnological analysis (771303)
- Umwelttoxikologie (911305)

Die Kernaufgabe der FH Technikum Wien ist die Ausbildung junger Erwachsener. Zum Ende des Projekts konnten insgesamt 22 Bachelor- und Masterarbeiten im Zusammenhang mit dem Projekt „Aufreinigungskaskade“ durchgeführt werden. Verglichen mit anderen Projekten ist dies eine sehr hohe Anzahl. Sie zeigt das große Interesse unserer Studierenden am Thema Altlastenmanagement/sanierung und Nachhaltigkeit allgemein. Von den Studierenden waren 2 Damen und 20 Herren; Die Arbeiten sind 4 Studiengängen zugeordnet: 8 Bachelorarbeiten (7 x internationales Wirtschaftsingenieurwesen, 1x Mechatronik/Robotik) und 14 Masterarbeiten (11 x internationales Wirtschaftsingenieurwesen, 3 x Maschinenbau).

Weiter erfolgte die Einbindung der Projektergebnisse in die Lehre. Umgesetzt wurden an der FH Technikum Wien: Vliese als Werkstoffe sind in den Werkstoffkunde-Unterricht im Master Maschinenbau (LV „Effektive Werkstoffwahl“), Master Internationales Wirtschaftsingenieurwesen (LV „Advanced Materials“) sowie im Bachelor Internationales Wirtschaftsingenieurwesen (LV „Werkstofftechnik 2“). Die ersten beiden Lehrveranstaltungen werden bestehen bleiben. Die LV „Werkstofftechnik 2“ wird in Zukunft nicht mehr angeboten, da die Curricula der FH Technikum Wien Bachelorstudiengänge hochschulweit standardisiert wurden.

Kaskade 2.0: Ausblick

Wie kann es nach diesem Forschungsprojekt weitergehen? Der Ausblick liefert dazu ein paar mögliche Ideen des Projektteams.

Das Forschungsprojekt „Aufreinigungskaskade“ hat anhand einer konkreten Altlast für neue und kombinierte in-situ Verfahren ein gutes Potential aufgezeigt. Es konnten auch 511 m³ Grundwasser nach dem neuen Verfahren aufgereinigt werden.

Das Verfahren wurde auf TRL 5 gehoben, die Machbarkeit wurde gezeigt. Es wurde ein Aufreinigungscontainer konzipiert, der für den Einsatz am Feld optimiert wurde, siehe Abb. 102. So könnte die Umsetzung unserer Forschung in die Praxis aussehen.

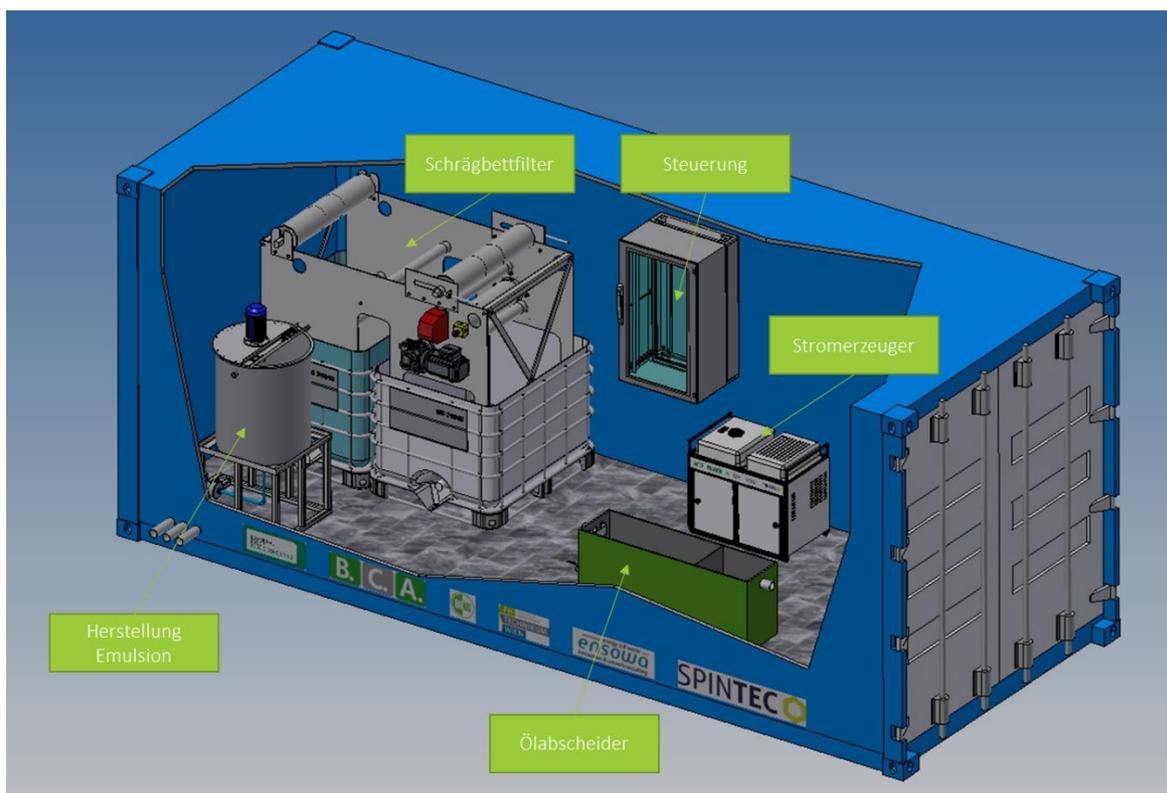


Abbildung 102: Kaskade Container: Zukunftsvision aus dem Projekt heraus.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Projektstruktur mit 4 Arbeitspaketen über 2 Jahre. Projektleitung durch die Firma BCA.	11
Tabelle 2: Zusammenfassung der Meilensteine.	17
Tabelle 3: Zusammenstellung der Deliverables.	18
Tabelle 4: Verfügbare Emulgatoren der Tween™-Reihe. Es handelt sich dabei um Polysorbate. Sie wurden für die Stabilisierung der Emulsionen aus Rapsöl in Wasser getestet.....	26
Tabelle 5: Die besten bzw. besonders stabilen Emulsionen, Teil 1.	27
Tabelle 6: Stabile Emulsionen, Teil 2.....	29
Tabelle 7: Emulsionen für den Feldversuch in Drösing.	30
Tabelle 8: Auswaschen von Kies aus Drösing mit unterschiedlichen Medien. Der Kies stammt aus der Schicht 7-8m in Drösing.	35
Tabelle 9: Auswaschen von Lehm aus Drösing mit unterschiedlichen Medien. Der Lehm stammt aus der Schicht 4-6m in Drösing.	36
Tabelle 10: Wie viel Pflanzenöl verbleibt im Boden?.....	37
Tabelle 11: Versickerungs- und Pumpversuche in der ungesättigten Zone	38
Tabelle 12: Infiltrierungs- und Pumpversuche in der gesättigten Zone.....	39
Tabelle 13: Insgesamt haben wir 511 m ³ Grundwasser in Drösing abgepumpt und aufgereinigt.	43
Tabelle 14: Substanzen, die mittels GC-MS in Ölphase detektiert wurden (exklusive n-Alkane).....	50
Tabelle 15: Auswahl bekannter Oxidoreduktasen	53
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Redox-Mediatoren	58
Tabelle 17: Identifizierte Enzymsequenzen mit Homologie zu MtL	65
Tabelle 18: Leitsubstanzen selektiert für enzymatische Abbauuntersuchungen im physiologischen Testsystem.....	75
Tabelle 19: Liste der getesteten am Institut produzierten bzw. zugekauften Enzyme*	76
Tabelle 20: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym UPO. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.....	78
Tabelle 21: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MtL. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.....	79

Tabelle 22: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MaL1. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.....	80
Tabelle 23: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym CotA. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.....	81
Tabelle 24: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym SiLA. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.....	82
Tabelle 25: Übersicht der statistischen Auswertung zum Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym TvL. Die Sterne indizieren die statistische Signifikanz der Veränderung: *signifikant, ** hoch signifikant, *** höchst signifikant.....	84
Tabelle 26: Chemische Analyse von Grundwasserproben (N77) im Laufe des Feldversuches	122
Tabelle 27: Teile Schrägbettfilter	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Historische Aufnahme der Petroleumfabrik Drösing, etwa 1935.	8
Abbildung 2: Konzept der Aufreinigungskaskade, Arbeitspakete.....	12
Abbildung 3: Schema der in-situ Aufreinigungskaskade. In Stufe 1 erfolgt die Extraktion von Kohlenwasserstoffen mit Pflanzenöl/Wasser-Mikroemulsionen, die in weiterer Folge über Vliese getrennt werden, so dass wiederum sauberes Wasser zur Verfügung steht. In Stufe 2 werden Enzyme in Form von Suspensionen in den Untergrund eingebracht, um nicht extrahierte Schadstoffe einem Abbau zuzuführen. Darüber hinaus erfolgt eine Immobilisierung von Enzymen an Vliesen, um deren Reinigungskapazität und damit Betriebszeit zu erhöhen.	15
Abbildung 4: Ansätze für Emulsionen im Labor. Die Zahlen geben die Mengen an Rapsöl, Tensid und Cotensid an.	24
Abbildung 5: Versickerungsversuche mit Emulsionen im Labor. Die Striche in rot zeigen jeweils 5cm Abstand. Die 6 Säulen von links sind aktuell mit Emulsion befüllt.	25
Abbildung 6: Entgasungspumpe und Vakuumkammer zur Entgasung der Emulsion. Dies konnte die Stabilität deutlich steigern.	26
Abbildung 7: Beispiele der Stabilität von Wasser, Öl und Tensid-Mischungen. 3 Mischungen sind über 36h stabil.	27
Abbildung 8: Die Feldversuche. Die rote Farbe ist zur besseren Sichtbarkeit. Links: 300l Mischer. Rechts: Detail des Mischvorgangs.....	31
Abbildung 9: Die Laborapparatur für Versickerungsversuche. Typischerweise wurden 250mm Bodensäule verwendet.	31
Abbildung 10: Versickerungsversuche in Feinputzsand. * = Bodenprobe mit Wasser gesättigt. 5/1 Emu = Emulsion: 5% Rapsöl, 1% Sojalecithin.	32
Abbildung 11: Weitere Versickerungsversuche im Labor, mit Estrichsand. Siehe Text für Details.....	33
Abbildung 12: Versickerungsversuche in Original-Bodenmaterial aus Drösing (gesättigte Zone).....	34
Abbildung 13: Aus dem Boden in Drösing gewonnenes Material, bereits teilweise entmischt. Die Menge der öligen Schicht (schwarz), welche aus einer Mischung aus Pflanzenöl und Mineralöl besteht, beträgt hier etwa 56 Liter, vgl. Tabelle 11. Dieses Material wurde aus der ungesättigten Zone abgezogen. Damit lässt sich folgende Zusammenfassung für die ungesättigte Zone geben:.....	38
Abbildung 14: Versuche zur Ölabtrennung mit Vliesen. Restölgehalt im Wasser 0,5 bis 1,5mg/l , Wassergehalt im Öl max. 2%.	40

Abbildung 15: Aufbau des Schrägbettfilters (SBF) auf Ergebnissen des Scale-up. BCA, FH Technikum Wien und Spintec haben hier eng zusammengearbeitet.....	41
Abbildung 16: Bei den Feldversuchen. Zu erkennen sind 2 IBC mit Pflanzenöl/Mineralöl, die mittels Schrägbettfilter abgetrennt werden konnten aus den geförderten 500m ³ Grundwasser.	44
Abbildung 17: GC-FID Chromatogramme der Ölphase und der Bodenproben aus den Schichten 2-4 m, 4-6 m und 7-8 m. Gelbe Pfeile kennzeichnen n-Alkan Peaks, rote Markierungen umfassen die Peakdupletten n-C17/Pristan und n-C18/Phytan.	48
Abbildung 18: GC-MS Spektrum der Ölphase.	48
Abbildung 19: GC-MS Spektrum eines Bodenextraktes im selected ion mode, mit ausgewählten Schadstoffen.	49
Abbildung 20: Anreicherungskulturen zweier Bodenproben bei pH 5 und 7.....	54
Abbildung 21: Krona-Plot der aeroben Kultur nach 297 Tagen Inkubation bei 20°C.	55
Abbildung 22: Krona-Plot der aeroben Kultur nach 254 Tagen Inkubation bei 10°C.	56
Abbildung 23: Verlauf der optischen Dichte (OD600nm) der Anreicherungskulturen mit Adamantan mit und ohne AQDS. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	58
Abbildung 24: Verlauf der optischen Dichte (OD600nm) der Anreicherungskulturen mit Diamantan mit und ohne AQDS. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	59
Abbildung 25: Vergleich der Anreicherungskulturen mit Phenanthren, Tag 0 (oben) und Tag 157 (unten).	59
Abbildung 26: Verlauf der optischen Dichte (OD600nm) der Anreicherungskulturen mit Phenanthren. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.	60
Abbildung 27: Verlauf der optischen Dichte (OD600nm) der Anreicherungskulturen in Gegenwart des Stressors Cyclohexan.	61
Abbildung 28: Krona-Plot des mikrobiellen Konsortiums der Anreicherungskultur mit AQDS zu Beginn (oben) und nach 97 Tagen (unten) in Gegenwart des Stressors Cyclohexan.....	62
Abbildung 29: Zusammensetzung des mikrobiellen Konsortiums nach 178 Tagen Inkubation von N77 Boden.....	63
Abbildung 30: Aktivitätstest des Enzyms PL für eine Auswahl an Standardsubstraten.....	66
Abbildung 31: PL pH-Optimum: Spezifische Aktivität für die Substrate ABTS (grün) und DMP (orange) in Abhängigkeit vom pH-Wert.	67
Abbildung 32: Aktivität des Enzyms PL bestimmt mit ABTS nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen.....	67
Abbildung 33: Stabilität des Enzyms PL bei Raumtemperatur, bestimmt mit ABTS. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	68

Abbildung 34: Lagerstabilität des Enzyms PL bei 4°C und -20°C mit/ohne Stabilisator Rinderserum Albumin (BSA) getestet auf ABTS	68
Abbildung 35: Michaelis- Menten Kinetik von PL auf ABTS, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	69
Abbildung 36: Reaktionsmechanismus des Laccase-katalysierten PAK-Abbaus am Beispiel Benz(a)anthracen	70
Abbildung 38: Proteinausbeuten der untersuchten Bodenproben mittels Ultraschallextraktion	72
Abbildung 39: Datenbankabgleich via UniProt Website	73
Abbildung 40: Chromatographische Analyse (Orbitrap-nanoLC) der mit SDS aus Boden extrahierten Proteine; hohe Signalstärke bei reduzierter Auflösung, geringe Anzahl an distinkten Peaks.....	74
Abbildung 41: Chromatographische Analyse (Orbitrap-nanoLC) der mit Puffer aus Boden extrahierten Proteine; es zeigen sich sehr scharfe, gut getrennte Peaks.....	74
Abbildung 42: Chromatographische Analyse (Orbitrap-nanoLC) der mit Puffer aus N77 Boden nach Anreicherung kompetenter Mikroorganismen extrahierten Proteine.....	74
Abbildung 43: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym UPO, Messung mit ITEX. Aktiv/Inaktiv - aktiver Ansatz berechnet relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	77
Abbildung 44: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym MtL, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	78
Abbildung 45: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym MaL1, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	79

Abbildung 46: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym CotA, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	81
Abbildung 47: Abbau von Modellschadstoffen (Leitsubstanzen) mit dem Enzym SiLA, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	82
Abbildung 48: Abbau von Modellschadstoffen (Standardsubstrate) mit dem Enzym TvL, Messung mit ITEX. Aktiver Ansatz relativ zur Kontrolle mit inaktiviertem Enzym bzw. aktiver Ansatz mit ABTS relativ zu inaktiviertem Enzym. . ADA-Adamantan, DMN-Dimethylnaphthalin, C15-n-Pentadecan, DIA-Diamantan, CYCC15-Cyclopentadecan, PRI-Pristan oder Tetramethylpentadecan, DBT-Dibenzothiophen, PHE-Phenanthren, PHY-Phytan oder Tetramethylhexadecan, MAN-Methylantracen, C25-n-Pentacosan. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	83
Abbildung 49: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym UPO bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	86
Abbildung 50: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MtL bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	88
Abbildung 51: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym MtL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	89
Abbildung 52: Abbau von Leitsubstanzen mit dem Enzym PL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	91
Abbildung 53: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym UPO bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	92

Abbildung 54: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym MtL bei 20°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	93
Abbildung 55: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym MtL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	94
Abbildung 56: Abbau von Adamantan und Diamantan mit dem Enzym PL bei 12°C im dynamischen Boden/Grundwassermodellsystem, Messung mit GC-MS und Flüssiginjektion. Abiotisch – Negativkontrolle. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	94
Abbildung 57: Setup Durchflussreaktoren	96
Abbildung 58: Abnahme von PAK, methylierten PAK und Alkanen im Boden/Grundwasser Durchflusssystem bei Raumtemperatur, Messung mittels GC-MS und Flüssiginjektion. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=9.....	98
Abbildung 59: Enzymatischer Abbau von MKW im dynamischen Boden/Wasser System	100
Abbildung 60: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaubversuches: mikrobielle und enzymatische Behandlungsverfahren bei 20°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	101
Abbildung 61: Gaschromatographische Analyse nach Ende des Abbaubversuches (Tag 8), blau: mikrobiell, rot: UPO und grün: MtL.....	102
Abbildung 62: Restmenge an Kohlenwasserstoffen nach enzymatischem (MtL und UPO) bzw. mikrobiellem Abbau dargestellt für die Sektoren >C10 bis C17 und >C17 bis C40 nach 8 Tagen Inkubation bei 20°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.	102
Abbildung 63: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaubversuches: mikrobieller und enzymatischer Abbau bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	103
Abbildung 64: Struktur von ABTS	104
Abbildung 65: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaubversuches: mikrobieller und enzymatischer Ansatz mit MtL mit und ohne Mediatorzugabe bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	104
Abbildung 66: MKW-Konzentration im Laufe des Abbaubversuches: mikrobieller und enzymatischer (PL) Abbau bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	105

Abbildung 67: Gaschromatographische Analyse nach Ende des Abbauesversuches (Tag 8), Vergleich mikrobieller Abbau (rot) und enzymatischer Abbau mit PL (blau).	106
Abbildung 68: Restmenge an Kohlenwasserstoffen nach enzymatischem (MtL und PL) bzw. mikrobiellem Abbau dargestellt für die Sektoren >C10 bis C17 und >C17 bis C40 nach 8 Tagen bei 12°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	107
Abbildung 69: Mikrobiologischer Schadstoffabbau (grün) gefolgt von enzymatischer Behandlung (rot) im dynamischen Modellsystem bei 20°C. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	108
Abbildung 70: Enzym-induzierte Abnahme der Schadstoffkonzentration nach Stagnation des mikrobiologischen Abbaus, Ausschnitt aus Abbildung 69 mit extrapoliertem mikrobiellem Abbau. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	108
Abbildung 71: Chromatogramme von Boden der Altlast N77 originär (A) und nach 258 Tagen mikrobieller Prädegradation (B)	109
Abbildung 72: Verlauf der Schadstoffkonzentration nach Enzymzusatz (PL, MtL) zu prädegradierten N77 Boden. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.	110
Abbildung 73: MKW-Konzentration nach 5 Tagen enzymatischer Abbau (MtL) im Boden/Grundwasser Durchflusssystem. Unterschied zum mikrobiellen Ansatz: * schwach signifikant, ** signifikant. Verhältnis Boden zu eingesetzter Enzymmenge 4:1 bzw. 2:1. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=9.....	111
Abbildung 74: MKW-Profile vor (blau) und nach Abbau (rot – mikrobiell, grün – Enzym MtL 2:1).....	112
Abbildung 75: Zeitlicher Verlauf der Enzymaktivität während der Beladung des Vlieses. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	113
Abbildung 76: Enzymaktivitäten in der Spüllösung, jeweils bestimmt für unterschiedliche Enzymkonzentrationen nach aufeinanderfolgenden Waschschritten. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	114
Abbildung 77: Enzymaktivität der nach Beladung getesteten Vliese. Ordinate: Enzymaktivität, Abszisse: Inkubationszeit mit Puffer, rot: Vlies beladen mit Enzym, blau: Kontrollansatz (unbeladenes Vlies). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.	115
Abbildung 62: Vliese in Grundwasser mit und ohne Enzymzusatz (MtL)	116
Abbildung 79: Vliese nach 3 Tagen Inkubation	116
Abbildung 80: Lage der Brunnen in der KASKADE Versuchszone des Altstandortes N77. Die Belüftung erfolgte über F-SB1 und F-DB. Bodenproben wurden in F-DB eingehängt, über diesen Brunnen wurde auch das Enzym eingebracht. Zur Beweissicherung diente F-GWB3.	118

Abbildung 81: Bodenprobe in Metallkorb mit Stahlmesh, bereit für den Feldeinsatz.....	118
Abbildung 82: Bodenprobe in Metallkörben mit Mesh- bzw. Vlieseinsatz, bereit für die Absenkung in F-DB.	119
Abbildung 83: Wasserproben aus F-GWB5, Duobrunnen und Sanierungsbrunnen vor Versuchsbeginn (von links nach rechts, aufschwimmende Ölphase deutlich erkennbar).	120
Abbildung 84: MKW-Gehalt der Bodenproben vor und nach 6-tägigem enzymatischen in situ Abbau. Die statistische Signifikanz der Differenz zum Startwert ist durch zwei Asteriske indiziert (P=0,007). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	123
Abbildung 85: Abbauraten der Feldversuchsansätze im Vergleich. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, n=3.....	124
Abbildung 86: Chromatogramm der Bodenproben aus den eingesetzten Körben, rot: mikrobieller Ansatz, blau: enzymatischer Ansatz mit Vlies.	125
Abbildung 87: Aufbereitungskonzept	127
Abbildung 88: Rührbehälter	128
Abbildung 89: Rührertypen. Der Propeller-Rührer wurde ausgewählt.	129
Abbildung 90: Monitoring- Sicherungskonzept	130
Abbildung 91: Einreichplan	131
Abbildung 92: Schema Feldversuch	132
Abbildung 93: Konzept Schrägbettfilter	133
Abbildung 94: Details Schrägbettfilter	133
Abbildung 95: Schrägbettfilter im 3D-Modell.	134
Abbildung 96: Details Schrägbettfilter	136
Abbildung 97: Details Schrägbettfilter	136
Abbildung 98: Gesamtsystem.....	137
Abbildung 99: Mischer im Feld. Zu sehen ist das Stromaggregat.....	138
Abbildung 100: Der Ölskimmer	139
Abbildung 101: Die Belüftung	140
Abbildung 102: Kaskade Container	147

Literaturverzeichnis

BacDive DSMZ. (2014). Retrieved from DSMZ:

<https://bacdive.dsmz.de/search?search=Eoetvoesia&submit=>

De-Chao, Z., Hong-Can, L., Yu-Hua, X., Yu-Guang, Z., Franz, S., & Rosa, M. (2010). *Sphingopyxis bauzanensis* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Pengfei, X., Hao, D., Xin, P., Yu, T., Yaoyu, Z., Xiangyan, C., . . . Lu, Y. (2020). Degradation of several polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase in reverse micelle system. *Science of The Total Environment* (708).

Abkürzungen

Abk.	Abkürzung
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz
ADA	Adamantan
AP	Arbeitspaket
AQDS	anthraquinone-2,6-disulfonate, ein Mediator
BCA	Firma (Vlieskonfektionierung)
BOKU	Universität (Bodenkultur)
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol
DIA	Diamantan
DOC	dissolved oxygen (gelöster Sauerstoff)
DSMZ	Leibniz Institute DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
F-DB	Brunnen (Duobrunnen)
F-GWB3	Brunnen (Grundwasserbrunnen)
FH	Fachhochschule
F-SB1	Brunnen (Sicherungsbrunnen)

FTIR	Fourier Transform Infrarot (Spektroskopie)
GC MS	Gaschromomatographie - Massenspektrometrie
GC-FID	Gaschromomatograph - Flammenionisationsdetektor
GWM2	Brunnen (Grundwassermonitoring)
IFA-Tulln	Forschungszentrum der BOKU in Tulln
ISPAK	Forschungsprojekt "Entwicklung eines Pflanzenöl-basierenden Verfahrens zur in-situ-Sanierung von PAK-kontaminierten Böden"
Kf	Bodendurchlässigkeitsbeiwert [m/s]
KMU	Klein- und Mittelbetrieb
KW	Kohlenwasserstoffe
LC	Liquid Chromatography
Lf	Leitfähigkeit
LV	Lehrveranstaltung
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe
MÖA	Mineralölabscheider
MÖL	Mineralöl

MPAK	siehe PAK
MtL	Ein Enzym: Laccase aus <i>Myceliophthora thermophila</i>
MWK	Mineralölkohlenwasserstoffe
N77	Altlast Nr. 77 in Niederösterreich, Petroleumfabrik Drösing
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OD _{600nm}	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
pH	pH (sauer/basisch)
PHE	Phenanthren
PÖL	Pflanzenöl
Q	Quartal
SBF	Schrägbettfilter
SDS	Sodiumdodecylsulfate, ein Tensid
SEM	Scanning Electron Microscopy
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung

UPO Ein Enzym: Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita*

US EPA Environmental Protection Agency der USA

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

Radetzkystraße 2, 1030 Wien

+43 1 711 62 65-0

[bmk.gv.at](https://www.bmk.gv.at)